

**Charakterisierung ionotroper purinergeer Rezeptoren
im Nucleus medianus praeopticus des
anterioren Hypothalamus der Ratte**

NORMA HITZEL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

**Charakterisierung ionotroper purinerge Rezeptoren
im *Nucleus medianus praeopticus* des
anterioren Hypothalamus der Ratte**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Norma Hitzel

Tierärztin aus Langen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
Prof. Dr. Dr. habil. Hans-Christian Siebert

Tag der Disputation: 10.06.2009

Meinem Opa

1	Einleitung	1
1.1	Der Hypothalamus als homöostatische Regelzentrum	1
1.2	Der MnPO – integratives Kerngebiet der Lamina terminalis	2
1.3	ATP – ein Neurotransmitter	5
1.4	Purinerge Rezeptoren	6
1.4.1	Historie	6
1.4.2	P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren)	7
1.4.3	Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P1-Rezeptoren	8
1.4.4	Ionotrope P2X-Rezeptoren	9
1.4.5	Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2X-Rezeptoren	14
1.4.6	Metabotrope P2Y-Rezeptoren	14
1.4.7	Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2Y-Rezeptoren	15
1.5	Freisetzungsmechanismen und extrazellulärer Abbau von ATP	16
1.6	Regulation der Körpertemperatur	19
1.6.1	Regelkreis zur Konstanthaltung der Körperkerntemperatur	19
1.6.2	Fieber – ein Sonderfall der Thermoregulation	23
1.6.3	Physiologische Bedeutung purinerner Signalübertragung in der Thermoregulation	26
1.7	Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts	33
1.7.1	Regelkreis zur Konstanthaltung des Salz- und Wasserhaushalts	33
1.7.2	Physiologische Bedeutung purinerner Signalübertragung in der Osmoregulation	37
1.8	Regulation der Nahrungsaufnahme	39
1.8.1	Hypothalamische Neurotransmittersysteme und Leptin/Ghrelin im Rahmen der Homöostase des Energiehaushalts	39
1.8.2	Physiologische Bedeutung purinerner Signalübertragung in der Regulation der Energiehomöostase	46
1.9	Regulation des Schlaf-Wach Rhythmus	48
1.9.1	Bedeutung (extra)hypothalamischer Kerngebiete für die Homöostase des zirkadianen Schlaf-Wach Rhythmus	48
1.9.2	Physiologische Bedeutung purinerner Signalübertragung in der Regulation des Schlafes	54
1.10	Purinerge Rezeptoren und Gliazellen	57
1.10.1	Astrocyten	57
1.10.2	Oligodendrocyten	59
1.10.3	Mikroglia	61
1.11	Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit	65
2	Material und Methoden	68
2.1	Material	68
2.1.1	Geräte	68

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	Gebrauchsmaterial	69
2.1.3	Verbrauchsmaterial	69
2.1.4	Chemikalien	70
2.2	Versuchstiere	73
2.3	Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer	73
2.3.1	Lösungen für die Immunhistochemie	73
2.3.1.1	Phosphatpuffer (PB)	73
2.3.1.2	Präinkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen	73
2.3.1.3	Inkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen	74
2.3.1.4	Paraformaldehydlösung (PFA)	74
2.3.1.5	Physiologische Kochsalzlösung	74
2.3.1.6	Saccharoselösung (20%)	74
2.3.1.7	Inkubationspuffer für immunocytochemische Untersuchungen	75
2.3.1.8	Waschpuffer für immunocytochemische Untersuchungen	75
2.3.2	Lösungen für die Primärzellkultur des MnPO	75
2.3.2.1	Neurobasal-A-Medium	75
2.3.2.2	Gey`s Balanced Salt Solution (GBSS)	75
2.3.2.3	Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	75
2.3.2.4	Ansetzen der Dispase-1 Lösung	76
2.3.2.5	Inaktivierungslösung der Dispase-1	76
2.3.3	Lösungen für die Ratio-Imaging-Messungen	76
2.3.3.1	Calciummesspuffer	76
2.3.3.2	Calcium-Minimalpuffer	76
2.3.4	Lösungen für den IL-6 und TNF Bioassay sowie das Passagieren der B9- und WEHI-Zelllinie	77
2.3.4.1	IL-6 Bioassay- und B9-Zellkulturmedium	77
2.3.4.2	TNF-Bioassay- und WEHI-Zellkulturmedium	77
2.3.4.3	MTT-Lösung	77
2.3.4.4	Isopropanol-HCl-Lösung	77
2.4	Methoden	78
2.4.1	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR)	78
2.4.1.1	Grundlagen	78
2.4.1.2	Gewinnung der Gewebeproben für die QRT-PCR	81
2.4.1.2.1	Präparation des MnPO adulter Tiere	82
2.4.1.2.2	Präparation des MnPO neonataler Tiere	82
2.4.1.2.3	Präparation der Spinalganglien	83
2.4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA	83
2.4.1.4	Quantitative und qualitative Bestimmung der RNA	84
2.4.1.5	cDNA-Synthese	85
2.4.1.6	Durchführung und Auswertung der QRT-PCR	86
2.4.2	Primäre Zellkultur des MnPO der Ratte	87

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.1	Grundlagen	87
2.4.2.2	Vorbereitung der Zellkulturkammern	88
2.4.2.3	Kultivierung von Primärzellen aus dem MnPO	88
2.4.3	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ratio-Imaging Technik	89
2.4.3.1	Grundlagen der Ratio-Imaging Technik	89
2.4.3.1.1	Der Einsatz von Fura-2-Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur	92
2.4.3.1.2	Der Imaging-Messstand	92
2.4.3.1.3	Vorbereitung der Versuchsdurchführung	94
2.4.3.2	Messprotokolle für die Ratio-Imaging Technik	94
2.4.3.2.1	Stimulation mit ATP und 2Me-SATP sowie α, β me-ATP und 2Me-SATP	95
2.4.3.2.2	Stimulation mit Bz-ATP und 2Me-SATP	96
2.4.3.2.3	Stimulation mit dem P1-Rezeptoragonisten und 2Me-SATP	96
2.4.3.2.4	Dosisabhängige Superfusionsstudie mit 2Me-SATP	96
2.4.3.2.5	Desensibilisierungsstudie mit 2Me-SATP	97
2.4.3.2.6	Herkunft des Calciums nach Stimulation mit 2Me-SATP	97
2.4.3.2.7	Antagonisierung der 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch PPADS	98
2.4.3.2.8	Antagonisierung der 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch TNP-ATP	98
2.4.3.2.9	Antagonisierung der 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch Rb2	99
2.4.3.2.10	Einfluss von Zink auf die 2Me-SATP-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$	99
2.4.3.3	Auswertung der Ratio-Imaging Untersuchungen	99
2.4.4	Immunhisto- und Immuncytochemie	101
2.4.4.1	Grundlagen	101
2.4.4.2	Verwendete P2X-spezifische Antikörper/-seren	101
2.4.4.3	Immuncytochemie: Mehrfachmarkierung in der MnPO-Primärkultur	103
2.4.4.4	Transkardiale Perfusion	105
2.4.4.5	Präparation des Gehirns und Anfertigung der Gefrierschnitte	106
2.4.4.6	Gelatinebeschichtung der Objektträger	107
2.4.4.7	Immunhistochemie: Einfachmarkierung der Gehirnschnitte	107
2.4.4.8	Negativkontrollen	108
2.4.4.9	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	109
2.4.5	Cytokin-Bioassay	109
2.4.5.1	Bioassay <i>versus</i> ELISA	109
2.4.5.2	Versuchsansätze	110
2.4.5.3	Der Interleukin-6 (IL-6) Bioassay	111
2.4.5.3.1	Passagieren der B9-Zelllinie	111
2.4.5.3.2	Durchführung und Auswertung des IL-6 Bioassays	111

2.4.5.4	Der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) Bioassay	114
2.4.5.4.1	Passagieren der WEHI-Zelllinie	114
2.4.5.4.2	Durchföhrung und Auswertung des TNF- α Bioassays	114
2.4.5.5	Auswertung der Bioassays zur Zytokinbestimmung	116
3	Ergebnisse	117
3.1	QRT-PCR	117
3.1.1	Expression purinerner Rezeptoren im MnPO adulter Ratten	117
3.1.2	Expression purinerner Rezeptoren im MnPO neonataler Ratten	118
3.1.3	Expression purinerner Rezeptoren in Spinalganglien adulter Ratten	118
3.1.4	Abschließende Betrachtung der <i>real-time</i> PCR Ergebnisse	119
3.2	Ergebnisse der Calcium Ratio-Imaging Versuche	120
3.2.1	Stimulation der MnPO-Primärkultur mit ATP und seinen Analoga 2Me-SATP bzw. α,β me-ATP	121
3.2.2	Stimulation der MnPO-Primärkultur mit dem P2X ₇ -spezifischen Agonist Bz-ATP und 2Me-SATP	125
3.2.3	Stimulation der MnPO-Primärkultur mit P1-Agonisten (NECA und CCPA) und 2Me-SATP	127
3.2.4	Dosisabhängigkeit der Aktivierung purinerner P2X-Rezeptoren in der MnPO-Primärkultur	129
3.2.5	Repetitive, äquimolare Stimulation der MnPO Primärkultur mit 2Me-SATP	133
3.2.6	Herkunft des Calcium nach Stimulation mit 2Me-SATP	141
3.2.7	Reaktionsmuster der durch Applikation von 2Me-SATP induzierten Calciumsignale in den Zelltypen der Primärkultur des MnPO	143
3.2.8	Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch PPADS	145
3.2.9	Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch den P2X ₁ - und P2X ₃ - bzw. P2X _{2/3} -spezifischen Antagonisten TNP-ATP	152
3.2.10	Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch den P2X ₂ - und P2Y-spezifischen Antagonisten Rb2	167
3.2.11	Einfluss von Zink als Potentiator oder Inhibitor auf die durch 2Me-SATP vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$	170
3.3	Immunhisto- und cytochemischer Nachweis ionotroper purinerner Rezeptoren	172
3.3.1	Expression des P2X ₁ -Rezeptors	173
3.3.2	Expression des P2X ₂ -Purinozeptors	176
3.3.3	Expression des P2X ₄ -Purinozeptors	178
3.3.4	Abschließende Betrachtung	179
3.4	Auswirkung von Agonisten und Antagonisten an purinergen Rezeptoren auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	180
3.4.1	ATP und 2Me-SATP induzieren die Freisetzung von TNF- α	180

3.4.2	ATP induziert zeitabhängig eine Freisetzung von TNF- α	181
3.4.3	PPADS und TNP-ATP hemmen die durch LPS induzierte Freisetzung von TNF- α	182
3.4.4	ATP und 2Me-SATP induzieren die Freisetzung von IL-6	184
3.4.5	ATP induziert zeitabhängig eine Freisetzung von IL-6	186
3.4.6	PPADS und TNP-ATP hemmen die durch LPS induzierte Freisetzung von IL-6	188
4	Diskussion	190
4.1	Charakterisierung purinerger Rezeptoren im MnPO	190
4.1.1	Neurone	192
4.1.2	Astrocyten	199
4.1.3	Oligodendrocyten	203
4.2	Purinerge Rezeptoren immunkompetenter Zellen des MnPO im Zusammenhang mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	206
4.3	Ausblick	211
5	Zusammenfassung	213
6	Abkürzungsverzeichnis	219
7	Literaturverzeichnis	222
8	Anhang	264
8.1	Danksagung	264
8.2	Erklärung	265

1. Einleitung

1.1. Der Hypothalamus als homöostatisches Regelzentrum

Der Hypothalamus repräsentiert das wichtigste zentralnervöse Integrationszentrum für die Homöostase zahlreicher autonomer Regelkreise im Organismus der Säugetiere. Er ist Zentrum für die Steuerung lebenswichtiger Funktionen des Individuums und über die Regelung der Fortpflanzung essentiell für die Erhaltung der verschiedenen Spezies. Zu den vom Hypothalamus gesteuerten Funktionen gehören die Temperaturregulation (Simon et al. 1986; Gerstberger 1999), die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes (Gerstberger et al. 2001; McKinley et al. 2004), die Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs (Naslund and Hellstrom 2007; Valassi et al. 2008), das Justieren der biologischen Rhythmen (Saper et al. 2005; Levi and Schibler 2007) und die Steuerung der Hormonsekretion des Hypophysenvorderlappens (Sam and Frohman 2008). Der Hypothalamus ist durch wichtige Nervenbahnen mit vielen anderen Gebieten des Gehirns verbunden, beispielsweise mit dem limbischen System, das für die Verarbeitung und Erzeugung von Emotionen wichtig ist. Neuronale und humorale Afferenzen aus der Peripherie übermitteln dem Hypothalamus Informationen bezüglich der jeweils zu regelnden Größe aus inneren Organen, dem Blutgefäßsystem bzw. kutanen Arealen. In hypothalamischen Kerngebieten werden diese Signale neuronal verarbeitet und nach entsprechender Integration über nervale Verbindungen (Efferenzen) über den Hirnstamm und andere Zentren des vegetativen Nervensystems an periphere Organsysteme als Stellglieder zur regulatorischen Wiederherstellung des Istwertes vermittelt. Eine schematische Darstellung des Homöostase-Modells zeigt Abb. 1.

Neben diesen nervalen Verbindungen steht der Hypothalamus in bestimmten Bereichen, den circumventrikulären Organen (CVOs), mit dem Blutgefäßsystem in direktem, gegenseitigen Stoffaustausch. Diese CVOs sind durch eine fehlende Blut-Hirn Schranke (BHS), dichte Vaskularisation und fehlenden Kontakt zum cerebroventrikulären System charakterisiert (Hofer 1958). Der Hypothalamus bekommt aber nicht nur afferente Informationen über den Blutweg im Bereich der CVOs, sondern Neurone des Hypothalamus sezernieren auch Neurohormone, die dann efferent über den Blutkreislauf ihre Zielorgane erreichen. Der Hypothalamus befindet sich an der Basis des *Diencephalon* (Zwischenhirn) in direkter Nähe zum dritten Hirnventrikel (VIII). Die rostrale Begrenzung bildet die *Lamina terminalis*, nach caudal erstreckt sich der Hypothalamus bis zum *Corpus mammillare* inklusive des *Nucleus tuberomammillare ventrale*. Anatomisch in vier Regionen (präoptische, anteriore, tuberale und mamilläre) und drei Zonen (late-

rale, mediale und periventriculäre) eingeteilt, beinhaltet der Hypothalamus eine Vielzahl von Kerngebieten (*Nuclei*) für die oben aufgeführten homöostatischen und neuroendokrinen Regulationssysteme.

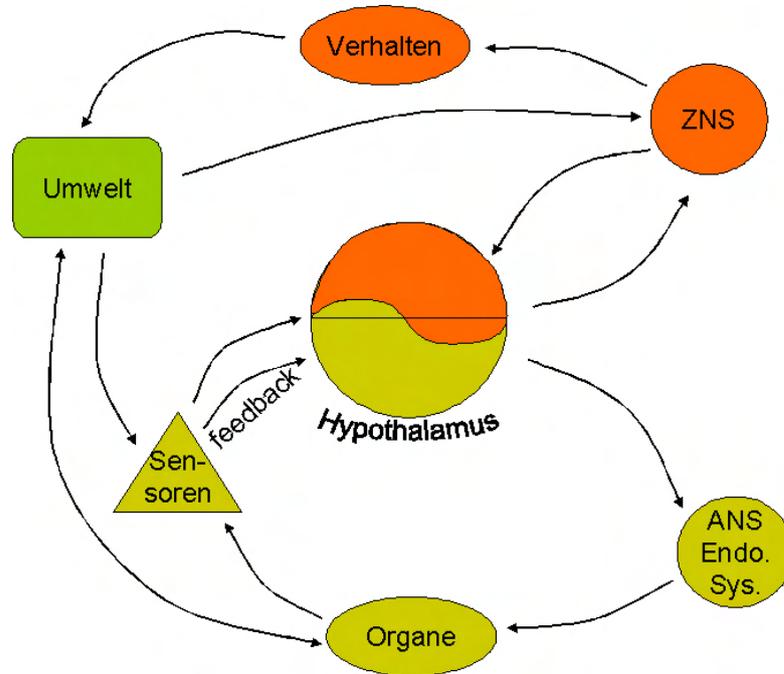


Abbildung 1: Vereinfachtes Homöostase-Modell mit Hypothalamus als Regelzentrum

Im Hypothalamus werden über Sensoren Informationen aus der Körperperipherie (Organe) und der Umwelt sowie aus dem zentralen Nervensystem (ZNS) verarbeitet, um das Gleichgewicht für lebenswichtige Systeme auf einem optimalen Niveau für basale (Waagerechte im Hypothalamus-Bild) und für Belastungs-Bedingungen (Sinuskurve) zu regulieren. Die vitalen Funktionen in der Körperperipherie werden efferent über das autonome Nervensystem (ANS) und das endokrine System reguliert. Die für die Homöostase essenziellen Verhaltensweisen wie Trinken und Nahrungsaufnahme werden durch neuronale Muster des ZNS gesteuert. Die Umwelt ist durch das Verhalten und den Stoffaustausch beteiligt. Störgrößen können auf allen Ebenen des Regelkreises einwirken.

1.2. Der MnPO - integratives Kerngebiet der Lamina terminalis

Die *Lamina terminalis* bildet sowohl die rostrale Begrenzung des Hypothalamus, als auch die anteriore Wand des dritten Hirnventrikels (McKinley et al. 2004). In ihr sind neurogliale Strukturen, wie das Subfornikalorgan (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) lokalisiert (siehe Abb. 2). Beide Strukturen gehören zu den in Kap. 1.1 beschriebenen CVOs. Im Gehirn der Ratte sind sieben verschiedene CVOs klassifiziert worden (Hofer 1958). Neben SFO und OVLT gehören die *Glandula pinealis* (Epiphyse), die *Eminentia mediana* (ME), die Neurohypophyse, das *Organum subcom-*

missurale (SCO) und die *Area postrema* (AP) ebenfalls zu den CVOs (Oldfield and McKinley 1995). Strukturähnlichkeiten auf zellulärer Ebene finden sich in einer CVO-Untergruppe, die nicht nur Gliazellen, Dendriten und Axone, sondern auch neuronale Zellkörper enthalten. Zugehörig sind OVLT, SFO und AP, die als sensorische CVOs bezeichnet werden (McKinley et al. 2003). Die lokale Durchlässigkeit der BHS im Bereich dieser CVOs beruht auf (1) der vorherrschenden Ausprägung fenestrierter Kapillarendothelien mit ausgedehnten, perivaskulären Räumen und lecken Zell-zu-Zell Verbindungen sowie (2) dem Fehlen der die Kapillaren umgebenden Astrocytenausläufer (Bradbury 1984; McKinley et al. 2003; Roth et al. 2004). Diese morphologische Spezialisierung ermöglicht den direkten Kontakt im Blut zirkulierender Substanzen mit neuroglialen Strukturen von OVLT, SFO und AP. Spezialisiert als rezeptive Strukturen für humorale Botenstoffe, aktivieren diese über spezifische Rezeptoren entweder Neurone der sensorischen CVOs direkt oder induzieren etwa in Gliazellen oder Endothelzellen die Produktion weiterer Mediatoren, welche ihrerseits die neuronale Aktivität modulieren könnten (Cottrell and Ferguson 2004; Roth et al. 2004).

Die Integration der sowohl in diesen Kerngebieten perzipierten humoralen Informationen als auch der afferenten neuronalen Signale erfolgt zum einen in den parvozellulären Anteilen des *Nucleus paraventricularis* (pPVN), zum anderen im *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO), der, innerhalb der BHS gelegen, Teil der *Lamina terminalis* ist. Der MnPO als integrative Relaisstation ist Gegenstand intensiver Forschung bezüglich seiner modulatorischen Funktion und beteiligter Transmittersysteme im Rahmen der Homöostase der Temperaturregulation (Patronas et al. 1998; Lazarus et al. 2007; Nakamura and Morrison 2008a), der circadianen Rhythmik (Szymusiak et al. 2007; Uschakov et al. 2007) der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes (McAllen et al. 1990; McKinley et al. 2004; Saad et al. 2006), der Futterraufnahme (Briski and Sylvester 1999) und auch dieser Arbeit. Cytoarchitektonisch wird der MnPO in eine dorsale (dMnPO) und eine ventrale (vMnPO) Komponente eingeteilt, basierend auf deren Lokalisation relativ zur *Commissura anterior* (CA) (Paxinos and Watson 2004). Cranial der CA liegt die anteriore Untereinheit des MnPO (aMnPO).

Schon frühe neuronale Degenerationsstudien bei der Ratte wiesen darauf hin, dass der MnPO sowohl zum SFO als auch zum OVLT projiziert (Hernesniemi et al. 1972). Zur histologischen Aufklärung afferenter und efferenter Konnektivitäten zwischen verschiedenen Kerngebieten bediente man sich schon früh anterograder (vom Soma zum Axonende) und retrograder (vom Axonende zum Soma) neuronaler Tracer. Hierunter versteht man die lokale Mikroinjektion von Farbstoffen, die dann intravesikulär mit Hilfe

spezifischer zellulärer Motorproteine anterograd (Kinesin) oder retrograd (Dynein) transportiert werden und so die Kartierung axonaler Projektionsfelder erlauben (Stenoi-en and Brady 1999). Efferente Projektionen MnPO-intrinsischer Neurone mit direkten synaptischen Verbindungen zu vasopressinergen Neuronen des PVN und SON konnten mittels retrograder Tracer wie Fluorophoren oder Meerrettichperoxidase aufgedeckt werden (Grazi and Miselis 1980; Sawchenko and Swanson 1981; McKinley et al. 1990). Die Rolle des MnPO als integratives Kerngebiet des anterioren Hypothalamus wird durch seine neuronalen Verbindungen mit überwiegend reziprokem Charakter unterstrichen (Gerstberger et al. 2001) (Abb. 2). So existieren auch zahlreiche reziproke Projektionen des MnPO zum SON (Oldfield et al. 1991), zum magno- sowie parvozellulären Anteil des PVN und zur medialen präoptischen Region (POA) (Uschakov et al. unpublished). Darüber hinaus sind Projektionen des MnPO von und zum SFO und OVLT innerhalb der *Lamina terminalis* besonders ausgeprägt (Miselis et al. 1979; Camacho and Phillips 1981; Oldfield et al. 1992; Uschakov et al. unpublished). Afferenzen von peripheren Baro-, Chemo-, Volumen- und Thermorezeptoren projizieren über Kerngebiete des Hirnstammes und der Pons, wie den *Nucleus tractus solitarius* (NTS), die ventrolaterale *Medulla oblongata* und den *Nucleus parabrachialis* (NPB) zum MnPO (Saper and Levisohn 1983; Edwards et al. 1989; Nakamura and Morrison 2008b). Efferenzen vom MnPO zum Hirnstamm projizieren vor allem zu Neuronen des zentralen Höhlengraus, teilweise auch zum *Locus coeruleus*. Die rasch fortschreitende Technik erlaubt es, u.a. die stereotaktischen Koordinaten auf unter 1 µm genau einzustellen, sowie die Injektionsvolumina der verwendeten Tracer stetig zu verringern. So ist es mittlerweile möglich, nicht nur Projektionen zwischen verschiedenen Kerngebieten zu untersuchen, sondern sich auch auf die Involvierung bestimmter Substrukturen eines Kerngebietes festzulegen. Demzufolge konnte durch Injektion kleinster Volumina des anterograden Tracers Biotin-Dextran-Amin gezeigt werden, dass Efferenzen des dMnPO und vMnPO vor allem in die „dorsal cap“ des OVLT projizieren und dessen zentrale, stark vaskularisierte Komponente aussparen. Ebenso bestehen zusätzliche intranukleäre Konnektivitäten zwischen den drei MnPO-Parzellen (aMnPO, dMnPO, vMnPO) (Uschakov et al. unpublished).

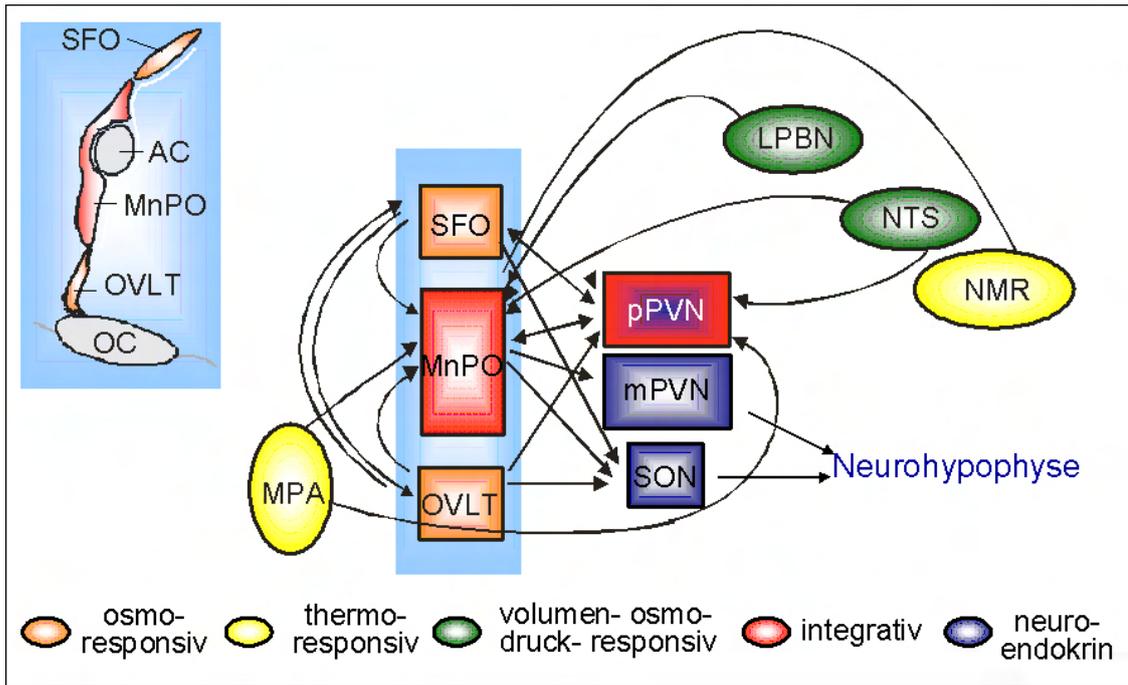


Abbildung 2: Konnektivitäten innerhalb der *Lamina terminalis* sowie der *Lamina terminalis* und intra- bzw. extrahypothalamischen Strukturen

Blau hinterlegtes Bild oben links: Schematische, sagittale Darstellung der *Lamina terminalis*
 Abkürzungen: SFO: *Organum subfornicale*; AC: *Commissura anterior*; MnPO: *Nucleus medianus praeopticus*; OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*; OC: *Chiasma opticum*

Großes Bild: Afferente und efferente Verbindungen der *Lamina terminalis* mit hypothalamischen und extrahypothalamischen Kerngebieten. Die farbliche Hinterlegung beschreibt die Beteiligung an den jeweiligen hypothalamischen Regelkreisen, bzw. die Funktion als integratives Kerngebiet (rot).

Abkürzungen: MPA: mediale präoptische Region; pPVN und mPVN: magnozellularer bzw. parvocellularer *Nucleus paraventricularis*; SON: *Nucleus supraopticus*; LPBN: *Nucleus parabrachialis lateralis*; NTS: *Nucleus tractus solitarius*; NMR: *Nucleus raphe medianus*

1.3. ATP – ein Neurotransmitter ?!

1929 wurde das Molekül Adenosin 5`triphosphat (ATP) parallel von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen in Heidelberg (Lohman 1929) und Harvard (Fiske and Subbarow 1929) entdeckt. Die Bedeutung des ATP als universelle, biochemische „Energieeinheit“ in biologischen Systemen geht zurück auf das Jahr 1941 (Lippman 1941). Interessanterweise ist die Idee, dass Purine auch als extrazelluläre Transmitter fungieren können, genauso alt wie die Entdeckung des ATP an sich (Drury and Szent-Gyorgyi 1929). Diese Autoren fanden heraus, dass intravenös appliziertes Adenosin oder Adenosin 5`monophosphat (AMP) negativ chronotrope Effekte auf das Herz von Säugetieren (Hund, Katze Meerschweinchen) hatten, den Blutdruck senkten und intestinale Kontraktionen supprimierten. Der erste Hinweis, dass Adenosin und ATP unterschiedliche Wirkungen entfalten, stammt aus dem Jahre 1934 (Gillespie 1934). ATP induzierte

einen Anstieg des Blutdrucks bei Kaninchen und Katzen, was zuvor durch Adenosin- oder AMP-Applikation nicht beobachtet wurde. Mehr noch, ATP erwies sich als wesentlich potenter verglichen mit Adenosin oder AMP, Kontraktionen des *Ileum* und des *Uterus* beim Meerschweinchen hervorzurufen. Knapp 25 Jahre später beobachtete Holton (1959) einen transienten Anstieg des extrazellulären ATP nach elektrischer Stimulation des *Nervus auricularis* beim Kaninchen und folgerte daraus, dass ATP ähnlich wie Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt werden könnte. 1970 präsentierten Burnstock et al. (1970) den ersten Beweis, dass extrazelluläres ATP die Funktion eines modulierenden Neurotransmitters im Rahmen der nicht-cholinergen, nicht-adrenergen Signalübertragung im vegetativen Nervensystem aufweist. Burnstock war auch derjenige, der den Begriff der „purinergen neuronalen Signalübertragung“ prägte und erstmals von purinergen Rezeptoren sprach (Burnstock 1972, 1976). ATP erfüllt alle Kriterien eines Neurotransmitters:

1. ATP wird in präsynaptischen Vesikeln synthetisiert und gespeichert
2. Die Freisetzung erfolgt durch elektrische Stimulation der beteiligten Neurone
3. Freigesetztes ATP wird rasch durch Enzyme wieder abgebaut
4. Substanzen, welche die Effekte des endogenen ATP unterbinden, hemmen auch die induzierbaren, postsynaptischen Effekte

1.4. Purinerge Rezeptoren

1.4.1. Historie

Die erste Unterscheidung der purinergen Rezeptoren in P1- (Adenosinrezeptoren) und P2-Rezeptoren (sensitiv für Purine wie ATP/ADP sowie Pyrimidine wie Uridin 5' tri- und diphosphat (UTP/UDP)) erfolgte erstmals durch Burnstock (1978). Etwa zur gleichen Zeit wurden zwei P1-Rezeptor-Subtypen beschrieben (van Calcar et al. 1979; Londres et al. 1980), jedoch dauerte es bis zum Jahr 1985, bis zum ersten Mal vermutet wurde, dass es pharmakologische Anzeichen für zwei Typen von P2-Rezeptoren (P2X und P2Y) gibt (Burnstock and Kennedy 1985). 1993 wurden die ersten G-Protein gekoppelten P2-Rezeptoren kloniert (Lustig et al. 1993; Webb et al. 1993), in *Xenopus* Oocyten exprimiert und genauer charakterisiert; ein Jahr später folgte die Klonierung zweier ionotroper Rezeptoren (Brake et al. 1994; Valera et al. 1994). Im selben Jahr schlugen Abbracchio und Burnstock (1994), basierend auf der molekularen Struktur der Proteine und der unterschiedlichen Mechanismen intrazellulärer Signaltransduktion, die Einteilung der purinergen Rezeptoren in zwei Familien vor: Zum einen in die Familie der P2X-Rezeptoren (durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle), zum anderen in die Familie

der P2Y-Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren). Purinerge Rezeptoren sind an vielen neuronalen und nicht neuronalen Mechanismen beteiligt, welche so verschiedene, komplexe Systeme wie Exo- und Endocytose, Immunreaktionen, Prozesse des Entzündungs- und Schmerzgeschehens, Thrombocytenaggregation und vaskuläre Dilatation einschließen (Burnstock 2006). Im Rahmen der neonatalen Entwicklung sowie zellulären Regenerationsmechanismen sind sie an der Zellteilung, Zelldifferenzierung sowie der Apoptose beteiligt (Burnstock 2002).

1.4.2. P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren)

Basierend auf pharmakologischen Studien und molekularbiologischen Klonierungstechniken sind zur Zeit vier Subtypen der Adenosin-Rezeptoren bekannt: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ (Olah and Stiles 2000; Fredholm et al. 2001; Yaar et al. 2005). Alle vier Subtypen gehören zur Proteinfamilie der sieben-transmembranalen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Hinsichtlich ihrer Primärstruktur stellt der A₃-Subtyp mit 318 Aminosäuren (AS) die kürzeste, der A_{2A}-Subtyp mit 412 AS die längste Variante dar. Die transmembranalen Segmente der P1-Rezeptorproteine enthalten zahlreiche hydrophobe AS und bilden als Sekundärstruktur α -Helices aus, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre hydrophile peptiderge Schleifen verbunden sind. Während der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist, befindet sich der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite. Die dreidimensionale Anordnung der α -Helices ermöglicht die Ligandenbindung in der extrazellulären Domäne des Rezeptors (Ralevic and Burnstock 1998).

A₁-Rezeptoren sind ubiquitär im ZNS vorhanden, mit höchster Expressionsrate in *Cortex*, *Hippocampus*, *Cerebellum*, Hirnstamm, *Thalamus* und Rückenmark (Reppert et al. 1991; Dixon et al. 1996). Die Expression in cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns ist von immenser Bedeutung für die homöostatische Regulation des Schlafes (siehe Kap. 1.6) (Basheer et al. 2001; Thakkar et al. 2003). In der präoptischen Region des Hypothalamus sind diese Rezeptor-Subtypen an die Regulation der Körpertemperatur beteiligt (siehe Kap. 1.6) (Ticho and Radulovacki 1991). A_{2A}-Rezeptoren sind im ZNS vor allem in *Striatum*, *Nucleus accumbens* und *Bulbus olfactorius* lokalisiert (Jarvis and Williams 1989; Ongini and Fredholm 1996). Im *Nucleus ventrolateralis praeopticus* (VLPO) des Hypothalamus sind sie analog zu A₁-Rezeptoren an der Steuerung des Schlaf-/Wachverhaltens beteiligt (Morairty et al. 2004; Gallopin et al. 2005) (siehe Kap. 1.9). A_{2B}-Rezeptoren werden nahezu in jedem Gewebe exprimiert, jedoch mit meist geringer Expressionsrate, so dass lediglich hohe Konzentrationen an Adenosin diesen Subtyp aktivieren (Ralevic and Burnstock 1998).

A₃-Rezeptoren finden sich hauptsächlich in peripheren Geweben und Zellen (Dixon et al. 1996). Beispielsweise hat die Aktivierung von A₃-Rezeptoren auf Leukocyten anti-inflammatorische Wirkung (Bar-Yehuda et al. 2007) (siehe Kap. 1.6.3). Bronchokonstriktion bei Ratten wird durch A₃-Rezeptoren auf Mastzellen vermittelt (Pauwels and Joos 1995), und auch kardioprotektive Effekte werden sowohl durch A₃-, als auch durch A₁-Rezeptoren vermittelt (Wang et al. 1997).

1.4.3. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P1-Rezeptoren

Die hier beschriebenen Signalwege dürfen prinzipiell nicht losgelöst von der zelltyp-abhängigen Lokalisation des jeweiligen Rezeptor-Subtyps betrachtet werden und sollen nur einen kurzen Einblick in die vielfältigen Mechanismen der Signaltransduktion metabotroper P1-Rezeptoren geben, die für alle vier Subtypen prinzipiell an die Adenylatcyclase gekoppelt ist. A₁- und A₃-Rezeptoraktivierung hemmt die Adenylatcyclase (G_{i/o}-Protein, d.h. α -Untereinheit vom Typ α_i und α_o), was einen Abfall des *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bedingt (van Calker et al. 1978; Londos et al. 1980). Cyclisches AMP seinerseits induziert die Aktivierung von Proteinkinasen mit nachfolgender Phosphorylierung diverser Proteine wie Enzyme oder Kanäle. Ein weiterer, für A₁-Rezeptoren beschriebener Signaltransduktionsmechanismus besteht in der Aktivierung der Phospholipase C. Dieses Enzym spaltet Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Iredale et al. 1994; Megson et al. 1995; Peakman and Hill 1995). IP₃ bindet an IP₃-gesteuerte Calciumkanäle des endoplasmatischen *Reticulum* (ER) und setzt so Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei. Die sich nun anschließenden Signalwege sind vielfältig; beispielsweise wird die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche bestimmte Proteine in der Zielzelle (z.B. Ionenkanäle) phosphoryliert. Weiterhin ist die Interaktion von A₁-Rezeptoren, DAG-vermittelt, mit ATP-sensitiven K⁺-Kanälen (K_{ATP}-Kanäle) in der Literatur beschrieben (Kirsch et al. 1990; Merkel et al. 1992; Heurteaux et al. 1995). Durch diese Interaktion wird die Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen an exzitatorischem Gewebe moduliert (Reduzierung der Impulsfrequenz von Neuronen durch Hyperpolarisation) bzw. wird eine Dilatation glatter Gefäßmuskelzellen etwa der kardialen Coronararterien induziert, wodurch dem Adenosin eine bedeutende Rolle im Rahmen der kardiovaskulären Regulation zukommt (Kirsch et al. 1990; Merkel et al. 1992; Nakhostine and Lamontagne 1993). Interessanterweise kommt es in der Niere, induziert durch den *Macula densa* Mechanismus, ebenfalls A₁-Rezeptor vermittelt zu

einer markanten Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen der *Glomerula* im Sinne einer Autoregulation der glomerulären Filtrationsrate (Kim et al., 2005; Castrop, 2007).

A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren aktivieren die Adenylatcyclase (G_s -Protein) (Reshkin et al. 2000). Durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) wird diese aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung verschiedener Proteine wie z.B. metabolischen Inhibitoren (Inhibitor 1, DARPP-32), Membranproteinen (Glutamatrezeptoren, Calciumkanäle, Na^+/K^+ -Pumpe) oder Genexpressionsfaktoren (CREB = cAMP-responsives Element-bindendes Protein). Phospho-CREB steigert die Synthese des "immediate early gene" Fos, das wiederum die Transkription anderer Zielgene reguliert. Beim humanen A_{2B} - sowie auch dem A_3 -Rezeptor-Subtyp wurde zudem beobachtet, dass sie durch $G_{q/11}$ -Aktivierung regulatorische Funktionen in Form einer Aktivierung der Phospholipase C ausübten (Linden et al. 1999; Williams and Jarvis 2000).

1.4.4. Ionotrope P2X-Rezeptoren

Bei P2X-Rezeptoren, auf denen auch das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt, handelt es sich um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die für Natrium, Kalium und Calcium permeabel sind, wobei $p_{Ca^{2+}}$ zwei- bis fünffach höher ist als p_{Na^+} und p_{K^+} (Valera et al. 1994; Buell et al. 1996). Meist drei oder sechs Proteinuntereinheiten sind am Aufbau der P2X-Rezeptoren beteiligt. Deren kodierende Gene wurden aus cDNA Bibliotheken hauptsächlich von Mensch und Ratte, zum Teil auch Maus, Meerschweinchen, Huhn und Zebrafisch kloniert (Khakh et al. 2001b; North 2002). Bei intrazellulären N- sowie C-Termini mit *consensus* Bindungsmotiven für Proteinkinasen (PKA und PKC), die vor allem die Aktivität von $P2X_2$ modulieren (Chow and Wang 1998; Boue-Grabot et al. 2000) zeichnen sich P2X-Rezeptor-Untereinheiten durch zwei transmembranale Regionen (aus jeweils etwa 20 AS) aus, welche den Ionenkanal auskleiden (Burnstock 2004) (Abb. 3). Diese sind durch eine große, extrazelluläre hydrophile Schleife, bestehend aus ca. 300 AS mit 10 hoch konservierten Cystein-, 13 Glycin- und zwei bis sechs Asparaginresten, verbunden (Brake et al. 1994; North 1996; Ralevic and Burnstock 1998). Diese extrazelluläre Schleife enthält die ATP-Bindungsstelle und eine hydrophobe H5-Region, die an der Modulation des Rezeptors durch Kationenbindung (Magnesium, Kupfer Zink etc.) beteiligt ist (Burnstock 2004) (Abb. 3). P2X-Rezeptoren sind oligomere Proteine, die aus mehreren Untereinheiten einen funktionellen Ionenkanal bilden. Stöchiometrisch scheinen dabei drei Untereinheiten involviert zu sein, die

entweder ein homomeres Trimer bilden, oder ein heteromeres Hexamer aus zwei verbundenen Trimeren (Nicke et al. 1998; North 2002).

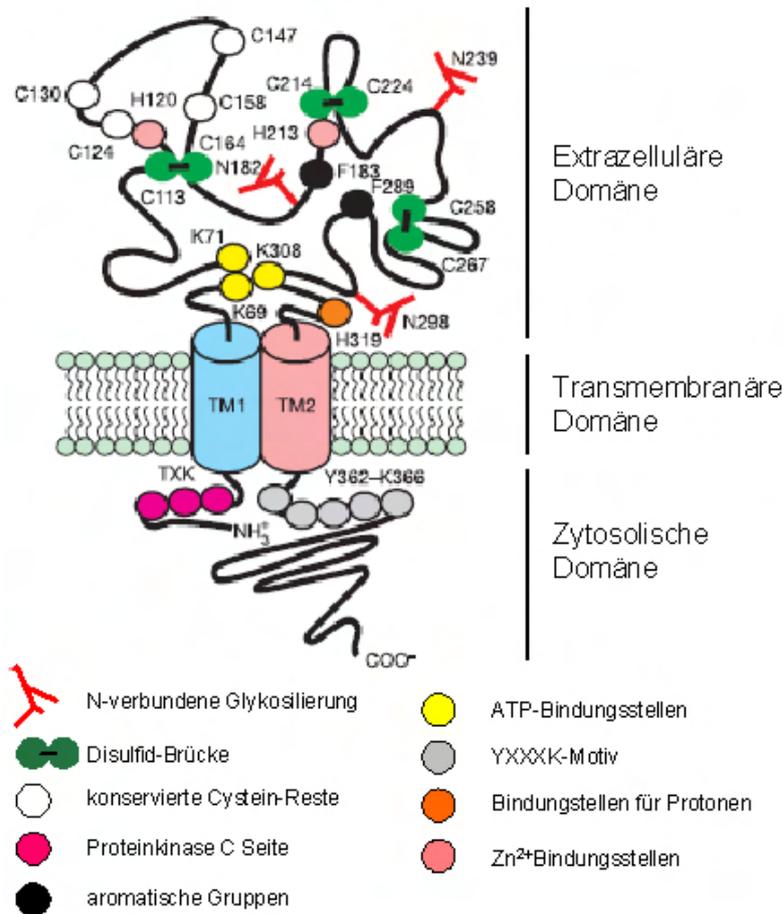


Abbildung 3: Struktur und Schlüsselfunktionen einer P2X-Rezeptor-Untereinheit

Dieser hypothetische Aufbau basiert vor allem auf Studien an P2X₁- und P2X₂-Rezeptoren (Ralevic and Burnstock 1998). Modifiziert nach Khakh and North 2006.

Oberes Bilddrittel: Extrazelluläre Domäne - Hydrophile Schleife bestehend aus etwa 300 AS, verbunden durch Disulfidbrücken (grün). Sie enthält u.a. die ATP-Bindungsstelle (gelb) sowie Bindungsstellen für Kationen, wie z.B. Zink (altrosa)

Mittleres Bilddrittel: Transmembranale Domäne - Sie kleidet den Ionenkanal aus und besteht aus zwei mal 20 AS

Unteres Bilddrittel: Zytosolische, intrazelluläre Domäne - Beispielhaft für P2X₂ enthält sie u.a. Bindungsmotive für Proteinkinasen (pink - Proteinkinase C Bindungsstelle), die ihrerseits die Aktivität nachgeordneter Enzyme oder Faktoren steuern und somit eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion spielen

Zur Zeit sind sechs homomere (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ und P2X₇) und sechs heteromere (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} und P2X_{4/6}) P2X-Rezeptoren bekannt (Burnstock 2007a). Nachfolgend soll die Expression homomerer P2X-Rezeptoren mit Fokus auf den Hypothalamus kurz dargestellt werden. Ihre Funktionalität wird in diesem Kapitel nur angerissen und findet sich ausführlich in Kap. 1.6 bis 1.9 („Bedeu-

tung von ATP als hypothalamischer Neurotransmitter im Rahmen homöostatischer Regelkreise“) dargestellt. Ebenso erfolgt hier keine eingehende, pharmakologische Charakterisierung der P2X-Rezeptoren, da diese einen wichtigen Aspekt der Diskussion dieser Arbeit darstellt (siehe Kap. 4).

P2X₁-Rezeptoren wurden ursprünglich aus dem Samenleiter (*Vas deferens*) der Ratte kloniert (Valera et al. 1994). Peripher werden P2X₁-Rezeptoren vor allem in der glatten Muskulatur exprimiert (Blase, Darm, Arterien und Samenleiter), wo sie an der sympathischen bzw. parasympathischen Kontraktionsvermittlung beteiligt sind (Hoyle et al. 1989; Valera et al. 1994, 1995; Palea et al. 1995; Mulryan et al. 2000; Burnstock and Knight 2004). Im ZNS sind P2X₁-Rezeptoren nicht primär lokalisiert, doch gibt es Anhaltspunkte für eine moderate Expression im Dorsalhorn des Rückenmark (Vulchanova et al. 1996), in *Cerebellum*, *Striatum*, *Hippocampus* und *Cortex* (Kidd et al. 1995). Im peripheren Nervensystem (PNS) hingegen findet sich eine markante Expression in Neuronen sensorischer Ganglien (*Ganglion spinale*, (DRG), *Ganglion trigeminale* (GT) sowie *Ganglion nodosum* (GN)) (Collo et al. 1996). Die Expression von P2X₁-Rezeptoren auf der Ebene des Hypothalamus ist in der Literatur *dato* nicht beschrieben worden. Charakteristisch für P2X₁-Rezeptoren sind die schnelle Aktivierung (0,01 – 1 Sekunde), sowie die rasche Desensibilisierung (0,1 – 10 Sekunden). Ebenso ist in der Literatur eine Internalisierung des Rezeptors nach seiner Aktivierung beschrieben (Dutton et al. 2000). Pharmakologische Untersuchungen zeigen wenig Unterschiede zwischen rekombinant exprimierten P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren (Gever et al. 2006).

P2X₂-Rezeptoren wurden erstmals aus der Phäochromocytom-Zelllinie PC12 kloniert (Brake et al. 1994). P2X₂ wird sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem exprimiert. Im zentralen Nervensystem (ZNS) finden sich P2X₂-Rezeptoren in *Cortex*, Kleinhirn, *Striatum*, *Hippocampus* und *Hypothalamus*, sowie in der *Medulla oblongata* (NTS) und im Dorsalhorn des Rückenmarks. Hypothalamisch konnte die Expression von P2X₂ vor allem im *Nucleus arcuatus* (ARC), im PVN, im SON, im *Nucleus tuberomammillare* (TM), der ME, dem OVLT, aber auch im Bereich des MnPO nachgewiesen werden (Kidd et al. 1995; Collo et al. 1996; Vulchanova et al. 1996; Simon et al. 1997; Xiang et al. 1998b; Kanjhan et al. 1999; Shibuya et al. 1999; Burnstock and Knight 2004). Im peripheren Nervensystem (PNS) ist P2X₂ in Neuronen sensorischer und autonomer Ganglien lokalisiert (Vulchanova et al. 1997; Zhong et al. 2000; Ma et al. 2004, 2005; Cockayne et al. 2005). Von P2X₂ mRNA des Menschen, der Ratte und des Meerschweinchens sind jeweils mehrere Spleiß-Varianten bekannt (Brandle et al. 1997; Koshimizu et al. 1998; Chen et al. 2000a). Dies unterscheidet den

P2X₂-Purinozeptor von anderen Subtypen der P2X-Rezeptoren. Zusätzlich erschwert ist hierdurch jedoch die genaue Charakterisierung von P2X₂ in nativem Gewebe oder in *in vivo* Studien, da hier die Möglichkeit besteht, dass das Gesamtprotein mit verkürzten Spleiß-Varianten heteromere Rezeptoren bildet. Inwieweit pharmakologische Ergebnisse aus Untersuchungen an rekombinant in Zelllinien exprimierten P2X₂-Rezeptoren hierauf übertragbar sind, bleibt zunächst noch fraglich. P2X₂-Rezeptoren zeigen nach Aktivierung lediglich ein eingeschränktes Desensibilisierungsprofil.

P2X₃-Rezeptoren wurden erstmalig aus den Spinalganglien der Ratte kloniert (Lewis et al. 1995), und finden sich vorwiegend in Neuronen sensorischer Ganglien (DRG, GN, GT) (Bradbury et al. 1998; Dunn et al. 2001; Burnstock and Knight 2004). Hier sind sie an der somatosensorischen (v.a. nozizeptiven und mechanosensorischen) Signalübertragung beteiligt, mit Afferenzen beispielsweise aus Gelenken, Harnleiter, Harnblase oder dem Gastrointestinaltrakt (Lee et al. 2000; Wynn et al. 2003; Rong and Burnstock 2004; Ishikawa et al. 2005). Im ZNS finden sich P2X₃ und P2X_{2/3} im Bereich des Dorsalorns des Rückenmarks und im NTS des Hirnstammes, wo sie möglicherweise für die präsynaptische Glutamat-Freisetzung von Bedeutung sind (Nakatsuka and Gu 2001, Jin et al. 2004). Auf Ebene des Hypothalamus wird der P2X₃-Rezeptor vor allem im SON und PVN mit möglicher Beteiligung an der Freisetzung von Vasopressin exprimiert (Shibuya et al. 1999).

Das Gen, das für das Protein des P2X₄-Rezeptors kodiert, wurde ursprünglich aus dem Gehirn der Ratte kloniert (Bo et al. 1995). Er ist derjenige Purinozeptor, der auf mRNA- und Proteinebene am weitesten verbreitet ist; auf Ebene des ZNS vor allem im *Hippocampus*, in Purkinjezellen des *Cerebellum* und im *Bulbus olfactorius*, moderat auch im Hypothalamus (vor allem im SON, PVN, POA, *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), und im TM, vereinzelt auch im MnPO) sowie im Rückenmark (Buell et al. 1996; Collo et al. 1996; Soto et al. 1996; Wang et al. 1996; Shibuya et al. 1999). Im peripheren Nervensystem wird P2X₄ vorrangig in autonomen und sensorischen Ganglien exprimiert (Xiang et al. 1998a). Welche physiologischen Funktionen P2X₄-Rezeptoren in den meisten dieser neuroglialen Strukturen übernehmen, ist Gegenstand laufender Forschung. Studien der letzten Jahre zeigen jedoch einen Zusammenhang zwischen Verletzungen an Rückenmark und Spinalnerven sowie durch Formalin-induzierten Entzündungen, und einer erhöhten Expression von P2X₄ in aktivierten Mikrogliazellen des Rückenmarks (Inoue et al. 2004; Guo et al. 2005; Schwab et al. 2005). Die intraspinale Applikation von Antisense-Oligodeoxynukleotiden spezifisch für die P2X₄ mRNA reduzierte die Expression von P2X₄ im Rückenmark und unterdrückte die Entwicklung einer

taktilen Allodynie nach der Verletzung spinaler Nerven (Tsuda et al. 2003). Diese Erkenntnisse sprechen für eine wichtige modulatorische Funktion von ATP und P2X₄-Rezeptoren im Zusammenhang mit neuropathischem sowie chronischem Entzündungsschmerz. Nach Aktivierung durch ATP desensibilisieren homomere P2X₄-Rezeptoren relativ langsam.

P2X₅-Rezeptoren sind in einer Vielzahl v.a. mitotisch aktiver Gewebe wie dem Darm (Groschel-Stewart et al. 1999), der Harnblase und dem Harnleiter (Lee et al. 2000); sowie der Haut (Inoue et al. 2005) exprimiert. Die Aktivierung durch ATP hemmt die Proliferation und erhöht die Differenzierung der Zellen durch Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) und der damit verbundenen Signalkaskade (Ryten et al. 2002). In den letzten Jahren zeichnete sich ab, dass P2X₅-Rezeptoren auch in Satellitenzellen der Skelettmuskulatur lokalisiert sind (Ryten et al. 2002). Im Bereich des ZNS lassen sich P2X₅-Purinozeptoren im Rückenmark, in der Epiphyse und im *Nucleus trigeminalis* (NTG) der *Medulla oblongata*, sowie hypothalamischen Kerngebieten, vor allem im PVN und SON, moderat auch im ventromedialen Hypothalamus (VMH), im SCN, in der ME und im lateralen Hypothalamus (LH) nachweisen (Collo et al. 1996; Garcia-Guzman et al. 1996; Burnstock and Knight 2004; Xiang et al. 2006).

Der P2X₆-Rezeptor stellt eine Besonderheit unter den P2X-Rezeptoren dar, da er nicht als funktioneller homomerer Rezeptor exprimiert zu sein scheint (Collo et al. 1996). Neuere Daten belegen jedoch, dass eine Glykosylierung des homomeren P2X₆ sehr wohl zu einem funktionellen Rezeptor führt (Jones et al. 2004). Im ZNS ist P2X₆ auf mRNA- und Proteinebene in Purkinje-Zellen des Kleinhirns und in Pyramidenzellen des *Hippocampus*, moderat auch im Hypothalamus (vor allem im SCN, SON, TM, aber auch im MnPO, in der POA, im PVN, VMH und ARC) exprimiert (Collo et al. 1996; Shibuya et al. 1999; Rubio and Soto 2001; Burnstock and Knight 2004; Xiang and Burnstock 2005b). Weiterhin ist die Lokalisation von P2X₆ u.a. in sensorischen Ganglien beschrieben (Xiang et al. 1998a).

Der P2X₇-Rezeptor wird vor allem von immunkompetenten Zellen exprimiert, wie Makrophagen / Monocyten, dendritischen Zellen, Lymphocyten und Mastzellen. Im Bereich des ZNS / PNS konnte der P2X₇-Purinozeptor in verschiedenen Typen von Gliazellen, wie Mikroglia, Astrocyten, Oligodendrocyten und Schwann-Zellen nachgewiesen werden (Collo et al. 1997; Buell et al. 1998; Burnstock and Knight 2004; Bulanova et al. 2005). Im Hypothalamus konnte P2X₇ mRNA im SON molekularbiolo-

gisch erfasst werden. Funktionell scheint der P2X₇-Rezeptor an die Freisetzung von biologisch aktiven Cytokinen beteiligt zu sein (Ferrari et al. 1997c; Mehta et al. 2001; Chakfe et al. 2002), vermutlich auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen und zentralen Entzündungsprozessen (Chakfe et al. 2002; Le Feuvre et al. 2002; Duan et al. 2003; Parvathenani et al. 2003).

1.4.5. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2X-Rezeptoren

Nach Aktivierung durch extrazelluläres ATP öffnet sich der aus mehreren Untereinheiten bestehende Rezeptor und erlaubt die Passage von Kationen durch die Zellmembran, wobei Kalium (K⁺) aus dem Zytosol ausströmt und Natrium (Na⁺) und Calcium (Ca²⁺) aus dem Extrazellularraum in das Zytosol einströmen. Hieraus resultiert ein verändertes elektrochemisches Potential der Zelle (Depolarisation in Neuronen und Gliazellen) (Bean 1992, Dubyak and el-Moatassim 1993), welches seinerseits für die Impulsübertragung bei Neuronen und in Bezug auf die Muskelkontraktilität unabdingbar ist. Somit modulieren ionotrope P2X-Rezeptoren die schnelle neuronale synaptische Signalübertragung, wohingegen metabotrope P2Y-Rezeptoren langsame neuromodulatorische Effekte induzieren, wie Differenzierung, Dendritenwachstum, Degeneration und Regeneration (D'Ambrosi et al. 2001, Illes and Alexandre Ribeiro 2004). Die Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Calciumkanäle, was zu einer weiteren Akkumulation von Ca²⁺-Ionen im Zytosol führt. Calcium *per se* ist intrazellulär an der Modulation vielfältiger Prozesse beteiligt, z.B. an der Freisetzung von Neurotransmittern über ein Calmodulin-abhängiges Verfahren. Über Aktivierung von Calmodulin wird die Proteinkinase II angeregt, die ihrerseits Synapsin auf der Oberfläche synaptischer Vesikel phosphoryliert und so deren Abtrennung vom Cytoskelett bewirkt. Das Vesikel erreicht die präsynaptische Nervenendigung und kann exocytotisch die enthaltenen Transmitter in den synaptischen Spalt freisetzen (Lin et al. 1990). Weiterhin besteht die Möglichkeit der Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK). Beispielsweise werden die MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-related kinases*) und p38 durch P2X₇-Rezeptoren in Astrocyten aktiviert, was in letzter Folge zur Expression von MCP-1 (*monocyte chemo attractant protein-1*) führt und so aufgrund von Traumata oder Entzündungen eine Leukozyteninfiltration ins ZNS bewirkt (Panenka et al. 2001).

1.4.6. Metabotrope P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren sind analog zu den P1-Rezeptoren GPCRs (siehe Kap. 1.4.2). In ihrer Aminosäuresequenz sind sie, verglichen mit diesen, lediglich zu 11 - 18 % identisch. Zum heutigen Zeitpunkt sind acht humane P2Y Subtypen bekannt (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁₋₁₄ (Abbraccio et al. 2003, 2006)). Die fehlenden Nummerierungen repräsentieren einerseits Spezieshomologe, die nicht aus Säugetiergeweben kloniert wurden, andererseits Rezeptoren, die zwar eine Sequenzhomologie zu P2Y-Rezeptoren aufweisen, für die jedoch kein funktioneller Nachweis hinsichtlich ihrer Nukleotidsensitivität besteht, ein endogener Ligand also nicht bekannt ist (sogenannte „orphan receptors“). Beispielsweise ist p2Y3 des Huhnes vergleichbar mit dem humanen P2Y₆ (Li et al. 1998). Aus Froschembryonen wurde p2Y8 kloniert und dieser Rezeptor-Subtyp scheint funktionelle Bedeutung bei der Entwicklung der Neuralplatte zu haben, aus der sich später das zentrale Nervensystem entwickelt (Bogdanov et al. 1997). p2Y5 und p2Y10 werden als „orphan receptors“ betrachtet. Die Größe der Proteine der P2Y-Rezeptoren rangieren von 328 – 377 AS (Ralevic and Burnstock 1998).

Auf diencephalischer Ebene des Rattengehirns sind P2Y-Rezeptoren (P2Y₁ und P2Y₄) im posterioren Hypothalamus (TM) exprimiert und vermutlich an der Regulation des Schlaf-/Wachverhaltens beteiligt (Sergeeva et al. 2006) (siehe Kap. 1.9). Weiterhin zeigten immunhistochemische Studien eine Lokalisation von P2Y₁ im dorso- und ventralen Hypothalamus (DMH, VMH), der lateralen hypothalamischen Region (LH) sowie dem *Nucleus arcuatus* (ARC), welcher maßgeblich in die zentrale Kontrolle der Nahrungsaufnahme eingebunden ist (Seidel et al. 2006) (siehe Kap. 1.8). Einen funktionellen Nachweis von P2Y₁-Rezeptoren *in vivo* in diesem Zusammenhang wurde durch lokale hypothalamische Applikation spezifischer Agonisten und Antagonisten erbracht (Kittner et al. 2006).

1.4.7. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung von P2Y-Rezeptoren

P2Y_{1,2,4,6,11}-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C *via* Koppelung an G_{q/11} Proteine (Ralevic and Burnstock 1998), woraus - wie in Kap. 1.4.3 beschrieben - die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern resultiert. Aktivierung von P2Y_{12,13,14} führt zur Hemmung der Adenylatcyclase über G_{i/o} Proteine (Jin et al. 2001, Muller 2002). Der P2Y₁₁-Rezeptor stellt eine Besonderheit dar, da er sowohl zur Stimulation des Phosphatidylinositol- wie auch des Adenylatcyclase-Signaltransduktionsweges führt (Communi et al. 1999, van der Weyden et al. 2000). Ebenso wie bei P1-Rezeptoren ist auch bei P2Y-Rezeptoren die weitere Signaltransduktion abhängig vom

jeweiligen Zelltyp, der den Rezeptor exprimiert. Erschwerend kommt hinzu, dass die Hypothese klassischer Kaskaden des intrazellulären Signalweges nach Aktivierung von GPCRs den Studien der letzten Jahre nicht mehr standhält. Mittlerweile weiß man, dass GPCRs nicht losgelöst von anderen Rezeptoren, Kanälen, integralen Membranproteinen sowie intrazellulär lokalisierten, proteinergeren Signalsubstanzen betrachtet werden dürfen, sondern dass diese in Interaktion miteinander treten (Erb et al. 2006). Beispielsweise enthält der intrazelluläre C-Terminus des humanen P2Y₁-Rezeptors eine Bindungsdomäne für konservierte Proteine (PDZ-Domänen) des Na⁺/H⁺ *exchanger regulatory factor* (NHERF), und übt so direkt regulierenden Einfluss auf den Ionenfluss über die Zellmembran aus (Hall et al. 1998). Eine weitere konservierte Sequenz wurde am C-Terminus von P2Y_{1,2,6,11} entdeckt. Elektrophysiologische und molekularbiologische Studien an rekombinant in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierten humanen P2Y-Rezeptoren deckten die Interaktion der oben genannten Rezeptoren und einem spannungsabhängigen Na⁺-Kanal auf (Lee et al. 2003). Die Interaktion von P2Y₁ und thermo-TRP-Kanälen (*transient receptor potential*) im Zusammenhang mit der Schmerz- und Temperaturperzeption wird in Kap. 1.6.2 beschrieben.

1.5 Freisetzungsmechanismen und extrazellulärer Abbau von ATP

Im ZNS wird ATP häufig neuronal mit Glutamat oder Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) (Jo and Schlichter 1999, Jo and Role 2002) co-sezerniert, bzw. alleinig aus ATP-haltigen Vesikeln präsynaptisch freigesetzt (Robertson and Edwards 1998). Zusätzlich können präsynaptische Nervenendigungen sowohl ATP- als auch Glutamat-haltige Vesikel aufweisen, wobei die Freisetzung beider Signalstoffe zwar gleichzeitig, die des ATP jedoch nicht in Abhängigkeit von der des Glutamats erfolgt (Pankratov et al. 2006) (Abb. 4). Für das periphere Nervensystem ist zusätzlich eine ATP-Speicherung in Acetylcholin- (Morel and Meunier 1981), bzw. Noradrenalin-haltigen Vesikeln (Stjarne 2001) beschrieben. Die Freisetzung eines einzelnen ATP-haltigen Vesikels führt zu Konzentrationen von 5 – 500 µM/L ATP im synaptischen Spalt, bei weitem genug, um postsynaptische P2X-Rezeptoren zu aktivieren (Pankratov et al. 2006). Die Aufnahme in Vesikel erfolgt höchstwahrscheinlich über einen spezifischen Nukleotidtransporter (ADP/ATP-Translokase) (Gualix et al. 1999). Für Gliazellen werden neben der Exocytose weitere, nicht-vesikuläre Mechanismen diskutiert (Abb. 4). Darunter fällt die Freisetzung von ATP durch Connexin-Hemikanäle (Stout et al. 2002), durch Volumen-sensitive Chloridkanäle (Darby et al. 2003) oder dilatierte P2X₇-Rezeptoren (Suadicani et al. 2006). Weiterhin kommen für Zellen nicht-neuronalen Ursprungs

(Gliazellen, Epithelzellen) die Ausschleusung von ATP direkt oder indirekt über membranintrinsic ATP Bindungskassetten (ABC-Transporter, *ATP binding cassette*) in Betracht (Schwiebert 1999). Letztere Hypothese ist jedoch sehr umstritten. Viele Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung spezieller ABC-Transporter (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) bzw. *multi drug resistance transporter* (MDR)) und einem extrazellulären Anstieg von ATP herstellen (Abraham et al. 1993, Reisin et al. 1994, Pasyk and Foskett 1997), andere wiederum nicht (Grygorczyk et al. 1996, Li et al. 1996). Schwiebert (1999) postulierte daher, dass der exocytotischen Freisetzung von ATP größere Bedeutung zukommt.

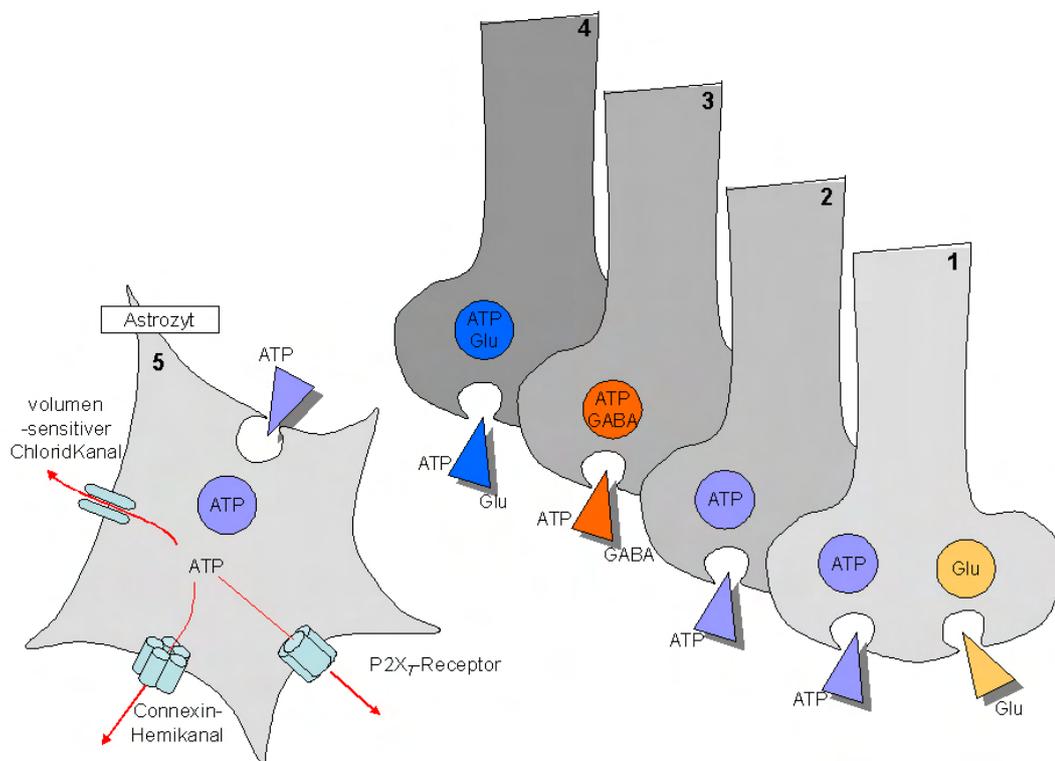


Abbildung 4: Freisetzungsmechanismen für ATP im ZNS

- (1): ATP-haltige Vesikel können neben Glutamat-haltigen in synaptischen Nervenendigungen co-existieren. Die Freisetzung beider erfolgt gleichzeitig, jedoch unabhängig voneinander
- (2): Freisetzung von ATP ohne die Beteiligung weiterer Neurotransmitter
- (3): Gemeinsame Speicherung und Freisetzung von ATP und GABA in einem Vesikel
- (4): Speicherung und Abgabe von ATP und Glutamat in einem Vesikel
- (5): Möglichkeiten der Ausschleusung von ATP in Gliazellen

Diese Grafik berücksichtigt nicht die Freisetzung von ATP durch ABC-Transporter

Außerhalb der Zelle werden Nukleotide im ZNS, wie auch im PNS, durch Einwirkung verschiedener, meist membranständiger Ekto-Nukleotidasen mit extrazellulärer Aktivi-

tätsdomäne zum jeweiligen Nukleosid hydrolisiert. Die beteiligten Enzyme lassen sich zur Zeit einer von vier Enzym-Familien zuordnen. Zur Familie der Ekto-Nukleosid-triphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDase) gehören acht Enzyme (NTPDase 1 - 8). Die Vertreter dieser Familie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrer zellulären Lokalisation. Bisher sind vier Spezies bekannt, die alle auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (NTPDase1 – 3 und 8) (Zimmermann 2001a, Bigonnesse et al. 2004). Im ZNS wird NTPDase1 auf Endothelzellen und Mikroglia exprimiert (Braun et al. 2000, 2001); NTPDase2 wird von neuronalen Vorläuferzellen / Stammzellen der späten Embryonalphase und auch auf eben diesen Zellen des adulten Gehirns exprimiert (Braun et al. 2003, Shukla et al. 2005). NTPDase3 konnte ebenfalls im Gehirn detektiert werden, wobei die genaue zelluläre Lokalisation dieses Enzyms noch nicht bestimmt wurde (Smith and Kirley 1998, Lavoie et al. 2004, Vorhoff et al. 2005). NTPDase8 ist im ZNS nicht existent (Bigonnesse et al. 2004). NTPDase4 – 7 liegen intrazellulär in der Membran des Golgi-Apparates oder des endoplasmatischen *Retikulum*.

NTPDase1 – 3 hydrolysieren sowohl Purin- als auch Pyrimidinnukleotide; wobei hier nur auf die Hydrolyse von Adeninnukleotiden eingegangen werden soll. NTPDase1 hydrolysiert ATP und ADP mit vergleichbarer Potenz, wobei ATP durch doppelte Dephosphorylierung direkt zu AMP umgewandelt wird. NTPDase2 hingegen weist eine Substratpräferenz für ATP auf, bei lediglich eingeschränktem Abbau auch von ADP; hier erfolgt nach der Hydrolyse des ATP eine extrazelluläre Anreicherung von ADP. Die NTPDase3 nimmt bei moderater Affinität für ATP eine Zwischenstellung ein; als Endprodukte der enzymatischen Aktivität entstehen sowohl ADP als auch AMP. Die zugrunde liegenden Untersuchungen erfolgten an CHO-Zellen mit rekombinanter NTPDase Expression und nachfolgender Analyse der Abbauprodukte mittels RP-HPLC (Heine et al. 1999, Zimmermann 2001a, Kukulski et al. 2005).

Zu den weiteren, Nukleotid-spaltenden Enzymen gehören (1) die Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/-phosphodiesterasen (E-NPPs mit den drei Vertretern NPP1 – 3), (2) die GPI-verankerten (Glykosylphosphatidylinosit) alkalischen Phosphatasen und (3) die ebenfalls GPI-verankerte Ekto-5'-Nukleotidase (Zimmermann 2001a), die eine breite Gewebeverteilung aufweisen. Die Enzyme der E-NPP-Familie bauen ATP (analog zur NTPDase1) direkt zum AMP ab. Die Ekto-5'-Nukleotidase spielt eine große Rolle in der Umwandlung von AMP zu Adenosin, und die alkalischen Phosphatasen sind ebenfalls an der Generierung von Adenosin aus AMP beteiligt (Zimmermann 2001a, Matsuoka and Ohkubo 2004). Die aus ATP als Substrat freigesetzten Produkte wie ADP, AMP

und vor allem Adenosin dienen teilweise ihrerseits als Signalmoleküle mit spezifischer Rezeptorinteraktion. Gleichzeitig werden ATP-sensitive Rezeptoren wie die P2X-Rezeptoren vor Desensibilisierung geschützt (Zimmermann 2006). So führte die experimentelle Induktion einer transienten Vorderhirn-Ischämie zu einer Hochregulation von NTPDase1 und der Ekto-5'-Nucleotidase in aktivierten Mikrogliazellen des Hippocampus, wodurch möglicherweise ein neuroprotektiver Schutzmechanismus für das umgebende Gewebe erzielt wird (Zimmermann 2006). Eine Expression der NTPDase2 in neuronalen Vorläuferzellen weist auf eine wichtige regulatorische Funktion bei der adulten Neurogenese hin (Braun et al. 2003, Zimmermann 2006).

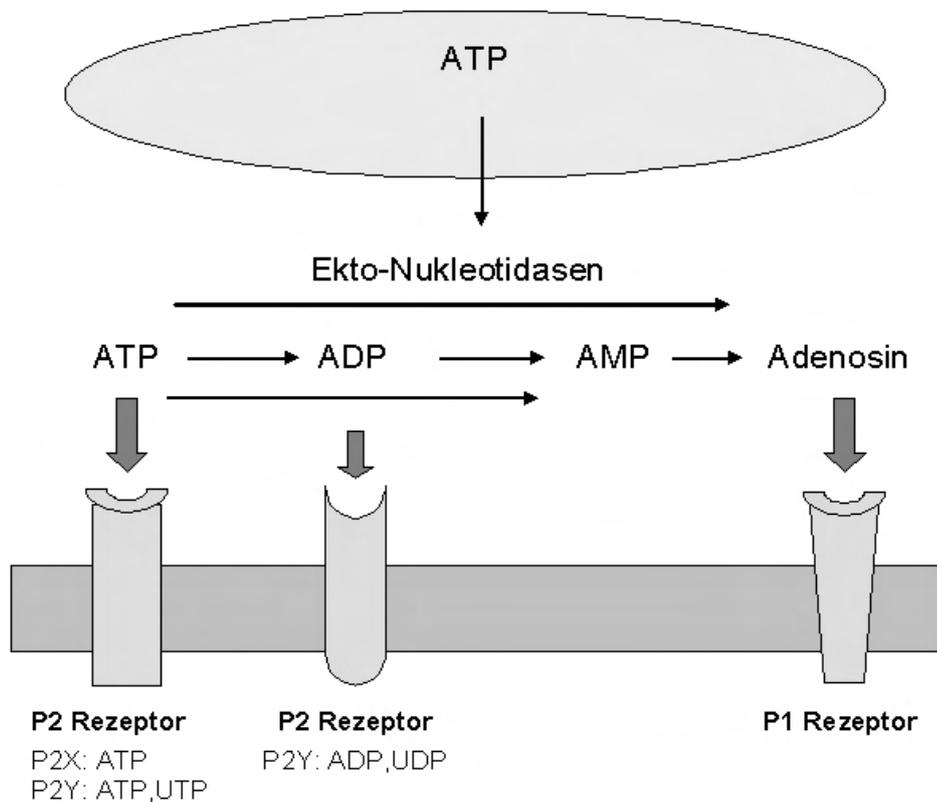


Abbildung 5: Extrazelluläre ATP-Hydrolyse

In den Extrazelluläreum freigesetztes ATP kann durch die enzymatische Aktivität meist membranständiger Ekto-Nucleotidasen zu ADP, AMP sowie Adenosin abgebaut werden, welche ihrerseits mit P2X-Rezeptoren (ATP), P2Y-Rezeptoren (ADP) oder P1-Rezeptoren (Adenosin) auf nachgeschalteten Zellen (Neuronen) interagieren.

1.6. Regulation der Körpertemperatur

1.6.1. Regelkreis zur Konstanthaltung der Körperkerntemperatur

Unter Thermoregulation versteht man die Fähigkeit homoiothermer Organismen, ihre Körperkerntemperatur (KT) unter wechselnden Umweltbedingungen und unterschiedlichen eigenen StoffwechsellLeistungen bei geringen Schwankungen konstant zu halten. Prinzipiell ist die Konstanz der Körperkerntemperatur als Resultat einer ausgeglichenen Wärmebilanz anzusehen; das heißt, sie setzt eine Parität von Wärmeproduktion und -abgabe voraus. Zu den Mechanismen der Wärmeabgabe zählen äußere Konduktion und Konvektion, evaporative Mechanismen wie Transpiration, Salivation oder Hecheln sowie die Vasodilatation peripherer Gefäße als Übergang von der inneren zur äußeren Konvektion (Simon, 1997). Mechanismen der Wärmeproduktion repräsentieren das Muskelzittern, die zitterfreie Thermogenese durch Aktivierung des braunen Fettgewebes sowie bei Tieren die Piloerektion zur Reduktion der äußeren Konvektion (Kanosue et al. 1998; Simon 1997). Die Koordination dieser efferenten thermoregulatorischen Mechanismen obliegt vornehmlich der *präoptischen Region* (POA) im Hypothalamus (Boulant 1981, Simon et al. 1996).

Um die KT in ihren engen Grenzen konstant zu halten, bedarf es einer präzisen Übermittlung thermischer Informationen an die integrativen Strukturen des Gehirns. Die afferente Signalübertragung wird über spezialisierte Sinneszellen, sogenannte Thermosensoren, vermittelt. Diese finden sich sowohl in der Haut (Necker 1977, Gentle 1989, Boulant 1998a), als auch im Körperinneren (Hensel 1981) und lassen sich in Warm- und Kaltsensoren unterteilen. Kutane Informationen beruhen hauptsächlich auf Afferenzen von Kaltsensoren (Heppelmann et al. 2001), während die sensorischen Strukturen im Körperkern vornehmlich warmsensitiv sind (Bicego et al. 2007). Dabei könnte es sich bei den Thermosensoren tiefer Körperzonen um multimodale Interaktionen mit anderen homöostatischen Regelkreisen handeln (Simon 2000). Die rezeptiven Strukturen beider Sensorarten bilden unmyelinisierte Nervenfaserverendigungen afferenter Neurone. Der Erregungsmechanismus basiert auf einer Aktivierung von Ionenkanälen, die bei spezifischen Temperaturen mit einem depolarisierenden Kationeneinstrom reagieren. Diese sogenannten thermo-TRP-Kanäle (*transient receptor potential*) decken in ihrer Gesamtheit bei Säugetieren die Spannweite (patho)physiologischer Temperaturen ab (Okazawa et al. 2002, Patapoutian et al. 2003). Die Informationsvermittlung findet schließlich codiert über die Impulsfrequenz der entsprechend beteiligten Neurone statt, die sich mit steigender Temperatur bei warmsensitiven Neuronen erhöht und bei kaltsensitiven Neuronen verringert, und umgekehrt. Die aktuellen Ist-Werte der

lokalen Hauttemperatur werden so über sensorische Afferenzen an die *Laminae I* und *II* im Hinterhorn des Rückenmarks übermittelt. Ähnliches gilt für Afferenzen aus tiefen Körperregionen. Hier erfolgt die Umschaltung auf Interneurone, bzw. spinale thermoresponsive Neurone. Im *Tractus spinothalamicus* (= Vorderseitenstrang) steigt der größte Teil der aufsteigenden Fasern zum Ventrobasalkomplex des Thalamus auf und führt über somatosensorische Areale des *Cortex* zur Wahrnehmung peripherer Temperatursignale (Perl 1990). Der kleinere Teil der aufsteigenden Fasern gelangt über retikuläre, multisynaptische Bahnen entweder direkt zum Hypothalamus, oder nach Umschaltung der Afferenzen im Bereich des medullären *Nucleus raphe* und der *Regio subcoerulea* zu hypothalamischen Strukturen wie der POA. Parallel zu den beschriebenen Afferenzen zeigen neueste *in vivo* und *in vitro* Studien, dass kutane Kältesensoren über das Rückenmark und den *Nucleus parabrachialis* direkt in die POA und den MnPO projizieren, wobei Glutamat als wesentlicher Neurotransmitter fungiert (Nakamura and Morrison 2008b). Die POA inklusive MnPO stellt somit einen wichtigen Endpunkt multisynaptischer, afferenter Nervenbahnen aus der Peripherie an das ZNS im Rahmen der Thermoregulation dar.

Neben den peripheren existieren auch zentrale, direkt im ZNS lokalisierte Thermosensoren (Simon et al., 1996). Schon 1938 identifizierten Magoun und Mitarbeiter die POA als zentrale thermosensitive Region, wobei die Anzahl warmsensitiver diejenige kaltsensitiver Neurone in diesem Bereich überwog (Hammel 1965, 1968, Boulant 2000). Diese Neurone sind somit in der Lage, die lokale hypothalamische Temperatur zu erfassen. Genauer betrachtet weist diese hypothalamische Struktur etwa 30 % warmresponsive, 5 % kaltresponsive und 65 % temperatur-unempfindliche Neurone auf (Boulant 1998, Griffin 2004). Somit integriert die POA Informationen, vermittelt sowohl über periphere als auch lokale, in der POA befindliche Thermosensoren, und vergleicht diese mit dem Soll-Wert der physiologischen Körpertemperatur. Daraufhin kommt es zu einer koordinierten Aktivierung thermoregulatorischer Effektormechanismen, unter Einbeziehung ebenfalls temperaturresponsiver Neurone im Bereich des posterioren Hypothalamus (Boulant and Dean 1986, Griffin et al. 1996, Nagashima et al. 2000). Die Körperkerntemperatur repräsentiert dabei das Resultat der Wärmebilanz, und der Soll-Wert bezeichnet denjenigen Bereich der KT, bei der „weder Entwärmungs- noch Kälteabwehrvorgänge in Tätigkeit sind“, bzw. sich Mechanismen der Wärmebildung- und -abgabe die Waage halten, und die Thermoregulation energetisch somit auf möglichst niedriger Stufe abläuft (Thermoindifferenzbereich oder Thermoneutralzone) (Brück 1985, Roth 2003). Die zellulär-molekulare Basis des Sollwertes ist *dato* unbekannt.

Die Steigerung der Wärmeproduktion wird durch Neurone im posterioren Hypothalamus gesteuert. Als ein Beispiel soll hier die Regulation der zitterfreien Thermogenese vorgestellt werden. Die letztendliche Wärmebildung resultiert aus der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien des braunen Fettgewebes (BAT). Ausgeprägt ist dieser Mechanismus bei winterschlafenden Säugetieren sowie z.B. Mensch und den meisten Haustieren im neonatalen / juvenilen Entwicklungsstadium (Heldmaier and Neuweiler, 2004), bei Rückbildung des BAT mit zunehmendem Lebensalter. Ausgehend von zentralnervösen, übergeordneten Zentren des autonomen Nervensystems, wie dem *Nucleus raphe pallidus* als caudalem Kerngebiet der Raphegruppe, ziehen efferente postganglionäre Fasern des Sympathikus nach Umschaltung im Rückenmark zum vorrangig interskapulär lokalisierten BAT. Dabei wird der *Nucleus raphe pallidus* seinerseits efferent von der POA, dem dorsomedialen Hypothalamus und pontinen inhibitorischen Neuronen aus dem zentralen Höhlengrau moduliert (Bamshad et al. 1999, Morrison 2004, Dimicco and Zaretsky 2007). Mittels Aktivierung noradrenerger β_3 -Adrenozeptoren kommt es zur gesteigerten Lipolyse im BAT, wobei die freigesetzten Fettsäuren durch mitochondriale β -Oxidation verstoffwechselt werden. Der durch die oxidative Phosphorylierung etablierte Protonengradient, der normalerweise durch Protonenfluss über die F_0/F_1 -ATPase die ATP-Synthese bewirkt, wird durch das membran-intrinsische Thermogenin entkoppelt (Golozoubova et al. 2001, Morrison 2004, Nedergaard et al. 2001). Im Gegenzug bildet sich aus der gesamten freien Enthalpie Wärme. Weitere Wärmebildungsmechanismen sind die Erhöhung der metabolischen Rate (Freaker and Oppenheimer 1995), Muskelzittern (Nagashima et al. 2000), Wärmekonservierung durch Konstriktion peripherer Gefäße (Johnson 2007, Wilson et al. 2007) und adaptives Verhalten wie willkürliche Muskelarbeit und das Aufsuchen einer wärmeren Umgebung.

Im Gegensatz zur Wärmebildung etwa bei kalter Umgebung ist eine aktive Kältebildung etwa bei warmer Umgebung nicht möglich, daher beschränkt sich das Herunterkühlen der Körpertemperatur auf die Intensivierung der Wärmeabgabe. Physikalische, trockene Formen der Wärmeabgabe wie Konvektion (Wärmeübertragung durch Wärme transportierende Teilchen), Konduktion (Wärmefluss in einem Kontinuum aufgrund eines Temperaturgradienten) oder Strahlung (langwellige Infrarotstrahlung aufgrund einer Temperaturdifferenz) können von Mensch und Tier lediglich durch ein modifiziertes Verhaltensrepertoire beeinflusst werden. Die regulatorisch kontrollierbaren Wärmeabgabemechanismen lassen sich in nicht-evaporative (periphere Vasodilatation) und evaporative (Transpiration, Hecheln, Salivation) unterteilen. Auch hier geht die Steue-

rung von der präoptischen Region des Hypothalamus aus. Als ein Beispiel seien die efferenten Konnektivitäten zur Regulation der peripheren Durchblutung angeführt. Diese geht von einer Aktivierung warmsensitiver Neurone in der POA aus (Zhang et al. 1995). Die Efferenzen der POA steigen durch das mediale Vorderhirnbündel ab (Kanosue et al. 1994), aktivieren spezifische Neurone des zentralen Höhlengraus auf Ebene der Pons, während zeitgleich POA-Neurone inhibitorische Signale an die vaso-konstriktorischen Neurone der ventralen tegmentalen Region senden (Romanovsky 2007). Die medullären prämotorischen Neurone, welche die sympathischen Efferenzen zur Regulation der peripheren kutanen Durchblutung (beispielsweise für die Arterien am Rattenschwanz, bzw. am Kaninchenohr) beeinflussen, werden von Neuronen des zentralen Höhlengraus und der tegmentalen Region innerviert und sind in den *Nuclei raphe* lokalisiert (Rathner and McAllen 1999, Nagashima et al. 2000, Ootsuka et al. 2004). Die induzierte Vasodilatation begünstigt die erhöhte Wärmeabgabe über das Blut an die Umwelt.

1.6.2. Fieber – ein Sonderfall der Thermoregulation

Fieber stellt einen pathophysiologischen Sonderfall der Thermoregulation dar und ist das Resultat einer aktiven Verstellung des Soll-Wertes der KT. Aufgrund des zu Beginn der Fieberantwort erfolgenden Anstiegs des Soll-Wertes reagiert der Organismus mit einer Aktivierung der Wärmebildungsmechanismen bei gleichzeitiger Reduktion der Wärmeabgabe. Anders als bei Hyperthermie, bei der die Wärmeabgabemechanismen des Körpers überlastet sind, kommt es also zu Beginn der Fieberphase nicht zu einer gesteigerten evaporativen oder kutanen Wärmeabgabe, sondern zu Vasokonstriktion und muskulärem Kältezittern. Diese Soll-Wert Verstellung wird induziert durch Pyrogene, welche die Aktivität hypothalamischer warmsensitiver Neurone offensichtlich derart beeinflussen, dass deren Impulsrate vermindert wird, während die der kaltsensitiven Neurone erhöht wird (Hori et al. 1991, Shibata and Blatteis 1991, Roth 2003, Roth et al. 2006). Durch die so entstandene Differenz wird letztendlich die Körperkerntemperatur so lange gesteigert, bis die Signale der warmsensitiven Afferenzen bzw. hypothalamischen Neurone mit denen der kaltsensitiven wieder im Gleichgewicht stehen.

Pyrogene sind Stoffe, in der Lage sind, Fieber und seine Begleiterscheinungen zu induzieren (Bennett and Beeson 1953). Exogene Pyrogene (wie beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien) induzieren als „*Pathogen-assoziierte molekulare Muster*“ (PAMPs) über Bindung an spezifische, membran-intrinsische oder -assoziierte Rezeptorproteine (sog. *Toll-like* Rezeptoren) von Makrophagen,

dendritischen Zellen oder etwa Mikrogliazellen die Bildung und Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine / endogener Pyrogene wie Interleukin-1 β und -6 (IL-1 β , IL-6) oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferone (INF) (Kopp and Medzhitov 1999, Rivest 2003).

Cytokine wirken vornehmlich lokal im Rahmen eines peripheren Entzündungsgeschehens, können jedoch - in größeren Mengen freigesetzt - in die Blutbahn übertreten, wodurch das Entzündungsgeschehen generalisiert. In diesem Fall induzieren die pro-inflammatorischen Cytokine die Akute-Phase-Reaktion (APR), welche eine Bezeichnung für die komplexen Prozesse einer akuten generalisierten Entzündung darstellt. Zu den zentralnervös gesteuerten Komponenten der APR gehören die Generierung von Fieber, den damit verbundenen Begleiterscheinungen wie Anorexie, Adipsie, Abgeschlagenheit und Somnolenz, die kollektiv als „sickness behavior“ bezeichnet werden (Kent et al. 1992, Dantzer 2001a,b, Kelley et al. 2003; Roth et al., 2006), sowie die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysenachse (HPA), aus der letztendlich die anti-inflammatorische Glucocortikoidfreisetzung aus der Nebenniere resultiert (Rothwell and Hopkins 1995). Dass Cytokine eine aktive Beteiligung an der Soll-Wert Verstellung haben, zeigen Studien, in denen Injektionen von TNF- α und IL-6 in den anterioren Hypothalamus von Meerschweinchen und Ratten Fieber induzierten (Blatteis et al. 1990, Klir et al. 1993).

Dabei stellt sich die Frage, wie zirkulierende Cytokine in das Parenchym des Hypothalamus gelangen, und ob Cytokine nur in der Peripherie oder auch intracerebral gebildet werden, und letztlich die finalen Mediatoren der Fiebergenese darstellen oder nicht (Wuchert et al. 2008, 2009). Die präoptische Region als *Locus* des Soll-Wertes ist durch eine physiologische Barriere, die sogenannte Blut-Hirn Schranke (BHS) von der peripheren Zirkulation weitgehend isoliert. Hier sind die Endothelien der Kapillaren nicht fenestriert, sondern besitzen *tight junctions* = *Zonulae occludentes* (siehe Kap. 1.1) (Bradbury 1984). Wie schon erwähnt, ist die BHS lediglich im Bereich der CVOs nicht oder nur unzureichend ausgebildet und die Endothelien somit *per se* für zirkulierende Cytokine mit Molekulargewichten von 17 – 18 kDa (IL-1 β , TNF- α , nicht glykosiliert) bzw. 21 – 28 kDa (IL-6, \pm glykosiliert) zumindest eingeschränkt durchlässig (Roth et al. 2006). Eine besondere Bedeutung in der Fiebergenese kommt hierbei dem OVLТ zu, das als ventrale Komponente der *Lamina terminalis* schon durch seine unmittelbare Nähe zur POA und dem MnPO prädestiniert für eine Beteiligung an der Fiebergenese ist (Hashimoto et al. 1994, Blatteis 2000, Harré et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit besteht im aktiven Transport der Cytokine durch die BHS. Dies wurde für

IL-1 β , IL-6 und TNF- α nachgewiesen (Banks et al. 1995). Eine schnelle Sättigung der Transportsysteme und entsprechend geringe Kapazität schließt diesen Weg für eine Hauptbeteiligung bei der Fiebergenese jedoch aus. Das Hauptaugenmerk liegt daher einerseits auf der rezeptorunabhängigen Diffusion der Cytokine durch fenestrierte Kapillaren im Bereich der CVOs (Roth et al. 2004), wo sie an ihren spezifischen Rezeptoren auf Neuronen oder Gliazellen wirken. Andererseits können Cytokine auch ohne Verlassen der Blutbahn mit spezifischen Rezeptorproteinen an der luminalen Membran von Endothelzellen der Gehirnkapillaren binden (Schlitz and Sawchenko 2003, Matsumura and Kobayashi 2004).

In beiden Fällen wird die zentrale Fieberantwort über nachgeschaltete Botenstoffe induziert. Vor allem dem Eikosanoid Prostaglandin E₂ (PGE₂) kommt über seine Wirkung an EP₃-Rezeptoren in der POA und im MnPO eine finale Bedeutung in der Fiebergenese zu. So reagierten EP₃-Rezeptor knock-out Mäuse auf Stimulation mit LPS, IL-1 β und PGE₂ nicht mehr mit einer Fiebergenese (Ushikubi et al. 1998). Die lokale, molekulargenetische Deletion der EP₃-Rezeptor Expression im Bereich des MnPO adulter Mäuse konnte ebenfalls die PAMP-induzierte Fieberantwort eliminieren (Lazarus et al. 2007). Als lipophile und niedermolekulare, parakrine Botenstoffe können Prostaglandine passiv aus dem Zytosol durch die Zellmembran diffundieren (Schuster 1998). Die Synthese der PG verläuft über den sogenannten „Cyclooxygenase-Weg“ mit Phospholipiden der Zellmembran als Ausgangsprodukt. Durch Einwirkung der Phospholipase A₂ (PLA₂) entsteht Arachidonsäure, die durch Cyclooxygenasen (COX) und verschiedene Zwischenschritte u.a zu PGE₂ umgewandelt wird. Die durch proinflammatorische Cytokine (insbesondere IL-1 β) induzierte PGE₂-Synthese verläuft über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, woraufhin dann in Endothelzellen des Gehirns die Expression der COX ausgelöst wird (Laflamme et al. 1999). Neueste Studien an Ratten zeigten, dass auch IL-6 über den Transkriptionsfaktor STAT3 und nachfolgende COX-Expression an der PGE₂-Synthese beteiligt ist. Ratten, bei denen intraperitoneal ein IL-6 Antiserum und nachfolgend subcutan LPS injiziert wurde, zeigten eine verminderte Expression der COX-mRNA (Rummel et al. 2006). Die Kinetiken systemisch und intrahypothalamisch gemessener TNF- α - und IL-6-Konzentrationen während der febrilen Phase unterscheiden sich gravierend. Der TNF- α Spiegel im Blut erreicht sein Maximum sehr schnell nach peripherer Injektion von LPS gefolgt von einem raschen Abfall bis unter die Nachweisgrenze. Im Hypothalamus korreliert der TNF- α Peak mit dem Peak des Fiebers. IL-6 hingegen korreliert im Blut mit der Fieberantwort, während sein intrahypothalamischer Peak schon in der ersten Phase des Fiebers liegt. Zudem konnte bei der Ratte eine hypothalamische Mikro-

Injektion von IL-1 β spezifischen Antikörpern den IL-6 Anstieg im Gehirn verhindern, während die Konzentration an systemischem IL-6 unverändert blieb (Roth et al. 1993, Klir et al. 1994, Roth 1998). Dies untermauert die These einer lokalen, hypothalamischen Cytokininduktion (Nakamori et al. 1993).

Ein erster Fieberanstieg nach Infektion oder etwa systemischer Injektion bakterieller oder viraler PAMPs liegt oft schon vor dem Auftreten signifikant erhöhter Cytokinpiegel in der peripheren Zirkulation vor. Neben den oben beschriebenen humoralen Signalwegen wird daher der schnellen afferenten neuronalen Signalübertragung große Bedeutung in der Fiebergenese zugeschrieben; dabei kommt dem *Nervus vagus* eine besondere Rolle zu. Der *Nervus vagus* enthält neben den klassischen parasympathischen efferenten Anteilen zum größten Teil viszerosensorische afferente Fasern, die Informationen etwa aus der Peritonealhöhle zum Gehirn übermitteln (Ritter et al. 1992). Subdiaphragmale Vagotomie mit anschließender Applikation pyrogener Substanzen führte zu einer Abschwächung bis hin zur Unterdrückung der zentralnervösen Komponenten der APR wie „sickness behavior“ (Konsman et al. 2000), Fieber (Sehic and Blatteis 1996, Romanovsky et al. 1997) oder Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema et al. 1995). Dies ist allerdings abhängig von der Pyrogenkonzentration sowie dem Injektionsort. Niedrige, intraperitoneal (i.p.) verabreichte Pyrogendosen werden in ihrer Wirkung durch Vagotomie markant eingeschränkt, wohingegen hohe Konzentrationen an Pyrogen i.p. oder eine intramuskuläre Pyrogeninjektion bei vagotomierten Tieren nicht zu einer Suppression des Fiebers führten (Goldbach et al. 1997). Vagale sensorische Afferenzen exprimieren IL-1 β und PGE₂ spezifische Rezeptoren (Ek et al. 1998). Vom medullären NTS aus, in welchem die vagalen Afferenzen terminieren, wird Noradrenalin -vermittelt schließlich das Signal an die POA weitergeleitet, in der dann die PGE₂-Synthese und nachfolgend die Sollwert-Verstellung erfolgen (Sehic and Blatteis 1996).

1.6.3. Physiologische Bedeutung purinerge Signalübertragung in der Thermoregulation

Neben Prostaglandin E₂ werden vor allem der gasförmige Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) und purinerge Agonisten wie ATP oder Adenosin als wichtige sekundäre Neuromodulatoren im Rahmen der Homöostase der Körpertemperatur diskutiert.

Dabei ergaben sich schon auf der Ebene der peripheren Thermosensoren Interaktionen zwischen den in Kap. 1.6.1 erwähnten TRP-Ionenkanälen, denen bei der Erregung afferenter Wärmesensoren möglicherweise eine initiale Rolle zukommt, und Purinozep-

toren. Der Fokus der Interaktion mit Purinozeptoren lag *dato* vor allem auf der Modulation des TRPV-1 Kanals. TRPV-1 wird erst bei Temperaturen von über 42°C aktiviert und stellt damit eher einen polymodalen Schmerzrezeptor der Haut sowie Viszera dar, der u.a. auch auf Hitze reagiert, als dass er definitiv der Temperaturperzeption zuzuordnen wäre (Patapoutian et al. 2003). Nicht-thermische Faktoren noch unbekannter Natur scheinen jedoch vor allem im Bereich der Viszera TRPV-1 Kanäle zu aktivieren und somit zu einer Hemmung autonomer Mechanismen der Kälteabwehr wie kutaner Vasokonstriktion sowie Thermogenese zu führen (Steiner et al. 2007). Der TRPV-1 Kanal wird unter anderem durch metabotrope, purinerge Rezeptoren (P2Y₁) derart modifiziert, dass sein Temperaturschwellenwert gesenkt wird und er somit durch niedrigere, physiologisch relevante Temperaturen aktivierbar ist. Dies führte zu einer neuen Hypothese, die besagt, dass metabotrope purinerge Rezeptoren durchaus an der Temperaturperzeption bzw. Schmerzinduktion beteiligt sein könnten (Tominaga et al. 2001). Für eine mögliche Desensibilisierung kutaner Warmsensoren durch die Aktivierung ionotroper P2X₃-Rezeptoren sprechen die detaillierten Studien einer japanisch-amerikanischen Kooperationsstudie. So führte ein kutaner thermischer Stimulus von 45°C, der an einer Hinterextremität der Maus gesetzt wurde, zu einer signifikant höheren Fos Expression im ipsilateralen Dorsalhorn des Rückenmarks (vor allem *Laminae I* und *II*) der P2X₃ knock-out Tiere als in der Kontrollgruppe des Wildtyps (Shimizu et al. 2005). Das Fos Protein als Translationsprodukt des *c-fos* Gens repräsentiert einen nukleären Transkriptionsfaktor, durch dessen immunhistochemische Visualisierung im Gehirnschnitt es möglich ist, die Aktivierung von Neuronen als Resultat der elektrischen Exzitation mit nachfolgender Genexpression im zeitlichen Zusammenhang darzustellen (Morgan and Curran 1989). Die potentielle Rolle von P2X₃-Rezeptoren im Rahmen der afferenten thermischen / schmerzinduzierten Signalübertragung wird durch immunhistochemische Untersuchungen an sensorischen Ganglien der Ratte gestützt. Etwa 40 % der Neurone der Hinterwurzelganglien (DRG) der Ratte exprimieren P2X₃ und projizieren in die *Lamina II* des Dorsalorns (Vulchanova et al. 1998) und von hier zu hypothalamischen Zentren mit Bedeutung für die Regulation der Körpertemperatur (siehe Kap. 1.6.1). Andererseits konnte durch das Ausschalten von für ionotrope P2X₃-Rezeptoren kodierenden Genen die durch ATP ausgelösten thermischen Vermeidungsreaktionen, sprich das Schmerzverhalten, bei Mäusen nur teilweise reduziert werden (Cockayne et al. 2000, Souslova et al. 2000).

Auf der efferenten Seite des thermoregulatorischen Regelkreises scheint ein Zusammenhang zwischen der Expression prä-synaptischer P2-Rezeptoren an sympathischen Varikositäten und der Konstriktion peripherer Gefäße im Rahmen der Kälteabwehr zu

bestehen. Eine Reduktion der Außentemperatur von 25°C auf 10°C führte bei Ratten zur lokalen Freisetzung von ATP, welches prä-synaptische, exzitatorische P2-Rezeptoren aktivierte und so die Exocytose von Noradrenalin aus sympathischen Varikositäten induzierte, welches seinerseits α_1 - und α_2 -Adrenozeptor vermittelt zur Konstriktion der glatten Muskelzellen peripherer Blutgefäße führte (Koganezawa et al. 2006). Diese ersten *in vivo* Studien werden durch mehrere frühere *in vitro* Studien gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass post-ganglionäre sympathische Nervenfasern sowohl inhibitorische als auch exzitatorische P2-Rezeptoren aufweisen, welche die Freisetzung von Noradrenalin modulieren können (von Kugelgen et al. 1989, 1993, Sperlagh and Vizi 1991, Sperlagh et al. 2000). Eine direkte Interaktion noradrenerger und purinergener Transmittersysteme auf der Ebene peripherer Effektorsysteme der Thermoregulation ergab sich auch für die Aktivierung des BAT im Rahmen der zitterfreien Thermogenese. So induzierte ATP, möglicherweise noradrenerg vermittelt, die mikrokalorimetrisch erfassbare Wärmeproduktion isolierter brauner Fettzellen neonataler Ratten, basierend auf einer transienten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in diesen Zellen (Lee et al. 1997, 2005).

In vivo Studien hinsichtlich einer Beteiligung von P2X- bzw. P2Y-Purinozeptoren an thermoregulatorischen Prozessen auf der Ebene des anterioren Hypothalamus als Regler für die Homöostase der Körperkerntemperatur sind *dato* in der Fachliteratur nur limitiert verfügbar. So bedingte unter thermoneutralen Versuchsbedingungen bei einer RT von 25°C (Romanovsky et al. 2002) die Mikroapplikation des P2X-Agonisten α,β me-ATP in den dritten Hirnventrikel (intracerebroventrikulär = icv.) - also in die unmittelbare Nähe der präoptischen Region - eine Reduktion der stressinduzierten Erhöhung der Körpertemperatur bei Ratten, ohne jedoch die Basalwerte der KT unter Ruhebedingungen maßgeblich zu beeinflussen (Gourine et al. 2002, 2004). Dabei stellte das „handling“ der Versuchstiere im Rahmen der icv. Applikation den Stressor dar. Die zentrale Mikroapplikation des generellen P2X-Rezeptor Antagonisten PPADS verursachte hingegen eine verstärkte transiente Erhöhung der KT während des 60-minütigen Stress *peak*. Ebenfalls als P2-Rezeptor Antagonist fungierendes Suramin induzierte andererseits einen lang anhaltenden (360 min) Anstieg der basalen KT sowohl bei einer RT von 25°C als auch 30°C. Bei kalter RT von 10°C und gleichem Versuchsansatz sank die KT der Versuchstiere nach icv. Applikation des Agonisten α,β me-ATP signifikant um etwa 2°C für einen Zeitraum von 45 min ab; dieser Effekt erwies sich in Gegenwart von Suramin als reversibel und eindeutig Purinozeptor-vermittelt (Gourine et al. 2002). Vor allem der experimentelle Einsatz der Antagonisten weist somit auf eine thermolytische Wirkung von hypothalamisch exprimierten P2-Rezeptoren unter

Bedingungen der stressinduzierten Hyperthermie wie auch euthermeren Verhältnissen hin. Die Beteiligung von ATP als endogenem Purinozeptor Agonisten im Dienste der hypothalamischen Temperatur-Homöostase wird durch elektrophysiologische *in vitro* Versuche der gleichen Arbeitsgruppe gestützt, in denen die Impulsfrequenz warmsensitiver Neurone im 400 µm dicken coronalen Gehirnschnittpräparationen auf der Ebene der POA nach Applikation von 50 mM/L ATP in 60 % der Fälle zunahm (Gourine et al. 2004).

Etwa von LPS-aktivierten Makrophagen freigesetzte pro-inflammatorische Cytokine sind bekanntermaßen pyrogen (siehe Kap. 1.6.2). Vergleichende ATP- und LPS-Exposition von Monocyten und Lymphocyten von P2X₇ knock-out Mäusen mit denen des Wildtyps zeigten unterschiedliche morphologische und pharmakologische Reaktionen beider Zelltypen; so veränderten Blutzellen von Wildtyp-Tieren ihre Form und setzten IL-1β frei, Zellen der knock-out Tiere jedoch nicht (Labasi et al. 2002). Der intrazelluläre C-Terminus des P2X₇-Purinozeptors weist ein potentiell Bindungsmotiv für LPS auf, womit sich erklären ließe, dass der in immunkompetenten Zellen exprimierte P2X₇-Rezeptor durch die direkte Interaktion mit LPS und ATP aktiviert werden kann (Denlinger et al. 2001). Die signifikante Reduktion zirkulierender Konzentrationen an IL-1β, IL-6 und TNF-α in mit LPS behandelten Ratten durch die P2-Antagonisten PPADS und Brilliant Blue G deutete zudem auf eine wichtige Funktion purinerg Agonisten in der Fiebergenese hin (Gourine et al. 2005). Das Ergebnis einer attenuierten Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine in der Peripherie durch P2X-Antagonisten könnte für die einhergehende partielle Suppression der LPS-induzierten Fieberantwort verantwortlich zeichnen.

Eine zentrale Funktion purinerg Systeme konnte durch *in vitro* Studien gezeigt werden, in welchen ATP in der Lage war, die Freisetzung von IL-1β (Perregaux and Gabel 1998, Chakfe et al. 2002), IL-6 (Inoue 2002) und TNF-α (Hide et al. 2000) im ZNS, vor allem aus Mikroglia, zu induzieren. Während sich die intrahypothalamische Mikroapplikationen von α,βme-ATP, PPADS oder Suramin kurz vor der systemischen LPS-Injektion (50 µg/kg KG) als unwirksam hinsichtlich einer möglichen Modulation der ersten sowie zweiten Phase der Fieberantwort erwiesen, konnte von Gourine und Mitarbeitern (2002, 2004) demonstriert werden, dass die zentrale Verabreichung von α,βme-ATP etwa 2,5 Std nach Injektion von bakteriellem LPS bei Ratten zu einem Abfall der durch LPS induzierten Fieberantwort von etwa 39°C auf durchschnittlich 37,8°C führte. Zu diesem Zeitpunkt konnte die zweite Komponente der klassischen, biphasischen Fieberantwort auf Stimulation mit LPS verzeichnet werden (Gourine et al. 2002). Die späte

sitiver POA-Neurone Pyrogen-vermittelt schon so weit herabgesetzt, dass P2X-Antagonisten keinen Einfluss mehr nehmen können. Zusätzlich induziert α, β -me-ATP im febrilen Zustand und Umgebungstemperaturen von 25 C durch Steigerung der Impulsfrequenz warmsensitiver Neurone einen markanten Abfall der KT, der bei afebrilen Tieren nicht beobachtet wurde. In Abb. 6 ist diese Hypothese schematisch skizziert.

Im Unterschied zu den an der Ratte durchgeführten Versuchen bewirkte am wachen Kaninchen die Mikroapplikation verschiedener P2X-Rezeptor Antagonisten (PPADS, BBG und oATP) in den Bereich des anterioren Hypothalamus eine Verstärkung vor allem der zweiten Fieberphase, induziert durch die systemische Injektion von bakteriellem LPS (0,5 μ g/kg KG), wohingegen die basale Körpertemperatur in keiner Weise beeinflusst wurde (Gourine et al. 2007). Die Tatsache, dass sich PPADS und die P2X₇-Purinozeptor spezifischen Antagonisten oATP und BBG dabei als äquipotent erwiesen, spricht gegen eine Beteiligung von P2X₇-Rezeptoren. So ist der IC₅₀ für PPADS (50 μ M/L) an P2X₇ bedeutend höher als für oATP und BBG (Ralevic and Burnstock 1998, North 2002). Da sich PPADS und BBG an P2X₂-Purinozeptoren als etwa äquipotent zeigen (North 2002) und P2X₂ im Hypothalamus stark exprimiert wird (Xiang et al. 1998b, Kanjhan et al. 1999, Loesch et al. 1999, Yao et al. 2003), sind möglicherweise homomere P2X₂- oder heteromere P2X_{2/3}- P2X_{2/6}-Rezeptoren die Zielstrukturen für die oben beschriebenen, purinerg vermittelten Effekte. Durch den Einsatz amperometrischer Biosensoren für ATP und Adenosin *in vivo* war es möglich, am wachen Kaninchen im Bereich des anterioren Hypothalamus die Freisetzung von ATP / Adenosin während der durch LPS hervorgerufenen Fieberantwort zu analysieren. Die initiale Fieberphase nach Injektion von LPS in die Ohrvene des Kaninchens ging dabei mit einem markanten Anstieg an extrazellulärem ATP im anterioren, nicht jedoch posterioren Hypothalamus einher (Gourine et al. 2007). Zeitversetzt stieg ebenfalls die Adenosinkonzentration im anterioren Hypothalamus an. Hieraus kann gefolgert werden, dass im Rahmen einer systemischen Inflammation im anterioren Hypothalamus freigesetztes ATP als lokaler, antipyretischer Mediator an der Begrenzung der Pyrese beteiligt sein könnte. Bei dem ungewöhnlichen Versuchsansatz einer LPS-Applikation direkt in das *Corpus striatum* von Ratten verzeichnete Choi et al. (2007) lokal eine vermehrte Expression von P2X₇ und schrieben dem ATP somit eher eine inflammatorische Wirkung zu.

Adenosin als Abbauprodukt des ATP wird schon länger als Mediator oder Botenstoff im Rahmen der Thermoregulation, der Fiebergenese oder entzündlicher Prozesse diskutiert. Dabei schreibt die Literatur systemisch wirkendem Adenosin vor allem anti-inflam-

matorische Effekte zu. So induzierte CF-101 als spezifischer Agonist an metabotropen A_3 -Rezeptoren eine Deregulation des inflammatorischen NF- κ B Signalweges in Leukozyten (Bar-Yehuda et al. 2007). Im verletzten Gewebe wurden über Adenosin-Rezeptoren die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren aus Makrophagen und Monozyten deutlich reduziert (Sajjadi et al. 1996, Hasko et al. 2000, Sullivan 2003). Darüber hinaus förderte Adenosin die Freisetzung anti-inflammatorischer Cytokine wie IL-10 (Hasko et al. 1996). Dabei gibt es verstärkte Hinweise darauf, dass LPS an Strukturen des A_1 -Rezeptors auf Endothelzellen bindet und so in direkter Interaktion parallel zum inflammatorischen (über TLR) ein anti-inflammatorischer Weg beschritten werden kann (Wilson and Batra 2002).

Die Bedeutung für die hypothalamische Temperaturhomöostase betreffend, induzierten bilaterale Mikroinjektionen sowohl des relativ unselektiven A_1 -/ A_2 -Agonisten NECA als auch des spezifischen A_1 -Agonisten CCPA in die POA von Ratten einen Abfall der Kerntemperatur (Ticho and Radulovacki 1991). Auch andere Arbeitsgruppen konnten nach icv. Applikation von Adenosin oder P1-Rezeptor Agonisten bei Mäusen eine Abnahme der KT verzeichnen (Anderson et al. 1994), ebenso wie nach der Injektion eines spezifischen A_1 -Agonisten in die anteroventrale präoptische Region (Barros et al. 2006). Bei LPS-induziertem Fieber (1 μ g/kg BW iv.) konnte für das Kaninchen durch systemische Injektion von Adenosin-Analoga das Fieber deutlich gesenkt werden (Matuszek and Gagalo 1997), wobei die zugrunde liegenden Mechanismen *dato* ungeklärt sind. Es ist seit längerem bekannt, dass unter hypoxischen Bedingungen die KT abfällt (Dupre and Owen 1992, Clark and Fewell 1994, Mortola and Seifert 2000) und dabei ein erhöhter cerebraler Adenosinspiegel gemessen werden kann (Winn et al. 1981, Zetterstrom et al. 1982). Anbetracht der Tatsache, dass Ektonukleotidasen im ZNS exprimiert werden (Zimmermann 1996, Matsuoka and Ohkubo 2004), besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Interaktion von Adenosin und ATP im Rahmen der Modulation zentraler Mechanismen der hypoxisch-induzierten Hypothermie. Um dieser Fragestellung nachzugehen, beschäftigten sich Chevrier et al. (2006) mit der zentralnervösen Interaktion von P1- und P2X-Rezeptoren bei Ratten unter Versuchsbedingungen einer hypobaren (485 und hypoxisch (75 mmHg pO_2) induzierten Hypothermie (Chevrier et al. 2006). Dabei hatte die icv. Applikation von Suramin *per se* keinen Effekt, wohingegen die Co-Applikation von Suramin icv. und dem P1-Rezeptorantagonisten CGS-15943 systemisch die Hypothermie markant zu unterdrücken vermochte. Dies führte zu dem Schluss, dass Adenosin und ATP sich hinsichtlich der frühen (Adenosinwirkung) und späten (ATP-Wirkung) Phasen der hypobaren, hypoxisch induzierten Hypothermie ergänzen. Weiterhin werden Untersu-

chungen gestützt, in welchen die Applikation von P1-Agonisten die KT senkt, und diejenige von P2X-Antagonisten unter hypothermen Bedingungen zu einem Anstieg der KT führen.

1.7. Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts

1.7.1. Regelkreis zur Konstanthaltung des Salz- und Wasserhaushalts

Im Rahmen der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes stellen das Volumen und die Natriumkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit (EZF) die wichtigsten Regelgrößen dar, wobei beide eng miteinander verbunden sind, da eine Modulation etwa der Tonizität der EZF zu einer sekundären Volumenverschiebung zwischen dem extra- und intrazellulären Flüssigkeitsraum führt. Veränderungen des Volumens bzw. der Tonizität der EZF, beispielsweise durch ausgeprägtes Schwitzen (hypertone Hypovolämie), Blutverlust (isotone Hypovolämie) oder Wasserintoxikation (hypotone Hypervolämie), werden durch periphere und/oder zentrale Osmo-, Natrium- oder Volumenrezeptoren detektiert (Robertshaw 1989; Bourque et al. 1994).

Vergleichbar zum Regelkreis der Thermoregulation findet sich das übergeordnete Regelzentrum zur Konstanthaltung der EFZ im Bereich des anterioren Hypothalamus. Dort erfolgt die Integration der afferent übermittelten Informationen bezüglich des Status von Volumen und Tonizität der EZF mit nachfolgender neuronaler, neuroendokriner oder vegetativer, efferenter Kontrolle zentraler (Wasseraufnahme, Salzappetit, Vasopressinfreisetzung) und peripherer (Nierenfunktion, Sympathikusaktivität) Effektorsysteme.

Vasopressin (= AVP = Antidiuretisches Hormon = ADH) ist ein im Hypothalamus, genauer in den magnozellulären Neuronen (MNCs) des *Nucleus paraventricularis* und des *Nucleus supraopticus* synthetisiertes Nonapeptid, das über den *Tractus supraopticohypophysialis* mittels axonalem Transport den Hypophysenhinterlappen erreicht. Die Abgabe in das Gefäßsystem korreliert mit dem Frequenzmuster der Aktionspotentiale der MNCs (Bicknell 1988, Poulain and Theodosis 1988; Renaud and Bourque 1991). Registrieren Osmorezeptoren einen geringfügigen Anstieg der Natriumkonzentration in der EZF (= Tonizität), bzw. systemische Dehnungsrezeptoren eine markante Reduktion des EZF-Volumens, so wird ADH vermehrt aus der Neurohypophyse in den Blutkreislauf abgegeben und bewirkt an der Niere als Zielorgan die Aquaporin-2 vermittelte Rückresorption von Wasser (Boone and Deen 2008).

Periphere Osmorezeptoren sind im Bereich der Leber, vor allem deren Pfortader, lokalisiert. So bedingten Infusionen einer hypertonen Lösung in das Pfortadersystem der Ratte unmittelbar ein reduziertes Urinvolumen (Haberich 1968). Elektrophysiologische Studien demonstrierten, dass die neuronale Aktivität hepatischer Afferenzen (C-Fasern) des *Nervus vagus* von Meerschweinchen (Niiijima 1969), Ratten (Adachi et al. 1976) und Kaninchen (Andrews and Orbach 1974) durch Infusion hyper- oder hypotoner Lösungen in den Pfortaderbereich moduliert werden konnten. Die Hypothese, dass der *Nervus vagus* afferente Fasern peripherer Osmorezeptoren zum ZNS führt, wurde durch Studien an vagotomierten Ratten gestützt (Baertschi and Vallet 1981). Neben dem *Nervus vagus* übermittelt auch der *Nervus splanchnicus* osmotisch relevante Informationen ans ZNS (Choi-Kwon and Baertschi 1991). Afferenzen beider Nerven projizieren über den NTS (Kobashi and Adachi 1985) und die ventrolaterale *Medulla oblongata* (King and Baertschi 1991, 1992) direkt zu den MNCs des PVN (Ciriello and Calaresu 1980, Kannan and Koizumi 1981) sowie zu Neuronen des MnPO (Saper and Levisohn 1983, Edwards et al. 1989; Bourque 2008). Die Bedeutung des MnPO als integratives Kerngebiet bei der Verarbeitung afferenter osmotischer Signale und der nachfolgenden Kontrolle efferenter Effektororgane wird durch eine Studie von King und Mitarbeitern (1991) bestätigt. Im MnPO der Ratte gesetzte Läsionen konnten die durch orale Infusion hypertoner Lösungen induzierbare ADH-Freisetzung abschwächen. Dies führte zu der These, dass periphere osmotische Signale im Bereich des MnPO prozessiert werden, bevor sie die MNCs erreichen, und impliziert zusätzlich, dass Osmorezeptoren im Bereich des Oropharynx an der frühen, präabsorptiven Osmoregulation beteiligt sind (Stricker and Hoffmann 2007). Periphere Volumenrezeptoren (Dehnungssensoren) befinden sich in der *Vena cava*, im rechten Atrium, Drucksensoren hingegen im Aortenbogen und im *Sinus carotis*. Sie detektieren Änderungen des Blutvolumens oder des arteriellen Blutdrucks. Über eine Abnahme der Frequenz afferenter Nervenimpulse wird die ADH-Sekretion erhöht (Bisset and Chowdrey 1988). Afferenzen des *Nervus vagus* und des *Nervus glossopharyngeus* projizieren über den NTS in den MnPO sowie die MNCs von PVN und SON (Card et al. 2006).

Indirekte erste Hinweise auf die Existenz zentraler Osmo- bzw. Natriumsensoren lieferten Studien an wachen Hunden (Verney 1947). Infusionen hypertoner NaCl-Lösung in die *Arteria carotis* dieser Tiere lösten eine ADH-bedingte Antidiurese aus. Zehn Jahre später konnte mittels intracranialer Mikroapplikations- und Ablationsstudien, ebenfalls an Hunden durchgeführt, die Lokalisation der zentralen Osmorezeptoren auf den anterioren Hypothalamus eingegrenzt werden (Jewell and Verney 1957; Bie 1980; Robertshaw 1989; Bourque et al. 1994; Bourque and Oliet 1997). Mittlerweile weiß man, dass

die zentralen Osmorezeptoren in der antero-ventralen Region des dritten Hirnventrikels (AV3V) und der *Lamina terminalis* exprimiert sind (Bourque et al. 1994, McKinley et al. 2004). Infusionen konzentrierter Harnstofflösungen, ebenfalls in die *Arteria carotis* bei Schafen, führten nicht zu einer ADH-Sekretion und Stimulation des Trinkverhaltens. Da Harnstoff die BHS rasch überwindet und dennoch - im Vergleich zu einer hypertonen NaCl-Lösung - keine ADH-vermittelte Antidiurese induzierte, lag die Vermutung nahe, dass Osmorezeptoren außerhalb der BHS, also im Bereich der sensorischen CVOs (OVLT und SFO) lokalisiert sein könnten (McKinley et al. 1978). Dennoch führten gezielte Läsionsstudien von OVLT und/oder SFO bei Hunden, Ratten, Schafen, Enten und Hühnern nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der osmotisch induzierten ADH-Sekretion (Thrasher et al. 1982, Mangiapane et al. 1984, McKinley et al. 1984; Gerstberger et al. 1997), wohingegen eine Ablation der gesamten *Lamina terminalis* (inklusive des MnPO) beim Schaf hierzu in der Lage war (McKinley et al. 1999).

Die Strukturen der *Lamina terminalis* weisen mannigfaltige neuronale Verbindungen untereinander sowie zu zahlreichen anderen Hirnregionen auf. So verdeutlichten antero- und retrograde Tracingstudien, durchgeführt in erster Linie an der Ratte, die Konnektivitäten innerhalb der *Lamina terminalis* sowie auch zu den MNCs von PVN und SON (Miselis et al. 1979, Wilkin et al. 1989, Gu and Simerly 1997, McKinley et al. 2003). Es bestehen reziproke Verbindungen zwischen OVLT, SFO und MnPO (McKinley et al. 2003) sowie bisynaptische Konnektivitäten von SFO und OVLT zum SON über Synapsen im MnPO (Honda et al. 1990a, Oldfield et al. 1991). Mikroinjektionen eines neurotrophen, polysynaptisch transportierten *Pseudorabies* Virus (PRV) in den HHL von Ratten ergaben nach 16 Std die zu erwartende retrograde Projektion in die Zellkörper der zugehörigen MNCs von SON und PVN, nach 20 - 28 Std in die Peripherie des SFO, die „dorsal cap“ des OVLT und den gesamten MnPO (McLear et al. 1992). Elektrophysiologische Studien an Urethan-narkotisierten Ratten *in situ* deckten die Bedeutung des Zusammenspiels von MnPO, OVLT, AV3V-Region und SON im Rahmen der Osmoregulation auf. Zellen des PVN/SON wiesen nach direkter osmotischer Stimulation des MnPO durch hypertone NaCl-Lösung eine Zunahme der neuronalen Entladungsrates auf (Honda et al. 1992). Die durch eine elektrische Feldstimulation der AV3V-Region hervorgerufene Erregung magnozellularer Neurone des SON konnte nach Injektion des Localanästhetikum Lidocain in den Bereich des MnPO nahezu vollständig unterdrückt werden, wodurch die integrative Funktion des MnPO hervorgehoben wurde (Honda et al. 1990). Es wurde postuliert, dass MnPO, OVLT, AV3V-Region und SON gemeinsam einen „Osmorezeptorkomplex“ bilden, der z.B für

die osmotisch kontrollierte Freisetzung des Vasopressins verantwortlich ist (Honda et al. 1990).

Eine geregelte Rückresorption von Wasser in distalen Nephronabschnitten der Niere, unter Mitwirkung u.a. der Hormone ADH, Atriopeptin und Aldosteron, kann *per se* die Homöostase des Wasserhaushalts nicht ausreichend gewährleisten. Die endokrine Kontrolle der Wasserresorption ist eng verknüpft mit einer Kontrolle der renalen Salzausscheidung sowie der oralen Wasser- sowie Natriumaufnahme. Abb. 7 verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel im Rahmen der Konstanzhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes: Das wichtigste Effektororgan zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes stellen die paarigen Nieren dar. Kontrolliert wird die Nierenfunktion vielfach humoral, aber auch neural. Die renale Applikation attenuierter PR-Viren zur transsynaptischen Markierung polysynaptischer, efferenter Innervationsbahnen vom ZNS

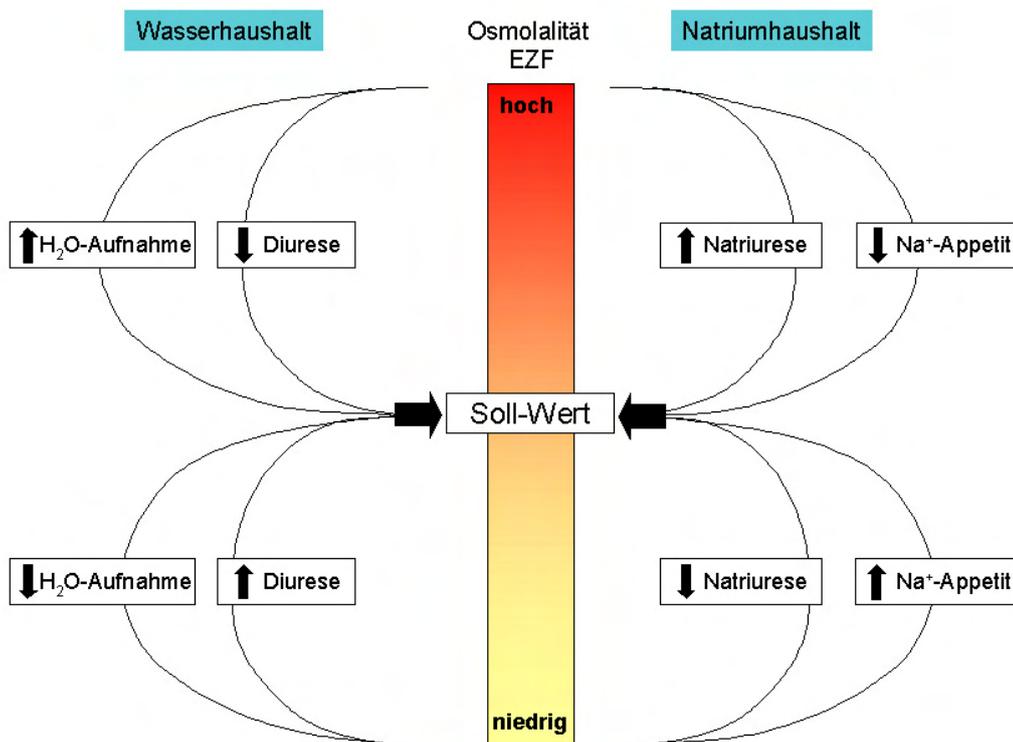


Abbildung 7: Homöostatische Stellgrößen im Rahmen von Veränderungen der Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit

Das Diagramm illustriert physiologische Veränderungen für die Aufrechterhaltung des Sollwertes der Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit (EZF). Komponenten der linken Seite betreffen die Balance des Wasserhaushalts. Dies schließt die verhaltensgesteuerte Wasseraufnahme sowie die Kontrolle der renalen Wasserausscheidung durch Vasopressin ein. Komponenten der rechten Seite beziehen sich auf die Balance des Elektrolythaushaltes und sind geprägt durch verhaltensgesteuerte Natriumaufnahme, sowie die neuroendokrine und nervale Regulation der renalen Natriumausscheidung.

(Modifiziert nach Bourque, 2008, Nature Rev. Neurosci. 9)

zur Niere wies auf die Bedeutung der *Lamina terminalis* als übergeordnete Struktur des anterioren Hypothalamus hin (Sly et al. 1999), mit letztendlich vegetativer, efferenter Innervation glomerulärer (afferente Arteriolen, Mesangium), tubulärer sowie vaskulärer Komponenten der Niere. Mikroapplikationen von Angiotensin II (AngII) in den Bereich der *Lamina terminalis* erniedrigten bei Ratten die Reninsekretion (Weekley 1992) und bei Schafen die renale sympathische Nervenaktivität (RSNA) (May and McAllen 1997). Elektrische Stimulation der sympathischen Innervation der Niere bei Hunden führte zur Vasokonstriktion, Antinatriurese und Reninsekretion (Yamaguchi et al. 2000). Durch die Reninsekretion wird das Renin-Angiotensin-System (RAS) aktiviert und verstärkt über AngII primär die Vasokonstriktion sowie sekundär Aldosteron-vermittelt die Natrium- und Wasserretention (DiBona 2000). Dies zeigt, dass die *Lamina terminalis* neben einem humoralen auch einen nervalen Einfluss auf die Nierenfunktion ausübt.

1.7.2. Physiologische Bedeutung purinergener Signalübertragung in der Osmoregulation

Für Mikroinjektionen von ATP *per se* sowohl in den SON als auch in den PVN der wachen Ratte konnte schon in den 1990er Jahren deren antidiuretische Wirkung durch den Nachweis eines verminderten Urinvolumen bei erhöhten ADH-Spiegeln im Blutplasma gezeigt werden (Mori et al. 1992, 1994). Extrazelluläre Ableitungen im Hypothalamus der Ratte *in vivo* sowie an Hypothalamus-Explantaten *in vitro* demonstrierten nach lokaler Applikation von ATP eine Exzitation magnozellularer Neurone des SON, ein Effekt, der sich durch das heute als unspezifischer Purinozeptor-Antagonist bekannte Suramin unterdrücken ließ (Day et al. 1993; Hiruma and Bourque 1995). Diese Ergebnisse erbrachten den ersten Hinweis darauf, dass dem ATP als zentralem Neurotransmitter eine spezifische physiologische Funktion im Rahmen der Kontrolle homöostatischer Systeme wie des Salz- und Wasserhaushaltes zukommt.

Noradrenerge Neurone der caudalen, ventrolateralen *Medulla oblongata* (A1 Zellgruppe) projizieren bekanntermaßen in den SON und PVN (Day and Renaud 1984, McAllen and Blessing 1987, Cunningham and Sawchenko 1988). Die durch Stimulation des *Nervus vagus* induzierte Aktivierung vasopressinergischer Neurone, gleichsam die afferente Signalübertragung peripherer Osmo- und Volumenrezeptoren nachahmend, konnte durch Suramin markant reduziert werden. Die Weiterleitung der medullär perzipierten Signale an hypothalamische MNCs war somit auf Noradrenalin unter Beteiligung von ATP als Neurotransmitter zurückzuführen. Unilaterale, intrahypothalamische Suramin-Injektionen mit nachfolgender isotoner Volumendepletion durch kontrollierte

Hämorrhagie bis zu einem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks auf 60 mmHg für 30 min führten bei der Ratte zu einer signifikant niedrigeren Fos-Expression der MNCs im SON auf der ipsi-, nicht jedoch kontralateralen Seite (Buller et al. 1996). Dass dieser Effekt nicht auf einer durch Hypovolämie induzierten Aktivitätsänderung der A1-Zellgruppe zurückzuführen war, konnte durch deren unveränderte Fos-Expression nachgewiesen werden. Der durch einen transienten Verschluss der *Vena cava inferior* verursachte Abfall des arteriellen Druckes bedingte in extrazellulären Ableitungsstudien an MNCs des SON der Ratte *in vivo* einen Anstieg ihrer Impulsfrequenz, ein wiederum durch Mikroinjektionen von Suramin in den SON supprimierbares Ereignis. ATP scheint also als Neurotransmitter der A1-Zellgruppe der ventrolateralen Medulla eine Rolle bei der Signalübermittlung peripherer Volumensensoren zu spielen (Buller et al. 1996). Die gemeinsame synaptische Freisetzung von Noradrenalin und ATP konnte *in vitro* an hypothalamischen Gehirnschnitten der Ratte nach elektrischer Stimulation bestätigt werden (Sperlagh et al. 1998a).

Unklar bleibt allerdings bis heute, ob beide Neuromodulatoren aus verschiedenen oder ein und derselben Synapse(n) freigesetzt werden; in letzterem Fall stellte sich Frage, ob diese Abgabe vereint aus einem Vesikel(-typ) oder aber getrennt aus verschiedenen forciert wird. An isolierten Präparaten des Hypothalamo-Neurohypophysensystems (HNS) der Ratte bewirkten sowohl Superfusionen mit ATP als auch mit Phenylephrin eine ADH-Freisetzung. Während es bei sequentieller Applikation des α_1 -Agonisten und ATP lediglich zu einer transienten, jeweils 1,5-fach erhöhten ADH-Sekretion kam, bewirkte die äquimolare Co-Applikation beider Transmitter eine langandauernde, um das 3 – 4 fach stimulierte ADH-Freisetzung. Diese Befunde konnten kürzlich ebenfalls für die der ADH-Freisetzung zugrunde liegende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Fura-2 Messungen in SON-Neuronen von explantierten HNS-Präparaten verifiziert werden (Song et al. 2006). Molekularbiologisch konnte im SON der Ratte die Expression von Purinozeptoren des P2X₂-, P2X₃-, P2X₄-, P2X₆- und P2X₇-Subtyps nachgewiesen werden, bei einer Dominanz von P2X₃, P2X₄ und P2X₇ (Shibuya et al. 1999). Auch im PVN finden sich mRNA-Transkripte von P2X₂-, P2X₃-, P2X₄- und P2X₆-Purinozeptoren, jedoch erwies sich deren Expression im SON als deutlich stärker ausgeprägt (Collo et al. 1996; Shibuya et al. 1999). Superfusionsstudien an dissoziierten SON-Neuronen zeigten anhand von Calcium-Imaging Untersuchungen mit FURA-2 zelluläre Reaktionen in Form eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf die P2X-Agonisten ATP γ S und 2Me-SATP. An isolierten neurohypophysären Nervterminalen konnte in pharmakologischen Studien eindeutig die Beteiligung von P2X₂- und/oder P2X₃-Purinozeptoren für die Depolarisation der

Membran, den Einstrom von Calciumionen sowie die vesikuläre Freisetzung von ADH aufgezeigt werden (Knott et al. 2008).

Die Rolle von P2Y-Rezeptoren im SON der Ratte hingegen ist umstritten. Auf der Ebene der neurohypophysären Nervterminalen erwiesen sich P1- und P2Y-Agonisten (Adenosin und Adenosinmonophosphat, bzw. UTP) als nahezu inaktiv (Troadek et al. 1998, Shibuya et al. 1999). Calcium-Imaging Versuche an isolierten HNS-Präparaten der Ratte einer anderen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine ausgeprägte Suppression des durch ATP-Superfusion induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ lediglich durch Co-Applikation von P2X- und P2Y-Antagonisten zu erreichen war (Song et al. 2007).

Immunfluoreszenzstudien demonstrierten eine ausgeprägte Co-Lokalisation von P2X₂-Purinozeptoren und zytosolischer, neuronaler Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) in MNCs des SON, moderat auch des PVN (Yao et al. 2003). Die Autoren zogen einzig aufgrund dieser Co-Lokalisation den Schluss, dass ATP *via* Aktivierung von P2X-Rezeptoren präsynaptisch die NO-Synthese fördern könnte; das folglich gebildete NO könnte seinerseits die Freisetzung von ADH induzieren (Ota et al., 2003) und gleichzeitig in Folge einer negativen Rückkopplung die ATP-Sekretion hemmen. Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen an Neuroblastomazellen, in denen die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren die NO-Synthese induziert (Reiser 1995), sowie durch die Tatsache, dass NO *in vitro* die Freisetzung von Purinen aus Zellen des Hippocampus der Ratte unterdrückte (Juranyi et al. 1999). Immunhistochemisch konnte auch der P2X₅-Rezeptor sowohl mit nNOS als auch mit AVP im SON und PVN adulter Ratten co-lokalisiert werden (Xiang et al. 2006). Dass der P2X₅-Purinozeptor in vorherigen Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung und RT-PCR auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden konnte (Collo et al. 1996, Shibuya et al. 1999) lag möglicherweise am Alter der Tiere. Während Xiang et al. (2006) ihre Studien an adulten Tieren durchgeführt haben, untersuchten die anderen beiden Arbeitsgruppen die Expression purinergere Rezeptoren in jungen, etwa 2 - 4 Wochen alten Tieren. Den genauen Zusammenhang zwischen der Interaktion von NO und ATP gilt es noch zu klären.

1.8. Regulation der Nahrungsaufnahme

1.8.1. Hypothalamische Neurotransmittersysteme und Leptin/Ghrelin im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes

An der hypothalamischen Kontrolle der Nahrungsaufnahme ist eine Vielzahl peripherer und zentraler Faktoren beteiligt, welche Informationen über Energieaufnahme und -speicherung sowie den Status des Energiehaushaltes afferent an den Hypothalamus weiterleiten. Dazu gehören neben gastrointestinalen Hormonen wie Cholecystokinin oder Ghrelin auch hormonale Langzeitregulatoren wie das von weißen Fettzellen synthetisierte Leptin. Im Hypothalamus werden diese Informationen integriert und somit kurz- bzw. langfristig die Nahrungsaufnahme auf den Energiebedarf abgestimmt. Bei der Verarbeitung dieser Informationen sind eine Reihe intrahypothalamischer Neurotransmitter beteiligt, die entweder orexigene (Nahrungsaufnahme steigernd) oder anorexigene (Nahrungsaufnahme hemmend) Wirkungen vermitteln (Schwartz et al. 2000; Langhans et al. 2005; Shioda et al. 2008).

In den 1950er Jahren wurden, basierend auf zahlreichen Untersuchungen an Katzen, zwei hypothalamische Regionen als Zentrum für Hunger (lateraler Hypothalamus =LH) und Sättigung (ventromedialer Hypothalamus =VMH) beschrieben (Teitelbaum and Stellar 1954). Mittlerweile muss jedoch die reine „Zentrentheorie“ modifiziert werden, da sich die Regulation der Nahrungsaufnahme als weitaus komplexer darstellt und zahlreiche (extra-)hypothalamische Kerngebiete an der zentralen Energiehomöostase involviert sind. Hypothalamische Strukturen der Energiehomöostase sind neben LH und VMH der dorsomediale Hypothalamus (DMH), der *Nucleus arcuatus* (ARC) und der PVN. Generell kann man zwei Systeme unterscheiden, die an der Energiehomöostase beteiligt sind:

Die Größe der Einzelmahlzeit wird im Rahmen einer kurzfristigen Regulation (Detektion der Sättigung) durch afferente Projektionen an den NTS geregelt. Vagale (Schwartz et al. 1999) und im sympathischen System (*Nervus splanchnicus*) verlaufende (Sclafani et al. 2003) Afferenzen detektieren (1) die Aktivierung gastraler Dehnungssensoren (Haupt 1982), (2) die Erregung von Rezeptoren für Cholecystokinin (CCK), das von duodeno-jejunalen Zellen infolge chemosensorisch erfaßter Triglyceride/Fettsäuren im Rahmen der Verdauung sezerniert wird (Garlicki et al. 1990), und (3) die metabolische Aktivität der Leber (über Glucose-sensitive Rezeptoren der Portalvene) (Bray 1996). Neurone des NTS projizieren nachfolgend indirekt über den *Nucleus parabrachialis* in den LH (Schwartz 2006). Möglicherweise wird u.a in Neuronen des LH die Freisetzung

von Orexin A und B sowie von Melanin-concentrating hormone (MCH), beides Peptide, die die Nahrungsaufnahme stimulieren, gehemmt.

Leptin (und Insulin) gehören zu den Langzeitregulatoren der Energiehomöostase; das heisst, sie übermitteln den Zustand der Energiereserven, also des Körperfettanteils, an den Hypothalamus („adiposity signals“) und regulieren so die Frequenz der Mahlzeiten. Leptin ist das Proteinprodukt des „ob“ Gens und wird vorrangig in weissen Adipocyten gebildet. Die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin korrelieren mit der Größe der Fettdepots (Bagdade et al. 1967, Considine et al. 1996). Auf hypothalamischer Ebene hat Leptin über seine Bindung an Ob-Rezeptoren (Ob-R, zugehörig zur Klasse-I der Cytokin-Rezeptoren) (Tartaglia et al. 1995) von Neuronen des ARC größere Bedeutung als Insulin (Sindelar et al. 1999). Dabei wird postuliert, dass Kapillaren des ventralen ARC aufgrund dessen unmittelbarer Angrenzung an die *Eminentia mediana* lediglich über lecke „*Zonulae occludentes*“ verfügen, die Blut-Hirn Schranke somit relativ permeabel für zirkulierende Botenstoffe wie Leptin ist (Meister and Hakansson 2001). Unabhängig vom klassischen Weg der Signaltransduktion (JAK/STAT-Weg, d.h. Aktivierung einer Janus-Kinase mit nachfolgender Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT) kann Leptin aktiv die Impulsfrequenz Glucose-responsiver Neurone supprimieren (Spanswick et al. 1997). In Neuronen des ARC sind das Neuropeptid Y (NPY) und das *Agouti gene-related protein* (AGRP), beide potente Stimulatoren der Nahrungsaufnahme, als Neuromodulatoren co-lokalisiert (Broberger et al. 1998, Hahn et al. 1998; Valassi et al. 2008). Ebenso existieren Neurone, die Pro-Opiomelanocortin (POMC, Vorläufer des α -Melanocyten-stimulierenden Hormons (α -MSH)) und „Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript“ (CART) enthalten, welche beide die Nahrungsaufnahme hemmen (Elias et al. 1998a, Kristensen et al. 1998; Schwartz et al. 2000; Valassi et al. 2008). Beide Neuronenpopulationen exprimieren den Ob-Rezeptor (Cheung et al. 1997, Baskin et al. 1999), und Leptin entfaltet hier antagonistische Wirkungen, d.h. hohe Leptinspiegel aktivieren POMC/CART Neurone und hemmen NPY/AGRP Neurone (Morton 2007)

Der PVN als integratives Kerngebiet nebst DMH (welche vermutlich zusammen eine funktionelle Einheit bilden) und der LH als „Hungerzentrum“ sind von NPY/AGRP- und/oder POMC/CART-Terminalen des ACR innerviert (Elmqvist et al. 1998, 1999; Kalra et al. 1999). Leptin-aktivierte POMC/CART Neurone des ARC setzen im PVN α -MSH als Prozessierungsprodukt des POMC sowie CART frei. α -MSH entfaltet seine Wirkung an neuronalen Melanocortin-Rezeptoren des PVN (v.a. MC4-R und MC3-R). Nachfolgend werden Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), Corticotropin-Releasing-

Hormon (CRH) und Oxytocin als intrahypothalamische Neurotransmitter (nicht als neuroendokrine Botenstoffe) freigesetzt, die sowohl anorexigen wirken, als auch den Energieverbrauch steigern (Kow and Pfaff 1991, Dallman et al. 1993, Verbalis et al. 1995). Über die Projektionen zum LH wird leptinerg vermittelt die Freisetzung der orexigenen Transmitter MCH und Orexin A und B gehemmt (Elias et al. 1999). CART entfaltet analoge Effekte zu α -MSH, ein eigener Rezeptor ist in der Literatur bislang nicht beschrieben (Stanley et al. 2001, Vicentic et al. 2006). Sinkt die Leptinkonzentration im Plasma, und somit auch dessen Bindung an den Ob-R des Hypothalamus, so werden orexigene NPY/AGRP Neurone des ARC aktiviert. Eine Mutation im ob-Gen, führt zu Hyperphagie und somit Adipositas (Zhang et al. 1994).

Die orexigene Wirkung von NPY wurde erstmals 1984 von Stanley und Leibowitz beschrieben (Beck 2006). Mikroinjektionen von NPY in den PVN von Ratten stimulierten die Futtermaufnahme. NPYerge Neurone vermitteln dabei nicht nur eine Regulation der Energiehomöostase über eine Steigerung der Futtermaufnahme, sondern auch über Projektionen vom PVN zu Neuronen der *Medulla oblongata* mit efferenter Innervation präganglionärer, sympathischer Neurone der spinalen intermediolateralen Zellsäule (IML) (Saper et al. 1976; Valassi et al. 2008) eine Verminderung der Impulsfrequenz sympathischer Efferenzen zum braunen Fettgewebe. Dies bedingt eine Abnahme der Wärmeproduktion und damit eine effizientere Energiespeicherung (siehe Kap. 1.6.1) (Egawa et al. 1991, Billington et al. 1994). NPY bindet dabei an metabotrope Rezeptoren, wobei molekularbiologische Studien auf hypothalamischer Ebene hauptsächlich die Expression von Rezeptorproteinen des NPY₁, -Y₂, -Y₄ und -Y₅-Subtyps mit unterschiedlichen Lokalisationen verifizierten (Herzog et al. 1992, Grundemar et al. 1993, Bard et al. 1995; Alexander et al. 2008), deren physiologische Funktionen kontrovers diskutiert werden. NPY wirkt über einen negativen *feedback* autoregulatorisch auf *N. arcuatus*-intrinsische NPY/AGRP Neurone, welche möglicherweise NPY₂/₄-Rezeptoren exprimieren, sowie auf in POMC/CART Neuronen exprimierte NPY-Rezeptoren, wodurch die Freisetzung von α -MSH gehemmt wird (Broberger et al. 1997, King et al. 1999, 2000).

Die Suche nach dem ultimativen „Hunger-Rezeptor“ gestaltet sich als äußerst komplex. Während die *in vivo* Versuche an Ratten einiger Arbeitsgruppen für eine signifikante Beteiligung von NPY₁ sprechen (Leibowitz and Alexander 1991, Wieland et al. 1998), postulierten andere, dass diese Funktion dem NPY₅ zukommt (Schaffhauser et al. 1997, Widdowson 1997). So unterdrückte die icv. Injektion NPY₅ spezifischer Antisense Oligodeoxynukleotide (AS-ODNs) bei Ratten eine Fasten-induzierte

Futteraufnahme, und darüber hinaus führte eine zentrale Mikroapplikation von NPY₅ spezifischen AS-ODNs mit nachfolgender icv. Injektion von NPY nicht zu einer gesteigerten Futteraufnahme (Schaffhauser et al. 1997). Diese detaillierte Studie stellte andere *in vivo* Studien mit zentraler Applikation mehr oder weniger Subtyp-spezifischer Agonisten- und -Antagonisten in Frage und den NPY₅-Subtyp bei der Suche nach dem „Hunger-Rezeptor“ in den Focus der Forschung.

Mit NPY co-sezerniert wird AGRP, welches wie α -MSH an MC3- und MC4-Rezeptoren bindet; d.h. die antagonistische Wirkung von AGRP resultiert aus einer kompetitiven Verdrängung von α -MSH vom gemeinsamen Rezeptorprotein (Ollmann et al. 1997) und führt zu Hyperphagie, Adipositas und einem reduzierten Energieumsatz (Lu et al. 1994). Orexinerge Neurone des LH weisen reziproke Konnektivitäten zu ARC-NPY/AGRP Neuronen und auch zu ARC-POMC/CART Neuronen auf (Elias et al. 1998b, Horvath et al. 1999, Muroya et al. 2004). Injektionen von Orexin A und MCH, nicht jedoch von Orexin B in den lateralen Ventrikel der Ratte führten zu einer Steigerung der Futteraufnahme (Haynes et al. 1999, Sakurai 1999). Dieser Effekt ist möglicherweise über die Konnektivitäten des ARC und LH vermittelt. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten *in vitro* nach Applikation von Orexin A eine 85 % Responsivität der ARC-Neurone (Rauch et al. 2000). Dies konnte durch *in vivo* Versuche an Ratten unterstützt werden, bei denen eine icv. Administration eines NPY₁-Rezeptor Antagonisten eine Reduzierung der Futteraufnahme auf eine nachfolgende icv. Injektion von Orexin A bewirkte (Yamanaka et al. 2000). Dieser Effekt wurde durch den injizierten Antagonisten jedoch nicht komplett unterbunden, was entweder auf eine Beteiligung mehrerer NPY-Rezeptor-Subtypen oder aber auf einen zusätzlichen, NPY-unabhängigen Weg hinweist. MCH-mRNA ist im LH von Mäusen nach 24-stündiger Nahrungskarrenz, sowie bei Ob-R knock out Mäusen *per se* überexprimiert (Qu et al. 1996). Gleiches gilt für prepro-Orexin mRNA, deren Expression nach Futterdeprivation bei Ratten erhöht ist (Sakurai et al. 1998). Zusätzlich sind auf orexinergen Neuronen des LH Leptinrezeptoren exprimiert (Horvath et al. 1999). Somit übt Leptin nicht nur einen direkt hemmenden Einfluss auf die NPY/AGRPergen Neurone des ARC, sondern auch auf die Orexin-synthetisierenden Neurone des LH aus (Beck and Richy 1999, Yamanaka et al. 2003). Da der LH eine ausgeprägte endotheliale BHS aufweist, erreicht Leptin diese hypothalamische Substruktur möglicherweise über einen sättigbaren, aktiven Transportmechanismus (Banks et al. 1996).

Dass ein homöostatischer Regelkreis nicht losgelöst von anderen betrachtet werden kann, zeigt schon die oben erwähnte Verbindung von NPY zur Thermoregulation; Ähn-

liches gilt für Orexin. Mutationen des Orexin2-Rezeptors führten bei Hunden zu Narkolepsie, gleiches gilt für Orexin knock-out Mäuse (Chemelli et al. 1999, Lin et al. 1999). Über Projektionen u.a. zum *Locus coeruleus* (LC) erhöhte Orexin unter physiologischen Bedingungen die lokomotorische Aktivität sowie die Vigilanz, die oft während einer Situation längerer Nahrungskarrenz zu beobachten ist (Hagan et al. 1999, Ida et al. 1999). Elektrophysiologische Untersuchungen an Gehirnschnitten der Ratte zeigten Exzitation der Neurone des LC auf Applikation von Orexin A. Dies geht konform mit Studien, die Exzitation von Neuronen des LC vor allem in der Phase des Erwachens, nicht jedoch in REM (*rapid eye movement*)-Schlafphasen beobachtet haben. (Aston-Jones and Bloom 1981, Berridge and Foote 1996). Die Verbindung beider Regelkreise zeigt eine Studie, in der dauerhafte Orexin-A Applikation icv. über eine implantierte Minipumpe bei Ratten während der Tages-, nicht jedoch Nachtphasen zu einer erhöhten Futteraufnahme führte. Während allerdings ein Leptindefizit zu Adipositas führte, konnte dies nach Orexinapplikation nicht beobachtet werden (Yamanaka et al. 1999). Außerdem erwiesen sich orexinerge Neurone als Glucose-sensitiv; so führte ein erniedrigter Blutglucosespiegel zu einer erhöhten Orexin mRNA-Expression im LH (Cai et al. 1999, Griffond et al. 1999).

Das Zentralnervensystem ist bekanntlich nahezu exklusiv auf über die BHS durch Transportproteine aufgenommene Glucose (GLUT-1 endotheliale, GLUT-3 neuronale Lokalisation) als Energiequelle angewiesen. Darüber hinaus finden sich im ZNS Glucose-sensitive Neurone mit Aufgaben als Sensoren im Rahmen der Homöostase des Energiehaushaltes (Marty et al. 2007; Pénicaud et al. 2007). Die Funktion dieser Glucose-sensitiven Neurone kann schon allein aufgrund ihrer hypothalamischen (ARC, DMH, PVN, VMH, LH) (Fukuda et al. 1984, Dunn-Meynell et al. 1997a, Muroya et al. 1999) und extrahypothalamischen Lokalisation (z.B. NTS, *Cortex cerebri*, Hippocampus) (Ritter et al. 1981, Mizuno and Oomura 1984, Ohno-Shosaku and Yamamoto 1992) nicht losgelöst von anderen neuronalen, energiehömostatischen Systemen betrachtet werden. Analog zur Thermoregulation muss man auch bei Glucose-empfindlichen Neuronen zwischen Glucose-responsiven (Erhöhung der Exzitationen bei steigendem Glucosespiegel) und Glucose-sensitiven (Anstieg der Impulsfrequenz bei sinkendem Glucosespiegel) Neuronen unterscheiden (Pénicaud et al. 2007). Während der LH etwa 30 - 40 % Glucose-sensitive und nur ca. 5 % Glucose-responsive Neurone enthält, sind die Verhältnisse im VMH genau umgekehrt (Fukuda et al. 1984, Ashford et al. 1990, Dunn-Meynell et al. 1997b), was die frühe, duale Hypothalamustheorie des Hungers unterstützt. Die allgemeine Theorie, dass der Blutzuckerspiegel im engeren Sinne mit der langfristigen Energiehomöostase nichts zu tun hat, wurde widerlegt. Eine

intraperitoneale (ip) Injektion von Gold-ThioGlucose bei Mäusen zerstörte selektiv Glucose-responsive Neurone und die Tiere entwickelten ein Hyperphagie mit nachfolgender Adipositas (Bergen et al. 1996, Kishi et al. 2001).

Die POA und der MnPO spielen hinsichtlich der Regulation der Energiehomöostase eher eine untergeordnete Rolle. Dennoch führt die ip-Injektion eines Glucoseantimetaboliten (2-Deoxy-Glucose) zu einer signifikant höheren Fos-Expression im MnPO und

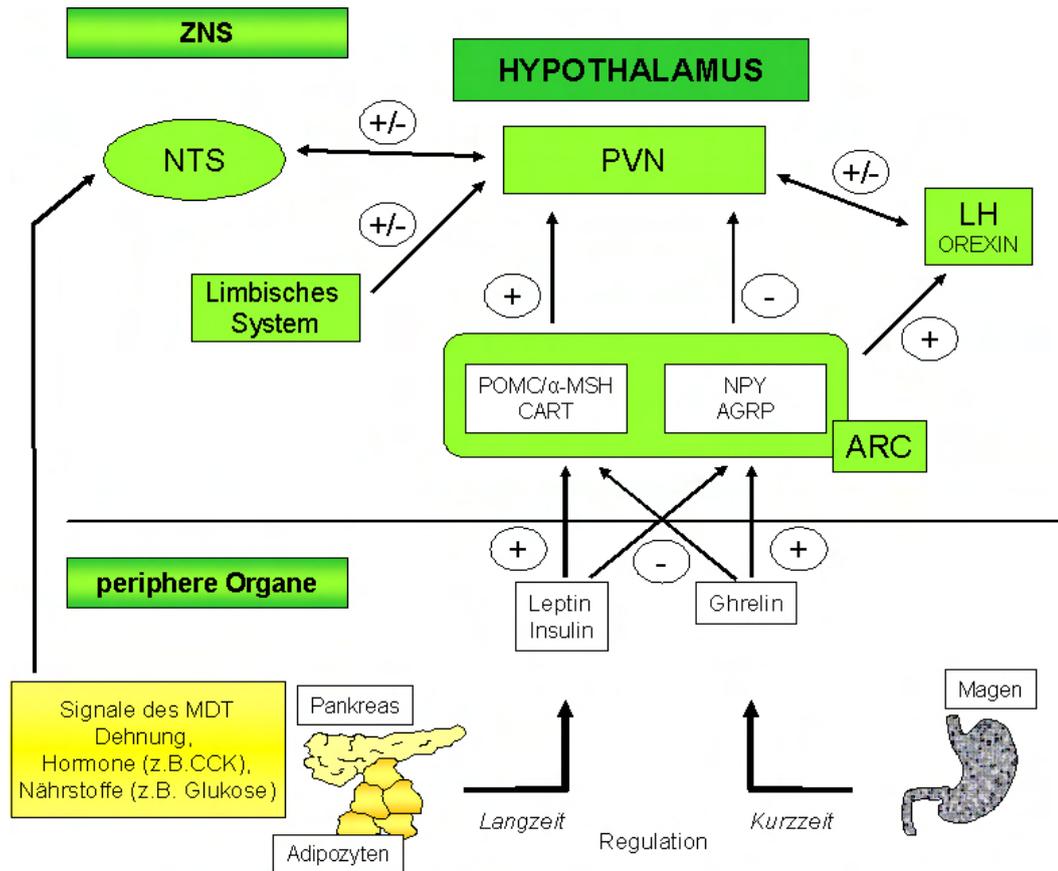


Abbildung 8: Vereinfachtes Model der Energiehomöostase

Ghrelin aktiviert NPY/AGRP-Neurone des ARC, die wiederum orexinerge Neurone des LH stimulieren und so die Nahrungsaufnahme anregen, während gleichzeitig POMC/CART-Neurone inhibiert werden. Im Gegensatz dazu aktivieren Leptin und Insulin POMC/CART-Neurone des ARC, hemmen NPY/AGRP-Neurone und vermitteln so die Sättigung. Periphere vagale Afferenzen detektieren über Projektionen in den NTS Sättigungssignale. Der NTS wiederum integriert diese mit längerfristigen Regulationsmechanismen über reziproke Konnektivitäten sowohl in den PVN, als auch in den LH (Weg nicht gezeigt). Das limbische System wirkt über die Motivation „Appetit“ zusätzlich regulierend auf die Nahrungsaufnahme ein.

Abkürzungen: AGRP = *Agouti gene related protein*, ARC = *Nucleus arcuatus*; CART = Cocain und Amphetamin regulierendes Transkript; CCK = Cholecystokinin; LH = lateraler Hypothalamus; α-MSH = Melanozyten stimulierendes Hormon; NPY = Neuropeptid Y; NTS = *Nucleus tractus solitarius*; POMC = Proopiomelanocortin; PVN = *Nucleus paraventricularis*; ZNS = Zentrales Nervensystem

der POA der Ratte, im Vergleich zu Saline-injizierten Kontrolltieren, bei gleichzeitig moderater Co-Lokalisation der Fos-Signale mit nNOS (Briski and Sylvester 1999). Über Projektionen vom MnPO zum PVN hemmt NO hier möglicherweise die Expression anorexigener Transmittersubstanzen (Oxytocin, CRH) und forciert so die durch Gluco-deprivation induzierte Nahrungsaufnahme. Eine weitere Involvierung der AV3V-Region in die Regulation der Energiehomöostase findet sich auf sekundärer Ebene. Ein ausgeglichener Energiehaushalt ist unter anderem wichtig für die ovarielle und testikuläre Funktion. Leptin stimuliert die Sekretion von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) aus der AV3V-Region, direkt über Ob-Rezeptor exprimierende GnRH-Neurone oder indirekt über Projektionen des ARC in die POA (Mezey et al. 1985). Bei Leptin-defizienten Individuen bleiben Follikelreifung und Ovulation, bzw. die Spermatogenese aus. Eine Leptinsubstitution antagonisiert den Effekt (Mezey et al. 1985, Chehab et al. 1996, Ewart-Toland et al. 1999).

Einen bedeutenden „Gegenspieler“ zu Leptin stellt das Peptidhormon Ghrelin dar, welches in den Fundusdrüsen des Magens gebildet und in die Blutbahn freigesetzt wird, wenn längere Zeit keine Nahrung zugeführt wurde (Nogueiras et al. 2008; Puztai et al. 2008). Die Zielstrukturen von Ghrelin sind primär die NPY/AGRP-Neurone des ARC (Nakazato et al. 2001); zusätzlich stimuliert es die Sekretion von Somatotropin (Takaya et al. 2000), welches seinerseits glykogeno- und lipolytisch wirkt und somit dem Energie-defizit durch die Mobilisierung körpereigener Reserven entgegenwirkt. Erwähnt werden sollte auch noch, dass langfristige und kurzzeitige Regulationsmechanismen nicht unabhängig voneinander existieren. Die Tatsache, dass der NTS reziproke Konnektivitäten zum PVN aufweist (Ter Horst et al. 1989), Ob-Rezeptoren exprimiert (Mercer et al. 1998) und Neurone beinhaltet, welche POMC-mRNA exprimieren (Bronstein et al. 1992), weist auf eine untrennbare Verbindung der beiden Regelkreise hin. Die hier dargestellte Regulation der Nahrungsaufnahme beinhaltet lediglich das Grundprinzip, welches durch Abb. 8 noch einmal verdeutlicht wird.

1.8.2. Physiologische Bedeutung purinerger Signalübertragung in der Regulation der Energiehomöostase

Wie schon beschrieben, repräsentieren der *Nucleus arcuatus* (ARC), der dorso- (DMH) sowie ventromediale Hypothalamus (VMH) und die laterale hypothalamische Region (LH) Schlüsselstrukturen für die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes. Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung purinerger Rezeptoren in der hypothalamischen Kontrolle der Energiehomöostase demonstrierten eine Beteiligung sowohl ionotroper als auch metabotroper P2-Rezeptoren.

Sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene konnte für VMH und ARC die ausgeprägte Expression des P2X₂-Purinozeptorsubtypes für die Ratte (Kanjhan et al. 1999; Florenzano et al. 2006; Zemkova et al. 2008), des P2X₅-Purinozeptors für die Maus (Guo et al. 2008) nachgewiesen werden. Elektrophysiologische *in vitro* Untersuchungen an orexinerger Zellen des Hypothalamus in Gehirnschnittpräparationen der Maus zeigten, dass ATP, ATP_γS jedoch nicht α,βme-ATP zu einem nicht-selektiven Kationeneinstrom führten, welcher durch Absenken des pH-Wertes des Mediums potenziert werden konnte, was für die Beteiligung von P2X₂-Rezeptoren spricht (Wollmann et al. 2005). Pharmakologisch wurden P2X-Rezeptoren *in vitro* auch in multipolaren großen Neuronen des ARC und in Neuronen des DMH und VMH mittels elektrophysiologischen- und/oder Ca²⁺-Imaging-Untersuchungen charakterisiert (Sorimachi et al. 2001, Matsumoto et al. 2004, Wakamori and Sorimachi 2004). Zumindest auf Ebene des ARC waren diese als P2X₂-Subtyp charakterisierbar (Wakamori and Sorimachi 2004). *In vitro* wurde ATP mit GABA in Neuronen des LH von embryonalen Hühnern und neonatalen Ratten co-sezerniert, was die Frage nach der Herkunft des ATP beantworten würde (Jo and Role 2002). In einer Studie von Kittner et al. (2006) wurde eine Beteiligung von P2X-Rezeptoren an der Regulation der Nahrungsaufnahme allein durch die Tatsache ausgeschlossen, dass α,βme-ATP icv. appliziert keine erhöhte Futteraufnahme induzierte - eine Interpretation, die unter der Annahme einer funktionellen P2X₂-Purinozeptor Expression nicht haltbar erscheint.

Hinsichtlich einer möglichen Beteiligung metabotroper Purinozeptoren an der zentralen Kontrolle des Energiehaushaltes konnte demonstriert werden, dass eine restriktive Fütterung bei Ratten zu einer Überexpression von P2Y₁-Rezeptoren in Somata von Neuronen des DMH, VMH, ARC und LH führte, teilweise co-lokalisiert mit nNOS (Seidel et al. 2006). Pharmakologische Hinweise, dass P2Y₁-Rezeptor vermittelte Effekte an die Synthese von NO gekoppelt sind, zeigte eine *in vitro Studie* an isolierten, noradrenerg prä-kontrahierten Mesenterialarterien der Ratte. Eine Perfusion mit Agonisten für P2Y-Rezeptoren führte zu einem Anstieg von NO und cGMP, sowie zu einer Vasodilatation (Buvinic et al. 2002). Weiterhin verursachte die icv. Applikation von ATP/ ADP bei der Ratte eine höhere Futteraufnahme nach 18-stündiger Nahrungskarrenz als bei der mit aCSF injizierten Kontrollgruppe. Der durch ATP erzielte Effekt lies sich durch Prä-Applikation des unspezifischen purinergen Antagonisten PPADS unterdrücken, die durch ADP induzierte Futteraufnahme wurde durch vorherige Administration eines spezifischen P2Y₁-Antagonisten gehemmt. Außerdem wurde die Wirkung von ADP durch Infusion sowohl eines spezifischen nNOS-Inhibitors als auch eines cGMP-Antagonisten unterdrückt, ein weiterer Hinweis

darauf, dass eine Aktivierung von P2Y-Rezeptoren die NO-Synthese induzierte. In allen aufgeführten Kerngebieten konnte immunhistochemisch auch eine Expression von P2Y₁ Rezeptoren in Astrocyten nachgewiesen werden, prozentual am höchsten im ARC. In welcher Form Astrocyten in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert sind, bleibt *dato* unklar. Möglicherweise entfernen sie Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt (Semenoff and Kimelberg 1985), die während der Futteraufnahme im Hypothalamus freigesetzt werden (Hoebel et al. 1989). Die erhöhte neuronale Expression von P2Y₁ trägt eventuell dazu bei, die Freisetzung anderer relevanter orexigener Neurotransmitter (NPY/AGRP im ARC oder Orexin im LH) zu erleichtern.

Eine mögliche Bedeutung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten MnPO des anterioren Hypothalamus für die Energiehomöostase wird erst in neuester Zeit diskutiert, nachdem zunächst aufgrund früherer Untersuchungen am Schaf postuliert wurde, dass die Ablation des MnPO zu keinerlei Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme geführt hatte (McKinley et al., 1999). Elektrophysiologische *in vivo* Studien an der Ratte konnten zumindest zeigen, dass die Stimulation vagaler Afferenzen mit teilweise gastrointestinalem Ursprung die Entladungsfrequenz osmotisch oder angiotensinerg aktivierter MnPO-Neurone zu modulieren vermochte (Stocker and Toney 2007). Läsionen des LH modifizierten die durch nNOS-Blockade im Bereich des MnPO induzierte Diurese/Natriurese (Saad et al. 2004). Die funktionelle Projektion orexinerger Neurone in den MnPO konnte durch immunocytochemische Markierung sowie patch-clamp Experimente an Gehirnschnittpräparationen der Ratte aufgezeigt werden (Kolaj et al. 2008). Darüber hinaus verursachte die lokale Hemmung neuronaler Schaltkreise im Bereich des MnPO eine erhöhte nukleäre Fos-Translokation in hypocretinergen Neuronen des LH (Kumar et al. 2008). Hinsichtlich eines MnPO-intrinsischen Purinozeptorsystems ist *dato* lediglich die Expression des P2X₂- bzw. P2X₅-Rezeptors andeutungsweise in der medialen präoptischen Region sowie dem *Nucleus medialis praeopticus* beschrieben (Kanjhan et al. 1999; Guo et al. 2008).

1.9. Regulation des Schlaf-Wach Rhythmus

1.9.1. Bedeutung (extra)hypothalamischer Kerngebiete für die Homöostase des zirkadianen Schlaf-Wach Rhythmus

Schlaf ist definiert als ein reversibler, physiologischer Zustand des Organismus, der durch reduzierte Motilität und Responsivität auf äußere Einflüsse gekennzeichnet, und für höhere Organismen offensichtlich lebensnotwendig ist. Systematischer Schlafent-

zug ist ein solch schwerwiegender Eingriff in die Regelmechanismen des Körpers, dass er z.B. bei Ratten nach 5 - 30 Tagen zum Tod führt (Rechtschaffen et al. 1983). Dabei variiert die tägliche Gesamtdauer des Schlafes von wenigen min bei Giraffen bis zu 20 Std bei männlichen Löwen (Penzlin 2005). Trotz dieser grundlegenden Bedeutung des Schlafs gibt es über seine Funktion nur Hypothesen, die sich im wesentlichen zwei Kategorien zuordnen lassen und die sich gegenseitig nicht ausschließen (Horne 1988). Zum einen gibt es einen adaptiven Wert des Schlafes durch Optimierung der Überlebensstrategie (Feindvermeidung, Energiesparen), zum anderen fördert der Schlaf restaurative Prozesse (Wiederherstellung metabolischer Gleichgewichte, Reparaturen, Erneuern innerer Ressourcen). Beispielsweise wirkt sich Schlafentzug negativ auf die Wundheilung bei Ratten aus (Gumustekin et al. 2004). Der normale Nachtschlaf eines Primaten ist nicht etwa ein Kontinuum, sondern er besteht aus mehreren Schlafzyklen von etwa 90 min Dauer, in denen jeweils eine festgelegte Folge von Schlafstadien durchlaufen wird. Innerhalb eines Zyklus unterscheidet man eine REM-Phase (*rapid eye movement*), gekennzeichnet durch Sakkaden-artige Augenbewegungen hinter geschlossenen Lidern, und einer weitgehenden Atonie der gesamten Skelettmuskulatur) von einer Non-REM-Phase (eingeteilt mit Hilfe der Registrierung über das Elektroenzephalogramm (EEG) in vier Stadien mit zunehmender Schlaftiefe) (Dement and Kleitman 1957).

Auch der Schlaf wird vom Hypothalamus gesteuert. Die an der Regulation des Schlafes und der Wachheit beteiligten Kerngebiete und Transmitter sollen im Folgenden näher erläutert werden. Hinweise darauf, dass der posteriore Hypothalamus für den Status des Wachseins und der anteriore Hypothalamus für den Schlaf zuständig ist – wieder im Sinne der klassischen Zentrentheorie - stammen aus frühen Studien an Patienten mit viraler Enzephalitis (von Economo 1923, 1930). Patienten mit komaartigen Schlafzuständen litten unter einem Funktionsverlust der Neurone des posterioren Hypothalamus und des Hirnstamms, wohingegen bei Patienten mit Schlaflosigkeit Läsionen im anterioren Hypothalamus zu verzeichnen waren. Die Wachheit wird durch das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (ARAS) geregelt (Moruzzi and Magoun 1949, Starzl et al. 1951), welches Anteile der pontinen *Formatio reticularis* umfasst, intensive afferente Zuflüsse aus dem Hinterhorn des Rückenmarks, von Hirnnervenkerne sowie zusätzliche Impulse aus dem Cortex erhält. Der hierbei beschrittene Signalweg teilt sich in zwei Äste auf. Cholinerge Neurone des *Nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (PPT) und des *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LPT) des Hirnstamms projizieren zu spezifischen Kerngebieten des Thalamus. Die Aktivierung dieser Neurone ermöglicht die Informationsübermittlung zum Cortex (Hallanger et al. 1987). Die

Impulsfrequenz der Neurone des PPT/LPT ist während der Schlaflosigkeit und der REM-Phase erhöht. Der zweite Ast umgeht den Thalamus und aktiviert stattdessen Neurone des LH, des basalen Vorderhirns (BF) und den gesamten Cortex (Saper 1985, Saper et al. 2001, 2005; Jones 2003). Hieran beteiligte Kerngebiete sind noradrenerge Neurone des *Locus coeruleus* (LC), serotonerge Neurone der *Nuclei raphe*, dopaminerge Neurone des zentralen Höhlengraus und histaminerge Neurone des TM.

Die Aktivierung kortikaler Neurone wird auch durch orexinerge Neurone des LH und cholinerge/GABAerge Neurone des BF erhöht. Läsionen orexinergischer Neurone des LH durch die lokale Applikation des Neurotoxins Hypocretin-2-Saporin führte bei Ratten zu langanhaltendem Schlafverhalten bis hin zum Koma (Gerashchenko et al. 2003) (vergleiche Kap. 1.8.1). Extrazelluläre Ableitungen der Neurone monoaminergischer Nuclei bei Ratten demonstrierte die höchste Entladungsrate im Zustand des vollen Bewusstseins, eine abnehmende Impulsfrequenz während der Non-REM-Phasen des Schlafes und eine praktisch nicht mehr vorhandene Aktivität in REM-Schlafphasen (Aston-Jones and Bloom 1981, Fornal et al. 1985, Steininger et al. 1999). Gleiches gilt für orexinerge Neurone des LH (Lee et al. 2005a), wohingegen cholinerge Neurone des BF vor allem im Zustand des Wachens und im REM-Schlaf aktiv sind (Lee et al. 2005b). Die Aktivität in REM-Schlafphasen bewirkt eine Hyperpolarisation der α -Motoneurone im Rückenmark und somit die Atonie der gesamten Skelettmuskulatur.

Hemmend auf die Neurone des Hypothalamus und Hirnstamms, und somit auf das ARAS, wirken GABA- und Galanin-haltige Neurone des *Nucleus praeopticus ventrolateralis* (VLPO), sowie GABAerge Neurone des MnPO, deren Impulsfrequenz in Schlafphasen zunimmt. (Gaus et al. 2002, Suntsova et al. 2002, Gvilia et al. 2006, Szymusiak et al. 2007). Interessanterweise geht die Applikation eines milden Wärmestimulus durch implantierte Thermoden in die POA bei Kaninchen mit Reaktionen einher, die auch bei Beginn des Schlafes beobachtet werden (Aktivierung der Wärmeabgabemechanismen resultierend in peripherer Vasodilatation mit dem Resultat einer niedrigeren KT; vergleiche Kap.1.6.1 (Boulant, 1981). Zusätzlich fördert die lokale Applikation eines milden Wärmestimulus der POA bei Katzen die Tiefschlafphase, was sich in einer signifikanten Zunahme der für diese Phase charakteristischen niederfrequenten Delta-Wellen (0,5 - 4 Hz) im EEG zeigte (Roberts and Robinson 1969). Dies führte zu der Hypothese, dass Neurone der POA, welche den Schlaf regulieren, thermosensitiv sind, und erklärt so möglicherweise den Abfall der KT während des Schlafes. Durch Quantifizierung der Entladungsraten thermosensitiver Neurone der POA bei Ratten und Katzen *in vivo* während des Schlafes und bei vollem Bewusstsein

mittels implantierter Thermoden und Elektroden wurde diese Theorie untermauert (Alam et al. 1995, 1997). Die Entladungsrates warmsensitiver Neurone stieg um etwa 50 % während der Non-REM-Schlafphase, während die Impulsfrequenz kaltsensitiver Neurone vor allem in Phasen der Schlaflosigkeit anstieg. Immunhistochemische Untersuchungen an Ratten, denen Schlaf gewährt wurde, zeigten eine signifikant höhere Markierung Fos-positiver Neurone im VLPO, aMnPO und vMnPO, verglichen mit Tieren, die unter Schlafentzug litten (Gong et al. 2000). Zudem korrelierte die Anzahl Fos-positiver Neurone positiv mit der Schlafdauer. Durch die Implantation von Elektroden im MnPO und der POA, zusammen mit der Ableitung des EEGs, bei Ratten konnte eruiert werden, dass Neurone des MnPO an der Initiierung des Übergangs vom Zustand des Bewusstseins zum stabilen Non-REM-Schlaf beteiligt sind (hohe Impulsfrequenz zu Beginn des Non-REM-Schlafes, abnehmende Impulsfrequenz bei anhaltenden Non-REM Episoden), während Neurone des VLPO eine Rolle in der Schlaferhaltung und –kontinuität spielen (Aktivitätsanstieg erst während des Non-REM-Schlafes) (Suntsova et al. 2002). Die Interaktion der beschriebenen Kerngebiete des ARAS und des MnPO/VLPO erfolgt nach dem sogenannten „flip-flop switch“ (siehe Abb. 9), einer Bezeichnung aus der Elektrotechnik, die einen eigendynamischen Kreislauf beschreibt, welcher reziprok verbundene inhibitorische Elemente enthält. Die Aktivität eines der konkurrierenden Elemente unterdrückt inhibitorische Einflüsse der anderen Seite und disinhibiert so die eigene Aktivität. Flip-flop Systeme vermeiden Übergangszustände, und so erklärt sich möglicherweise, warum der Wechsel von Wachheit zum Schlaf oftmals ziemlich abrupt vollzogen wird. Evolutionär gesehen ist ein andauernder „Dämmerzustand“ zudem ineffektiv für die Regenerationsprozesse des Körpers und gefährlich in Bezug auf die Feindexposition (Saper et al. 2005).

Orexinerge Neurone des LH stützen das ARAS durch afferente Projektionen zu allen monoaminergen und cholinergen Kerngebieten des Hirnstamms (Peyron et al. 1998, Chemelli et al. 1999), zusätzlich bestehen reziproke Konnektivitäten zwischen dem VLPO/MnPO und dem LH, jedoch exprimieren VLPO/MnPO -intrinsische Neurone keine Orexinrezeptoren (Marcus et al. 2001, Gong et al. 2005, Yoshida et al. 2006), und können somit nicht direkt durch den LH inhibiert werden. Diese asymmetrische Beziehung stabilisiert möglicherweise den „flip-flop switch“, und verhindert ungewollte Übergänge zum Schlaf. Ob und wann man schläft, hängt von zwei Hauptfaktoren ab. Einmal der zirkadianen Rhythmik, die den Tagesrhythmus definiert, zum anderen von einer homöostatischen Komponente, was bedeutet, dass extensive Phasen des Wachseins einen langanhaltenden und tiefen Schlaf nach sich ziehen (Erholungsschlaf) (Borbely 1982).

Eine zirkadiane Rhythmik (lateinisch *circa* „um“, „um herum“, „ungefähr“ und *dies* „der Tag“) nennt man in der Chronobiologie die endogenen Rhythmen, die eine Periodenlänge von etwa 24 Std aufweisen. Die bedeutendste der die zirkadianen Rhythmen kontrollierende „inneren Uhren“ der Säugetiere liegt im SCN (Stetson and Watson-Whitmyre 1976) des Hypothalamus. Äußere Einflüsse wie vor allem die Veränderung

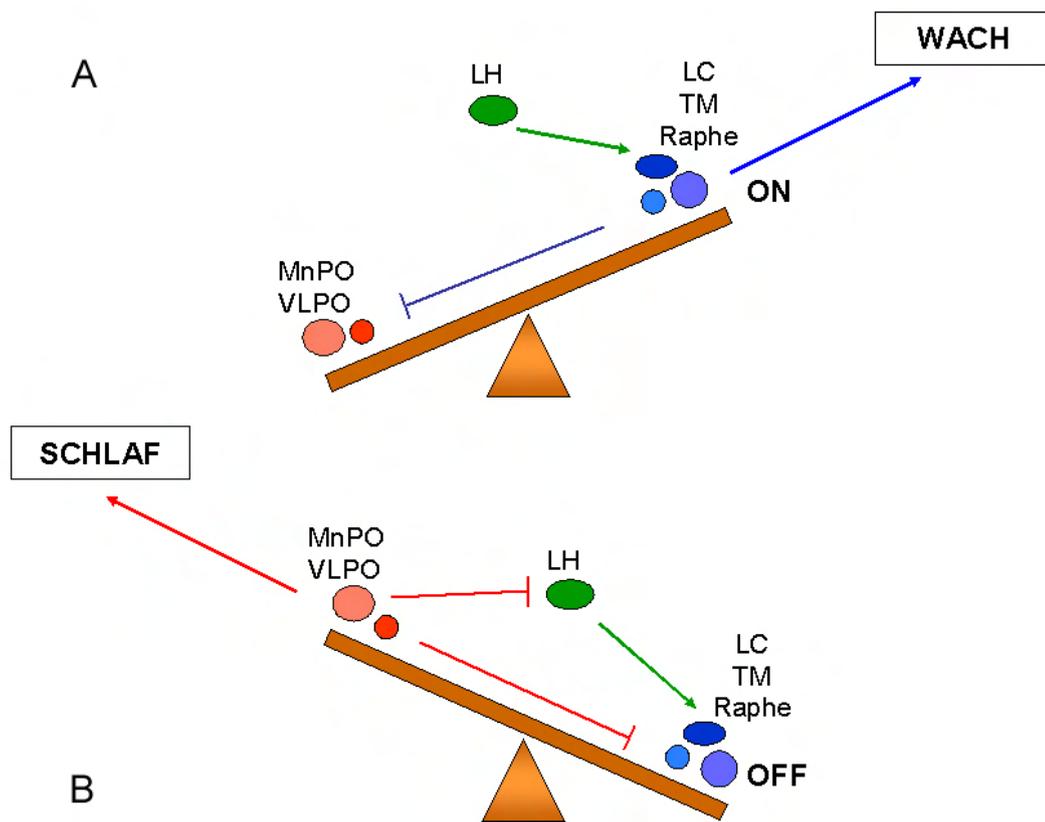


Abbildung 9: Schematische Abbildung des „flip-flop switch“ Modells

A: Während des Wachseins inhibieren monoaminerge Kerngebiete (blau) Regionen des anterioren Hypothalamus (rot), was in einer Disinhibition des LC, TM, der *Nuclei raphe* und der Aktivität orexinergener Neurone des lateralen Hypothalamus (LH) (grün) resultiert. Da Neurone des VLPO/MnPO keine Orexinrezeptoren exprimieren, verstärken orexinerge Neurone des LH die Exzitationen monoaminergener Neurone, statt direkt GABAerge Neurone des VLPO/MnPO zu supprimieren.

B: Während des Schlafes ist die Impulsfrequenz GABA- und galaninhaltiger Neurone des VLPO/MnPO erhöht und unterdrückt so die Impulsfrequenz monoaminergener Neurone des posterioren Hypothalamus und des Hirnstammes, bzw. orexinergener Neurone des LH was ebenfalls zu einer Disinhibition der Neurone des VLPO/MnPO führt und gleichzeitig durch Blockade orexinergener Neurone des LH die Aktivierung monoaminergener Neurone verhindert, da deren Aktivität den Schlaf unterbrechen würde.

Die direkte reziproke Verbindung zwischen VLPO/MnPO und LC/TM/*Nuclei raphe* bildet einen klassischen „flip-flop switch“, der langandauernde Übergangszustände verhindert, jedoch relativ instabil ist. Orexinerge Neurone des LH stabilisieren den „switch“, zirkadiane und homöostatische Faktoren wirken regulierend.

Abkürzungen: VLPO *Nucleus ventrolateralis praeopticus*; MnPO *Nucleus medianus praeopticus*; LH lateraler Hypothalamus, LC *Locus coeruleus*, TM *Nucleus toberomamillaris*, Raphe *Nuclei raphe*

(Modifiziert nach Saper et al. 2005, Nature 437)

während eines 24-Std Tages ist der Wechsel zwischen Wachheit am Tag und dem Schlafen in der Nacht. Das Hormon Melatonin, gebildet von den Pinealocyten der Epiphyse, ist ein wichtiger Mediator des Tag-Nacht Rhythmus. Die Melatoninkonzentration im Blut folgt einem zirkadianen Muster mit hohen Werten in der Nacht und niedrigen während des Tages. Über spezifische Photorezeptoren in der Retina wird der tägliche Hell-Dunkel Wechsel wahrgenommen und diese Information gelangt über den retino-hypothalamischen Trakt zum SCN. Über multisynaptische Afferenzen (vom SCN zum pPVN, hier Umschaltung auf deszendierende Bahnen zum *Nucleus intermediolateralis* des Rückenmarks, über *Truncus vagosymphaticus* zum *Ganglion cervicale superior* (GCS)) erreichen postganglionäre sympathische Fasern die Epiphyse (Larsen 1999). Hier bewirkt Noradrenalin β -Rezeptor vermittelt in den Pinealocyten letztendlich über intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen eine erhöhte Aktivität der N-Acetyltransferase und somit eine gesteigerte Melatoninsynthese (Kappers 1960, Moore 1978, Klein 1985).

Unter Lichteinfluss ist die Impulsfrequenz GABAerger Neurone im SCN erhöht und die Melatoninsynthese gehemmt (Gao and Moore 1996). Melatonin seinerseits supprimiert u.a. über metabotrope MT_1 -Rezeptoren die Impulsfrequenz der Neurone des SCN (Reppert et al. 1994) und wirkt schlaffördernd (Dijk and Cajochen 1997, Stone et al. 2000, Krauchi and Wirz-Justice 2001). Der SCN weist nur geringgradig efferente Projektionen sowohl zu VLPO und LH auf (Watts et al. 1987, Abrahamson et al. 2001, Chou et al. 2002), und projiziert indirekt über die subparaventriculäre Zone (SPZ) und die POA zum MnPO (Deurveilher and Semba 2003). Im VLPO/MnPO wird am Tag GABAerg deren Aktivität gehemmt. Der größte Teil der Efferenzen projiziert jedoch über die SPZ zum DMH (Lu et al. 2001, Deurveilher and Semba 2005). Der DMH wiederum hat ausgeprägte Konnektivitäten zum VLPO (GABAerge Aktivitätshemmung des VLPO) und zum LH (über Glutamat und TRH vermittelte Aktivierung orexinerger Neurone des LH) (Thompson et al. 1997, Chou et al. 2002, 2003, Yoshida et al. 2006). Der DMH hat eher schwach ausgeprägte Konnektivitäten zu Kerngebieten des Hirnstammes, diese bestehen jedoch durch die Projektionen des LH (siehe oben). Neurotoxische Läsionstudien des DMH von Ratten resultierten nicht nur in einer gestörten zirkadianen Rhythmik des Schlaf-Wach Verhaltens, sondern auch in verminderten Plasmaspiegeln an Corticosteroiden, einer reduzierten lokomotorischen Aktivität und einer geringeren Nahrungsaufnahme (Chou et al. 2003), was einmal mehr die enge Vermaschung mehrerer homöostatischer Regelkreise demonstriert (vergleiche Kap. 1.8.1) sowie verdeutlicht, dass zirkadian nicht nur der Schlaf-Wach Rhythmus, sondern auch viele andere Körperfunktionen reguliert werden.

1.9.2. Physiologische Bedeutung purinerner Signalübertragung in der Regulation des Schlafes

Adenosin als Neuromodulator ist für die homöostatische Regulation des Schlafes von großer Bedeutung (Radulovacki et al. 1984, Benington and Heller 1995, Strecker et al. 2000). Die Entdeckung hypnogener Effekte von Adenosin gehen zurück auf das Jahr 1954 (Feldberg and Sherwood 1954). Icv. Applikation von Adenosin in den lateralen Ventrikel von Katzen induzierte Schlaf-ähnliches Verhalten. Diese Beobachtungen wurden durch Untersuchungen an Ratten gestützt. Die icv. Applikation von Adenosin-Analoga führte bei diesen Tieren zu einem Anstieg des niederfrequenten Deltaschlafes (slow wave sleep = SWS), charakteristisch für die tiefe Non-REM Schlafphase (Radulovacki 1985). Die Applikation eines A_1 -Agonisten in den Bereich des BF von Katzen durch Mikrodialyse sowie eines A_2 -Agonisten in den VLPO förderte bei Ratten bzw. Katzen die Schläfrigkeit, reduzierte die Wachsamkeit und induzierte die Expression von c-Fos (Portas et al. 1997, Scammell et al. 2001). Mehr noch, ein Schlafentzug für sechs Stunden führte im BF von Katzen zu einem markanten Anstieg der Adenosinkonzentration, der erst bei Eintritt in die nachfolgende Schlafphase wieder abnahm (Porkka-Heiskanen et al. 1997). Dieses Phänomen wurde in anderen extrahypothalamischen Regionen wie *Thalamus* oder *Nuclei raphe* nicht beobachtet, was die Spezifität des BF und des VLPO als Zielstrukturen für die purinerge Modulationen des Schlaf-Wach Verhaltens unterstreicht (Strecker et al. 1999).

Koffein und Theophyllin repräsentieren potente Antagonisten an A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren und erhöhen dementsprechend die Wachsamkeit. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sind sie membrangängig, so dass sie nach oraler Aufnahme und Resorption im Magen-Darm Trakt über den Blutweg das ZNS erreichen können (Schwierin et al. 1996, Fredholm et al. 1999). Diese Beobachtungen führten zu der These, dass Adenosin im ZNS die Funktion eines homöostatischen Schlafregulators einnimmt („Schlaf-Faktor“). Der Metabolismus von Adenosin ist an den Energiestoffwechsel gekoppelt, der für die Beziehung von neuronaler Aktivität und „Schlaf-Drang“ relevant ist (Benington and Heller 1995). Phasen längerer Schlaf-Deprivation resultieren in einem Abbau der Glycogenreserven und der intrazellulären ATP-Konzentration des ZNS (Kong et al. 2002, Shepel et al. 2005). Der intrazelluläre Metabolismus von ATP führt zu einem Anstieg von Adenosin (u.a. über die Aktivität der Zytosolischen 5'-Nukleotidase (Montero and Fes 1982) oder Inhibition der Adenosin-Deaminase (Lloyd and Fredholm 1995)), welches über sogenannte unspezifische „equilibrative nucleoside transporters“ (ENTs) in den Extrazellularraum ausgeschleust wird (Dunwiddie and Masino 2001, Latini and Pedata 2001). Diese Transporter sind bidirektional aktiv, d.h.

abhängig vom Konzentrationsgradienten werden Purine und Pyrimidine in den Extra- oder Intrazellularraum transportiert (Latini and Pedata 2001). Der massive Anstieg der extrazellulären Adenosin-Konzentration resultiert nicht nur aus einer Zytosolischen Formation, sondern auch durch extrazellulären Abbau von ATP (vergleiche Kap. 1.5) (Dunwiddie et al. 1997). Die Tatsache, dass Nitrobenzylthioinosine als potente Antagonisten an ENTs nach microdialytischer Mikroapplikation in das BF von Katzen zu einem Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration führten, spricht dafür, dass unter physiologischen Bedingungen eine Adenosinaufnahme ins Zytosol, entsprechend dem Konzentrationsgradienten, erfolgt, die sich unter pathologischen Bedingungen (Schlafmangel) umkehrt, und somit der intrazellulären Bildung von ATP größere Bedeutung zukommt (Porkka-Heiskanen et al. 1997).

Die Entladungsrate cholinergischer Neurone des BF ist in der Phase der Schlaflosigkeit am höchsten (Szymusiak and McGinty 1989, Jones 1993). Über Projektionen zum Cortex sind diese Neurone massiv am Zustand der Vigilanz beteiligt. *In vitro* patch clamp Studien am Gehirnschnitt von Ratten sowie *in vivo* Studien an wachen Ratten und Katzen (extrazelluläre Ableitung cholinergischer Neurone und microdialytische Applikation von Adenosin) führten zu einer Abnahme der Impulsfrequenz cholinergischer Neurone. Dadurch konnte wiederum die physiologische Relevanz von Adenosin als homöostatischem Regulator des Schlafes untermauert werden. Die Frage nach der Beteiligung des Rezeptor-Subtyps klärte sich erneut durch die microdialytische Applikation spezifischer Agonisten und Antagonisten an P1-Rezeptoren in das BF von Katzen (Thakkar et al. 2003). A₁-Rezeptor Agonisten supprimierten die Impulsfrequenz cholinergischer Neurone, A₁-Antagonisten erhöhten deren Exzitationen. A_{2A}-Agonisten und Antagonisten waren ineffektiv. Zudem führte ein sechsständiger Schlafentzug bei Ratten zu einer ausgeprägten Hochregulierung von A₁-Rezeptor-, nicht jedoch A_{2A}-Rezeptor-spezifischer mRNA (Basheer et al. 2001). Der hierbei beschriebene intrazelluläre Signalweg führte nach Interaktion von Adenosin und A₁-Rezeptoren zu einer Aktivierung der Phospholipase C (Freund et al. 1994) mit nachfolgendem Anstieg der [Ca²⁺]_{iz} und anschließender Stimulation der Proteinkinase C. Dies wiederum bedingte eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern und induzierte die Expression von A₁-Rezeptoren (Porkka-Heiskanen et al. 2002). Dennoch unterschied sich das Schlaf-Wach EEG-Muster in A₁-Rezeptor knock-out Mäusen nach sechsständigem Schlafentzug nicht signifikant von dem des Wild-Typ Stammes (Stenberg et al. 2003). Zudem führte die icv. Applikation eines A₁-Agonisten in A_{2A}-Rezeptor knock out Mäusen auch nicht zu einem veränderten Schlafverhalten, wohingegen die icv. Applikation eines A_{2A}-Agonisten im Wild-Typ-Stamm schlaffördernd wirkte (Urade et al.

2003). A_{2A} -Rezeptoren sind verstärkt in der *Leptomeninx encephali* von Ratten exprimiert (Sebastiao and Ribeiro 1996). Die Infusion eines A_{2A} -Agonisten in den Subarachnoidalraum in der Nähe des BF bei Ratten erhöht sowohl die Non-REM, als auch die REM Schlafphase, wohingegen A_1 -Agonisten Schlaf inhibierten (Satoh et al. 1996). Im direkt angrenzenden VLPO, in dem GABAerge, schlaf-aktive Neurone lokalisiert sind (siehe oben) (Sherin et al. 1996), konnte bei Ratten nach subarachnoidaler Infusion eines A_2 -Agonisten eine signifikant erhöhte c-Fos-Expression mittels immunhistochemischen Nachweises des Fos-Proteins im Vergleich zu mit aCSF behandelten Kontrolltieren beobachtet werden (Scammell et al. 2001). Gleichzeitig stieg die Konzentration an GABA in histaminergen Neuronen des TM an (Hong et al. 2005), was impliziert, dass A_{2A} -Rezeptor-vermittelt über Aktivierung GABAerger Neurone des VLPO das histaminerge Vigilanzsystem des TM gehemmt wird. *In vitro* patch-clamp Studien an VLPO-enhaltenden Gehirnschnitten von Ratten demonstrierten zwei mögliche Effekte von Adenosin an A_{2A} -Rezeptoren des VLPO. Zum einen eine direkte Aktivierung GABA-erger Neurone (Gallopín et al. 2005), zum anderen über präsynaptische A_{2A} -Rezeptoren eine Blockade inhibitorischer GABAerger Afferenzen, was wiederum die Disinhibition schlaf-aktiver VLPO-Neurone nach sich zog (Morairty et al. 2004). Es gibt daher klare Hinweise für eine Beteiligung sowohl von sowohl A_1 -, als auch A_{2A} -Rezeptoren an den hypnogenen Effekten des Adenosins, jedoch in unterschiedlichen Regionen des ZNS. Möglicherweise sind A_1 -Rezeptoren mehr in die normale homöostatische Regulation involviert, wohingegen A_{2A} -Rezeptoren mehr an der Schlafinduktion durch leptomenigeale Entzündungen beteiligt ist, da die hypnogenen Effekte von Prostaglandin D2 an die Interaktion mit A_{2A} -Rezeptoren gekoppelt zu sein scheinen (Satoh et al. 1996).

Die große physiologische Bedeutung von Adenosin und P1-Rezeptoren in der homöostatischen Regulation des Schlafes steht einer offensichtlich entweder geringfügigen oder noch nicht näher bekannten Bedeutung ionotroper und metabotroper P2-Rezeptoren gegenüber. Auf der Basis molekularer (single cell RT-PCR) und pharmakologischer (patch clamp und extrazelluläre Ableitungen) Studien konnten sowohl $P2X_2$ - als auch $P2Y_1$ - und $P2Y_4$ -Rezeptoren in histaminergen Neuronen des TM nachgewiesen werden (Vorobjev et al. 2003a, Sergeeva et al. 2006). Deren physiologische Relevanz ist allerdings noch unklar. Die Charakterisierung von $P2X_2$ -Rezeptoren orexinerger Neurone des LH und deren Bedeutung bei der Nahrungsaufnahme und/oder des Schlaf-Wach Verhalten wurde bereits in Kap. 1.8.2 aufgeführt (Wollmann et al. 2005, Florenzano et al. 2006).

1.10. Purinerge Rezeptoren und Gliazellen

Im Rahmen der Abhandlung vier wichtiger homöostatischer Systeme zur Konstanthaltung der Körperkerntemperatur, des Salz- und Wasserhaushaltes, der Nahrungsaufnahme sowie der circadianen Rhythmik inkl. des Schlaf-Wach Verhaltens wurde jeweils die mögliche Bedeutung purinerner Signaltransduktion und Rezeptoren erläutert. Dabei stand naturgemäß die neuronale Komponente einzelner Gehirnstrukturen vor allem des Hypothalamus im Vordergrund des Interesses. Neben den Neuronen können jedoch auch Gliazellen, also Astrocyten, Oligodendrocyten oder Mikrogliazellen Zielstrukturen für ATP oder Adenosin repräsentieren.

1.10.1. Astrocyten

Erste Untersuchungen zur modulatorischen Wirkung von ATP an Astrocyten stammen aus den 1980er Jahren (Neary et al. 1988). So induzierte die Applikation von ATP einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ in Astrocyten einer Primärkultur aus dem Cortex neonataler Ratten, gemessen als Nettoaufnahme von radioaktiv markiertem $^{45}Ca^{2+}$, wobei es möglicherweise über Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Stimulation der Prostaglandinsynthese kam (Murphy et al. 1988, Dumuis et al. 1989). Die Tatsache, dass in Astrocyten eine Vielzahl an ionotropen und metabotropen Purinozeptoren exprimiert wird (P2X₁₋₇, P2Y_{1,2,4,6,12,13,14}) (Abbraccio et al. 1995a, Franke et al. 2001a, Fumagalli et al. 2003), gibt Hinweise darauf, dass ATP als physiologischer Mediator an der neuroglialen oder interglialen Kommunikation beteiligt ist, und dass spezifische Rezeptorsubtypen abhängig vom funktionellen Zustand der Zelle und den herrschenden (patho-)physiologischen Konditionen transkribiert, translatiert und schließlich in die Zellmembran transloziert werden (Barres 1991, Abbraccio and Ceruti 2006).

Diese „Kommunikation *via* ATP“ wurde mehrfach an primären Astrocytenkulturen aus dem Cortex neonataler Mäuse und Ratten, der Retina der Ratte (Müller-Zellen) und an Mischkulturen aus Astrocyten und Mikrogliazellen des Hippocampus embryonaler Ratten demonstriert. Elektrische, mechanische, und/oder chemische Stimulation (ATP) eines Astrocyten induzierte mikrospektrofluorimetrisch-detektierbare Calcium-Oszillationen in dieser Zelle, die sich aufgrund der Kopplung durch *gap junctions* in direkt benachbarten Astrocyten fortpflanzten. Im extrazellulären Medium konnte *post stimulationem* ein Anstieg der ATP-Konzentration verzeichnet werden (Messung mittels HPLC und/oder Luciferin/Luciferase-Assay). Diese Effekte ließen sich durch den allgemeinen Purinoceptor Antagonisten PPADS inhibieren (Hassinger et al. 1996, Newman and Zahs 1997, Guthrie et al. 1999, Haydon 2001, Coco et al. 2003). Die Stimulation der

neuroglialen Kommunikation durch ATP wurde an Präparationen der Retina der Ratte (Newman 2003, 2004) sowie des Hippocampus von Mäusen und Ratten (Zhang et al. 2003, Pascual et al. 2005) demonstriert. Chemische und/oder mechanische Stimulationen der entsprechenden Gliazellen aktivierten die Freisetzung von ATP, welches extrazellulär enzymatisch zu Adenosin hydrolysiert wurde und *via* Interaktion mit A₁-Rezeptoren einerseits die präsynaptische Glutamatfreisetzung an CA3- und CA1-Synapsen inhibierte (Zhang et al. 2003), oder andererseits über einen erhöhten K⁺-Einstrom zu einer Hyperpolarisation der retinalen Ganglienzellen führte und so deren spontane Exzitation hemmte (Newman 2003, 2004).

Neben diesen Kurzzeit-Effekten sind auch Langzeit-Effekte beschrieben, die durch ATP in Astrocyten induziert werden. ATP wird infolge von Entzündungen des ZNS (traumatisch oder ischämisch bedingt) signifikant aus Neuronen und Gliazellen freigesetzt und bewirkt über die parakrine oder autokrine Aktivierung ionotroper und metabotroper purinergere Rezeptoren neuroglialer Zellkomponenten eine Modulation ihrer Genexpression. In einigen Studien kam es letztlich zur Astrocytenproliferation und als Endresultat wurde eine astrocytäre Vernarbung konstatiert (reaktive Astroglie) (Neary et al. 1996, Abbraccio et al. 1999, Franke et al. 1999, Abbraccio and Ceruti 2006). Erste Hinweise auf die proliferative Wirkung von ATP und Aktivierung von Astrocyten stammten aus Untersuchungen an Primärkulturen striataler Astrocyten von Ratten (Abbraccio et al. 1995, Bolego et al. 1997). Die Stimulation dieser Zellen mit ATP und dessen Derivaten induzierte die Expression von c-fos und c-jun und, nach dreitägiger Inkubation mit ATP, morphologische Zellveränderungen in Form einer Elongation astrocytärer Zellfortsätze. Diese Effekte ließen sich durch Suramin und PPADS, nicht jedoch durch den P2X-spezifischen Antagonisten TNP-ATP inhibieren, was eine Beteiligung metabotroper purinergere Rezeptoren implizierte (Bolego et al. 1997, Brambilla et al. 2002). Mittlerweile weiß man, dass sowohl über die Aktivierung von ionotropen (P2X₂, P2X₇) als auch metabotropen (P2Y₁) purinergere Rezeptoren eine Signalkaskade mit Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) und der Proteinkinase B in kortikalen Astrocyten neonataler Ratten induziert wird, wodurch letztlich die Astroglie bedingt ist (Brambilla et al. 2003, Neary et al. 2003, Jacques-Silva et al. 2004, Neary and Kang 2005). Dennoch ist eine Vielzahl der an dieser Signaltransduktion beteiligten Purinozeptoren bislang nicht eindeutig charakterisierbar (Neary and Kang 2005). Weiterhin ist in diesem Zusammenhang *via* ATP die Freisetzung von Arachidonsäure und die Hochregulierung der COX-2, hemmbar durch PPADS, beschrieben (Bolego et al. 1997, Brambilla et al. 1999), was die Bildung von PGE₂ als einem der Endmediatoren der reaktiven Astroglie durch Stimulation purinergere

Rezeptoren impliziert. Microapplikationen von α,β me-ATP, ADP und UTP und/oder PPADS in den *Nucleus accumbens* (NAC) von Ratten beweisen einmal mehr die Heterogenität der an der reaktiven Astrogliose beteiligten purinergen Rezeptoren (Franke et al. 2001b). Die anschließenden Immunfluoreszenzstudien zur vermehrten Lokalisation von astrocytärem *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) im läsierten Bereich deuteten auf mitogene Effekte für α,β me-ATP und ADP, nicht jedoch für UTP, hin. Vorbehandlung mit PPADS vermochte die mitogene Wirkung der genannten ATP-Analoga zu unterdrücken. Der immunhistochemische Nachweis von P2Y₁ und P2X₃ Rezeptorprotein kann als Hinweis auf die Bedeutung sowohl ionotroper als auch metabotroper purinergener Rezeptoren dienen, wobei *dato* nicht untersuchte Rezeptor-Subtypen nicht ausgeschlossen werden können. Im NAC konnte mittels RT-PCR die Expression aller P2X-Subtypen nachgewiesen werden (Franke et al. 2001a). Auf Proteinebene konnten P2X₂, P2X₃ und P2X₄ mit GFAP als Astrocytenmarker co-lokalisiert werden. Nachdem eine gezielte Läsion im NAC gesetzt wurde, konnten auch die unter physiologischen Bedingungen auf Proteinebene nicht nachweisbaren Rezeptoren P2X₁ und P2X₇ immunhistochemisch dokumentiert werden, was auf ein verändertes Expressionsmuster purinergener Rezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen hindeutet.

1.10.2. Oligodendrocyten

Oligodendrocyten (OD) 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 (Bunge et al. 1978, Trotter 1993, Zalc 1995). In den 1990er Jahren konnte demonstriert werden, dass die Applikation von ATP in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Tiere und der Länge der Kultivierungszeit der ODs einen Einstrom von Calciumionen in das Zytosol kultivierter OD induzierte (Kastritsis and McCarthy 1993, He and McCarthy 1994, Takeda et al. 1995). Erste Studien zur physiologischen Wirkung von ATP an OD-intrinsischen Purinozeptoren finden sich in der Fachliteratur erst seit Anfang dieses Jahrtausends. Durch Western-Blot Analyse konnte in OD-Isolaten aus dem ZNS neonataler Ratten die Expression sowohl ionotroper (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄ und P2X₇) als auch metabotroper (P2Y₁, P2Y₂ und P2Y₄) Purinozeptoren nachgewiesen werden (Meomartini et al. 2003). Funktionell konnten P2X₇- und P2Y₁-Purinozeptoren mittels mikrospektrofluorimetrischer Untersuchungen und Einsatz spezifischer Agonisten und Antagonisten charakterisiert werden (Agresti et al. 2005). Neuronal generierte Aktionspotentiale scheinen die Reifung axonnaher Oligodendrocyten zu induzieren. So induzierte axonal, nicht-synaptisch freigesetztes ATP (bzw. anschließend durch Hydrolyse

entstandenes Adenosin) in Co-Kulturen sensorischer Neurone und OD-Vorläuferzellen sowohl die morphologische Entwicklung als auch Myelinsynthese der ODs. Dies repräsentiert einen der wichtigsten Mechanismen der Kommunikation zwischen Axonen und myelinbildenden Gliazellen (Fields and Stevens-Graham 2002, Stevens et al. 2002). An dieser durch ATP und/oder Adenosin stimulierten Differenzierung von Vorläuferzellen der Oligodendrocyten zu reifen Gliazellen wird die Beteiligung heterodimerer A₁- und P2Y₁-Rezeptoren diskutiert (Yoshioka et al. 2001, 2002).

Die modulatorische Wirkung von ATP in Bezug auf eine erhöhte Axonmyelinisierung konnte an ausdifferenzierten ODs (3 - 4 Wochen kultiviert) in einer Mischkultur mit Neuronen des DRG embryonaler Mäuse histochemisch mittels Sudan Schwarz zum Nachweis lipidreicher Zellstrukturen demonstriert werden (Ishibashi et al. 2006). Die Applikation von Adenosin hatte in diesem Stadium keine Auswirkung auf eine vermehrte Myelinbildung. Dabei konnte gezeigt werden, dass die neuronal generierten elektrischen Impulse zu einer axonalen Freisetzung von ATP führten, welches an Astrocyten die Abgabe des Leukämie-inhibierenden-Faktors (LIF) induzierte, der in niedrigen Konzentrationen einen Anstieg der Myelinbildung der OD forcierte; hohe LIF-Konzentrationen wirkten inhibitorisch.

Assays zur Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von ATP auf OD-Vorläuferzellen ermöglichten u.a. den Nachweis einer migrationsfördernden Wirkung von ATP (Frost et al. 2000, Agresti et al. 2005). Während die Stimulation von Astrocyten mit ATP eindeutig deren Proliferation induzierte (reaktive Astroglieose siehe oben) (Abbraccio et al. 1999), weist die Applikation von ADP und ATP an isolierten OD eher auf antiproliferative Effekte hin (Agresti et al. 2005). Eine 24-stündige Inkubation kultivierter ODs mit PDGF (*platelet-derived growth factor*) und ATP sowie ADP oder Adenosin inhibierte signifikant die Aufnahme von Bromdesoxyuridin (BrdU) im Vergleich zur Inkubation von PDGF *per se*. Zusammengefasst liefern diese Daten Hinweise darauf, dass ATP (und vielleicht auch andere Nucleotide), welches unter inflammatorischen Bedingungen (siehe Kap. 1.10.1) im ZNS freigesetzt wird, möglicherweise den Prozess der Remyelinisierung der Axone bei inflammatorisch demyelinisierenden Krankheiten wie z.B. Multipler Sklerose (MS) regulieren. So lieferten Untersuchungen der MS am Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wichtige Anhaltspunkte für die Bedeutung von LIF für die Remyelinisierung der Axone (Butzkueven et al. 2002).

1.10.3. Mikroglia

Die Mikroglia stellen eine Gruppe immunkompetenter Zellen des ZNS dar, die möglicherweise von während der späten embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsphase in das Gehirn eingewanderten Monocyten abstammt (Perry et al. 1985, Ashwell 1991, Milligan et al. 1991; Farber and Kettenmann 2005). Darüber hinaus wird diskutiert, ob es im adulten Organismus zu einer Neudifferenzierung von sekundär aus dem roten Knochenmark eingewanderten Zellen kommen kann (Soulet and Rivest 2008). Unter physiologischen Bedingungen im gesunden Gehirn sind Mikrogliazellen durch eine charakteristisch verzweigte Form gekennzeichnet („ruhende/nicht aktivierte Mikroglia“), während diese unter pathologischen Bedingungen (Traumata, Inflammation u.a.) aktiviert werden und der morphologische Zustand der Zellen sich hin zu einer amöboiden Form verändert (Kreutzberg 1996, Boussein et al. 2000). In diesem Status sind Mikrogliazellen zur chemotaktisch induzierten Migration und Proliferation sowie Freisetzung immunmodulatorischer Substanzen (beispielsweise Cytokinen oder NO) in der Lage (Garden and Möller 2006, Harnisch and Kettenmann 2007).

RT-PCR, Western-Blot und/oder pharmakologische sowie zellbiologische Untersuchungen demonstrierten die Expression sowohl von P1- ($A_{1,2,3}$), P2X- ($P2X_{1,2,3,4,6,7}$) als auch P2Y-Rezeptoren ($P2Y_{1,2,3,4,6,12,13}$) sowohl in permanenten Mikrogliazelllinien (Maus-N9) als auch in nativen Mikroglia der Maus und Ratte (Gebicke-Haerter et al. 1996, Hammarberg et al. 2003, Sasaki et al. 2003, Bianco et al. 2005, Xiang and Burnstock 2005a). Quantitativ vorherrschend findet man in der Mikroglia der Ratte die Purinozeptor-Subtypen $P2X_4$ und $P2X_7$, sowie $P2Y_2$, $P2Y_6$ und $P2Y_{12}$ exprimiert (Inoue 2006).

Die Inkubation einer Primärzellkultur kortikaler Mikroglia neonataler Ratten mit ATP bewirkte eine durch P2Y-Rezeptor Aktivierung vermittelte, zielgerichtete Migration (Chemotaxis), wobei vor allem $P2Y_{12}$ - oder $P2Y_{12}$ -like-Rezeptoren beteiligt schienen (Honda et al. 2001). Durch Depletion der extrazellulären Calciumkonzentration sowie Applikation spezifischer $G_{i/o}$ -gekoppelter P2Y-Antagonisten konnte eine Beteiligung von P2X-Rezeptoren ausgeschlossen werden. Die der Rezeptor-Bindung nachgeschaltete, intrazelluläre Signalkaskade erwies sich als sehr komplex und involvierte die Aktivierung von Rac (kleine GTPase) mit nachfolgender Ausstülpung der Zellmembran und Bildung von Lamellipodien (Ridley et al. 1992, Hall 1998), morphologische Zellveränderungen, die für die chemotaktische Migration von Bedeutung sind. Diese *in vitro* Studie demonstrierte, dass eine Aktivierung und Migration von Mikroglia *in vivo* aufgrund einer

Verletzung des ZNS, möglicherweise durch die Freisetzung von ATP aus umliegenden geschädigten Neuronen und deren Axonen, zurückzuführen war.

Die durch ATP induzierte Freisetzung proinflammatorischer Cytokine im Zusammenhang mit der Fiebergenese wurde in Kap. 1.6.3 bereits erwähnt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Garden and Moller 2006; Inoue 2008). Während Choi et al. (2007) zentralem ATP eine inflammatorische Wirkung zuschreibt, belegen Studien von Gourine und Mitarbeiter (2002, 2005, 2007) das Gegenteil. Die Stimulation einer aus dem Gehirn neonataler Ratten etablierten, primären Mikrogliazellkultur mit ATP und dem P2X₇-Purinozeptor Agonisten Bz-ATP führte zur vermehrten Expression von TNF- α mRNA sowie zur Freisetzung von bioaktivem TNF- α in den Zellkulturüberstand (Hide et al. 2000, Suzuki et al. 2004). Die nach Rezeptoraktivierung angestoßene Signalkaskade schließt die Aktivierung von ERK und p38 (Mitglieder der MAPK-Familie) sowie der JAK ein. Wahrscheinlich spielt die Aktivierung von p38 eine Schlüsselrolle in der Cytokinfreisetzung. So identifizierten Studien an humanen Monozyten p38 als spezifischen Angriffspunkt einer neuen Klasse Cytokin-supprimierender, anti-inflammatorischer Arzneimitteln (Pyridinyl-Imidazole) (Lee et al. 1994). Die Aktivierung von p38 konnte durch Applikation von BBG (P2X₇-Antagonist) unterdrückt werden (Suzuki et al. 2004). Die Phosphorylierung der MAPK verursachte möglicherweise eine Aktivierung sowohl von Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1 als auch von NF- κ B (p65), welche in die Transkription des TNF- α Gens involviert sind. Letzteres konnte nach Stimulation der Mikrogliazelllinie N9 mit ATP demonstriert werden (Ferrari et al. 1997a). Die Aktivierung der ERK scheint P2X₇ unabhängig zu sein, da BBG sich nicht als potenter Inhibitor der Phosphorylierung erwies (Suzuki et al. 2004). Die Aktivierung der ERK ist von entscheidender Bedeutung für Produktion und Freisetzung von TNF- α , indem sie die Aktivität von TACE (TNF- α *converting enzyme*) reguliert. TACE konvertiert das membrangebundene, 26 kDa große pro-TNF in die kleinere (17 kDa), lösliche Form an der Zelloberfläche (Moss et al. 1997, Rosendahl et al. 1997).

ATP ist ebenfalls in der Lage, die Freisetzung von IL-6 zu stimulieren. Die Inkubation von MG5-Zellen (permanente Mikrogliazelllinie aus p53 defizienten Mäusen) mit ATP bewirkte nach sechs Stunden einen messbaren IL-6 Anstieg (Shigemoto-Mogami et al. 2001), welcher weder durch ADP, UTP oder Adenosin reproduzierbar war. Die Tatsache, dass die TNF- α Sekretion sowohl nach Inkubation von MG-5 Zellen als auch primärer Mikroglia mit ATP bereits nach einer Stunde anstieg und nach drei bzw. sechs Stunden ein Maximum erreichte (Hide et al. 2000, Shigemoto-Mogami et al. 2001), führte zu der Annahme, dass ATP die Abgabe von IL-6 sekundär, infolge der Frei-

setzung von TNF- α und/oder IL-1 β induziert haben könnte. Dies konnte sowohl für primäre Astrocytenkulturen neonataler Ratten (Norris et al. 1994), als auch für humane Fibroblasten demonstriert werden (Zhang et al. 1990). Auch die mikrogliale IL-6 Freisetzung ist an die Aktivierung der MAP-Kinase p38 gekoppelt, jedoch unabhängig von einer Beteiligung des P2X₇-Purinozeptors. Bz-ATP aktivierte zwar p38, bewirkte jedoch nicht die Synthese von IL-6. Anscheinend ist die Freisetzung von IL-6 an die Expression metabotroper Rezeptoren gebunden, da eine Co-Inkubation mit ATP und Inhibitoren der PKC die IL-6 Synthese signifikant supprimierten (Shigemoto-Mogami et al. 2001). Diese These wird zum Teil durch *in vivo* Versuche an P2X₇ knock-out Mäusen gestützt, und steht ihr dennoch konträr gegenüber (Solle et al. 2001). Primärziel dieser Studie war es, die Freisetzungsmechanismen von IL-1 β zu untersuchen. LPS *per se* induzierte zwar die Bildung von pro-IL-1 β in Mikrogliazellen von Mäusen, die Freisetzung an prozessiertem, „reifen“ IL-1 β jedoch nur eingeschränkt. Dies führte zu der Forderung eines weiteren, extrazellulären Stimulus in Kombination mit LPS für die IL-1 β Reifung und Freisetzung. Dass hierbei ATP eine große Rolle spielt, konnte Mitte der 1990er erstmals demonstriert werden. Die gleichzeitige Applikation von ATP und LPS hatte eine signifikante Freisetzung von IL-1 β sowohl aus Mikroglia von Mäusen als auch aus humanen Makrophagen zur Folge (Ferrari et al. 1996, 1997b, 1997c). Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen wurden wenige Jahre später aufgedeckt. So induzierte ATP die Aktivierung einer Cystein-Protease (IL-1 β converting enzyme (ICE)/Caspase 1), mit einem Peak sechs Stunden *post stimulationem* mit LPS. Dieses Enzym spaltet pro-IL-1 β (34 kDa) in IL-1 β (17 kDa) (Sanz and Di Virgilio 2000). Für die Aktivierung von ICE selber wird eine niedrige K⁺-Konzentration im Zytosol der Zelle verantwortlich gemacht (Cheneval et al. 1998). Da weder K⁺-Kanalblocker noch K⁺-Ionophore (wie beispielsweise das Antibiotikum Nigericin) physiologischerweise im Körper vorkommen, scheint der durch ATP-bedingte K⁺-Ausstrom eine gute Erklärung für die Aktivierung von ICE zu sein.

In den letzten Jahren rückte ein weiterer, in Mikrogliazellen exprimierter ionotroper Purinozeptor-Subtyp (P2X₄) in das Interesse der Forschung (Inoue 2008). Der Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression von P2X₄ in Mikroglia im Dorsalhorn des Rückenmarks in Verbindung mit einer Verletzung der Spinalnerven, und der Entwicklung einer neuropathisch bedingten taktilen Allodynie wurde bereits in Kap. 1.4.4 erläutert (Tsuda et al. 2003). Studien an murinen BV-2 Zellen (permanente Mikrogliazelllinie aus der Maus) zeigten, dass eine 48-stündige LPS-Inkubation die Expression von P2X₄ sowohl auf mRNA-, als auch Proteinebene markant erhöhte; elektrophysiologisch konnte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ein erhöhter

Ionenstrom durch P2X₄-Rezeptoren aufgezeigt werden. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des P2X₇ Purinozeptor-Subtypes hingegen wies keine LPS-induzierte Veränderung auf (Raouf et al. 2007). Diese Daten deuten auf eine Beteiligung von P2X₄-Rezeptoren am inflammatorischen Geschehen hin. Verglichen mit anderen Agonisten für sogenannte „pattern-recognition receptors“ wie TLRs oder NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 2*), wie beispielsweise Muramyl-dipeptid, Polyinosin-Polycytidyl oder R848, scheint LPS der potenteste Induktor einer vermehrten Expression von P2X₄ auch in primären Mikroglia aus dem Gehirn neonataler Ratten zu sein (Guo et al. 2006).

Die physiologische Bedeutung der infolge eines Traumas des ZNS, Infektion, Entzündung oder Ischämie aus Mikrogliazellen, u.a. via ATP-aktivierten P2X₇ und/oder P2X₄ Rezeptoren freigesetzten Cytokine ist vielfältig. So wirkt TNF- α auf bislang unbekannte Weise einerseits neuroprotektiv aufgrund der vermehrten Expression antiapoptischer und -oxidativer Proteine, sowie der Suppression einer Glutamat-induzierten Apoptose (Suzuki et al. 2004, Inoue 2006). Andererseits auch neurotoxisch, da z.B. intracerebral applizierte TNF- α -Antikörper eine progressive, TNF- α bedingte Neurodegeneration im experimentellen Tiermodell des Hirninfarktes zu reduzierten vermochten (Barone et al. 1997, Meistrell et al. 1997). Die Ausprägung der TNF- α Wirkung scheint dabei sowohl vom beteiligten TNF-Rezeptor-Subtyp (Yang et al. 2002) als auch von der Zeitspanne abhängig zu sein, die nach Eintritt des Ereignisses vergangen ist (Scherbel et al. 1999). Zusätzlich scheint TNF- α in bezug auf die Entwicklung einer taktilen Allodynie ein potenter Schmerzinduktor zu sein (Homma et al. 2002). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch unklar, beruhen jedoch auf einer Modulation der Impulsfrequenz sensorischer Neurone (Schafers et al. 2003). Auch die Funktionen von zentral generiertem IL-6 sind vielfältig und schließen die Fiebergenese, die Schlafinduktion, Schmerzperzeption, Modulation der Nahrungsaufnahme sowie Symptome des *sickness behaviour* mit ein (Hanisch 2002). Welche Bedeutung zentral freigesetztem IL-6 *in vivo* aufgrund der Aktivierung purinergere Rezeptoren zukommt, ist letztendlich noch unklar, da sich die in der Literatur vorhandenen Daten bislang nur auf die involvierten Signalkaskaden in MG 5-Zellen beziehen. Tatsache ist, dass ATP in der Lage ist, die Cytokinfreisetzung aus Mikrogliazellen zu induzieren. Ob diese jedoch als endogene Pyrogene in Zusammenhang mit der Fiebergenese wirken, bleibt offen.

1.11. Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Die Integration sowohl der in sensorischen circumventrikulären Organen (sCVOs) des Hirnstammes perzipierten humoralen Informationen als auch afferenter neuronaler Signale mit Bedeutung für homöostatische Regelsysteme erfolgt unter anderem im *Nucleus medianus präopticus* (MnPO) als Komponente der *Lamina terminalis* des anterioren Hypothalamus. Die modulatorische Funktion des MnPO sowie die Beteiligung purinerner Rezeptoren bezüglich der Regulation der Körpertemperatur, des Salz- und Wasserhaushaltes, des Schlaf-/Wachverhaltens sowie des Energiehaushaltes repräsentieren die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Die funktionelle Expression purinerner Rezeptoren im MnPO ist in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine detaillierte molekularbiologische, immunhisto- und immunocytochemische sowie vor allem die Zelltyp-spezifische, funktionelle Charakterisierung ionotroper purinerner Rezeptoren des MnPO erfolgen.

- (1) Mittels *real-time* QRT-PCR sollte die relative mRNA-Expression ionotroper Purinozeptoren (P2X₁ – P2X₇) im MnPO neonataler und adulter Tiere aufgezeigt werden. Diese Untersuchungen sollten sowohl mögliche ontogenetische Unterschiede in der Expressionsrate ionotroper purinerner Rezeptoren im MnPO beider Tiergruppen aufzeigen, als auch wegweisend für die nachfolgende Charakterisierung auf Proteinebene sein. Darüber hinaus sollte sie als Hilfestellung für die Auswahl geeigneter Agonisten und Antagonisten für die pharmakologische Charakterisierung der exprimierten Rezeptor-Subtypen dienen.
- (2) Die Expressionstudie von P2X-Rezeptoren auf mRNA-Ebene im MnPO-Parenchym erlaubt keine Rückschlüsse auf deren neuro-gliale Verteilung. Zudem geht eine hohe Expressionsrate der mRNA für einen Purinozeptor nicht unbedingt mit deren Translation in ein funktionelles Rezeptorprotein einher. Daher sollte eine zelltyp-spezifische Charakterisierung von P2X Purinozeptoren (P2X₁ – P2X₇) auf Proteinebene mittels immunhisto- und -cytochemischer Methoden durchgeführt werden.
- (3) Die pharmakologische Charakterisierung funktionell im Bereich des MnPO exprimierter Purinozeptoren sollte auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Hierzu müsste zunächst eine neurogliale Primärzellkultur des MnPO neonateler Ratten etabliert werden; Neurone aus ZNS-Präparaten adulter Ratten können sich nicht ausreichend differenzieren. An den Zellen der etablierten MnPO-Primärkultur sollte nachfolgend mittels mikrospektrofluorimetrischer Techniken bei kontinuierlicher Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) die Bedeutung

ionotroper Purinozeptoren für Aktivierung von Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten und Mikrogliazellen erarbeitet werden.

- (a)** Zunächst sollte die neurogliale MnPO-Primärzellkultur auf ihre Responsivität (Calcium-Imaging) bei Superfusion mit ATP, generellen (2Me-SATP) sowie P2X-Rezeptor-Subtyp spezifischen Agonisten (α,β me-ATP für P2X₁ und P2X₃, Bz-ATP für P2X₇) getestet werden. Eine funktionelle Expression Adenosin-reaktiver P1-Purinozeptoren sollte mittels Superfusions-Stimulation der P1-Agonisten NECA (unselektiver A₁/A₂-Agonist) und CCPA (A₁-spezifischer Agonist) charakterisiert werden. Für ATP bzw. 2Me-SATP wurde geplant, eine detaillierte Dosis-Wirkungsbeziehung zu erstellen sowie für alle Zelltypen die Quelle der intrazellulären Calciumsignale zu ermitteln.
- (b)** Ionotrope purinerge Rezeptor-Subtypen unterscheiden sich u.a. durch ihr Reaktionsprofil hinsichtlich einer fehlenden, langsamen oder schnellen Desensibilisierung, bis hin zu einer möglichen Rezeptorinternalisierung. Diese Phänomene sollten durch äquimolare, repetitive Superfusionen des Agonisten (ATP oder 2Me-SATP) und nachfolgende Analyse der jeweiligen Anstiegssteilheit, Form und Dauer der intrazellulären Calciumsignale für alle Zelltypen der MnPO-Primärkultur erfasst werden.
- (c)** Hinsichtlich der Subtyp-Spezifität verfügbarer P2X-Rezeptor Antagonisten wird die Komplexität pharmakologischer Studien an ionotropen Purinozeptoren offensichtlich. Daher sollten in mikrospektrofluorimetrischen Experimenten mehrere in der Literatur hinreichend charakterisierte P2X Antagonisten (PPADS, TNT-ATP, *reactive blue 2*) in Gegenwart von ATP oder 2Me-SATP eingesetzt werden, um deren potentiell hemmende Wirkung auch in Relation zueinander beurteilen zu können. Der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen aller drei Antagonisten, sowie die Gruppierung von Neuronen, Astrocyten, Oligodendrocyten und Mikrogliazellen in „stark“ bzw. „schwach“ supprimiert sollte die Charakterisierung beteiligter Purinozeptoren erleichtern.
- (d)** Neben der rein kompetitiven Hemmung können auch allosterisch wirkende Faktoren wie Zn²⁺-Ionen die zelluläre Aktivität endogener oder exogener Purinozeptor Agonisten beeinflussen. Abhängig von Konzentration und vorherrschendem P2-Purinozeptor-Subtyp kann Zn²⁺ die zelluläre Wirkung des Agonisten ATP bzw. 2Me-SATP verstärken oder supprimieren. Daher sollte in einem weiteren mikrospektrofluorimetrischen Versuchsansatz der Einfluss von Zn²⁺ auf das Reaktionsverhalten (Calcium-Imaging) der neuroglialen Zellen des MnPO in Verbindung mit einer Agonistensuperfusion eruiert werden.

- (4) Aufgrund der Bedeutung des MnPO für die Generierung des zentralnervös vermittelten „sickness behaviour“ *in vivo* sollte durch *in vitro* Studien an der MnPO-Primärkultur aufgezeigt werden, ob ATP und/oder 2Me-SATP als purinerge Agonisten eine wahrscheinlich glial bedingte Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α und IL-6 induzieren könnten. Der Einsatz von Antagonisten ionotroper Purinozeptoren purinerge Rezeptoren in diesem Versuchsansatz sollte eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen der klassischen Induktion proinflammatorischer Cytokine durch exogene Pyrogene (LPS) und der durch ATP aufzeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Anästhesiekäfig (30 x 15 x 15 cm, B x L x H; Institut für Veterinär-Physiologie, D-Gießen)

Autoklav Systemec 2540 EL (Systemec, D-Wettenberg)

BioPhotometer (Eppendorf AG, D-Hamburg)

Computer: IBM kompatible Pentiumrechner

Dräger Vapor 19.3 Narkosemittel-Verdampfer mit Isofluran (Dräger Medizintechnik, D-Lübeck)

ELISA-Reader Mikrowin 2000 (Asys Hitech, Eugendorf, Österreich)

Eismaschine Icematic F120 (CastelMAC S.p.A., Castelfranco Veneto, Italien)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, D-Hamburg)

mit digitaler schwarz-weiß Kamera (Spot Insight, Diagnostic Instr. – Visitron Systems, D-Puchheim) und dazu gehöriger Software:

Spot Insight Software, (Diagnostic Instr., Sterling Heights, MI, USA)

Metamorph, Version 5.05 (Diagnostic Instr. - Visitron Systems, D-Puchheim)

Gefrier - Microtom Modell 1205 (Jung, D-Heidelberg)

Guillotine (W.G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Heißluftsterilisator ED 115/E2 (Binder GmbH, D-Tuttlingen)

Homogenisator Ultra Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, D-Staufen)

Inkubatoren:

Cellstar SWJ500DVBA (Queue Systems Inc., Asheville, NC, USA)

Nuaire™ US-Autoflow (Nuaire, Plymouth, MN, USA)

Kryostat Typ HM 500 O (Microm GmbH, D-Walldorf)

Mikrospektrofluometrisches Imaging System (Diagnostic Instruments – Visitron System, D-Puchheim) bestehend aus:

Ludl-Filterrad (Ludl Electronic Products Ltd, New York, NY, USA)

MAC 5000 Steuereinheit (Diagnostic Instr. – Visitron System, D-Puchheim)

Metafluor, Version 4.5 (Diagnostic Instr. – Visitron Systems, D-Puchheim)

Mikroskop Olympus IMT-2 (Olympus Optical, D-Hamburg)

Visicam CCD-Kamera (12 BIT digital CCD (charge-coupled device),

(Diagnostic Instr. – Visitron System, D-Puchheim)

Zellkultur-Messkammer (W. G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Mikrozentrifuge Force 7 (Roth, D-Karlsruhe)

pH-Meter 765 Calimatic (Kleinfeld Labortechnik, D-Hannover)

Real-time quantitative PCR System Typ ABI Prism 7300 (Applied Biosyst., Foster City, CA, USA)

Reinstwassersystem Milli-Q Biocel (Millipore, D-Eschborn)

Schlauchpumpe Minipuls-3 (Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld)

Schüttler Typ 3011 (Roth, D-Karlsruhe)

Sicherheits-Bunsenbrenner (Fireboy) (Technomara, D-Fernwald)

Sterilbänke:

Microflow Biological Safety Cabinet (Thermo Electrocorporation, D-Langensfeld)

Lamina Herasafe (Kendro Laboratory Product GmbH, D-Hanau)

Tischrühr- und Heizgerät Combimag (Roth, D-Karlsruhe)

Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin, D-Berlin)

Vakuumpumpe XF 54 230 50 (Millipore, D-Eschborn)

Vibratom TSE 550752/M (Technical & Scientific GmbH, D-Kronberg)

Wärmeblock QBT2 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Wärmeschrank, Typ 5050 EK (Haereus, D-Hanau)

Wasserbad BF 15 (Renner GmbH, D-Dannstadt)

Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, D-Hamburg)

2.1.2. Gebrauchsmaterial

Computerprogramme:

Adobe Photoshop, Version 7.0 (Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim)

Graph Pad Prism[®], Version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)

Windows Microsoft Word, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Windows Microsoft Excel, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Magnetrührstäbchen, PTFE ummantelt (Roth, D-Karlsruhe)

Messkolben Klasse A, 1, 2 und 5 l (Roth, D-Karlsruhe)

Messzylinder Klasse A, 100 und 250 ml (Roth, D-Karlsruhe)

Operationsbesteck (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)

Pinsel (Rotmarderhaar) (Renensis, D-Flensburg)

Pipetten:

(500-2000, 100-1000, 10-100, 2-10 µl) (Eppendorf AG, D-Hamburg)

(0,5-2 µl) (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)

Tierkäfige:

transparente Typ IV Polycarbonat Käfige 38 x 59 x 18 cm (B x T x H) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen)

transparente Typ III Polycarbonat-Käfige 28 x 42 x 15 cm (B x T x H) (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen)

2.1.3. Verbrauchsmaterial

12-well Zellkultur Testplatte (TPP, Trasadingen, Schweiz)

CELLocate[®] coverslips (Deckglas) (Eppendorf AG, D-Hamburg)

Deckgläschen 24 x 60 mm Stärke 1 (für Immunhistochemie) (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Einmalkanülen Sterican[®] 0,9 x 40 mm, 0,45 x 12 mm und 0,4 x 20 mm (Braun, D-Melsungen)

Einstreu für Tierkäfige: Altromin animal bedding (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe)

Einwegspritzen (BD Plastipak, Becton-Dickinson, D-Heidelberg)

Faltenfilter 604 1/2 (Ø 240 mm), (Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel)

Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammersysteme (Haereus, D-Hanau)

Küvetten UVette[®] (Eppendorf AG, D-Hamburg)

MicroAMP[™] optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Objektträger 76 x 26 mm (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Optical adhesive cover starter kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Parafilm[®] (Roth, D-Karlsruhe)

Pasteurpipetten 230 mm aus Glas (MAGV, D-Rabenau)

Petrischalen (Plastik), 100 x 20 und 35 x 10 mm (Sarstedt, D-Nümbrecht)

Petrischale (Glas), Ø 11 cm (MAGV, D-Rabenau)

pH-Indikatorpapier (Merck, D-Darmstadt)

Rasierklingen 752/1/SS (Campden Instruments Limited, Loughborough, UK)

Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml und 5 ml (Eppendorf AG, D-Hamburg)

serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)

Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S (Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel)

Skalpellschlingen BB522 (Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen)

Teflonschläuche (Innendurchmesser 0,75 und 1,98 mm) (Kronlab, D-Sinsheim)

Tierfutter: Zucht-Diätfutter (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe)

Tygon[®]-Schläuche (für Perfusionspumpe), Größe 2,057 und 2,794mm (Abimed Analysen Technik, D-Langenfeld)

Zentrifugenröhrchen, steril, 15 und 50 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht)

2.1.4. Chemikalien

Actinomycin D (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Adenosin 5'-triphosphat (ATP) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Advantage[®] RT-for-PCR kit (Clontech, Takara Bio Europe S.A.S, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

Äthanol, vergällt (Schmidt, D-Dillenburg)

Äthanol, unvergällt (Merck, D-Darmstadt)

Antikörper:

 Primäre Antikörper:

 Mouse anti- CNPase (Sigma Aldrich, D-München)

 Mouse anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Chemicon, Temecula, CA, USA)

 Mouse anti- MAP(2a+2b) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

 Mouse anti- rat CD163 (AbD Serotec, D-Düsseldorf)

 Rabbit anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO, Glostrup, DK)

 Rabbit anti- P2X₁ -Rezeptor (Chemicon, Temecula, CA, USA)

 Rabbit anti- P2X₂ -Rezeptor (BIOTREND Chemikalien GmbH, D-Köln)

 Rabbit anti- P2X₂ -Rezeptor (Abcam, Cambridge, UK)

Rabbit anti- P2X₃ -Rezeptor (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Rabbit anti- P2X₄ (BIOTREND Chemikalien GmbH, D-Köln)

Rabbit anti- P2X₅ (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Rabbit anti- P2X₆ (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Rabbit anti- P2X₇ (Chemicon, Temecula, CA, USA)

Sekundäre Antikörper:

Alexa[®]488 goat anti-mouse IgG (H+L) (MoBiTec GmbH,

Alexa[®]488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)

Cy3[™] donkey anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, D-Hamburg)

Cy3[™] donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Dianova, D-Hamburg)

B 27 Medium (Gibco, D-Karlsruhe)

2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin 5'-triphosphat Triethylammonium (Bz – ATP)
(Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Calciumchlorid (CaCl₂) (Merck, D-Darmstadt)

Carbogen (Messer Griesheim GmbH, D-Neuried)

2-Chloro-N₆-Cyclopentyladenosin (CCPA) (Tocris; Biotrend Chemikalien GmbH,
D-Köln)

Chloroform (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Chromalaun (Merck, D-Darmstadt)

Citifluor[®] (Cityfluor LTD, London, UK)

4'6 – Diamidin – 2'Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) (MoBiTec, D-Göttingen)

Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser (Fermentas, GmbH, D-St.-Leon-Rot)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, D-München)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolimbromid (MTT) (Sigma Aldrich,
D-Steinheim)

Di-Natriumphosphat Monohydrat (Na₂HPO₄) (Merck, D-Darmstadt)

Dispase I (Roche Diagnostics, D-Mannheim)

EDTA (Etylendiamin Tetraessigsäure) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

EGTA (Ethylenglykol-Bis-(β-Aminoethylether) - N,N,N',N'-Tetraessigsäure)
(SigmaAldrich, D-Steinheim)

Fetales Kälberserum (FKS) (PAA, A-Pasching)

Fluoromount (Serva, D-Heidelberg)

Fura-2 Acetoxymethylester (Fura -2- AM) (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)

Gelatine (Serva, D-Heidelberg)

Gentamicin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) (Tocris; Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln)

D-Glucose (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Glutamat (Monosodium-Glutamat) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

L-Glutamin (Biochrom, D-Berlin)

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biochrom ,D-Berlin)

HEPES Lösung (PAA, A-Pasching)

HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) (Sigma
Aldrich, D-Steinheim)

Histoacryl Gewebekleber (Braun, D-Tuttlingen)

II-6 Standard (50 IU/ml) und II-6 Qualitätskontrollen (10 IU/ml bzw. 30 IU/ml) (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK)

Isopropanol (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Kalibrierlösung für pH-Meter: Qualilab Pufferlösung pH 6,8 und 9,27 (Kleinfeld Labortechnik, D-Hannover)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, D-Darmstadt)

Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Merck, D-Darmstadt)

Mercaptoethanol (Life Technologies, Paisley, UK)

α,β -Methylenadenosin 5' triphosphat (α,β me-ATP) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

2-Methylthioadenosin 5' triphosphat (2Me-SATP) (Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln)

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Lösung (Sigma-Aldrich, D-Steinheim)

Natriumchlorid (NaCl) (Merck, D-Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH₂PO₄) (Merck, D-Darmstadt)

NECA (Adenosin-5'-N-Ethylcarboxamid) (Tocris, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln)

Neurobasal-A Medium (Gibco, D-Karlsruhe)

Normal horse serum (NHS) (PAA, A-Pasching)

Paraformaldehyd (PFA) (Merck, D-Darmstadt)

Phosphate buffered saline tablets (PBS-Tabletten) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom, D-Berlin)

Pentobarbital (Narcoren[®], Merial, D-Halbergmoos)

Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Pyridoxal-Phosphat-6-Azo (Benzol-2,4-Disulfonsäure) (PPADS) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Rothwell Park Memorial Institute Medium (RMPI-Medium) 1640 (Life Technologies, Paisley, GB)

Salzsäure (HCl) (Merck, D-Darmstadt)

Saccharose (Merck, D-Darmstadt)

Steriles Wasser für die Zellkultur (PAA, A-Pasching)

TaqMan[®] Gene expression assays Rn00564454_m1, Rn00586491_m1, Rn00579301_m1, Rn00580949_m1, Rn00589966_m1, Rn00562354_m1, Rn00570451_m1 und rat ACTB μ (actin, beta) endogenous control (Applied Biosystems Foster City, CA, USA)

TaqMan[®] Universal PCR master mix (Applied Biosystems Foster City, CA, USA)

Tissue Tek[®] (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)

TNF Standard (100 pg/ml) und TNF Qualitäts-Kontrollen (10 pg/ml bzw. 25 pg/ml) (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK)

TRI REAGENT[™] (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Triton-X-100 (t-Octylphenooxypoly-Ethoxyethanol) (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosin-5'-triphosphat (TNP-ATP) (Tocris Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln)

Trypsin (Biochrom, D-Berlin)

Wasser für die Molekularbiologie (Roth, D-Karlsruhe)

2.2. Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Wistar-Ratten der institutseigenen Zucht. Im Rahmen der quantitativen *real-time* PCR und der immunhistochemischen Untersuchungen wurden adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht (KGW) von 200 - 300 g eingesetzt. Nach Erreichen des Absetzgewichtes von 110 ± 10 g erfolgte eine Geschlechtertrennung und gruppierte Umsetzung von bis zu fünf Tieren in große Polycarbonat-Käfige (Typ IV). Unter diesen Haltungsbedingungen verblieben die Tiere bis zum Versuchsbeginn. Für die Versuche an der primären Zellkultur (*real-time* quantitative PCR, Ca^{2+} -Imaging, immunocytochemische Untersuchungen und Cytokin-Bioassays) wurden 4-6 Tage alte Wistar-Ratten männlichen Geschlechts verwendet. Die Haltung der adulten Tiere und Aufzucht der Jungtiere erfolgte in transparenten Polycarbonat-Käfigen (Typ III) bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ Raumtemperatur (RT), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12 : 12 Stunden hell : dunkel Rhythmus. Als Einstreu wurde Altromin animal bedding verwendet. Wasser und Futter (Rattenzuchtfutter Altromin) standen *ad libitum* zur Verfügung. Vor dem Beginn der Studie wurden beim RP Hessen die durchzuführenden Tierversuche per Antrag (Projektnummer V 54 - 19 c 20/15 (1) Gl 18/2) bzw. Anzeige (Projektnummer V 54 - 19 c 20/15 c Gl 18/2) genehmigt.

2.3. Verwendete Elektrolytlösungen und Puffer

2.3.1. Lösungen für die Immunhistochemie

2.3.1.1. Phosphatpuffer (PB)

Die Basislösung aller Inkubations- und Waschschriffe des immunhistochemischen Protokolls stellte ein jeweils frisch angesetzter 10^{-1} M/L Phosphatpuffer (PB) dar, welcher aus zwei Stocklösungen angesetzt und anschließend mit Reinstwasser aufgefüllt wurde. Stocklösung A entsprach einer 2×10^{-1} M/L Stammlösung aus Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na_2HPO_4), Stocklösung B einer 2×10^{-1} M/L Stammlösung aus Natriumdihydrogen-Phosphat (NaH_2PO_4). Durch Mischen von 72 Teilen NaH_2PO_4 und 28 Teilen Na_2HPO_4 mit 100 Teilen Reinstwasser erhielt man einen 10^{-1} M/L PB. Die Kontrolle des pH-Wertes (7,2 – 7,3) erfolgte durch Messung am zuvor geeichten pH-Meter.

2.3.1.2. Präinkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen

Um bei immunhistochemischen Untersuchungen mit Antigen-spezifischen Antikörpern/-seren eine erhöhte Hintergrundfärbung zu vermeiden, müssen potentiell unspezifische Antikörperbindungstellen (elektrische Ladungen, Bindegewebsstrukturen etc.) des Gewebepräparates abgesättigt werden. Hierzu wurde dem PB 10 % *normal horse serum* (NHS) zugesetzt. Zur partiellen Permeabilisierung des Gewebes (Gefriermikrotomschnitte) wurde als Detergens 0,3 % Triton-X-100 hinzugefügt.

2.3.1.3. Inkubationspuffer für immunhistochemische Untersuchungen

Zur Inkubation der Gewebeschnitte mit den primären bzw. sekundären Antikörpern wurde dem PB 2 % NHS und 0,1 % Triton-X-100 zugesetzt. In dieser Lösung wurden die Antikörper/-seren aus bei -20°C gelagerten Aliquots durch Verdünnungsreihen auf ihre letztendlich eingesetzte Konzentration gebracht.

2.3.1.4. Paraformaldehydlösung (PFA) (20 %)

Die in der Immunhisto- und -cytochemie eingesetzten spezifischen Antikörper/-seren sind gegen unterschiedliche Antigene gerichtet. Die spezifische Bindung des Antikörpers wird maßgeblich von der Konformation des Antigens beeinflusst. Um diese und die Lokalisation des Antigens zu erhalten, muss das zu untersuchende Gewebe fixiert werden. Hierzu wurde eine jeweils frisch angesetzte 4 % Paraformaldehyd (PFA) - Lösung benutzt, deren fixierende Wirkung v.a. auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen beruht. Eine entsprechende Menge des pulverigen Paraformaldehyds wurde unter dem Abzug abgewogen und auf einem Magnetrührer bei 60°C in PB gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Faltenfilters (Ø 240 mm) filtriert und auf 4°C gekühlt. Die PFA-Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

2.3.1.5. Physiologische Kochsalzlösung

Zur Entblutung der Versuchstiere während der Perfusion (siehe Kap. 2.4.4.4) wurde eine 0,9 % Natriumchloridlösung eingesetzt. Zur Herstellung wurden 9 g NaCl in 1L Reinstwasser gelöst.

2.3.1.6. Saccharoselösung (20 %)

Nach der Gewebeentnahme und einstündiger Postfixation in PFA wurde die Fixationslösung durch einen 10-minütigen Waschschrift aus dem Gewebe entfernt. Zur Kryoprotektion des Gewebes wurde eine 20 % Saccharoselösung in PB angesetzt (20 g Saccharose auf 100 ml PB). Das Gewebe wurde für 12 Stunden bei 4 C in die Saccharoselösung überführt.

2.3.1.7. Inkubationspuffer für immuncytochemische Untersuchungen

Grundlage des Inkubationspuffers waren phosphate buffered saline tablets (PBS, pH 7,4 (Angaben in mmol/L) NaCl 130, Na₂HPO₄ 8 und NaH₂PO₄ 1,2), die in einer entsprechenden Menge Reinstwasser gelöst wurden (1 Tablette auf 200 ml Reinstwasser). Dieser Lösung wurden 10 % fetales Kälberserum und 0,05 % Triton-X-100 zugesetzt.

2.3.1.8. Waschpuffer für immuncytochemische Untersuchungen

Als Basislösung diente der unter Kapitel 2.3.1.7 beschriebene Puffer aus phosphate buffered saline tablets. Diesem wurde 0,05 % Triton-X-100 zugesetzt.

2.3.2. Lösungen für die Primärzellkultur des MnPO

2.3.2.1. Neurobasal-Medium A

40 ml des Neurobasal-Mediums A wurden aus der Originalverpackung (500 ml) steril entnommen und 2 % B 27 Medium, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2×10^{-3} M/L Glutamin hinzugefügt. Diese Lösung diente als Nährmedium für die primäre Zellkultur.

2.3.2.2. Gey`s Balanced Salt Solution (GBSS)

Einer Originalflasche GBSS (500 ml) wurde 5 % Glucose zugesetzt. Jeweils 50 ml der Lösung wurden vor der Präparation in zwei Reaktionsgefäße (Vol. 50 ml) überführt, deren Verschluss mit einer sterilen Kanüle zweimal perforiert wurde. Auf Eis gelagert und mittels eines Schlauchsystems, das über Sterilfilter mit den Kanülen der Reaktionsgefäße und einer Carbogenflasche verbunden war, wurde die Lösung vor der Präparation für 20 min oxygeniert. GBSS diente als Lösung für Präparationsschalen und Vibratom.

2.3.2.3. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

30 ml HBSS wurden steril aus der Originalverpackung (100 ml) entnommen und 2×10^{-2} M/L HEPES hinzugefügt. HEPES lagerte als 5×10^{-1} M/L Stocklösung bei -20°C . Zur Herstellung dieser Stocklösung wurden 13 g HEPES in 100 ml Reinstwasser unter Rühren gelöst und der pH-Wert am zuvor geeichten pH-Meter auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und in 1 ml Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Lösung wurde in einem Reaktionsgefäß (Vol. 50 ml) angesetzt, dessen Verschluss mit einer sterilen Kanüle zweimal perforiert wurde. Die Oxygenierung erfolgte entsprechend der GBSS-Lösung (siehe Kap. 2.3.2.2). Diese Lösung wurde zum Ansetzen der Dispase-Lösung, deren Inaktivierungslösung, zum Sammeln der gewonnenen Gewebestücke und zum Reinigen der Instrumente benutzt.

2.3.2.4. Ansetzen der Dispase-1 Lösung

Die lyophilisierte Dispase-1 wurde mit einer entsprechenden Menge HBSS so angesetzt, dass die Gebrauchslösung eine Enzymaktivität von 2U/ml nicht überschritt. Ein bei -20°C gelagertes Aliquot der Dispase-1 (Vol. 1 ml; Konzentration 6 U/ml) wurde im Wärmeblock (37°C) aufgetaut und 2 ml HBSS zugefügt; die Gebrauchslösung enthielt somit eine Aktivität von 2 U/ml. Die Dispase-1 Lösung diente der enzymatischen Dissoziation der Gewebestücke.

2.3.2.5. Inaktivierungslösung der Dispase-1

Zur Inaktivierung der calciumabhängigen Dispase-1 wurden 10 ml HBSS 10^{-3} M/L Ethylendiamin Tetraessigsäure (EDTA) zugefügt.

2.3.3. Lösungen für die Ratio-Imaging Messungen

2.3.3.1. Calciummesspuffer

Der Calciummesspuffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (in mmol/L): HEPES Natriumsalz 5, NaCl 130, Glucose 10, KCl 5, MgCl_2 1 und CaCl_2 1,25. Am zuvor geeichten pH-Meter wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dieser Puffer wurde für alle Ratio-Imaging Messungen benutzt.

2.3.3.2. Calcium-Minimalpuffer

In einer der durchgeführten Versuchsserien stand die Herkunft der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration zur Diskussion. Zur Klärung der Frage, ob das Calcium aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Speichern stammte, wurde ein calciumfreier Puffer benötigt, dessen Zusammensetzung wie folgt war (in mmol/L): Hepes Natriumsalz 5, NaCl 120, Glucose 10, KCl 5, MgCl₂ 6 und EGTA 1. Am zuvor geeichten pH-Meter wurde der pH-Wert kontrolliert und auf 7,4 mit HCl eingestellt.

2.3.4. Lösungen für den Il-6 und TNF Bioassay sowie das Passagieren der B9- und WEHI-Zelllinie

2.3.4.1. Il-6 Bioassay- und B9-Zellkulturmedium

45 ml des RMPI-Mediums wurden aus der Originalverpackung (500 ml) steril entnommen und 4 ml fetales Kälberserum (FKS), 2×10^{-9} M/L Glutamin, 2×10^{-1} M/L Mercaptoethanol und 65 µl Gentamicin (10 mg/ml) hinzugefügt. Diese Lösung diente als Nährmedium für die B9-Zelllinie, sowie als Medium für das Il-6 Bioassay.

2.3.4.2. TNF- α Bioassay- und WEHI-Zellkulturmedium

Zur Originalverpackung (500 ml) des RMPI-Mediums wurden unter sterilen Bedingungen 55 ml FKS, 10^{-3} M/L Glutamin und 5 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 µg/ml) hinzugefügt. Diese Lösung diente als Nährmedium für die WEHI-Zelllinie sowie als Medium für das TNF Bioassay.

2.3.4.3. MTT-Lösung

In 20 ml PBS wurde 0,1 g 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolimbromid (MTT) gelöst. Diese Lösung diente zur Differenzierung der B9- bzw. WEHI-Zelllinie in lebende und abgestorbene und somit indirekt zur Messung des biologisch aktiven Il-6 bzw. TNF- α im Überstand der MnPO Primärkultur (siehe Kap. 2.4.5.3.2. bzw. 2.4.5.4.2.).

2.3.4.4. Isopropanol-HCl Lösung

Zu 196 ml Isopropanol wurden 4 ml 2 N HCl gegeben. Dieses Gemisch löst Zellwände und Zellorganellen auf und setzt somit die MTT-Formazan-Kristalle frei.

2.4. Methoden

2.4.1. Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR)

2.4.1.1. Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen eines vorliegenden ein- oder doppelsträngigen DNA-Moleküls (Mullis and Faloona 1987). Das typische PCR-Programm besteht für doppelsträngige DNA aus drei Schritten: (1) der Denaturierung doppelsträngiger DNA, (2) der Hybridisierung des Primers („annealing“) und (3) dem enzymatisch durchgeführten Verlängerungsschritt. Die Denaturierung erfolgt bei 94°C, da sich dann für alle DNA-Sequenzen die beiden Stränge der template-DNA trennen. Anschließend wird die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung eines im mehrfachen molaren Überschuss vorhandenen Oligodesoxynukleotid (ODN) Primerpaares an die jetzt einzelsträngige template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei die Primer-Sequenzen verlängert werden, bis wieder doppelsträngige, helikale DNA-Moleküle vorliegen, welche der als Ausgangsmaterial dienenden template-DNA exakt gleichen. Da die Komplementierung an beiden Strängen der template-DNA gleichzeitig abläuft, hat man in einem „Zyklus“ die Zahl der template-DNA-Moleküle verdoppelt. Wiederholt man den Zyklus, so hat sich die Anzahl an identischen Kopien vervierfacht usw. (Mülhardt 2002).

So entstehen in großer Anzahl identische DNA-Fragmente mit einer spezifischen Basenlänge und -sequenz. Durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem Agarose-Gel und anschließende Färbung mit einem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid, können diese DNA-Fragmente im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden (Kemp et al. 1989). Durch einen parallel aufgetragenen Größenmarker lässt sich die relative Größe des DNA-Amplifikats bestimmen (Mullis and Faloona 1987). Die Quantifizierung der Ausgangsmenge an RNA bzw. DNA kann nach einer herkömmlichen PCR nur durch Bestimmung der Bandenstärke im Agarosegel bzw. der Ethidiumbromid-Fluoreszenz erfolgen, wobei es sich hierbei jedoch um eine Endpunktbetrachtung der PCR handelt. Die Kinetik der Reaktion kann hierbei nicht berücksichtigt werden. Eine korrekte Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA bzw. RNA ist daher nur mittels einer *real-time* Analyse möglich, da die Kinetik der PCR hier verfolgbar ist.

Die quantitative *real-time* PCR kombiniert die DNA Amplifikation mit der Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß, vom Ansatz bis zur Auswertung. Erste publizierte Arbeiten beschäftigten sich mit dem Zusatz von Ethidiumbromid direkt zur PCR (Higuchi et al. 1992, 1993). Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Hierfür modifizierte Higuchi den Thermocycler, indem er ihn zusätzlich mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausstattete. Der Vorteil war die universelle Anwendbarkeit, da damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden konnte, der Nachteil jedoch, dass man nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakten unterscheiden konnte. Fast gleichzeitig wurde das Problem der mangelnden Spezifität von anderen Arbeitsgruppen gelöst. Basierend auf der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der eingesetzten DNA-Polymerase konnte man nämlich eine indirekte Aussage über die Zunahme der Amplifikate während der PCR treffen. Der PCR-Reaktion wurde somit ein drittes, radioaktiv markiertes ODN zugefügt (Holland et al. 1991), dessen 3'-Ende blockiert war, damit es nicht als Primer fungieren konnte. Es wurde so gewählt, dass es zwischen den beiden Primern hybridisierte. Erreichte nun die Polymerase während der Neustrangsynthese das radioaktive ODN, so wurde dieses abgespalten und die radioaktive Markierung freigesetzt. Mittels Dünnschichtchromatographie ließ sich dieses später von nicht radioaktiven ODNs unterscheiden. Entscheidender Nachteil war bei dieser Methodik dennoch die Entnahme von Aliquots während der Reaktion und Notwendigkeit einer erheblichen Nachbearbeitung.

Die heute gängige Lösung der *real-time* PCR baut auf der Ausnutzung des Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz-Energie-Transfers (fluorescence resonance energy transfer, FRET) auf (Cardullo et al. 1988) (Abb. 10). Hierbei werden bei der eigentlichen PCR-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) markierte ODNs eingesetzt. Diese so genannten „Sonden“ werden so gewählt, dass sie während der PCR-Reaktion in einem Bereich zwischen den beiden Primern hybridisieren. Sie sind in der Regel zwischen 20 und 30 Basen lang und ihre Sequenzen müssen, wie auch bei den Primern der PCR, speziell für das zu untersuchende Amplifikat ausgesucht werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen und strahlt die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab. Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs sind dabei für diesen charakteristisch. Bringt man allerdings ein Fluorochrom (F1) in ausreichende sterische Nähe zu einem zweiten (F2), dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (E1) entspricht, so springt

die Energie zwischen beiden über. Die Energie wird, statt als Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden, direkt an Fluorochrom 2 weitergegeben. Je nach Versuchsaufbau kann man nun während der PCR die Lichtstärke bei Wellenlänge E1 oder E2 verfolgen und sieht daran, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit voneinander getrennt (Messung E1) oder nahe beieinander (Messung E2) sind. Wird E1 gemessen, bezeichnet man Fluorochrom 1 als *reporter* (to report = berichten) und Fluorochrom 2 als *quencher* (to quench = löschen), misst man E2, heißen beide Donor und Akzeptor.

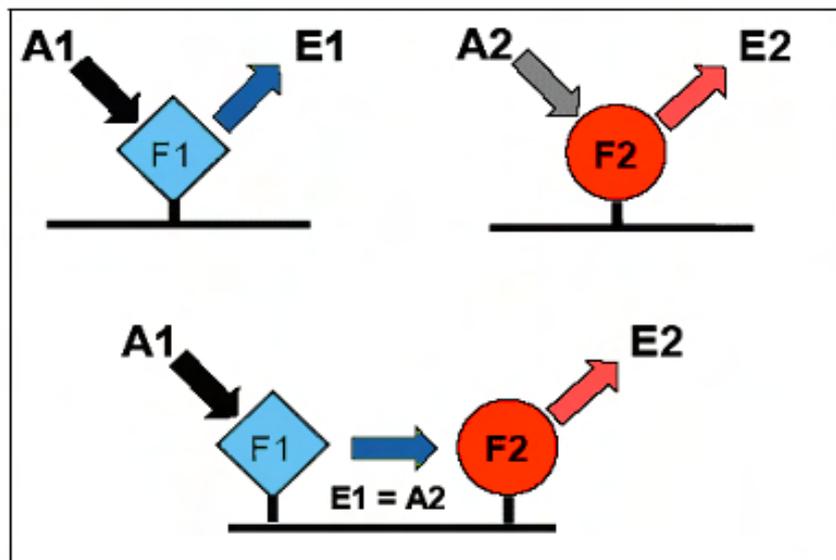


Abbildung 10: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfers (FRET)

Das Fluorochrom F1 hat die Anregungswellenlänge A1 und die Emissionswellenlänge E1. Das Fluorochrom F2 hingegen hat die Anregungswellenlänge A2 und die Emissionswellenlänge E2. Ist E1 nun gleich A2 und bringt man die Fluorochrome in räumliche Nähe, so wird die von Fluorochrom F1 emittierte Energie auf das Fluorochrom F2 übertragen.

Die älteste und bekannteste Kombination aus PCR-Gerät mit Fluoreszenzdetektion, spezifischen ODNs und FRET bezeichnet man als TaqMan® (Abb. 11). Hier sitzen Reporter und Quencher auf demselben ODN, vorzugsweise am 5`- und 3`-Ende. Solange das ODN intakt ist, ist die Lichtstärke bei E1 gering. Wird der Reporter durch die Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtausbeute bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke. Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden waren am 5`-Ende FAM™-markiert. Das 6-Carboxy-Fluorescein (FAM™) wurde mit Licht der Wellenlänge 492 nm angeregt und emittierte Licht der Wellenlänge 515 nm.

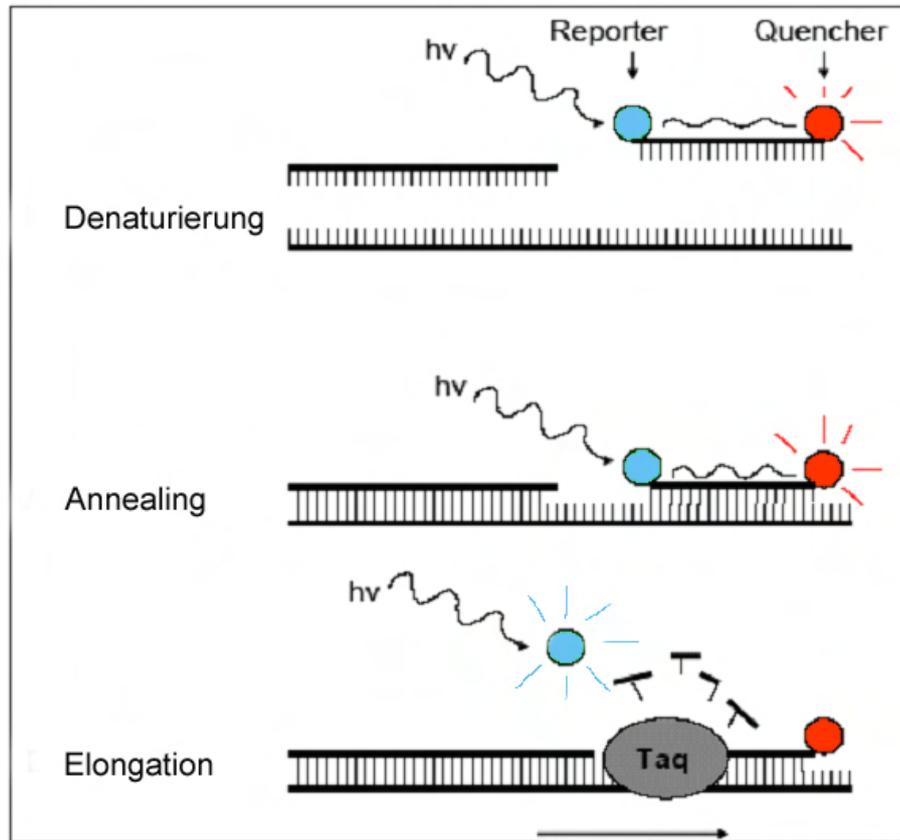


Abbildung 11: Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips

Ein Reporterfarbstoff befindet sich am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende der Sonde. Solange die Sonde intakt ist, ist das emittierte Licht des Reporters gering, da fast die gesamte Energie aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Fluorochrome vom Quencher aufgenommen wird. Während der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und spaltet diese. Nach der Spaltung sind Reporter und Quencher so weit voneinander entfernt, dass die emittierte Fluoreszenz des Reporters gemessen werden kann.

2.4.1.2. Gewinnung der Gewebeproben für die QRT-PCR

Mit Hilfe der eben dargestellten TaqMan QRT-PCR wurde die Expression purinergere P2X Rezeptorgene im isolierten MnPO-Parenchym adulter und neonataler Tiere untersucht. Als Referenzgewebe dienten Spinalganglien der Lendenwirbel 4 bis 6 (L4 - L6) adulter Tiere, für welche die Expression purinergere Rezeptoren mehrfach beschrieben wurde (Xiang et al. 1998a; Kobayashi et al. 2005).

Zur raschen Entnahme der relevanten Gewebe wurden die Tiere dekapitiert. Vor der Dekapitation wurden die adulten Tiere mit einem 4 Vol.% Isofluran-Sauerstoffgemisch im offenen System betäubt. Ein Anästhesiekäfig wurde dafür 10 min mit dem Gasgemisch geflutet; anschließend wurde das Tier in die Box umgesetzt und verblieb dort bis

zum Eintritt der Narkose. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die motorischen Reflexe überprüft; hierzu wurden die Tiere mit einer anatomischen Pinzette in die Zwischenzehenhaut gezwickt. War die Schmerzfreiheit der Versuchstiere sichergestellt, wurden sie aus dem Anästhesiekäfig entfernt genommen und mit Hilfe einer Guillotine rasch dekapitiert.

2.4.1.2.1. Präparation des MnPO adulter Tiere

Nach Dekapitation mit Hilfe der Guillotine wurde der Kopf kurz in 4°C kaltes Äthanol überführt. Die Kopfhaut wurde mit einem Scherenschnitt durchtrennt und die Schädeldecke von Muskulatur und Bindegewebe befreit. Mit Hilfe einer Pinzette wurde der Schädel in den medialen Augenwinkeln fixiert und mittels einer Knochenzange eröffnet. Nach Abpräparieren der Hirnhäute wurde das Gehirn sorgfältig mit einer Irisschere von den fixierenden Hirnnerven getrennt und entnommen. Das Kleinhirn wurde mittels eines Skalpells vom Großhirn steril separiert. Das Großhirn wurde in eine Petrischale (3 cm) mit GBSS überführt. Mit der caudalen Schnittfläche und mit Hilfe zweier Spatel wurde das Großhirn auf einen Teflon-Block aufgesetzt und mit Histoacryl Gewebekleber fixiert. Dieser Teflon-Block wurde nun in eine Kammer mit oxygeniertem, 4°C kaltem GBSS eingesetzt und diese in die Schiene eines Vibratoms eingespannt. Vom Vorderhirn mit Tel- und Diencephalon wurden 400 µm dicke Coronalschnitte angefertigt und die den MnPO enthaltenden Schnitte in eine mit GBSS gefüllten Petrischale überführt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Gehirnschnitt mit einer Pinzette fixiert und der MnPO mit einer Augenschere ausgeschnitten. Die MnPO-Präparationen von jeweils zwei männlichen Tieren wurden schnellstmöglich in ein steriles 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in einer Tischzentrifuge für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt, verworfen und das MnPO-Parenchym im Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung der Probe wurde das Röhrchen bei -70°C gelagert.

2.4.1.2.2. Präparation des MnPO neonataler Tiere

Neonatale männliche Ratten im Alter von 4 - 6 Tagen wurden mit einer scharfen Schere dekapitiert und der Kopf jeweils kurz in 4°C kaltes Äthanol überführt. Sowohl die Kopfhaut als auch die Schädelkalotte wurde mit einer Irisschere eröffnet und abgehoben. Die weitere Präparation und Lagerung der Gewebeproben bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 2.4.1.2.1 beschrieben. Für einen PCR Versuchsansatz wurden jeweils fünf männliche Tiere verwendet.

2.4.1.2.3. Präparation der Spinalganglien

Die Spinalganglien liegen im Bereich der Wirbelsäule im Zwischenwirbel- oder Wirbelseitenloch oder unmittelbar außerhalb davon (Nickel et al. 1991). Die Spinalnerven entspringen stets mit zwei morphologisch selbständigen und funktionell verschiedenwertigen Wurzeln aus dem Rückenmark: einer afferente Fasern führenden Dorsalwurzel (*Radix dorsalis*) und einer efferente Fasern führenden Ventralwurzel (*Radix ventralis*). Die Fasern von Dorsal- und Ventralwurzel vereinigen sich zum gemischtfasrigen *Truncus nervi spinalis*. Direkt vor dieser Vereinigung in der Dorsalwurzel befindet sich das jeweilige Spinalganglion. Der Körper der - wie in Kap. 2.4.1.2.1 beschrieben - betäubten und dekapitierten Tiere wurde auf eine desinfizierte Arbeitsfläche verbracht. Mit einem Skalpell wurde die Haut entlang der Wirbelsäule durchtrennt und die Wirbelsäule von Muskeln und Bindegewebe befreit. Mit Hilfe einer Knochenzange und Pinzette wurde der Wirbelkanal vorsichtig eröffnet und das Rückenmark freigelegt. Das Rückenmark wurde nun im Lendenwirbelbereich durchtrennt und die Spinalganglien freigelegt. Die Faserbündel der Dorsalwurzel wurden mit einer feinen Irisschere vorsichtig entfernt und das jeweilige Spinalganglion in eine 3 cm Petrischale mit GBSS (siehe Kap. 2.3.2.2) überführt. Die Spinalganglien zwischen L4 und L6 von jeweils zwei männlichen Tieren wurden im Anschluss an die Präparation sofort in ein steriles 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog wie in Kap. 2.4.1.2.1 dargestellt.

2.4.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von mRNA aus MnPO-Parenchym bzw. Spinalganglien erfolgte mit TRI-REAGENT™ und basiert auf der Methode von Chomczynski and Sacchi (1987). TRI-REAGENT™ stellt eine Mischung aus Phenol (ermöglicht die Isolierung von Protein und Nucleinsäuren in einer Phase) und Guanidinthiocyanat (inaktiviert RNasen und Proteinasen) dar, mit der sich außer der mRNA auch noch DNA und Protein isolieren lassen. Die gewonnenen neuroglialen Gewebeproben (Kap. 2.4.1.2.1 – 2.4.1.2.3) wurden alle nach demselben, folgenden Protokoll behandelt : 50 - 100 mg Gewebe wurde jeweils mit 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml TRI-REAGENT™ überschichtet und anschließend mit Hilfe des Ultra Turrax T25 3x für jeweils 30 sec bei 2.000 rpm homogenisiert. Danach wurden die homogenisierten Gewebeproben für 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Das entstandende Pellet enthielt nicht-relevante, störende Bestandteile wie zelluläre Membranfragmente, Polysaccharide etc. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues, steriles 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Um die komplette Dissoziation der Nucleo-Protein-Komplexe zu gewährleisten, wurden die

Proben für 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Zu jeder Probe wurden 200 µl Chloroform gegeben. Die Proben wurden für 15 sec kräftig geschüttelt und dann 10 min bei RT stehen gelassen. Hierdurch bilden sich drei Phasen, wobei die obere (wässrige) Phase die RNA enthält, die Interphase die DNA und die rote, organische Phase die Proteinfraction. Um die exakte Trennung der Phasen zu gewährleisten, schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C und 12.000 x g an. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in eine neues, steriles 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol zu jeder Probe wurde die RNA ausgefällt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 x g für 10 min sammelte sich die RNA als Pellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet mit 1 ml hochreinem 75 % Äthanol gewaschen, vorsichtig gemischt und bei 4°C für 5 min und 10.000 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Probenröhrchen für 10 min auf Eis unter dem Abzug zum Trocken offen stehen gelassen. Das so gewonnene RNA-Pellet wurde in 10 µl DEPC behandeltem Wasser gelöst

2.4.1.4. Quantitative und qualitative Bestimmung der RNA

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch an einem BioPhotometer[®] in einer Kunststoff-Küvette. Verunreinigungen der Probe können durch Verhältnisbildung (Ratios) verschiedener Absorptionswerte erkannt werden. Da Proteine maximal Licht einer Wellenlänge von 280 nm, RNA einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, kann die Reinheit einer Nukleinsäurelösung anhand der E260 / E280 Ratio abgeschätzt werden. Proben mit einem E260 / E280-Verhältnis von 1,8 – 2,0 wurden hinsichtlich ihres RNA-Anteils als rein befunden. Die Absorption bei 230 nm reflektiert Verunreinigungen durch z.B. Kohlehydrate, Phenole oder aromatische Verbindungen. Der Quotient E260 / E230 sollte für reine RNA-Proben bei >2,0 liegen. Das Lambert-Beersche Gesetz bildet die Grundlage der modernen Photometrie als analytische Methode. Es beschreibt die Schwächung der Strahlungsintensität mit der Weglänge beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz über den Zusammenhang der Intensitätsschwächung mit der Konzentration der absorbierenden Substanz. Die optische Dichte OD 260 von 1,0 entspricht bei einer reinen RNA-Präparation einer Konzentration von 40 mg/ml. Jeweils 1 µl der in Kapitel 2.4.1.3 gewonnenen Proben wurden mit 49 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Das Photometer wurde mit 50 µl Reinstwasser auf „0“ geeicht und anschließend die 1 : 50 verdünnten RNA-Proben gemessen.

2.4.1.5. cDNA Synthese

Für die durchzuführende *real-time* PCR war es notwendig, die in der RNA-Präparation enthaltenen mRNAs in komplementäre cDNA Stränge „umzuschreiben“. Im Advantage[®] RT-for-PCR kit waren folgende relevante Substanzen für die cDNA-Synthese enthalten:

100 µl	5 x Reaktionspuffer 250 mM/L Tris-HCl, pH 8,3 375 mM/L KCl 15 mM/L MgCl ₂
25 µl	Oligo(dt)18 Primer, 20 mM/L
30 µl	recombinante MMLV Reverse Transkriptase 200 U/µl (MMLV: Moloney murine leukemia virus)
15 µl	recombinanter RNase Inhibitor, 40 U/µl
25 µl	dNTP mix 10 mM/L
1 ml	DEPC-behandeltes Wasser (versetzt mit Diethylpyrocarbonat (1:1000) und autoklaviert)

Die oben beschriebenen Substanzen lagerten bei -20°C. Für die cDNA-Synthese wurden diese aufgetaut, kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. Zu jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde jeweils soviel DEPC-behandeltes Wasser hinzugefügt, dass das Gesamtvolumen am Ende bei jeder Probe 12,5 µl betrug. Danach wurden jeder Probe 1 µl Oligo(dt)18 Primer zugegeben und diese für ihre Anlagerung für 2 min auf 70°C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und 6,5 µl Mastermix zugegeben. Der Mastermix für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl	5 x Reaktionspuffer
1 µl	dNTP
0,5 µl	rekombinanter RNase Inhibitor
1 µl	MMLV Reverse Transkriptase

Als Negativkontrolle diente 1 µg Gesamt-RNA aus der Spinalganglien-Präparation, wobei diesem Ansatz anstatt Reverser Transkriptase nur DEPC-behandeltes Wasser zugesetzt wurde. Für die cDNA-Synthese wurden die Proben für eine Stunde bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase des Moloney murine leukemia virus (MMLV) inaktiviert, indem die Proben für weitere 5 min bei 95°C erhitzt wurden. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, 110 µl DEPC-

behandeltes Wasser zugegeben, durchmischt und erneut kurz zentrifugiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

2.4.1.6. Durchführung und Auswertung der QRT-PCR

Zur Durchführung der *real-time* PCR wurde die bei -70°C lagernde cDNA und die bei -20°C lagernden TaqMan® gene expression assays aufgetaut und auf Eis gelagert.

Die QRT-PCR Reaktionen enthielten pro 25 µl Ansatz:

6,25 µl	Wasser für die Molekularbiologie
12,50 µl	Universal MasterMix
1,25 µl	TaqMan® gene expression assay
5,00 µl	cDNA

Für die Genexpressionsanalyse zum Nachweis verschiedener purinergere Rezeptor-Subtypen der Ratte (P2rX₁, P2rX₂, P2rX₃, P2rX₄, P2rX₅, P2rX₆ und P2rX₇) im MnPO-Parenchym adulter sowie neonataler („Baby“) Ratten und Spinalganglien adulter Ratten wurden bei allen Experimenten Dreifachbestimmungen durchgeführt. Daraus ergab sich ein 12-facher Ansatz der oben aufgelisteten Substanzen für jeden Rezeptor-Subtyp sowie β-Aktin als „house-keeping“ Gen : 3 x für jede Gewebprobe sowie drei

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	rActb Adult	rActb Adult	rActb Adult	rActb Baby	rActb Baby	rActb Baby	rActb Ganglien	rActb Ganglien	rActb Ganglien	rAct NoRT	rActb NTC	rActb NTC
B	P2rX1 Adult	P2rX1 Adult	P2rX1 Adult	P2rX1 Baby	P2rX1 Baby	P2rX1 Baby	P2rX1 Ganglien	P2rX1 Ganglien	P2rX1 Ganglien	P2rX1 NoRT	P2rX1 NTC	P2rX1 NTC
C	P2rX2 Adult	P2rX2 Adult	P2rX2 Adult	P2rX2 Baby	P2rX2 Baby	P2rX2 Baby	P2rX2 Ganglien	P2rX2 Ganglien	P2rX2 Ganglien	P2rX2 NoRT	P2rX2 NTC	P2rX2 NTC
D	P2rX3 Adult	P2rX3 Adult	P2rX3 Adult	P2rX3 Baby	P2rX3 Baby	P2rX3 Baby	P2rX3 Ganglien	P2rX3 Ganglien	P2rX3 Ganglien	P2rX3 NoRT	P2rX3 NTC	P2rX3 NTC
E	P2rX4 Adult	P2rX4 Adult	P2rX4 Adult	P2rX4 Baby	P2rX4 Baby	P2rX4 Baby	P2rX4 Ganglien	P2rX4 Ganglien	P2rX4 Ganglien	P2rX4 NoRT	P2rX4 NTC	P2rX4 NTC
F	P2rX5 Adult	P2rX5 Adult	P2rX5 Adult	P2rX5 Baby	P2rX5 Baby	P2rX5 Baby	P2rX5 Ganglien	P2rX5 Ganglien	P2rX5 Ganglien	P2rX5 NoRT	P2rX5 NTC	P2rX5 NTC
G	P2rX6 Adult	P2rX6 Adult	P2rX6 Adult	P2rX6 Baby	P2rX6 Baby	P2rX6 Baby	P2rX6 Ganglien	P2rX6 Ganglien	P2rX6 Ganglien	P2rX6 NoRT	P2rX6 NTC	P2rX6 NTC
H	P2rX7 Adult	P2rX7 Adult	P2rX7 Adult	P2rX7 Baby	P2rX7 Baby	P2rX7 Baby	P2rX7 Ganglien	P2rX7 Ganglien	P2rX7 Ganglien	P2rX7 NoRT	P2rX7 NTC	P2rX7 NTC

Abbildung 12: Pipettierschema für eine Micro Amp™ optical 96-well reaction plate

- A1 - A12: Reaktionsansatz zum Nachweis der β-Aktin Expression, welches als „house keeping“ Gen zur Normierung der ct-Werte der anderen Ansätze herangezogen wurde.
- A1 - A3: Ansatz mit cDNA des MnPO der adulten Tiere
- A4 - A6: Ansatz mit cDNA des MnPO der neonatalen Tiere
- A7 - A9: Ansatz mit cDNA der Spinalganglien
- A10: Kontrolle (cDNA Ansatz der Spinalganglien ohne Reverse Transkriptase)
- A11 - A12: „no-template“-Kontrolle (PCR-Ansatz ohne cDNA)
- B1 - H12: Reaktionsansätze mit den entsprechenden TaqMan-Sonden für P2X₁ - P2X₇ Purinozeptor-Subtypen entsprechend dem Schema von A1 - A12

Negativkontrollen (1 x cDNA ohne Reverse Transkriptase = NoRT und 2 x „no-template“-Kontrolle = NTC, welche anstatt cDNA hochreines Wasser enthielt) (Abb. 12).

Die quantitativen PCR-Analysen wurden auf ABI 7300-Geräten mit entsprechender SD-Software (*sequence detection* Software) durchgeführt. Die Zyklusparameter waren wie folgt: 10 min bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, gefolgt von 45 Amplifikations-Zyklen für jeweils 15 sec bei 95°C zur Denaturierung und für jeweils 60 sec bei 60°C für das Hybridisieren der Primer und die Verlängerungsschritte. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte über die ΔCt -Methode. Die Ct-Werte wurden über die Expression der endogenen Kontrolle (β -Actin) normiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct-P2X-Gen} - \text{Ct-Referenzgen}$; in diesem Fall β -Actin). Im Anschluss erfolgte eine Berechnung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte, indem die ΔCt -Werte des jeweils am niedrigsten exprimierten P2X-Rezeptors (als Calibrator) von den ΔCt -Werten der übrigen Rezeptoren substrahiert wurden. Die n-fache Transkription errechnet sich dann aus der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Diese Berechnung setzt voraus, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Menge stattgefunden hat, also die QRT-PCR Effizienz 100% bzw. 2 beträgt (Livak and Schmittgen 2001).

2.4.2. Primäre Zellkultur des MnPO der Ratte

2.4.2.1. Grundlagen

Die Zellkultur ist definiert als das *in vitro* Wachstum von Zellen, welche aus dem elterlichen Gewebe nach spontaner Auswanderung oder durch mechanische oder enzymatische Vereinzelnung gewonnen wurden (Freshney 1990). Die Zellkultur stellt eine geeignete Möglichkeit dar, einzelne Zellen im Hinblick auf ihre Morphologie sowie ihre biochemischen, pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften zu untersuchen (Jurzak et al. 1994, 1995; Gebke et al. 1998, 2000). Man unterscheidet etablierte Zelllinien von Primärkulturen. Primärkulturen sind Zell-, Gewebe- oder Organkulturen nach ihrer Entnahme aus dem Organismus und vor der ersten Passage. Als Zelllinien dagegen werden Zellkulturen nach der ersten Passage bezeichnet. Mit Passage wird der Transfer von Zellen von einem Kulturgefäß in ein anders bezeichnet (Freshney 1990). Es ist davon auszugehen, dass Zellen aus Primärkulturen dem entsprechenden *in vivo* Zelltyp mehr ähneln als Zellen aus Zelllinien (Morgan and Darling 1994).

Nach der Isolation des gewünschten Gewebes aus dem Organismus müssen dessen Zellen enzymatisch und/oder mechanisch aus dem Gewebeverband gelöst werden. In

dieser Studie wurden die Gewebestücke zunächst enzymatisch dissoziiert, um die interzellulären Verbindungen zwischen den Zellen zu lösen. Zu diesem Zweck wurde die Protease Dispase-1 gewählt. Aufgrund seiner milden proteolytischen Eigenschaften löst dieses Enzym das Gewebe zwar nur unvollständig auf, bewirkt allerdings auch keine nennenswerte Schädigung der Zellmembranen (Frangakis et al. 1982; Frangakis and Kimelberg 1984; Cruz et al. 1997; Gebke et al. 1998, 2000; Wuchert et al., 2008, 2009). Da die späteren funktionellen Untersuchungen der kultivierten Zellen auf Einzelzellniveau erfolgen sollten, mussten die Zellen allerdings vollständig aus dem Gewebeverband gelöst werden. Aus diesem Grund folgte der enzymatischen Dissoziation eine zusätzliche milde mechanische, um die noch vorhandenen Zell-zu-Zell Kontakte zu zerstören (Jurzak et al. 1994; Gebke et al. 1998, 2000; Wuchert et al. 2008, 2009).

2.4.2.2. Vorbereitung der Zellkulturkammern

Die verwendeten Zellkulturkammern bestanden aus einer Flexiperm[®]-Mikro-Kammer (Grundfläche 28 mm²), deren Boden ein 15 mm Ø Coverslip aus Glas darstellte. Diese CELLocate[®] Zellkulturgläschen waren mit einem orthogonalen Koordinatensystem zur späteren Identifikation der Zellen, eingätzt durch Flusssäure, versehen. Die Mikroraster-Plättchen waren einzeln und steril versiegelt verpackt. Das Coverslip wurde unter der Sterilbank mit Hilfe einer Pinzette auf die Unterseite der Flexiperm[®]-Mikro-Kammer aufgelegt und leicht angedrückt. Glas ist eine für die Anheftung und das Wachstum von Zellen geeignete Oberfläche, dessen optische Eigenschaften (Freshney 1990) optimal für die mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen auf zellulärer Ebene geeignet waren. Um die Ratio-Imaging Studien zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) durchführen zu können, musste die Adhäsionsmatrix der Zellen eine hohe Durchlässigkeit für monochromatisches Licht entsprechender Wellenlänge bei vernachlässigbarer optischer und chromatischer Aberration aufweisen. Um das Anwachsen der Zellen zu begünstigen, wurden die Kammern mit ca. 20 µl Poly-L-Lysin gefüllt und für zwölf Stunden lichtgeschützt bei 4°C inkubiert.

2.4.2.3. Kultivierung von Primärzellen aus dem MnPO

Die Präparation des MnPO von 4 - 7 neonatalen Ratten erfolgte wie in Kap. 2.4.1.2.2 beschrieben, wobei die den MnPO enthaltenden Gewebeschnitte jedoch in einer Petrischale mit oxygeniertem HBSS aufbewahrt wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in ein Reaktionsgefäß (Vol. 15 ml), welches die Dispase-1 haltige Gebrauchslösung enthielt, überführt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte

unter Oxygenierung der die Lösung enthaltenden Gewebsfragmente. Die enzymatische Dissoziation der Gewebestücke wurde nach 45 min Inkubation beendet, indem die Dispase-1 haltige Lösung unter der Sterilbank entfernt, und die Gewebefragmente dreimal mit einer Inaktivierungslösung und anschließend dreimal mit Neurobasal-Medium A gewaschen wurden. Mittels einer feuerpolierten Pasteur-Pipette wurden die Gewebestücke durch rasches Auf- und Abpipettieren mechanisch auf sehr schonende Weise in eine Zellsuspension dissoziiert. Die vorbereiteten Zellkulturkammern wurden mit sterilem Wasser gespült, getrocknet und auf 37°C temperiert. 200 µl der Zellsuspension wurden in jede Kammer pipettiert, diese mit Zellkulturmedium aufgefüllt und bei 37°C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert. Nach 24 Std wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht, um den vorhandenen Zelldetritus zu entfernen. Ein weiterer Wechsel fand am vierten Tag nach der Präparation statt. Am fünften Tag wurde mit den weiterführenden Versuchen begonnen. Da eine exakte Präparation des MnPO nicht möglich war und immer von einem geringfügigen Anteil an angrenzendem Fremdgewebe ausgegangen werden muss, sollte korrekterweise von einer „MnPO-angereicherten neuroglialen Zellkultur“ gesprochen werden. Wenn im Folgenden von einer Primärzellkultur des MnPO gesprochen wird, ist eigentlich die „MnPO-angereicherte neurogliale Zellkultur“ gemeint.

2.4.3. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ratio-Imaging Technik

2.4.3.1. Grundlagen der Ratio-Imaging Technik

Die Ratio-Imaging Technik bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen ($[Ca^{2+}]_{iz}$) kontinuierlich zu messen (Hinman and Sammak 1998; Baylor and Hollingworth 2000). Damit stellt die Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der Transmitter-induzierten, intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen wie Neuronen, Astrocyten oder Oligodendrocyten dar (Jurzak et al. 1995; Gebke et al. 2000; Wuchert et al. 2008, 2009). Um Änderungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ messen zu können, macht man sich selektiver, Ca²⁺-chelierender Fluoreszenzfarbstoffe zunutze (Moreton 1994). Das Äquorin der Leuchtqualle war der erste, wissenschaftlich in der Muskelforschung eingesetzte Calciumindikator zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Entwicklung der ersten synthetischen Farbstoffe dieser Gruppe gelang Roger Tsien (Tsien 1980). Heute steht eine große Anzahl selektiver Fluoreszenzindikatoren zur Calcium-Messung zur Verfügung, wie beispielsweise Derivate des Calciumchelators EGTA (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2), des Fluoresceins (z.B. Fluo-3)

oder des Rhodamins (z.B. Rhod-2) (Grynkiewicz et al. 1985). Die Farbstoffe werden in zwei große Gruppen unterteilt: Die Wellenlängen-stabilen (*wavelength stable*) und die Wellenlängen-ändernden (*wavelength shifting*) Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den Wellenlängen-stabilen Fluoreszenzindikatoren, wie z.B. Quin-2, ändert sich durch Calciumbindung nur die Emissionsintensität, das Exzitations- und Emissionsspektrum aber bleiben konstant. Mitglieder der Gruppe der Wellenlängen-ändernden Farbstoffe ändern nach Calciumbindung entweder ihre Exzitations- oder ihre Emissionsspektren (Tsien 1980, 1989; Tsien and Poenie 1986; Ross 1989; Thomas and Delaville 1991; Moreton 1994) und erwiesen sich deshalb als besonders geeignet für die Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Zu den Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren gehört auch das in dieser Arbeit eingesetzte Fura-2 (Abb. 14), dessen Exzitationsspektrum sich nach Calciumbindung ändert (Tsien et al. 1985; Tsien and Poenie 1986; Roe et al. 1990). Das Anregungsoptimum des freien, polyanionischen Indikators Fura-2 liegt bei 363 nm, der mit Calcium gesättigte Farbstoff dagegen wird maximal durch Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Das Emissionsmaximum bleibt mit etwa 510 nm konstant (calciumfreies Fura-2 512 nm, calciumbindendes

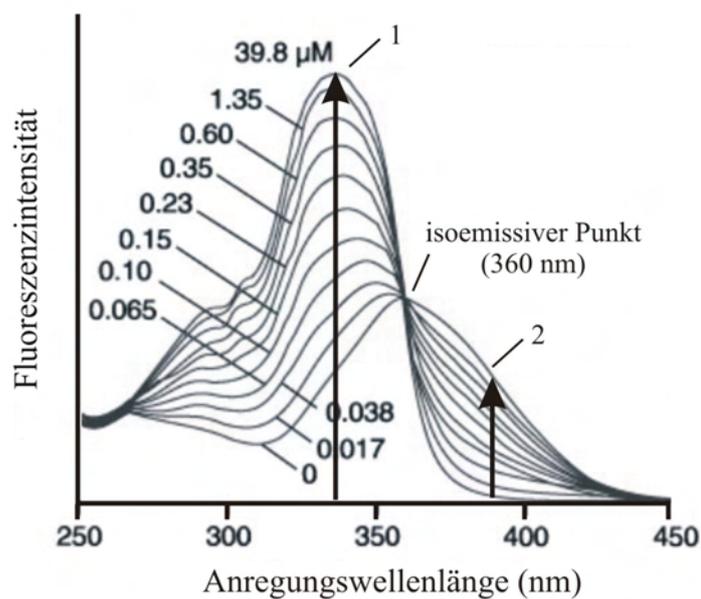


Abbildung 13: Exzitationsspektren von Fura-2

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge 510 nm) von Fura-2 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an freien Calciumionen ($[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ (μM)).

Kurve 1: das gesamte Fura-2 ist mit Calcium gesättigt; Emissionsmaximum bei 340 nm

Kurve 2: das gesamte Fura-2 liegt Calcium-frei vor; Emissionsmaximum bei 363 nm

Die Pfeile zeigen die Fluoreszenzintensitäten bei den beiden in der Praxis des Ratio-Imaging benutzten Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm. Hier ist jeweils die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca^{2+} -freies und -gesättigtes Fura-2 am größten.

Fura-2 505 nm) (Tsien and Poenie 1986, Thomas and Delaville 1991) (Abb. 13). In der Praxis werden zur Messung der Fluoreszenzintensität des Calcium-freien Farbstoffes allerdings nicht die Anregungswellenlänge von 363 nm benutzt, sondern Licht einer Wellenlänge von 380 nm. Der Grund hierfür ist, dass eine Wellenlänge von 363 nm sehr nah am sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens liegt, bei dem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 unabhängig von der Calciumkonzentration immer gleich ist (Abb. 13). Bei einer Anregungswellenlänge (ARW) von 380 nm ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Calcium-freies und –gesättigtes Fura-2 am größten (Abb. 13). Bei der Ratio-Imaging Technik wird der Quotient (Ratio) aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden ARWs 340 und 380 nm gebildet. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wider (Tsien et al. 1985). Der Vorteil des Einsatzes der Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren gegenüber den Wellenlängen-stabilen liegt in der Möglichkeit zur Ratiobildung (Roe et al. 1990). Imaging-Versuche werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die sich bei der Ratiomessung im gleichen Maß auf beide Anregungswellenlängen auswirken; mögliche Störeinflüsse werden somit bei der Quotientenbildung herausgekürzt. Die Messungen werden so unabhängig von (1) der intrazellulär vorhandenen Konzentration an Indikatorsubstanz, (2) einer eventuell ungleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs sowie (3) der Zelldicke sowie dem Ausbleichen („*photo bleaching*“) oder Austreten des Farbstoffes (Tsien et al. 1985, Tsien and Poenie 1986, Roe et al. 1990).

Gemäß des Massenwirkungsgesetzes verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration des vorhandenen freien bzw. gebundenen Calciums. Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission (340 nm) / Emission (380 nm)) kann mit Hilfe folgender Gleichung die absolute, intrazelluläre Calciumkonzentration errechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985) :

$$[Ca^{2+}] = KD \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{Sf2}{Sb2}$$

Formellegende:

- KD = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Calcium
- R = Ratio (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW)
- R_{min} = Ratio bei calciumfreiem Fura-2
- R_{max} = Ratio bei calciumgesättigtem Fura-2
- Sf2 = Emissionswerte des calciumfreien Fura-2 (ARW von 380 nm)
- Sb2 = Emissionswerte des calciumgesättigten Fura-2 (ARW von 380 nm)

In dieser Arbeit wurde aus den gemessenen Ratio-Werten allerdings nicht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration errechnet, da es ausreichte, die Ratioänderung als quantifizierbares Zeichen einer zellulären Reaktion heranzuziehen. Bei Fura-2 handelt es sich um ein stark negativ geladenes Molekül, welches nicht in der Lage ist, Zellmembranen zu permeieren. Um eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ohne Schädigung der Zellmembran zu ermöglichen, wurden Acetoxymethylesterderivate der Fluoreszenzindikatoren entwickelt. Diese sind lipophil und somit membranpermeabel, können allerdings keine Calciumionen binden. In der Zelle wird der Fura-2 Acetoxymethylester durch cytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Da das Fura-2 Molekül nun membranimpermeabel ist, ist der Farbstoff in der Zelle „gefangen“ (Tsien and Poenie 1986). Außerdem kann so aktivierte Fura-2 Molekül zweiwertige Kationen, vor allem freies Ca^{2+} , reversibel binden.

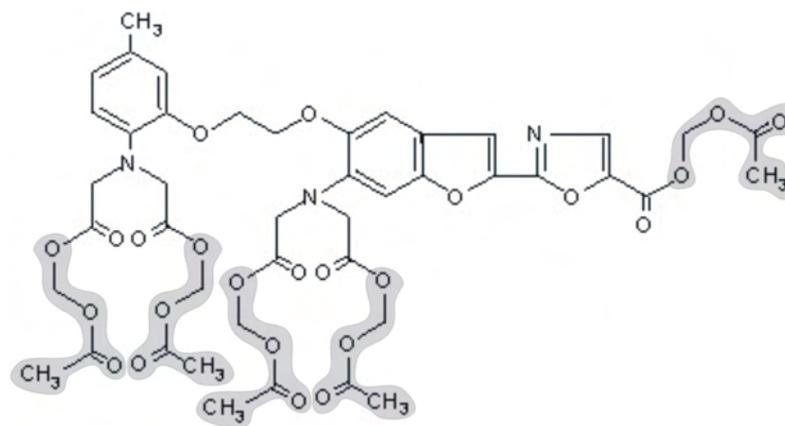


Abbildung 14: Strukturformel des Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM)

Die grau hinterlegten Bereiche des Moleküls werden in der Zelle durch cytoplasmatische Esterasen abgespalten. Fura-2 wird so membranimpermeabel und kann außerdem in aktivierter Form freie Calciumionen binden.

2.4.3.1.1. Der Einsatz von Fura-2 Acetoxymethyl(AM)ester in der Primärkultur

Um die calciumabhängige Responsivität der Zellen auf ATP und seine Derivate zu untersuchen, wurde als Indikatorfarbstoff Fura-2 gewählt. So konnten etwaige Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$ gemessen werden. Zur Beladung der zu untersuchenden Zellen der Primärkultur mit Fura-2 wurde die Zellkulturkammer mit Kulturmedium gefüllt, welches 2 μM Fura-2 AM enthielt (Fura-2 AM in Dimethylsulfoxid (DMSO); 1 mM Stammlösung bei -20°C gelagert). Während der 45-minütigen Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C und 5 % CO_2 unter Ausschluss von Licht erfolgte die zelluläre Aufnahme des Indika-

tors. Im Anschluss an die Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen mit Messpuffer überschüssiger Fura-2 AM aus der Kammer entfernt.

2.4.3.1.2. Der Imaging-Messtand

Die Ratio-Imaging Versuche wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Abb. 15). Da der eingesetzte Fluoreszenzindikator Fura-2 durch Calciumbindung sein Exzitationsspektrum ändert, wurde monochromatisches Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm benötigt. Die gewünschten Wellenlängen wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Filtern eines rotierenden Filtrerrades erzeugt, durch die das Licht einer 100 Watt Quecksilberlampe strahlte. Mit Hilfe des von einer Steuereinheit regulierten *Shutter* wurden die Zellen so gut wie möglich vor Hitze und *photo bleaching* geschützt. Über die Kamera konnten die Belichtungszeit sowie die zeitlichen Abstände zwischen den Belichtungen reguliert werden. Das aus dem Filtrerrad austretende Licht der entsprechenden Anregungswellenlängen wurde in ein inverses

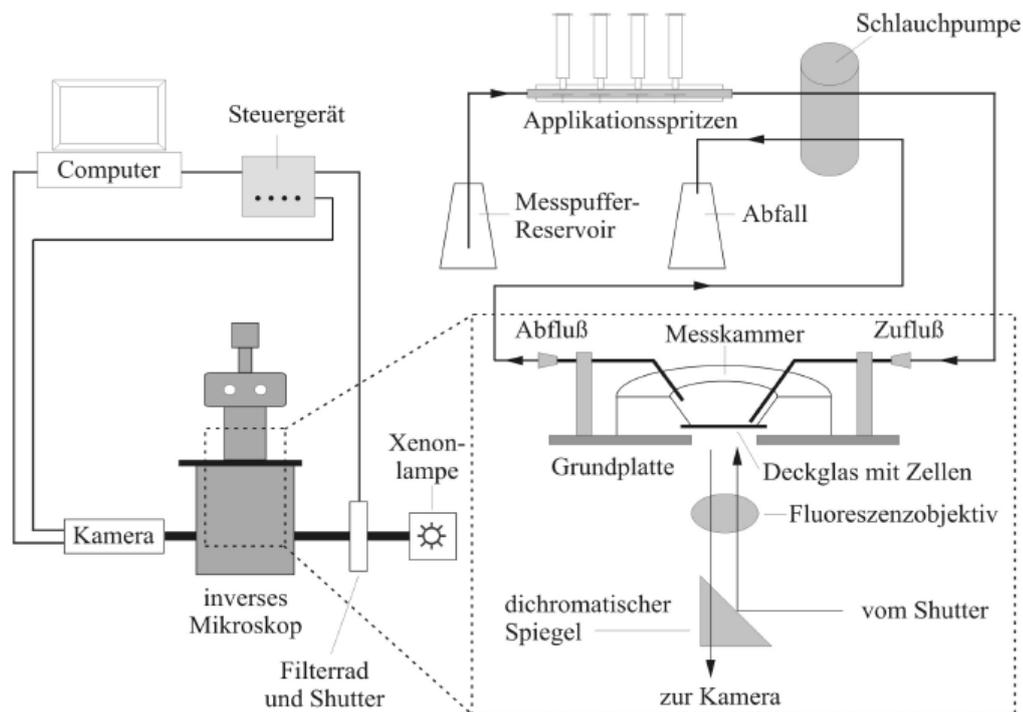


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ratio-Imaging Messtandes

Inverses Fluoreszenzmikroskop mit Xenonlampe, Filtrerrad und *Shutter*, sowie dem dichromatischen Spiegel und Imagingsystem (bestehend aus Computer mit systemeigener Software und CCD-Kamera). Die Schlauchpumpe garantiert die kontinuierliche Superfusion mit Messpuffer. Das von der Xenon-Lampe erzeugte Licht gelangt durch das rotierende Filtrerrad und den *Shutter*, über den dichromatischen Spiegel und das Fluoreszenzobjektiv, in die Messkammer und somit zu den mit Fura-2 beladenen Zellen. Das emittierte Licht gelangt aus der Messkammer wiederum durch Objektiv und Spiegel zur Kamera.

Fluoreszenzmikroskop geleitet. Im Mikroskop wurde das Licht an einem dichromatischen Spiegel abgelenkt und durch ein Fluoreszenzobjektiv in die Messkammer geleitet, wo es das Fura-2 zur Fluoreszenz anregte. Das vom Fura-2 emittierte Licht gelangte von der Messkammer aus wieder durch das Objektiv, durch einen Sperrfilter (515 nm) und über den dichromatischen Spiegel in eine CCD-Restlichtkamera. Die bei den daraus resultierenden Werten die Quotienten (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) gebildet, welche im Folgenden als Ratio angegeben werden.

2.4.3.1.3. Vorbereitung der Versuchsdurchführung

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die mit Fura-2 beladenen Zellen in das Messsystem verbracht. Um das CELLocate[®] Deckgläschen mit den adhären Zellen in die Messkammer (Abb. 15) einzuspannen, wurde zunächst die Flexiperm-Kammerwandung entfernt. Das CELLocate[®] Deckgläschen wurde auf die mittige Öffnung einer runden Stahlscheibe positioniert, welche die Basis der Messkammer bildete. Zur Befestigung wurde ein Teflonring, der gleichzeitig die Außenwand der Messkammer bildete, mit vier Edelstahlschrauben auf der Scheibe fixiert. Die Messkammer konnte nun in eine hierfür vorgesehene Öffnung des Objektisches des Mikroskops eingesetzt werden. Nach Montage der Messkammer wurde diese sofort mit 800 µl Messpuffer, auf Raumtemperatur temperiert, gefüllt. An die Messkammer wurden Zu- und Abfluss einer Schlauchpumpe in Form von gebogenen Kanülen angeschlossen. Die Kanüle, über die der Messpuffer in die Kammer geleitet wurde, reichte bis zum Boden der Kammer, während die Abflusskanüle lediglich knapp in den Flüssigkeitsspiegel eintauchte. Mit Hilfe der Schlauchpumpe wurde Messpuffer mit einer Flussrate von 2 ml/min aus einem Reservoir durch die Messkammer geleitet. So konnten eine konstante Füllung der Messkammer und ein kontinuierlicher Pufferwechsel bei minimaler Turbulenz gewährleistet werden. Die Zellen wurden nun für 10 min kontinuierlich mit Messpuffer superfundiert, damit der in die Zellen aufgenommene Indikatorfarbstoff vollständig hydrolysiert werden konnte.

2.4.3.2. Messprotokolle für die Ratio-Imaging Techniken

Jede Versuchsreihe wurde an Zellen aus mehreren Präparationen durchgeführt. Damit sollte erreicht werden, dass jeweils Zellen von Tieren aus verschiedenen Würfen untersucht werden, um individuelle Unterschiede der Versuchsansätze auszugleichen. Mit Hilfe des Imaging-Filters wurde bei einer Belichtungszeit von 100 msec und einer Wellenlänge von 380 nm ein Bild der Fura-2 beladenen Zellen im Gesichtsfeld erstellt

und mittels Durchlichtbild und einer Belichtungszeit von 10 msec deren Lokalisation im Koordinatensystem des CELLocate[®] Deckglases dokumentiert. Jede Zelle wurde als „region of interest“ (ROI) markiert und fortlaufend nummeriert (Abb. 16), so dass die Messung der Konzentration des intrazellulären Calciums für jede Zelle einzeln möglich war. Die Ermittlung der Ratio erfolgte im Abstand von 5 sec mit einer Belichtungszeit von 100 msec bei 340 nm bzw. 50 msec bei 380 nm.

Die zur Stimulation bzw. Blockade verwendeten Substanzen wurden als Aliquots bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut. Je nach Konzentration der eingefrorenen Stocklösungen und gewünschter Endkonzentration der Substanzen wurden erstere mit Messpuffer entsprechend verdünnt und in 10 ml Spritzen pipettiert, welche über ein Schlauchsystem mit der Messkammer in Verbindung standen (Abb. 15). Durch Umschalten der entsprechenden 3-Wege-Hähne einer Hahnbank wurde von Messpuffer auf substanzhaltigen Puffer umgeschaltet und dieser in die Kammer geleitet.

Nach 10-minütiger Superfusion mit Messpuffer begannen die sequentiellen (3 - 5) Superfusionsstimulationen mit Agonisten ± Antagonisten purinerge Rezeptoren für die Dauer von jeweils 3 min in meist alternierender Reihenfolge, wobei für jede auf einem CELLocate[®] Deckgläschen kultivierte Zellpopulation die einzelnen Stimulationsperioden von jeweils 8 – 15 minütigen Perioden mit reiner Messpuffersuperfusion unterbrochen wurden. Nach Abschluss der jeweiligen Messung wurde das zellbeladene CELLocate[®] Deckgläschen aus der Messkammer entfernt und in einer 12er-Multiwell-Platte für 15 min in 4 % PFA bei 4°C fixiert. Durch einen 3 x 5 min Waschschriff mit PBS wurde der PFA komplett entfernt. Die Zellen wurden in der Multiwell-Platte, überschichtet mit PBS bei 4°C, bis zu ihrer immunocytochemischen Identifikation aufbewahrt.

2.4.3.2.1. Stimulation mit ATP und 2Me-SATP sowie α,β me-ATP und 2Me-SATP

In einem ersten Versuchsansatz sollte eruiert werden, ob Neurone, Astrocyten sowie Oligodendrocyten der MnPO-Primärkultur auf die Superfusionsstimulation mit Adenosin 5`triphosphat (ATP) bzw. seinem Derivat 2-Methylthioadenosin 5`-triphosphat (2Me-SATP) mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten. Beide ATP-Analoga repräsentieren unspezifische Agonisten an P2X-Rezeptoren, mit ATP als endogenem Liganden. Die rasche Hydrolyse von ATP in Lösung durch Ektonukleotidasen ist mehrfach beschrieben (Chessell et al. 1997, Rassendren et al. 1997, Gomez-Villafuertes et al. 2000,

Hibell et al. 2000, Zimmermann 2006), sodass aufgrund der als Ergebnis erhaltenen Äquipotenz von ATP und 2Me-SATP (siehe Kap. 3.2.1) in allen folgenden Untersuchungen letzteres als Vergleichsstimulus für andere Agonisten herangezogen wurde. So wurden die Zellen der MnPO Primärkultur auch auf ihr Antwortverhalten nach Stimulation mit dem für P2X₁ und P2X₃ Rezeptoren spezifischen Agonisten α,β -Methylenadenosin 5'-triphosphat (α,β me-ATP) (Valera et al. 1994, Bianchi et al. 1999, Burgard et al. 1999) im direkten Vergleich zu 2Me-SATP untersucht. In allen Teilstudien wurden dazu die MnPO Zellen im randomisierten Verfahren jeweils für 3 min mit ATP, 2Me-SATP bzw. α,β me-ATP in einer finalen Kammerkonzentration von jeweils 10⁻⁶ M/L superfundiert. Nach jeder Liganden-Stimulation erfolgte eine 10-minütige Superfusion der MnPO-Primärkultur lediglich mit Messpuffer.

2.4.3.2.2. Stimulation mit Bz-ATP und 2Me-SATP

Der hochpotente Agonist an P2X₇-Rezeptoren 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin 5'-triphosphat (Bz-ATP) (Chessell et al. 1997, Rassendren et al. 1997, Hibell et al. 2000) wurde für den Nachweis einer funktionellen Expression dieses Rezeptorsubtyps in zwei Konzentrationen (10⁻⁷ M/L und 10⁻⁶ M/L) superfundiert. Die Auswaschphase betrug jeweils 8 min. Zum direkten Vergleich wurde wiederum 2Me-SATP in äquimolaren Konzentrationen und bei gleichen Regenerationsintervallen eingesetzt.

2.4.3.2.3. Stimulation mit dem P1-Rezeptor Agonisten und 2Me-SATP

Ziel dieser Teilstudie war es, mit den P1-Rezeptor Agonisten 2-Chloro-N⁶-Cyclopentyladenosin (CCPA), welcher als selektiver Agonist für den A₁-Rezeptorsubtyp charakterisiert wurde (Klotz 2000, Burnstock 2007b) und Adenosin-5'-N-Ethylcarboxamid (NECA) die funktionelle Expression von Adenosinrezeptoren in den Zellen des MnPO zu untersuchen. NECA repräsentiert einen Agonisten an P1-Rezeptoren mit höchster Aktivität aller Adenosinderivate für den A₂B-Rezeptorsubtyp (Klotz et al. 1998, Ralevic and Burnstock 1998, Klotz 2000). Während NECA in finalen Kammerkonzentrationen von 10⁻⁶ M/L und 10⁻⁵ M/L eingesetzt wurde, wurde CCPA lediglich in der Konzentration von 10⁻⁶ M/L superfundiert. Der direkte Vergleich der intrazellulären Calciumsignale nach Stimulation durch die P1-Rezeptor spezifischen Agonisten mit denen nach Aktivierung von P2X Purinozeptoren durch 2Me-ATP (10⁻⁶ M/L) sollte Rückschlüsse auf eine mögliche Co-Expression von P1- und P2X-Rezeptoren erbringen. Alle Stimulationen erfolgten, wie schon für Kap. 2.4.3.1.6 dargestellt, für jeweils 3 min, mit einer nachfolgenden Auswaschphase von 8 min.

2.4.3.2.4 Dosisabhängige Superfusionsstudie mit 2Me-SATP

Für die detaillierte Charakterisierung der zellulären P2X-Purinozeptoren wurden Ratio-Imaging Studien zum Nachweis einer möglichen dosisabhängigen, calciumvermittelten Signaltransduktion durch 2Me-SATP (10^{-8} - 10^{-6} M/L) an den unterschiedlichen Zelltypen des MnPO durchgeführt, beginnend mit der niedrigsten Konzentration. Zwischen den Applikationenphasen (3 min) wurde die Dauer der Auswasch- und Regenerationsphase jeweils so gewählt, dass die Fluoreszenz Ratio der Zellen wieder Basalniveau erreichte und dieses für weitere 5 min konstant blieb, was in alle Fällen einer Periode von 8 min entsprach.

2.4.3.2.5 Desensibilisierungsstudie mit 2Me-SATP

Als Vorversuch für nachfolgende, pharmakologische Versuchsserien mit Antagonisten spezifisch für P2X-Rezeptoren wurde die Wiederholbarkeit der zellulären Antwort auf vergleichbarem Niveau durch wiederholte Stimulation mit 2Me-SATP gleicher Konzentration überprüft. Damit sollte zudem aufgezeigt werden, ob der Effekt des 2Me-SATP vollständig reversibel war oder ob es bei den untersuchten Zellen zu einem Desensibilisierungsphänomen kam. Die Zellen wurden dreimal mit 2Me-SATP einer konstanten Konzentration (10^{-6} M/l) superfundiert. Gleichzeitig wurde untersucht ob, und wenn ja, die Länge des Regenerationsintervalls (8 bzw. 15 min) zwischen den Stimulationen einen Einfluss auf das Antwortverhalten der MnPO Zellen hatte.

2.4.3.2.6 Herkunft des Calciums nach Stimulation mit 2Me-SATP

Weiterhin sollte ermittelt werden, ob Calciumionen aus dem Extrazellulärraum zumindest teilweise als Quelle für den etwaigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ nach P2X-Rezeptor Aktivierung dienen, oder ob Calcium auch aus intrazellulären Speichern freigesetzt wurde. In diesen Experimenten wurden die Zellen zunächst mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) stimuliert, um ihr generelles Antwortverhalten zu demonstrieren. Nach einer Regenerationsphase von 15 min erfolgte eine Superfusion der Primärkultur mit calciumfreiem, EDTA-haltigen Messpuffer für 5 min. Unter diesen „calciumfreien“ Versuchsbedingungen wurden die Zellen erneut mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) stimuliert. Nach Äquilibration und Superfusion der Zellen mit calciumhaltigem Messpuffer für 10 min wurde eine finale Aktivierung mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) durchgeführt.

Durch den Einsatz spezifischer Agonisten wie α,β me-ATP (P2X₁ und P2X₃) (Kap. 2.4.3.2.1) oder Bz-ATP (P2X₇) (Kap. 2.4.3.2.2) bestand die Möglichkeit, die funk-

tionelle Expression eines oder mehrerer P2X-Rezeptorsubtypen in Zellen der MnPO Primärkultur zu charakterisieren. In einem zweiten Versuchsansatz sollten generelle sowie Subtyp-spezifische Antagonisten in Gegenwart des unspezifischen Agonisten 2Me-SATP auf Ihre Kapazität hin geprüft werden, die purinerge Signaltransduktion zu modulieren bzw. unterdrücken. Neben diesen kompetitiven Antagonisten kamen dabei auch hemmende, allosterische Einflüsse auf die Aktivierung der Purinozeptoren zur Anwendung.

2.4.3.2.7 Antagonisierung der durch 2Me-SATP-vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch PPADS

In dieser Versuchsserie wurde zunächst das Antwortverhalten der Zellen auf eine primäre Stimulation mit 2Me-SATP in submaximaler Konzentration (10^{-7} M/L) aufgezeichnet, basierend auf den Daten zur Dosis-Wirkungsbeziehung (Kap. 2.4.3.2.4). Nach einer Auswaschphase von 15 min erfolgte eine 3-minütige Applikation von Pyridoxalphosphat-6-Azo(Benzol-2,4)-Disulfonsäure (PPADS; 10^{-5} M/L), einem weithin eingesetzten, unspezifischen Antagonisten für purinerge Rezeptoren (Windscheif et al. 1995; Lambrecht 2000; Gourine et al. 2002; North 2002), um auszuschließen, dass PPADS *per se* ein intrazelluläres Calciumsignal auslösen könnte. In unmittelbarem Anschluss wurden 2Me-SATP (10^{-7} M/L) in Gegenwart von PPADS (10^{-5} M/L) für 3 min superfundiert. Nach einer Auswaschphase von 15 min wurde eine abschließende Stimulation mit äquimolarem 2Me-SATP für wiederum 3 min als Post-Kontrolle durchgeführt. In einer analogen, zweiten Versuchsserie wurde PPADS in einer Konzentration von 10^{-6} M/L eingesetzt.

2.4.3.2.8 Antagonisierung der 2Me-SATP-vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch TNP-ATP

Dieser Versuchsansatz gleicht der unter Kap. 2.4.3.2.7 beschriebenen Versuchsreihe. In den mit 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosin-5'-triphosphat (TNP-ATP) (spezifischer Antagonist an P2X₁-, P2X₃- und P2X_{2/3}-Purinozeptoren) (Lewis et al. 1998, Thomas et al. 1998, Virginio et al. 1998; Alexander et al. 2008) durchgeführten Versuchen wurde auch zunächst jeweils das Antwortverhalten der Zellen auf Superfusionsstimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) untersucht. Nach einer Auswaschphase von 15 min folgte eine Stimulation von dreiminütiger Dauer mit TNP-ATP (10^{-5} M/L), um dessen mögliche agonistische Aktivitäten abzugrenzen, gefolgt von einer zweiten Superfusion von 2Me-SATP (10^{-7} M/L) in Gegenwart von TNP-ATP (10^{-5} M/L) für wie-

derum 3 min. Nach einer Auswaschphase von 15 min wurde 2Me-SATP (10^{-7} M/L) als postexperimentelle Kontrolle für 3 min appliziert. In zwei analog durchgeführten Versuchsserien wurde TNP-ATP in niedrigeren Konzentration (10^{-6} M/L und 10^{-7} M/L) eingesetzt, basierend auf der offensichtlich differenzierten Sensitivität von P2X₁- und P2X₃- versus P2X₂- Purinozeptoren in myenterischen Neuronen und Gliazelllinien für diesen Antagonisten (Ohta et al. 2005; Trujillo et al. 2006; Alexander et al. 2008).

2.4.3.2.9 Antagonisierung der 2Me-SATP-vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch Rb2

Reactive blue 2 (Rb2) repräsentiert einen weiteren, unter anderem für P2X₂- und P2Y-Rezeptoren spezifischen Antagonisten (Inoue et al. 1991, Nakazawa et al. 1991). Auch hier wurde zunächst das Antwortverhalten der Zellen auf Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) untersucht. Nach einer Auswaschphase von 15 min folgte eine dreiminütige Applikationsperiode von Rb2 (10^{-6} bzw. 10^{-7} M/L) alleine, gefolgt von einer erneuten Superfusion von 2Me-SATP (10^{-7} M/L) in Gegenwart von Rb2 (10^{-6} bzw. 10^{-7} M/L) für eine Dauer von 3 min. Nach einer 15-minütigen Äquilibrationsphase mit reiner Messpuffer-Applikation wurde das Versuchsprotokoll durch eine Post-Kontrolle mit äquimolarem 2Me-SATP (10^{-7} M/L) abgeschlossen.

2.4.3.2.10. Einfluss von Zink auf die 2Me-SATP-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$

Die Interaktion von Zn²⁺-Ionen in niedriger Konzentration mit P2X-Rezeptorproteinen hängt davon ab, aus welchen Untereinheiten der jeweils zu charakterisierende Rezeptor zusammengesetzt ist. So hemmt Zink die ATP-Perge Aktivierung homomerer P2X₁- und P2X₇-Rezeptoren (Virginio et al. 1997, Wildman et al. 2002), wohingegen die Aktivität von ATP an homomeren, rattenspezifischen P2X₂-, P2X₄- und heteromeren P2X_{4/6}-Purinozeptoren durch Zink verstärkt wird (Brake and Julius 1996, Soto et al. 1996, Nakazawa and Ohno 1997, Wildman et al. 1998, Xiong et al. 1999; Friday and Hume 2008). Analog zu den schon beschriebenen Versuchsreihen wurde auch in diesem Versuchsansatz zunächst jeweils das Antwortverhalten der Zellen auf Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) registriert. Nach einer Auswaschphase von 15 min folgte eine Stimulation von dreiminütiger Dauer mit Zink (10^{-5} M/L) in Messpuffer, um zu überprüfen, ob Zink selbst Einfluss auf die intrazelluläre $[Ca^{2+}]$ nimmt. Im sofortigen Anschluss folgte eine Co-Superfusion von 2Me-SATP (10^{-7} M/L) und Zink (10^{-5} M/L) für 3 min. Nach einer Regenerationsphase von 15 min wurde wiederum die Stimulation von 2Me-SATP (10^{-7} M/L) für 3 min als post-experimentelle Kontrolle ausgeführt.

2.4.3.3. Auswertung der Ratio-Imaging Untersuchungen

Der ARW-abhängige Änderung der emittierten Fluoreszenzintensität des Fura-2 durch Bindung von intrazellulärem Calcium in den Zellen der MnPO-Primärkultur wurde mit Hilfe eines bildgebenden, computergestützten Verfahrens bestimmt. Dabei konnten gleichzeitig mehrere Zellen als „regions of interest“ (ROI) erfasst und deren $[Ca^{2+}]_i$ *on-line* analysiert werden, wobei die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität in Nicht-Echtzeit auf Einzelzellniveau erfolgte. Die mittels CCD-Kamera gemessenen Intensitätswerte der Lichtemission bei 510 nm nach Anregung einzelner Fura-2 beladener Zellen mit den für Fura-2 spezifischen Wellenlängen von 340 und 380 nm wurden wechselweise während der gesamten Versuchsdauer mit einer Frequenz von 0,2 Hertz in den Computer eingelesen. Die vom Computer jeweils ermittelten Quotienten der emittierten Lichtintensitäten (340 nm/380 nm Ratio) wurden zeitabhängig in einem X-Y Koordinatensystem dargestellt. Die gemessenen Werte wurden gespeichert und zur Bearbeitung und Darstellung in das Programm Graph Pad Prism[®] exportiert.

Bei der Auswertung am Ende einer Versuchsreihe wurden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, deren intrazelluläre Calciumkonzentration unter Kontrollbedingungen eine stabile Basislinie aufwies und die (für die Gruppe der Neurone) auf erhöhtes extrazelluläres Kaliumchlorid mit einer Ratio-Änderung antworteten. Zur klaren Abgrenzung gegenüber dem für spektrofluorimetrische Messungen typischen Grundrauschen der erhaltenen Signale wurden ausnahmslos Δ Ratio-Erhöhungen von $\geq 0,05$ als Stimulations-induzierte Calciumsignale gewertet. Für jeden der applizierten Neuromodulatoren / Agonisten wurde prozentual ermittelt, wie viele der untersuchten Zellen (Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten) jeweils stimuliert werden konnten. Für die reaktiven Zellen wurden der arithmetische Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) der jeweiligen Ratio-Änderung errechnet und diese Daten mit Hilfe des Computer-Programms Graph Pad Prism[®] in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Mit selbiger Software wurden statistische Untersuchungen durchgeführt und die MW der Ratio-Änderungen innerhalb einer Versuchsserie statistisch miteinander verglichen. Als statistischer Test wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U Rangtest gewählt (Sachs 2004). Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratio-Erhöhungen einzelner Versuchssegmente wurden folgendermaßen gekennzeichnet :
 $0,01 < 2P \leq 0,05$ (*, #, \$); $0,001 < 2P \leq 0,01$ (**, ##, \$\$); $2P \leq 0,001$ (***, ###, \$\$\$).

2.4.4. Immunhisto- und Immuncytochemie

2.4.4.1. Grundlagen

Die Grundlage der Immunhisto- oder Immuncytochemie bildet der histo- / cytologische Nachweis der Bildung eines lokalisierbaren Antigen-Antikörper Komplexes. Unter Verwendung spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper/-seren (meist IgG-Varianten) können antigene Strukturen in Zellen und Geweben lokalisiert werden (Harlow and Lane 1988). Die Determinante des Antigens (Ag), an welche der Antikörper (Ak) bindet, wird als Epitop, die Antigen-bindende Domäne des Ak als Paratop bezeichnet (Liddell and Weeks 1996, Drößler and Gemsa 2000). Die als Immunglobuline bezeichneten Antikörper sind von Plasmazellen gebildete Glykoproteine, die aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten bestehen. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden einerseits das konstante Fc-Fragment (*fragment crystallizable*), andererseits zwei Fab Fragmente (*fragment antigen binding*). An den Terminalen der Fab-Region befinden sich hypervariable Bereiche mit den Paratopen, an welche die Epitopbindung stattfindet (Janeway and Travers 1997, Drößler and Gemsa 2000).

Der histologische Nachweis von Antigen-Antikörper Komplexen im Gewebe bzw. in der Zellkultur kann durch unterschiedliche Verfahren erfolgen. Man unterscheidet direkte und indirekte Markierungsverfahren. Ist der erste Ak z.B. selbst mit einem visuell detektierbaren Liganden gekoppelt, so handelt es sich um eine direkte Markierung. Wird zur Detektion des primären Antikörpers ein sekundärer, seinerseits markierter Antikörper eingesetzt, so wird dies als indirekte Markierung bezeichnet. Für die vorliegende Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz gewählt (Coons 1958) (Abb. 16). Bei höherer Sensitivität sowie geringerer Hintergrundfärbung als bei den direkten immunhisto- bzw. -cytochemischen Verfahren ist darüber hinaus eine Mehrfachmarkierung möglich, so dass gleichzeitig verschiedene Antigene (Epitope) detektiert werden können. Ein Nachteil der Fluoreszenzmarkierung besteht in dem relativ raschen Ausbleichen der Fluorochrome bei Anregung im UV-Bereich, was durch spezielle Einbettmedien (hier: Fluoromount) zeitlich verzögert werden kann (Janeway and Travers 1997).

2.4.4.2. Verwendete P2X-spezifischer Antikörper/-seren

Um die Expression purinerner Rezeptor-Subtypen im MnPO auf Proteinebene vor allem auf dem Niveau der einzelnen Zelle sowohl im Gehirnschnitt als auch in der MnPO-angereicherten Primärkultur charakterisieren zu können, wurden die nachfol-

gend aufgelisteten Antikörper/-seren sowohl im Gewebeschnitt als auch in der Zellkultur eingesetzt (jeweils mit der entsprechenden Endverdünnung angegeben).

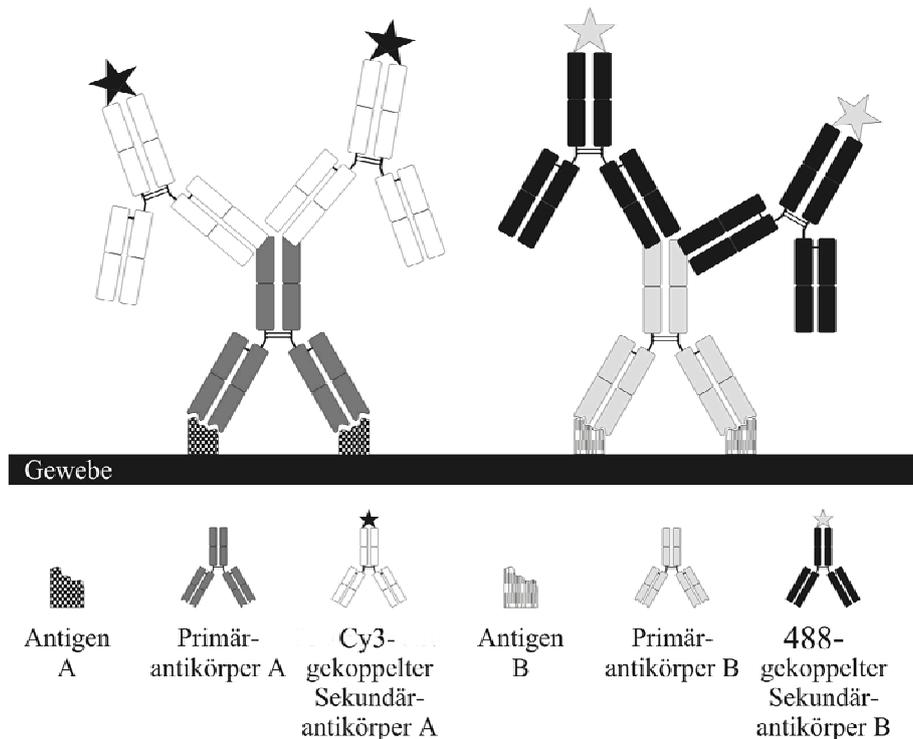


Abbildung 16: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die primären Antikörper A oder B binden im ersten Schritt mit ihren Fab – Fragmenten an die Epitope der Antigene A oder B. Mit Hilfe eines Fluorochrom (Cy3™)-gekoppelten Sekundärantikörpers A bzw. Alexa® 488-gekoppelten Sekundärantikörpers B, welche gegen das jeweilige Fc – Fragment des Spezies-spezifischen Primärantikörpers gerichtet sind, kann dieser Ag-Ak Komplex visualisiert werden. Diese Mehrfachmarkierung ist nur dann möglich, wenn die verwendeten Primärantikörper aus verschiedenen Tierspezies stammen, und die verwendeten Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind.

Rabbit anti-P2X ₁	1: 200
Rabbit anti-P2X ₂	1: 200 bzw. 1: 1000
Rabbit anti-P2X ₃	1: 200
Rabbit anti-P2X ₄	1: 200
Rabbit anti-P2X ₅	1: 200
Rabbit anti-P2X ₆	1: 200
Rabbit anti-P2X ₇	1: 200

Alle eingesetzten Antikörper entstammten polyklonalen Seren von Kaninchen und waren jeweils gegen den intrazellulären Carboxy-Terminus des entsprechenden Epitops (Peptids) gerichtet.

2.4.4.3. Immuncytochemie: Mehrfachmarkierung in der MnPO-Primärkultur

In den immuncytochemischen Studien der MnPO-Primärkultur erfolgte der Nachweis potentieller Purinozeptor-Expression sowie die genaue Charakterisierung der verschiedenen neuroglialen Zelltypen durch eine Doppelmarkierung. Zusätzlich zum Nachweis der zellulären Expression eines der genannten Purinozeptoren (siehe Kap. 2.4.4.2) erfolgte die immunologische Identifizierung des jeweiligen Zelltyps durch spezifische Antiseren/-körper gegen Proteine des Zytoskeletts, membranöser Strukturkomponenten bzw. cytosolischer Enzyme (Endverdünnungen in Klammer) :

Neurone :	Mouse anti-MAP(2a+b)	1: 600
Astrocyten :	Mouse anti-GFAP	1: 800
	Rabbit anti-GFAP	1: 800
Oligodendrocyten :	Mouse anti-CNPase	1: 300
Mikrogliazellen :	Mouse anti-rat CD68	1:2000

Die eindeutige Identifizierung der verschiedenen Zelltypen in der MnPO-Primärkultur erfolgte, unabhängig von der möglichen Co-Lokalisation eines P2X Rezeptorproteins, nach Abschluss jedes Calcium-Imaging Experiments mittels indirekter Immunfluoreszenz. Durch Einsatz eines monoklonalen primären Antikörpers, der gegen Microtubulus-assoziiertes Protein (MAP 2a+b) gerichtet ist, wurden Neurone detektiert. Astrocyten konnten mit Hilfe entweder eines aus dem Kaninchen stammenden polyklonalen primären Antiserums bzw. eines aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörpers charakterisiert werden, die beide das saure gliale Faserprotein (GFAP = *glial fibrillary acidic protein*) spezifisch erkennen. Desweiteren wurde eine Identifikation der Oligodendrocyten durch den Einsatz eines murinen monoklonalen primären Antikörpers, der gegen das Enzym Cyclische 2',3'-Nukleotid 3' Phosphodiesterase (CNPase) gerichtet ist, vorgenommen. Der murine monoklonale Antikörper anti-rat CD68 ist gegen ein 110 kD schweres Glykoprotein gerichtet (ED-1), das hauptsächlich in lysosomalen Membranen myeloischer Zellen wie etwa Mikrogliazellen exprimiert wird (Wuchert et al. 2008, 2009).

Da für jedes CELLocate® mit adherierten MnPO-Primärzellen aufgrund der möglichen Antikörperkonfigurationen lediglich eine Doppelmarkierung möglich war, musste nach Abschluss der Ratio-Imaging Versuche jedes Mal aufgrund von Erfahrungswerten aus der Durchlichtbeobachtung der jeweiligen Zellpopulation über die Auswahl zweier nachzuweisender Markerproteine entschieden werden.

Tabelle 1: Protokoll der Mehrfachmarkierung in der primären MnPO-Zellkultur

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit/Temperatur
Fixierung	4 % PFA	15 min bei 4°C
Waschen	PBS	3 x 5 min
Absättigung unspezifischer Bindungsstellen	10 % FKS + 0,05 % Triton-x-100 in PBS	2 Std, RT
Inkubation mit primären Antikörpern/-seren	Polyklonales anti-P2X _x Antiserum(1:200) und monoklonaler anti-MAP(2a+2b) (bzw. anti-GFAP, anti-CNPase oder anti-CD63) spezifischer Antikörper 10 % FKS + 0,05 % Triton-X-100 in PBS	48 Std bei 4°C
Waschen	PBS + 0,05 % Triton-X-100	3 x 5 min
Inkubation mit sekundären Antikörpern	Cy3™-donkey anti-rabbit IgG (1:800) und Alexa® 488-goat anti-mouse IgG (1:800) 10 % FKS + 0,05 % Triton-X-100 in PB	2 Std, RT
Waschen	PBS + 0,05 % Triton-X-100	3 x 5 min
Kernfärbung	DAPI (1:1000) in PB	10 min
Waschen	PBS + 0,05 % Triton-X-100	3 x 5 min
Dippen	Reinstwasser	1 x kurz
Deckeln	10 µl Citifluor®	

Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten in einer Multiwell-Platte (Tab. 1). Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen im Zellkultur-Inkubationspuffer für zwei Std bei RT wurden die Antikörper in den oben angegebenen Verdünnungen in Zellkultur-Inkubationspuffer gelöst und eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 4°C folgte ein 3 x 5 -minütiger Waschschrte (siehe Kap. 2.3.1.8) und anschließend der Einsatz der sekundären Antikörper in folgenden Verdünnungen:

Alexa® 488-goat anti-mouse IgG 1: 800

Cy3™ -donkey anti-rabbit IgG 1: 800

Nach 60-minütiger Inkubation wurden die zellbeladenen CELLocate® Deckgläschen von überschüssiger Antikörperlösung befreit und wiederum für 3 x 5 min mit Waschschrte behandelt. Nach diesem Waschschrte wurde eine Zellkernfärbung durch eine 10-minütige Inkubation der MnPO-Primärkulturen mit in PB 1:1000 verdünnter DAPI-

Lösung lichtgeschützt bei RT vorgenommen (Protokoll siehe Tab. 1). Dabei interkaliert DAPI als Indolderivat vornehmlich an AT-reichen Sequenzen der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix und lässt sich nach Exzitation im UV-Bereich als cyanblaues Fluorophor in allen Zellkernen der Primärkultur nachweisen (Tanious et al. 1992). Nach einem weiteren Waschschrift in PB für 3 x 5 min wurden die Deckgläschen abschließend in Reinstwasser getaucht, um Kristallisation von Puffersalzen auf der Glasoberfläche zu vermeiden. Auf einen Objektträger wurden 10 µl Citifluor[®] pipettiert und die Deckgläschen „upside down“ aufgelegt. Mittels des auf dem CELLocate[®] eingezätzten Rasters, mit Buchstaben und Zahlen markiert, und einem digitalen überlagerten Bild der Fura-2 beladenen MnPO-Zellen konnte eine eindeutige Charakterisierung und Typisierung der gemessenen ROIs vorgenommen werden (Abb. 17).

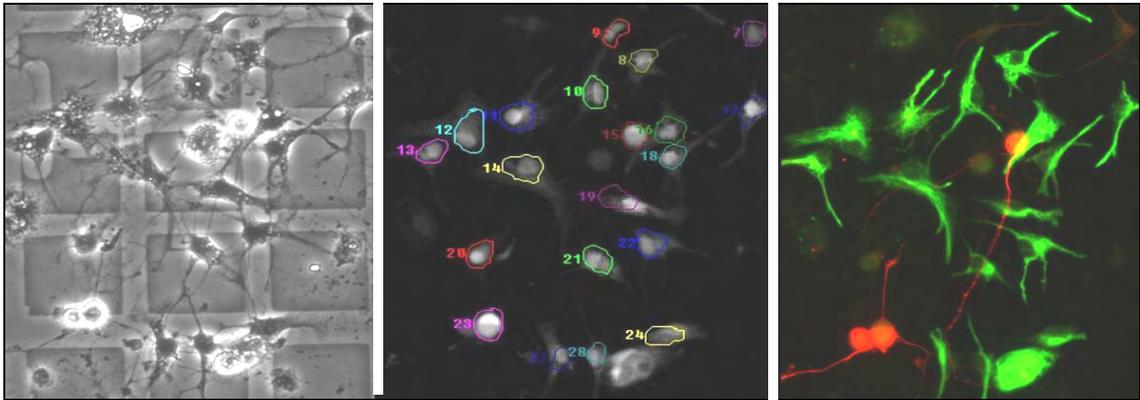


Abbildung 17: Immuncytochemische Identifikation der gemessenen ROIs

Links: Im Durchlichtbild sind die auf dem CELLocate[®] adhärennten Zellen der MnPO Primärkultur gut auf dem Raster zu identifizieren; im linken oberen Bildrand ist ein Buchstabe zur genauen Lokalisation der Zellen auf dem Raster zu erkennen

Mitte: Fura-2 beladene Zellen der MnPO-Primärkultur und farbig markierte „regions of interest“ (ROIs) für die Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration (gleicher Bildausschnitt)

Rechts: Immuncytochemischer Nachweis Zelltyp-spezifischer Markerproteine: in rot Cy3[™]-donkey anti-mouse IgG markiertes MAP(2a+b) für Neurone, in grün Alexa[®] 488-donkey anti-rabbit IgG markiertes GFAP für Astrocyten

2.4.4.4. Transkardiale Perfusion

Zur Gewinnung des in der Immunhistochemie untersuchten Gehirngewebes mussten die Tiere mit NaCl (0,9 %) und frisch angesetztem, unpolymerisierten PFA (4 %) transkardial perfundiert werden. Die dafür vorgesehene Apparatur bestand aus einem Pumpensystem und einer dazugehörigen Ablaufwanne mit aufliegendem Gitter. Dieses

Pumpensystem diente dazu, die Perfusionslösungen mit einem definierten Druck entsprechend dem mittleren arteriellen Blutdruck der Ratte (100 mmHg) in das Gefäßsystem des Tieres einzubringen. Die Perfusion erfolgte unter einem Abzug.

Unmittelbar vor der Perfusion wurden die Tiere mit 0,1 ml / 100 g KG Pentobarbital (160 mg / ml) i.p. tief narkotisiert und nach Ausbleiben der Reflexe in Rückenlage auf dem Gitter an allen vier Extremitäten durch Klebeband fixiert. Nach Eröffnung des Abdomens durch einen halbkreisförmigen Schnitt unterhalb des Rippenbogens wurde das Zwerchfell perforiert und an seinem Ansatz von der Thoraxwand abgetrennt. Mit einer Schere erfolgte die rasche Durchtrennung der Rippen. Durch Anbringen einer Klemme am *Cartilago xyphoideus* konnte die ventrale Thoraxwand so in dorsaler Stellung fixiert werden, dass die Brusthöhle frei zugänglich war. Nach Inzision des Herzbeutels und anschließender Freipräparation des Herzens wurde der linke Ventrikel durch eine 0,5 cm lange Stichinzision eröffnet und eine Knopfkanüle, die über einen Schlauch mit der Perfusionsapparatur verbunden war, bis in den Aortenbogen vorgeschoben. Sofort nach Beginn der transkardialen Perfusion bei einem Druck von 100 mmHg mit physiologischer Kochsalzlösung wurde mittels Stichinzision der rechte Vorhof eröffnet. Nach Klärung der ausschwemmenden Flüssigkeit wechselte die Perfusionsflüssigkeit durch Bedienen eines Dreiwegehahns zum 4°C kalten PFA. Zur vollständigen Perfusion wurden ca. 300 ml benötigt.

2.4.4.5. Präparation des Gehirns und Anfertigung der Gefrierschnitte

Die Präparation des Gehirns erfolgte wie in Kap. 2.1.4.2.1 beschrieben. Das Großhirn wurde in einem 30 ml Schraubgefäß mit 4°C kaltem PFA für 60 min postfixiert. Danach wurde es in ein 50 ml Schraubgefäß mit 20 % Saccharoselösung überführt und für 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Nach 12 Std hatte ein vollständiger Austausch des PFA gegen die Saccharoselösung stattgefunden. Überschüssige Saccharoselösung wurde mit einem Filterpapier entfernt und das Gehirn mit seiner coronalen Schnittfläche auf dem Objekthalter des Gefrier-Mikrotoms mit Gefrier-Einbettmedium nach Justierung aufgetragen. Durch rasche Entspannung (ca. 60 bar) von CO₂-Gas aus einer Druckluftflasche durch den metallenen Objekthalter kühlte dieser so weit ab, dass das Gehirn rasch und schonend von caudal nach rostral durchfror. Um einen gleichmäßigen Gefriervorgang zu erreichen, wurde eine Abdeckung über Präparat und Objekthalter gehalten, so dass das ausströmende Gas innerhalb des Deckels einheitlich verwirbelt wurde.

Bei einer im Gefrier-Mikrotom erhaltenen Schnittdicke von 40 µm mit coronaler Schnittebene durch das Rattengehirn wurden die Gehirnschnitte mit einem Pinsel (Rotmarderhaar) vom Messer des Mikrotoms aufgenommen und in einen Glasbehälter (Durchmesser 16 cm) mit 0,1 M/L PB überführt. In diesem befand sich ein in acht Sektoren gegliederter Einsatz aus transparentem Polycarbonat, dessen Boden ein feinmaschiges Polyethylenetz bildete. Die hier aufbewahrten Schnitte wurden vollständig vom 0,1 M/L PB umspült („free-floating“ Verfahren).

2.4.4.6. Gelatinebeschichtung der Objektträger

Zur Vorbereitung der zu beschichtenden Objektträger (OT) wurden diese für zwei Std in 70°C warmer Seifenlauge aufbewahrt und anschließend unter fließendem Leitungswasser klargespült. Die Entfettung erfolgte durch eine vierstündige Inkubation mit 70 % Äthanol, gefolgt von einem einstündigen Spülvorgang mit Reinstwasser. Nach Herstellung einer Lösung aus 0,5 % Gelatine und 0,05 % Chromalaun (zum Schutz vor bakterieller Kontamination) in Reinstwasser sowie deren Filtration mittels Faltenfilter und nach Erhitzung auf 60°C wurden die Objektträger für 10 sec in die heiße Gelatine / Chromalaun-Lösung (GC-Lösung) eingetaucht. Die Trocknung der beschichteten Objektträger fand durch einstündige Lagerung in einem auf 60°C temperierten Trockenschrank statt.

2.4.4.7. Immunhistochemie : Einfachmarkierung der Gehirnschnitte

Für den Nachweis der hypothalamischen Expression jeweils eines der Purinozeptor-Subtypen erfolgte nach Rehydrierung der Gehirnschnitte in 0,1 M/L PB die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Dazu wurde der Glasbehälter mit 100 ml Präinkubationspuffer gefüllt und die Gehirnschnitte für zwei Std bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 Gehirnschnitte in sterilen Reaktionsgefäßen (Vol. 5 ml) mit 500 µl Inkubationspuffer für 48 Std bei 4°C lichtgeschützt inkubiert, wobei der Inkubationspuffer das entsprechende polyklonale Antiserum gegen Epitope des entsprechenden Rezeptorproteins enthielt (Verdünnung 1:200). Zur Elimination überschüssigen P2X-Antiserums erfolgte ein 3 x 5 -minütiger Waschschrift. Die Gehirnschnitte wurden dazu in die sektoriell gegliederten, mit jeweils frischen 100 ml PB gefüllten Glasgefäße mit Hilfe eines Pinsels überführt. Für die nachfolgende Markierung der primären polyklonalen Antikörpermoleküle enthielt der zweite Inkubationspuffer einen sekundären, mit Cy3™-markierten donkey anti-rabbit IgG Antikörper (Verdünnung 1:800), in welchem die Gehirnschnitte für 60 min bei RT unter Ausschluss

von Licht inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschschritt wurden die Gehirnschnitte mit Hilfe eines Pinsels auf einen mit GC-Lösung beschichteten OT aufgetragen und für 12 Std bei RT und lichtgeschützt getrocknet. Danach wurden drei Tropfen des Eindeckmediums Fluoromount auf die OT aufgebracht und diese mit einem Deckglas versiegelt (Protokoll siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Protokoll der immunhistochemischen Einfachmarkierung (Gehirnschnitt)

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit/Temperatur
Waschen	0,1 M/L PB	3 x 5 min
Absättigen unspezifischer Ak-Bindungsstellen	10 % NHS + 0,3 % Triton-X-100 in PB	2 Std, RT
Inkubation mit primärem Antikörper/-serum	Polyklonales anti-P2X-Antiserum (1:200 bzw. 1:1000); 2 % NHS + 0,1 % Triton-X-100 in PB	48 Std bei 4°C
Waschen	0,1 M/L PB	3 x 5 min
Inkubation mit sekundärem Antikörper	Cy3-donkey anti-rabbit IgG (1:800) 2 % NHS + 0,1 % Triton-X-100 in PB	2 Std, RT
Waschen	0,1 M/L PB	3 x 5 min
Aufziehen auf OT	GC-beschichtete Objektträger	nach Bedarf
Trocknung		mind. 12 Std
Deckeln	3 Tropfen Fluoromount, Deckgläser	

2.4.4.8. Negativkontrollen

Zum Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper/-seren wurden bei jedem Versuchsansatz Negativkontrollen durchgeführt. Jedem kommerziell erworbenen Primärantikörper zur Detektion purinerner Rezeptoren war das jeweilige Kontroll-Antigen beigefügt. Für die Anfertigung der Negativkontrollen wurde 1 µg des gereinigten Peptids mit 1 µg des entsprechenden Antikörpers (entsprechend einem Molverhältnis von etwa 200 : 1) für 60 min bei RT vor Beginn des jeweiligen Protokolls der Immuncyto- bzw. histochemie an Gehirnschnitten bzw. MnPO-Primärkulturzellen auf einem Schüttler vorinkubiert. Ziel des Verfahrens war es, den Antikörper mit seinem Antigen so abzusättigen, dass keine Bindung mehr am Schnitt oder in der Kultur erfolgen konnte. Als weitere Kontrolle diente das „Weglassen“ der jeweiligen Primärantikörper/-seren im Rahmen des Versuchsprotokolls (Tab. 2), wodurch sowohl dessen

bzw. deren Antigen-Spezifität als auch mögliche unspezifische Bindungseigenschaften der Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper getestet werden konnten.

2.4.4.9. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Auswertung der immunhisto- und -cytochemischen Untersuchungen im MnPO erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Spezielle Filter erzeugten Licht geeigneter Wellenlänge, um die verwendeten Fluorochrome anzuregen, so dass eine jeweils längerwellige Emissionsstrahlung entstand. Die Cy3™-gekoppelten Sekundärantikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 – 530 nm angeregt, und emittierten optisch rotes Licht im Bereich von 630 – 660 nm. Die Alexa®-488 konjugierten Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 450 – 490 nm angeregt und bei 510 – 530 nm detektiert, visuell als grünes Licht wahrnehmbar. Der Kernfarbstoff DAPI emittierte blaues Licht einer Wellenlänge von 461 nm, nachdem er durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 358 nm angeregt worden war. Eine hochauflösende, digitale Restlichtkamera (s / w) mit zugehöriger Software wurde eingesetzt, um die mikroskopischen Bilder zu dokumentieren. Je nach emittierter Lichtfarbe entstanden schwarz-weiß Fotos, deren Graustufen mit Hilfe des Software-Programms Metamorph in der Farbe des jeweils emittierten Lichts eingefärbt wurden. Eine potentielle Co-Lokalisation zweier immunocytochemisch detektierter Antigene konnte durch die digitale Superposition der für jeweils einen Antigennachweis erhaltenen Aufnahmen ermittelt werden. Die ausgewählten Fotografien wurden mit Hilfe des Programms Photoshop 5.5 optimiert, d.h. Bildhelligkeit, Kontrast und Farbbalance der Bilder angepasst und dann mit demselben Programm zu Bildtafeln zusammengestellt.

2.4.5. Cytokin-Bioassays

2.4.5.1. Bioassay versus ELISA

Zur Quantifizierung von Cytokinen in Zellüberständen werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet. Zum einen der enzymimmunometrische Nachweis von Cytokin-Proteinen mittels ELISA-Techniken (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay), zum anderen Cytokin-spezifische, Zellkultur-abhängige Bioassays. Die verfügbaren ELISAs für humane, murine oder Ratten-spezifische Cytokine sind einfach zu handhaben und mit geringem zeitlichen Aufwand durchzuführen, jedoch detektiert diese Methode nicht nur biologisch aktive Cytokine, sondern auch z.B. inaktive Proteolysefragmente derselben (Lottspeich und Zorbas, 1998). Zudem sind Cytokine als komplexe (Glyco-)proteine und somit auch die verwendeten Antikörper Spezies-spezifisch, und letztere

aufgrund der geringen Kreuzreaktivität zu Cytokinproteinen anderer Spezies (etwa Pferd, Schwein, Carnivore, Wiederkäuer) nur limitiert einsetzbar.

Mittels Cytokin-spezifischer, Zellkultur-abhängiger Bioassays werden dagegen nur die biologisch aktiven Formen der Cytokine detektiert. Zudem ist die Sensitivität der Bioassays ausgesprochen hoch, wodurch selbst sehr geringe Konzentrationen des jeweiligen Cytokins exakt zu bestimmen sind. Aufgrund (1) der langjährigen und erfolgreichen, Instituts-internen Anwendung solcher Bioassays zum Nachweis der proinflammatorischen Cytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) (Harré et al. 2003; Roth 2006; Wuchert et al. 2008, 2009) und (2) der für die Mikrokulturen des MnPO zu erwartenden niedrigen Cytokinkonzentrationen wurden Bioassays zum Nachweis von IL-6 und TNF- α im Überstand von LPS- bzw. ATP-stimulierten Primärkulturen des MnPO eingesetzt.

2.4.5.2. Versuchsansätze

Primärzellkultur-Präparationen des MnPO wurden in ihren jeweiligen Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammern mit ATP bzw. 2Me-SATP dosis- sowie zeitabhängig stimuliert und die IL-6 sowie TNF- α Konzentrationen nach deren Freisetzung im Kulturmedium bestimmt. Für die Erfassung der Dosisabhängigkeit wurde pro Zellpräparation jeweils eine Mikrokammer nach Medienwechsel mit jeweils 400 μ l an frischem Medium (Kontrolle) bzw. ATP oder 2Me-SATP in jeweils einer von fünf Konzentrationen (3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} und 3×10^{-3} M/L), gelöst in frischem Medium, für sechs Stunden bei 37°C im Zellkulturschrank mit einer Atmosphäre von 5 % CO₂ / 95 % Luft unter sterilen Kautelen inkubiert. Im Rahmen der Studie zur Zeitabhängigkeit der purinerg induzierten Freisetzung an IL-6 und TNF- α wurde pro Zellpräparation jeweils eine Mikrokammer nach Medienwechsel mit jeweils 10^{-3} M/L ATP in 400 μ l frischem Medium für 0, 1,5, 3, 6 oder 12 Stunden bei 37°C stimuliert. Zu jedem der genannten Zeitpunkte wurde eine Negativkontrolle in Form einer unstimulierten Kultur (lediglich Mediumwechsel) durchgeführt.

Um eine mögliche Beteiligung des MnPO-endogenen purinergen Transmittersystems an der durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Freisetzung von TNF- α und IL-6 zu untersuchen, wurde in einer dritten Versuchsserie die durch LPS induzierte Freisetzung von TNF- α und IL-6 pro Zellpräparation in Ab- bzw. Anwesenheit des P2X Purinozeptor-Antagonisten PPADS bzw. des P2X₁- und P2X₃-selektiven Antagonisten TNT-ATP quantitativ bestimmt. Pro Zellpräparation wurde dazu jeweils eine Mikrokam-

mer nach Medienwechsel mit 400 µl an frischem Medium (Kontrolle) bzw. 100 µg/ml LPS, PPADS (10^{-5} M/L), 100 µg/ml LPS und PPADS (10^{-5} M/L) bzw. TNT-ATP (10^{-5} M/L) oder ATP (10^{-3} M/L), gelöst in 400 µl frischem Medium, für 90 min bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ / 95 % Luft inkubiert.

Die MnPO-spezifische neurogliale Primärkultur jeder Flexiperm[®]-Mikro-12 Kammer wurde lediglich einmal für eine Cytokin-Bestimmung herangezogen. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurden die Zellkultur-Überstände, ohne den Boden der Flexiperm[®]-Mikro-Kammer zu berühren, unter sterilen Bedingungen abpipettiert, in 1 ml-Eppendorf Reaktionsröhrchen überführt und bis zur Analyse der Cytokin-Konzentrationen bei -20°C verwahrt.

2.4.5.3. Der Interleukin-6 (IL-6) Bioassay

2.4.5.3.1. Passagieren der B9-Zelllinie

Entwickelt wurde diese Zelllinie von Lansdorp et al. (1986) und weist eine hohe mitogene Sensitivität gegenüber dem Cytokin IL-6 auf, so dass der Nachweis der Bioaktivität von IL-6 selbst für einen einzelnen menschlichen Monocyten möglich ist (Aarden et al. 1987). Eine realistische Nachweisgrenze liegt bei 5 IU/ml. Die B9-Zelllinie wächst als Suspensionskultur, daher war deren Subkultivierung ohne Einwirkung von Enzymen einfach mittels Verdünnung zu bewerkstelligen. Alle drei Tage wurden die Zellen in neue Kulturflaschen passagiert. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen 9 ml des Wachstumsmediums in eine neue Flasche pipettiert und 1 ml der Zellsuspension aus der zu passagierenden, alten Kulturflasche hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ / 95 % Luft.

2.4.5.3.2. Durchführung und Auswertung des IL-6 Bioassays

Das Prinzip dieses Bioassays beruht auf dem proliferativen Einfluss, den IL-6 auf die B9-Zelllinie ausübt (Aarden et al. 1987). Dieser Effekt ist dosisabhängig, d.h. je mehr IL-6 in der Probe vorhanden ist, desto höher die daraus resultierende Zellzahl. Die Durchführung des Assays erfolgt in 96-well-Mikrotiterplatten. Diese Platten wurden nach einem bestimmten Schema beschickt (Abb. 18).

Jede Mikrotiterplatte enthielt neben den zu untersuchenden Proben eine Standardreihe absteigender Konzentrationen (1 : 2 Verdünnung) an rekombinantem IL-6 (S1 – S10)

sowie zwei Proben mit einer definierten Menge an IL-6 für die Erfassung der Inter-Assay Variabilität (QK1 und QK2). In die Vertiefung B1 wurde 200 µl des höchsten IL-6 Standards (S1 = 50 IU) pipettiert. A2 und A3 sowie B2 und B3 enthielten 200 µl der Qualitätskontrollen (QK1 und QK2). A und B repräsentierten dabei Doppelbestimmungen derselben QK1- bzw. QK2-Proben. Die Vertiefung A1 (blank, Nullwert) blieb frei. Die Spalten ab A4 bis A8, sowie B4 bis B8 enthielten die zu bestimmenden Proben aus Überständen der MnPO-Primärkultur, wobei A und B jeweils Doppelbestimmungen derselben Proben (4 – 8) repräsentierten.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Blank	50 IU unverdünnt	1:2 25 IU	1:4 12,5 IU	1:8 6,25 IU	1:16 3,13 IU	1:32 1,56 IU	1:64 0,78 IU	1:128 0,39 IU	1:256 0,19 IU	1:512 0,1 IU	nur Medium
2	QK 1	QK1	1:2 A2	1:2 B2	1:4 A2	1:4 B2	1:8 A2	1:8 B2	1:16 A2	1:16 B2	1:32 B2	1:32 B2
3	QK2	QK2	1:2 A3	1:2 B3	1:4 A3	1:4 B3	1:8 A3	1:8 B3	1:16 A3	1:16 B3	1:32 A3	1:32 B3
4	Proben	Proben	1:2 A4	1:2 B4	1:4 A4	1:4 B4	1:8 A4	1:8 B4	1:16 A4	1:16 B4	1:32 A4	1:32 B4
5	Proben	Proben	1:2 A5	1:2 B5	1:4 A5	1:4 B5	1:8 A5	1:8 B5	1:16 A5	1:16 B5	1:32 A5	1:32 B5
6	Proben	Proben	1:2 A6	1:2 B6	1:4 A6	1:4 B6	1:8 A6	1:8 B6	1:16 A6	1:16 B6	1:32 A6	1:32 B6
7	Proben	Proben	1:2 A7	1:2 B7	1:4 A7	1:4 B7	1:8 A7	1:8 B7	1:16 A7	1:16 B7	1:32 A7	1:32 B7
8	Proben	Proben	1:2 A8	1:2 B8	1:4 A8	1:4 B8	1:8 A8	1:8 B8	1:16 A8	1:16 B8	1:32 A8	1:32 B8

Abbildung 18: Schematisches Pipettierschema einer für einen IL-6 Bioassay beschickten Mikrotiterplatte

Reihe 1: Verdünnungsreihe des IL-6-Standards (Einfachbestimmung): A1 Blank; L1 nur Medium; B1 - K1 1 : 2 Verdünnungsreihe, ausgehend von Standard S1 mit 50 IU IL-6

Reihe 2 und 3: Verdünnungsreihen (1 : 2) der Qualitätskontrollen QK1 und QK2 (Doppelbestimmungen)

Reihe 4 bis 8: Verdünnungsreihen (1 : 2) der Proben (Doppelbestimmungen)

Im Folgenden wurden nun sowohl von dem vorgegeben Standard S1 (50 IU in B1), als auch den als Doppelbestimmungen vorliegenden QKs und Zellkultur-Überständen (Probe 4 – 8) fortlaufende 1 : 2 Verdünnungsreihen angefertigt. Dazu wurde in jedes „well“ der Spalten C bis L jeweils 100 µl an Medium vorgelegt. Von allen „wells“ der Spalten A und B wurden nun fortlaufende Verdünnungsreihen (jeweils 1 : 2) angefertigt. Dazu wurden z.B. 100 µl aus B1 in C1 überführt, gut durchmischt, dann

100 µl aus C1 in D1 verbracht, gut gemischt usw. Bei der Standardreihe wurde in 10 Schritten eine Einfachbestimmung, bei den Qualitätskontrollen und den Proben in 5 Schritten eine Doppelbestimmung durchgeführt. Am Ende lag der Verdünnungsfaktor bei 1 : 512 bzw. 1 : 32. Die letzten 100 µl aus K1 - K8 bzw. L2 - L8 wurden verworfen. In L1 befand sich folglich nur noch Medium.

Die B9-Zellsuspension wurde aufbereitet, indem sie dreimal für 10 min bei 2.300 rpm zentrifugiert und in Assay-Medium resuspendiert wurde. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen nur noch in 3 ml resuspendiert. Für die 96-well Platte musste die vorliegende Suspension auf 5.000 Zellen / 100 µl eingestellt werden. Von den 3 ml wurden 50 µl abgenommen und eine Zählkammer nach Thoma damit beschickt. Jeweils 80 Kleinstquadrate (5 x (E)-Gruppenquadrate wurden ausgezählt, und der Verdünnungsfaktor nach folgender Formel berechnet: Verdünnungsfaktor = Zellzahl geteilt durch das Produkt aus dem Kammerfaktor K [50 (1/Rauminhalt)] und AZ [Anzahl ausgezählter Felder].

Nachdem die Zellsuspension in entsprechender Verdünnung vorlag, wurden in alle Vertiefungen (außer A1) 100 µl pipettiert und die Platte für 72 Std im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ / 95 % Luft inkubiert. Danach wurden in jede Vertiefung 25 µl Methylthiazoltetrazolium (MTT) pipettiert. MTT wird in den Mitochondrien der Zellen durch Succinyl-Dehydrogenase zu dunkelblauen Formazankristallen umgesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde nach Zugabe von MTT für weitere 4 Std im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden aus allen „wells“ 125 µl abpipettiert und 100 µl des Isopropanol-HCl Gemisches zugegeben. Dieses Gemisch wurde für weitere 12 Std lichtgeschützt bei RT auf den Zellen belassen. Zur Auswertung wurden die Mikrotiterplatten in einen ELISA-Reader eingelegt und die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

Um die Daten der Bioassays auszuwerten, musste zunächst eine Eichkurve erstellt werden. Hierfür wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel die Standardwerte der optischen Dichte auf der y-Achse (lin) gegen die IL-6 Konzentrationen auf der x-Achse (log) aufgetragen (Abb. 19). Die exponentiell lineare Komponente der log-lin Kurve repräsentiert die direkte Proportionalität zwischen in den Proben vorhandener IL-6 Konzentration (log) und dem Grad der Formazanbildung (lin), welcher seinerseits als Maß für das IL-6 induzierte Zellwachstum gilt. Es wurden nur diejenigen Verdünnungen der Proben ausgewählt, deren IL-6 Konzentrationen sich im Bereich der Regressionsgeraden befanden.

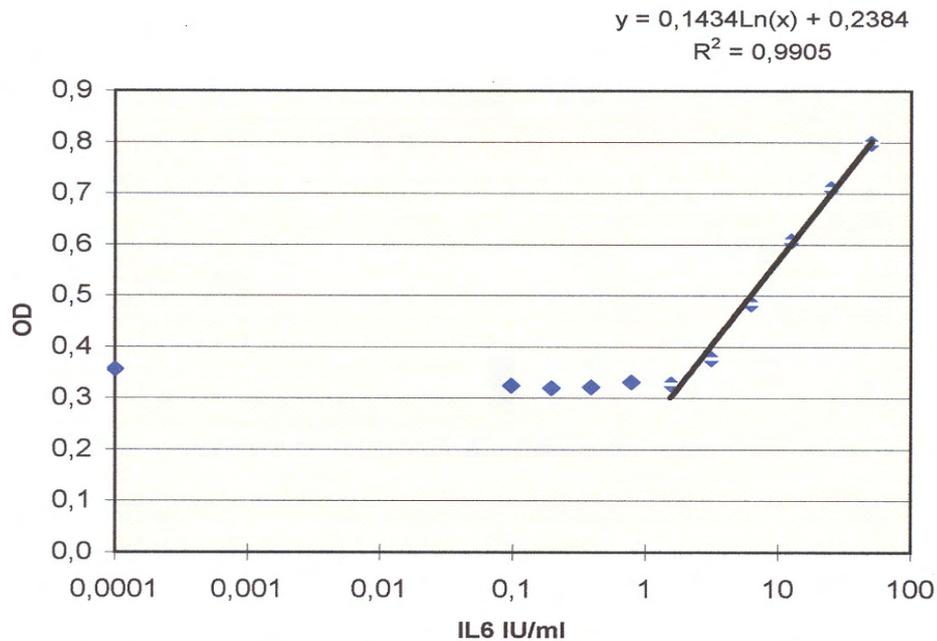


Abbildung 19: Exemplarische Eichkurve eines IL-6 Assay

Der Regressionskoeffizient der log-lin Beziehung zwischen der IL-6 Konzentration ([log IL-6]) auf der Abszisse und der optischen Dichte der Formazanbildung ([AU])⁹ auf der Ordinate liegt im linearen Bereich der Kurve bei 0,99.

2.4.5.4. Der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) Bioassay

2.4.5.4.1. Passagieren der WEHI-Zelllinie

Zur Bestimmung des TNF- α Gehalts in den Überständen der MnPO-Primärzellkultur im Bioassay wurden WEHI-Zellen, eine murine Fibrosarkomzelllinie des Walter & Elizabeth Hall Instituts, eingesetzt. Diese reagieren äußerst empfindlich auf die in diesem Fall cytotoxische Aktivität von TNF- α durch spontane Apoptose, (Espevik and Nissen-Meyer 1986), wodurch sich im Bioassay die niedrige Nachweisgrenze von 6 pg TNF- α pro ml ergab. Die WEHI-Zelllinie wächst adhärent, daher erfolgte die Subkultivierung mit Hilfe des proteolytischen Enzyms Trypsin. Das Nährmedium aus den Kulturflaschen der letzten Passage wurde dekantiert und die Zellen mit 12 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin (Fertiglösung 0,25 % in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) zugegeben. Unter leichtem Schwenken für 3 min lösten sich die Zellen als makroskopisch sichtbare Eintrübung der ansonsten klaren Enzymlösung vom Boden des Gefäßes. Die zellhaltige Trypsinlösung wurde nachfolgend auf zwei neue, mit je 20 ml Zellkulturmedium befüllte Kulturflaschen überführt, wobei die im Medium enthaltenen FK-Serumproteine ausreichten, das Trypsin zu inaktivieren. Die Kultivierung der WEHI-Zellen erfolgte im Zellinkubator bei einer Atmosphäre von 5 % CO₂ / 95 % Luft und

37°C bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers, worauf sich eine weitere Passage anschloss.

2.4.5.4.2. Durchführung und Auswertung des TNF- α Bioassays

Das Prinzip des Assays basiert auf dem cytotoxischen Effekt von TNF- α auf die murine Fibrosarkomzelllinie WEHI. Durch in den Überständen der MnPO-Primärzellkultur vorkommendes TNF- α kam es zu einem dosisabhängigen Absterben der Zellen im Testansatz, was sich quantitativ durch die Zugabe von MTT (Kap. 2.3.4.3) messen ließ. Der Versuchsansatz erfolgte analog zu der Durchführung des IL-6 Assays (Kap.2.4.5.4.1). Unterschiede lagen lediglich in der eingestellten Zellzahl für jede Vertiefung („well“) (hier 50.000 Zellen / 100 μ l) und in der Zugabe von Actinomycin D (4 μ l / ml) nach der Verdünnung der Zellsuspension. Actinomycin D diente einerseits dazu, das weitere Zellwachstum zu stoppen, andererseits dazu, die Sensibilität der Zellen für TNF- α zu erhöhen. Die Befüllung der Mikrotiterplatte erfolgte wie bei der Durchführung des IL-6 Assays (Kap.2.4.5.4.1), wobei die erste Inkubationszeit lediglich 24 Std betrug.

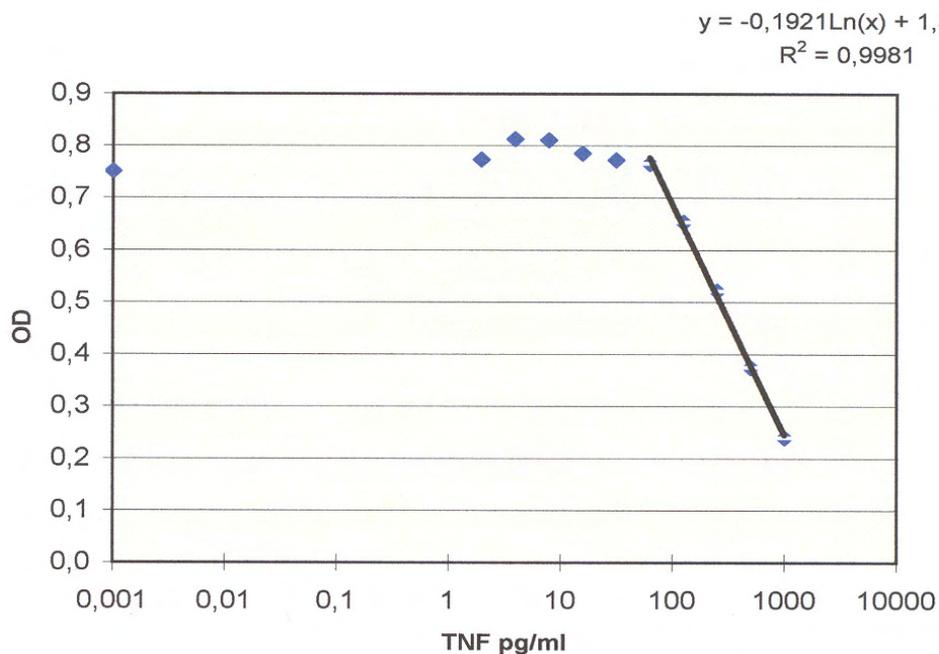


Abbildung 20: Exemplarische Eichkurve eines TNF- α Bioassay

Auch hier liegt die Regression im linearen Teil der Kurve bei annähernd 1. Im Unterschied zur Eichkurve des IL-6-Assays fällt die Kurve ab, da die Zellen mit steigender Konzentration absterben und somit auch die Menge an Formazankristallen, was eine sinkende optische Dichte bedingt.

Die Auswertung des TNF- α spezifischen Bioassays erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer Standardkurve und der daraus ermittelten logarithmisch-linearen Regressionsgeraden. Im Unterschied zum IL-6-Assay ergab sich mit steigender Aktivität von TNF- α auf Grund seiner Cytotoxizität logischerweise eine Reduktion der Zahl überlebender WEHI-Zellen und somit auch Menge an gebildeten Formazankristallen (Abb. 19). Die für die optische Dichte nahm dementsprechend ab. Es wurden ebenfalls nur diejenigen Verdünnungen ausgewählt, die im Bereich der Regressionsgeraden lagen. Anhand der Regressionsformel und des Verdünnungsfaktors wurde schließlich die TNF-Konzentration ermittelt.

2.4.5.5. Auswertung der Bioassay zur Cytokinbestimmung

Die ermittelten Konzentrationen an IL-6 bzw. TNF- α in den jeweiligen Überständen einzelner Mikrokammern der primären Zellkultur nach dosis- bzw. zeitabhängiger Stimulation mit ATP bzw. 2Me-SATP wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Test nach Bonferroni (Sachs 2004) miteinander verglichen. Die Varianzanalyse fand ebenfalls Anwendung auf den Vergleich der Konzentrationen an IL-6 bzw. TNF- α nach Stimulation der MnPO-Primärkultur mit LPS, LPS und PPADS bzw. TNP-ATP, ATP sowie PPADS bzw. TNP-ATP *per se*.

3. Ergebnisse

3.1. QRT-PCR

Um das Expressionsmuster der ionotropen P2X-Rezeptor-Subtypen P2X₁ bis P2X₇ in den für die Herstellung der MnPO-Primärkultur herangezogenen Gewebepräparationen des MnPO neonataler Ratten qualitativ und quantitativ zu erfassen, wurden *real-time* PCR Untersuchungen mit geeigneten Primerpaaren durchgeführt. Mögliche Hinweise auf unterschiedliche Muster in Abhängigkeit von der ontogenetischen Entwicklungsstufe sollten durch den Vergleich mit MnPO-Gewebe adulter Tiere erhalten werden. Der Nachweis Subtyp-spezifischer Purinozeptor mRNAs in Spinalganglien adulter Ratten mit aus der Fachliteratur bekannten Expressionsmustern diene als interne Kontrolle.

3.1.1. Expression purinergere Rezeptoren im MnPO adulter Ratten

Das unter Kap. 2.4.1.6 beschriebene Protokoll wurde zweimal durchgeführt, wobei für jeden PCR-Ansatz Dreifachbestimmungen erfolgten. Im MnPO adulter männlicher Wistar-Ratten wurde die Existenz aller sieben ionotropen P2X-Purinozeptoren molekularbiologisch demonstriert, wobei P2X₁ den am niedrigsten exprimierten Subtyp repräsentierte und damit als Referenzwert für alle anderen Subtypen herangezogen wurde. Abb.21 (A1 und A2) zeigt daher die Expressionsraten für P2X₂- bis P2X₇-Purinozeptoren jeweils relativ zu derjenigen von P2X₁. Beide Versuchsansätze ergaben ein vergleichbares Expressionsmuster. Der Subtyp P2X₄ stellte den am stärksten nachweisbaren Purinozeptor dar, mit jeweils mehr als 70fach erhöhter mRNA Menge im Vergleich zu der für den P2X₁ kodierenden mRNA. Nachfolgend erwiesen sich P2X₇ bzw. P2X₂ als 30fach bzw. 15fach stärker exprimiert als der P2X₁ Subtyp. Das Vorkommen purinergere Rezeptoren vom Subtyp P2X₃, P2X₅ und P2X₆ erwies sich im zweiten Versuchsansatz als zum P2X₁-Subtyp vergleichbar geringfügig ausgeprägt (Abb. 21; A2). Jedoch zeigten sich P2X₃ und P2X₆, nicht aber P2X₅ im ersten Ansatz um den Faktor 10 höher exprimiert (Abb. 21; A1). Diese Diskrepanz war eventuell auf minimale Unterschiede bei der MnPO-spezifischen Gewebsexzision zurückzuführen, da sich die Co-Präparation eines gewissen Anteils an Fremdgewebe aus der umliegenden POA nicht vermeiden lässt. Dennoch kommt diesen Subtypen aufgrund der in beiden Fällen relativ niedrigen Expressionsraten möglicherweise eine untergeordnete Rolle im Rahmen einer funktioneller Bedeutung purinergere Rezeptoren im Bereich des MnPO zu.

3.1.2. Expression purinerner Rezeptoren im MnPO neonataler Ratten

Auch für das aus neonatalen Gehirnen gewonnene MnPO-Gewebe wurden zwei Versuchsansätze unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt, wobei sich in beiden Fällen nahezu identische, zu den MnPO-Präparationen adulter Tiere jedoch signifikant unterschiedliche Expressionsmuster ergaben (Abb. 21; B1 und B2). Der P2X₅ repräsentierte dabei den am niedrigsten exprimierten Rezeptorsubtyp im MnPO neonataler Wistar – Ratten. Folglich zeigt Abb. 21 Expressionsraten von P2X₁ – P2X₇ Purinozeptoren relativ zu derjenigen des P2X₅-Subtyps. Wie schon für den MnPO adulter Tiere nachgewiesen (siehe Kap. 3.1.1), erwies sich die Expression von P2X₁ und P2X₃ eher moderat und vergleichbar mit der von P2X₅. P2X₂ hingegen stellte in beiden Ansätzen den vorherrschenden Purinozeptor-Subtyp der P2X-Familie dar. Seine Expression war um das 80fache (B1), bzw. 130fache (B2) höher als diejenige von P2X₅. Die nachfolgend stärkste Expression konnte für den P2X₄ Subtyp ermittelt werden, dessen mRNA in Relation zu P2X₅ 70fach konzentrierter im MnPO-Gewebe vorlag. Die Ausprägung von P2X₇ war ebenfalls noch über 50fach höher gegenüber der von P2X₅. Geringfügig höher als P2X₅ erwies sich der Subtyp P2X₆ exprimiert. Wenngleich Unterschiede im Profil der Purinozeptoren des MnPO zwischen neonatalen und adulten Tieren durch den Einsatz der *real-time* PCR deutlich wurden, so zeigten beide Altersgruppen übereinstimmend für die Purinozeptor-Subtypen P2X₂, P2X₄ und P2X₇ die markantesten Expressionsraten.

3.1.3. Expression purinerner Rezeptoren in den Spinalganglien adulter Ratten

Spinalganglien enthalten die Perikaryen afferenter, sensorischer Neurone und wurden eingehend immunhistochemisch und funktionell auf Vorhandensein und Funktion aller bekannten Purinozeptoren untersucht (Burgard et al 1999, Kobayashi et al 2005, Ruan et al 2005). Spinalganglien-Gewebe adulter Ratten wurde daher als interne Kontrolle für den Nachweis der Expression purinerner P2X Rezeptoren herangezogen. Wie schon für den MnPO gezeigt (Kap. 3.1.1), wies der Subtyp P2X₁ die geringste Expression in den Spinalganglien adulter Wistar-Ratten auf. In Abb. 21 (C1 und C2) ist die Expression von P2X₂ – P2X₇ folglich relativ zu derjenigen von P2X₁ graphisch dargestellt. Die ausgeprägteste Expression kam dabei dem P2X₃ Purinozeptor Subtyp mit einer etwa 1000fach höheren P2X₃-spezifischen mRNA Menge im Vergleich zu P2X₁ zu, gefolgt von P2X₄ (ca. 200fach), wie auch in der Literatur beschrieben (Kobayashi et al.2005; Xiang et al.2008).

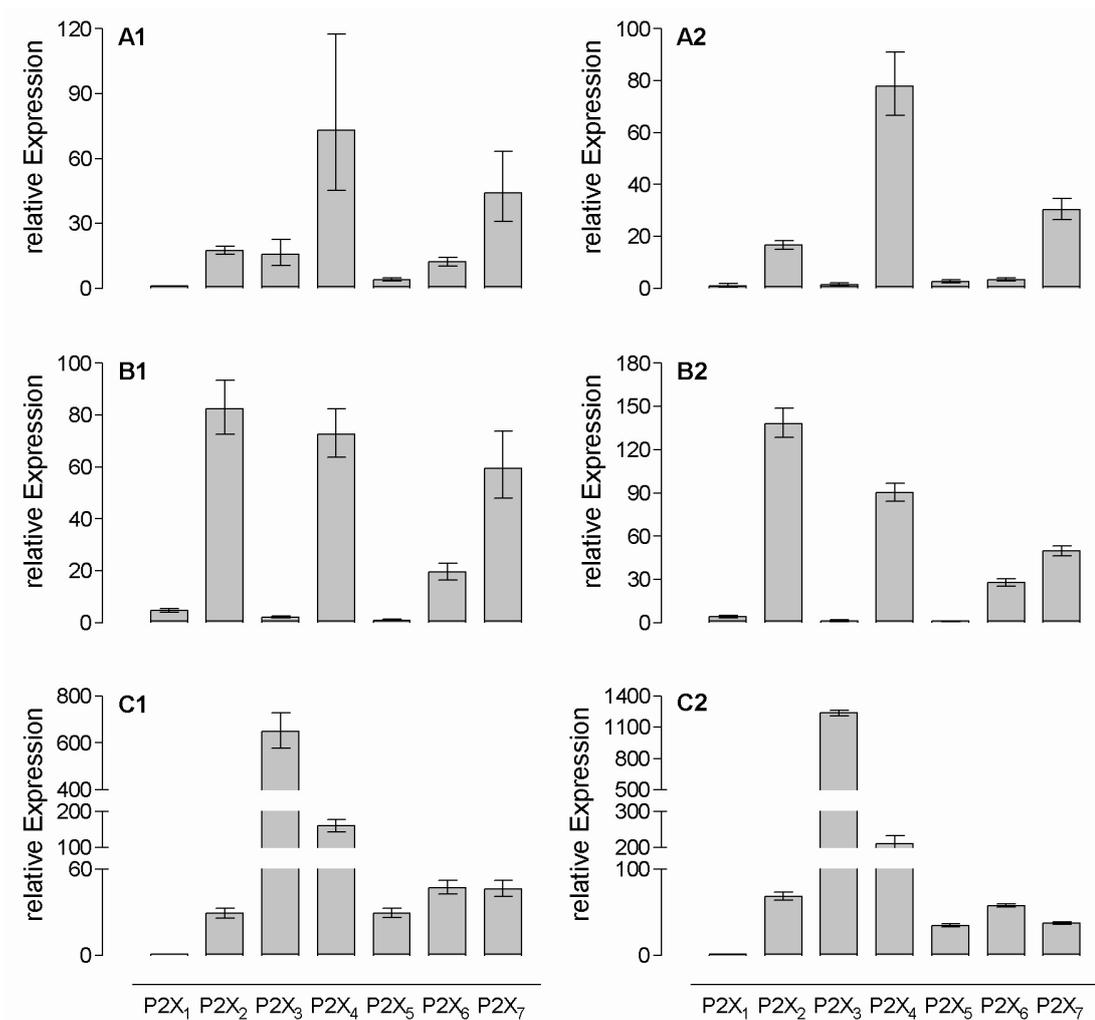


Abbildung 21: Expression purinergerezeptoren im MnPO adulter und neonataler Ratten sowie in den Spinalganglien adulter Ratten

- A1 und A2:** Expression von P2X₁–P2X₇ im MnPO adulter Ratten. Kalibrator ist der am niedrigsten exprimierte Rezeptorsubtyp (P2X₁)
- B1 und B2:** Expression von P2X₁–P2X₇ im MnPO neonataler Ratten. Kalibrator ist der am niedrigsten exprimierte Rezeptorsubtyp (P2X₅)
- C1 und C2:** Expression von P2X₁–P2X₇ in den Spinalganglien adulter Ratten. Kalibrator ist der am niedrigsten exprimierte Rezeptorsubtyp (P2X₁)

Die relative Expression wurde nach der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet. Dargestellt ist die x-fach höhere Expression des jeweiligen Rezeptorsubtyps verglichen mit dem am niedrigsten exprimierten Subtyp (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen \pm 95 % Konfidenzintervall).

3.1.4. Abschließende Betrachtung der *real-time* PCR Ergebnisse

Zwischen den mittels *real-time* PCR ermittelten Expressionsmustern purinergerezeptoren im MnPO neonataler und adulter Wistar – Ratten bestanden deutliche Unterschiede. Während sich für den MnPO adulter Tier die Expression von P2X₁ als am geringsten herausstellte, war dies bei neonatalen Tieren für den P2X₅ Subtyp der Fall.

Bezieht man nun die Expression der anderen Subtypen auf eben diese, so erwies sich bei adulten Tieren der Rezeptor vom Subtyp P2X₄ als am stärksten ausgeprägt (Abbildung 21, A), während dies im MnPO neonataler Tiere auf den P2X₂ Subtyp zutraf (Abbildung 21; B). Jedoch ist es nicht so, dass P2X₂ im MnPO neonataler Tiere im Vergleich zu adulten Tieren deutlich überexprimiert wäre. Vergleicht man nämlich die Expression der verschiedenen Purinozeptoren der beiden untersuchten Altersklassen miteinander, so lässt sich lediglich für die Subtypen P2X₃ und P2X₅ eine moderat höhere Expressionsrate (etwa 20fach) im adulten Tier gegenüber dem neonatalen Tier nachweisen (Daten nicht gezeigt). Für diese Berechnung wurden die ermittelten ΔC_T -Werte der einzelnen purinergen Rezeptoren im MnPO neonataler Tiere von denen der adulten Ratten substrahiert. Nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ lässt sich berechnen, um ein wie vieles höher die Expression von Rezeptor „X“ im MnPO neonataler zum Rezeptor „X“ im MnPO adulter Tiere war. Eine Gesamtbetrachtung der ermittelten Werte in Bezug zum insgesamt am niedrigsten exprimierten Rezeptor (P2X₅ der Neonaten) hingegen erwies sich als nicht sinnvoll. Neben einer fast 3000fach höheren Expression des ganglionären P2X₃ und eines etwa 100fach höheren Auftretens des ganglionären P2X₅ (Daten nicht gezeigt), ließen sich nämlich keine nennenswerten Unterschiede berechnen.

3.2. Ergebnisse der Calcium Ratio-Imaging Versuche

Die Zellen der Primärkultur des MnPO wurden 4 bis 5 Tage nach ihrer Dissoziation aus dem Gewebeverband und anschließenden Kultivierung, also im ausdifferenzierten Zustand, mittels der Ratio-Imaging Technik zum kontinuierlichen Nachweis der intrazellulären Calciumkonzentration auf die funktionelle Expression P2X-spezifischer Purinozeptoren hin untersucht. Die Versuchsdauer für ein einzelnes CELLocate® variierte, abhängig von der Anzahl der applizierten Substanzen (ATP-Analoga, Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten) und dem gewählten Regenerationsintervall, zwischen 20 und 60 min. Pro Zellkulturkammer (= CELLocate®) konnten gleichzeitig zwischen 20 und 40 Zellen mit keinem bzw. minimalem Zellkontakt untereinander untersucht werden. Der Anteil an Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten pro Mikrokultur war präparationsabhängig gewissen Schwankungen unterworfen und belief sich im Durchschnitt pro CELLocate® auf ca. 900 Neurone, 1850 fibrilläre und squamöse Astrocyten sowie 750 Oligodendrocyten.

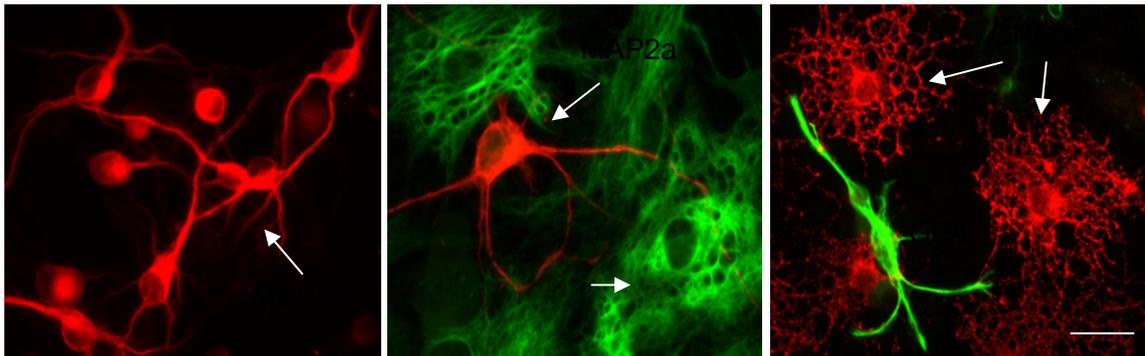


Abbildung 22: Immuncytochemische Identifizierung der Zellen in der Primärkultur des MnPO neonataler Ratten

Links: Identifizierung von Neuronen mittels monoklonalem mouse anti -MAP 2a+b Antikörper, als sekundärer Antikörper wurden Cy3TM markiertes donkey anti-mouse IgG eingesetzt.

Mitte: Nachweis von GFAP als Markerprotein für Astrocyten mittels polyklonalem rabbit Antiserum; als sekundärer Antikörper fungierte Alexa[®] 488 markiertes donkey anti-rabbit IgG. In diesem Bildausschnitt ist zusätzlich ein Map 2a+b immunpositives Neuron zu erkennen.

Rechts: Visualisierung von Oligodendrocyten durch den immuncytochemischen Nachweis von CNPase mittels eines monoklonalen mouse Antikörpers; als sekundärer Antikörper wurde wiederum Cy3TM markiertes donkey anti-mouse IgG eingesetzt. Zwischen den Oligodendrocyten ist ein GFAP-immunpositiver Astrocyt zu erkennen.

Der Eichbalken repräsentiert eine Strecke von 10 μ m.

Bei der endgültigen Auswertung der Daten wurden nur Zellen berücksichtigt, welche nach Abschluss eines Versuchstages eindeutig immuncytochemisch identifiziert werden konnten (Abb. 22) (Kap. 2.4.4.3). Darüber hinaus wurde ein durch exogene Stimulation induziertes intrazelluläres Calciumsignal nur dann als positiv gewertet, wenn der gemessene Anstieg der Fluoreszenz-Ratio des Calcium-bindenden Chelators Fura-2 nach alternierender Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm (siehe Kap. 2.4.3.1) während Superfusionsstimulation der Primärkultur sich als $\geq 0,05$ gegenüber der Basislinie erwies.

3.2.1. Stimulation der MnPO-Primärkultur mit ATP und seinen Analoga 2Me-SATP bzw. α,β me-ATP

Im Rahmen einer ersten Versuchsserie sollte untersucht werden, ob sowohl ATP als endogener Ligand für P2X-Rezeptoren als auch seine pharmakologischen Analoga 2Me-SATP und α,β me-ATP eine calciumabhängige, intrazelluläre Signaltransduktion in den drei untersuchten Zelltypen der MnPO-Primärkultur induzieren können. Bei 2Me-SATP handelt es sich um einen generellen P2 Rezeptor-Agonisten mit erhöhter Resi-

stanz gegenüber enzymatischer Hydrolyse. Für α,β me-ATP ist seine agonistische Wirkung vor allem auf schnell desensibilisierende P2X₁- und P2X₃-Rezeptorsubtypen beschrieben (Alexander et al.2008). Es wurde der prozentuale Anteil mit einem intrazellulären Calciumsignal reagierender Neurone, Astrocyten bzw. Oligodendrocyten an der jeweils getesteten Gesamtpopulation sowie die gemittelte Signalstärke für jeden Zelltyp errechnet. Hierfür wurden die Substanzen wie in Kap. 2.4.3.2.1 beschrieben sequenziell appliziert.

Im Folgenden wird zunächst vergleichend auf die Stimulation mit ATP und 2Me-SATP eingegangen. Nach den oben beschriebenen Auswahlkriterien gingen insgesamt 215 Neurone, 208 Astrocyten und 36 Oligodendrocyten in die Auswertung ein, basierend auf 16 getesteten Mikrokammern aus insgesamt 7 Zellpräparationen (Abbildung. 23; A1-A3). Auf eine Superfusion mit ATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L reagierten 41 (19,1 %) der 215 Neurone mit einer transienten Erhöhung des $[Ca^{2+}]_{iz}$. Der Mittelwert der 340/380 nm Fluoreszenz Δ -Ratiowerte lag bei $0,24 \pm 0,04$ (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M). Auf eine nachfolgende Superfusion mit 2Me-SATP in äquimolarer Konzentration reagierten die selben 41 Neurone; die mittlere Ratioänderung lag hier nicht signifikant ($P > 0,05$) unterschiedlich bei $0,18 \pm 0,03$. Von den insgesamt 208 identifizierten Astrocyten antworteten auf eine Stimulation mit ATP und 2Me-SATP, getestet im randomisierten Verfahren, 87 Zellen (41,8 %). Der Ratioanstieg lag im Mittel bei $0,24 \pm 0,02$ auf eine Stimulation mit ATP, bzw. bei $0,22 \pm 0,02$ bei Applikation von 2Me-SATP. 13 der 36 untersuchten Oligodendrocyten (36,1 %) erwiesen sich hinsichtlich einer Superfusions-Stimulation mit ATP oder 2Me-SATP als gleichermaßen responsiv. Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio erhöhte sich nach Superfusion von ATP um $0,26 \pm 0,06$, nach Applikation von 2Me-SATP nicht signifikant ($P > 0,05$) unterschiedlich um $0,31 \pm 0,02$. Alle ATP-responsiven Zellen der MnPO-Primärkultur konnten äquipotent mit 2Me-ATP stimuliert werden. ATP und 2Me-SATP repräsentierten somit gleichwertige Agonisten an purinergen Rezeptoren der Primärkultur des MnPO in Bezug auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. In allen weiteren Untersuchungen wurde daher das biochemisch stabilere 2Me-SATP als universeller P2-Rezeptoragonist eingesetzt.

In die Auswertung der Superfusionsstudie mit α,β me-ATP und 2Me-SATP, die beide ebenfalls im randomisierten Verfahren in einer Konzentration von 10^{-6} M/L an der Primärzellkultur des MnPO auf eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ getestet wurden, gingen 50 Neurone, 150 Astrocyten und 31 Oligodendrocyten, basierend auf 14 getesteten Mikrokammern aus insgesamt 9 Zellpräparationen, ein (Abb. 23; B1-B3). Keiner der untersuchten Zelltypen zeigte sich responsiv auf eine Stimulation mit α,β me-ATP. Auf eine Applikation von 2Me-SATP wiederum reagierten 17 (34 %) der untersuchten 50 Neurone mit einer Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,21 \pm 0,03$. Ebenso konnte bei 50 % (entspricht 75 responsiven Zellen) der untersuchten Astrocyten ein Ratioanstieg dokumentiert werden, welcher bei $0,23 \pm 0,01$ lag. Von den 31 identifizierten Oligodendrocyten zeigten 16 (51,6 %) ein transientes Calciumsignal mit Δ -Ratiowerten von $0,42 \pm 0,08$. Daraus lässt sich schließen, dass α,β me-ATP keinen adäquaten Agonisten an purinergen Rezeptoren der MnPO-Primärkultur darstellte.

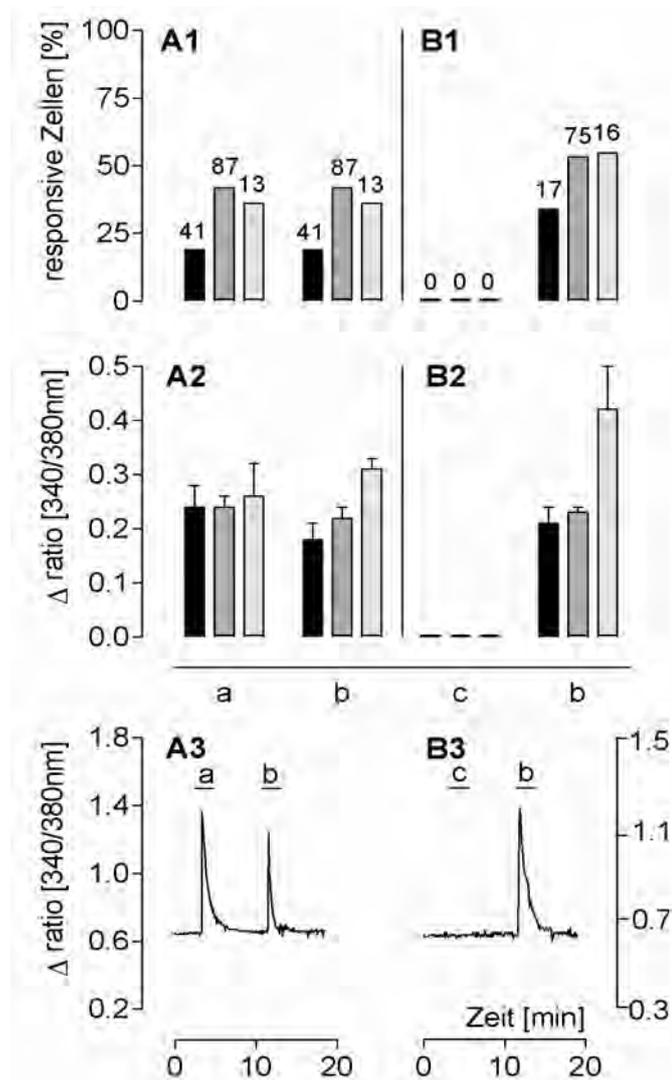


Abbildung 23: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit ATP (a), 2Me-SATP (b) und αβme-ATP (c)

A1-A3: Stimulation mit ATP (a) und 2Me-SATP (b) (10^{-6} M/L)

A1: Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der responsiven Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Superfusionsstimulation mit ATP (a) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M/L.

A2: Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Superfusion mit ATP (a) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von 10^{-6} M/L als arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.

A3: 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit ATP (a) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M/L.

B1-B3: Stimulation mit αβme-ATP (c) und 2Me-SATP (b)

B1: Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der responsiven Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Superfusionsstimulation mit αβme-ATP (c) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M/L.

B2: Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Superfusion mit αβme-ATP (c) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von 10^{-6} M/L als arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.

B3: 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit αβme-ATP (c) und 2Me-SATP (b) in einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M/L.

3.2.2. Stimulation der MnPO-Primärkultur mit dem P2X₇-spezifischen Agonist Bz-ATP und 2Me-SATP

Zum Nachweis der funktionellen Expression des P2X₇ Purinozeptors in Zellen der MnPO-Primärkultur wurden 24 Neurone, 143 Astrocyten und 18 Oligodendrocyten – basierend auf 12 Mikrokammern aus insgesamt 6 Zellpräparationen - hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Stimulation mit dem P2X₇-spezifischen Agonisten Bz-ATP untersucht. Dabei wurden die Primärkulturen sequentiell mit Bz-ATP und 2Me-SATP in jeweils zwei Konzentrationen (10^{-7} M/L und 10^{-6} M/L) in Messpuffer bei RT für jeweils 3 min superfundiert. Keine der untersuchten Zellen zeigte eine Änderung der Fluoreszenz Ratio auf eine Applikation von Bz-ATP (Abb. 24). Hingegen reagierten 5 (20,8 %) der untersuchten Neurone auf eine Superfusion von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$; die durchschnittlichen Änderungen der Fluoreszenz Ratio betrugen $0,08 \pm 0,02$ (10^{-7} M/L) und $0,07 \pm 0,01$ (10^{-6} M/L). In der Gruppe der post-experimentell als Astrocyten charakterisierten Gliazellen zeigten 90 (62,9 %) einen deutlichen Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio auf eine Applikation von 2Me-SATP (10^{-7} M/L), welcher im Mittel bei $0,16 \pm 0,01$ lag. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M/L reagierten vergleichbare 100 (69,3 %) der mikrospektrofluorimetrisch charakterisierten Astrocyten mit einer mittleren Ratioänderung von $0,17 \pm 0,01$ auf 2Me-SATP (Abb. 24 A). Da alle auf 10^{-7} M/L mit einer erhöhten $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierenden Astrocyten sich auch für die 10fach höhere Konzentration an 2Me-SATP als responsiv erwiesen, muss von der Existenz einer kleinen Gruppe MnPO-intrinsischer Astrocyten ausgegangen werden, die lediglich auf die hohe Agonisten-Konzentration hin ein intrazelluläres Calciumsignal generierten. Vergleichbar verhielt es sich mit den induzierten Calciumsignalen der Oligodendrocyten. Wurde 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-7} M/L appliziert, so antworteten 13 (72,2 %) von 18 Oligodendrocyten mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$, bei einem mittleren Ratioanstieg von $0,21 \pm 0,06$. Superfusion mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) hatte die Aktivierung eines weiteren Oligodendrocyten zur Folge. Dabei erhöhte sich gegenüber den Versuchen mit der niedrigeren 2Me-SATP Konzentration die mittlere Änderung der Fluoreszenz Ratio nicht signifikant ($P > 0,05$) auf $0,24 \pm 0,05$ (Abb. 24 A). Die Insensitivität der Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten gegenüber einer Stimulation mit Bz-ATP schließt für alle drei Zellgruppen die funktionelle Expression des P2X₇ Purinozeptor Subtyps hinsichtlich der Generierung eines Calciumsignals als nachgeschaltetem, intrazellulären Signaltransduktionsweg in der MnPO-Primärkultur neonateler Ratten nahezu aus. Eine genauere Betrachtung der Reaktionen der Zellen auf die zwei unterschiedlichen Konzentrationen mit 2Me-SATP zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$), jedoch nahm die Anzahl der responsiven Zellen, mit Ausnahme der Neurone, bei Superfusion des Agonisten in

einer Konzentration von 10^{-6} M/L leicht zu. Die Dosisabhängigkeit der verschiedenen Zelltypen bei purinergem Aktivierung wurde in einer separaten Studie genauer untersucht (siehe Kap. 3.2.4).

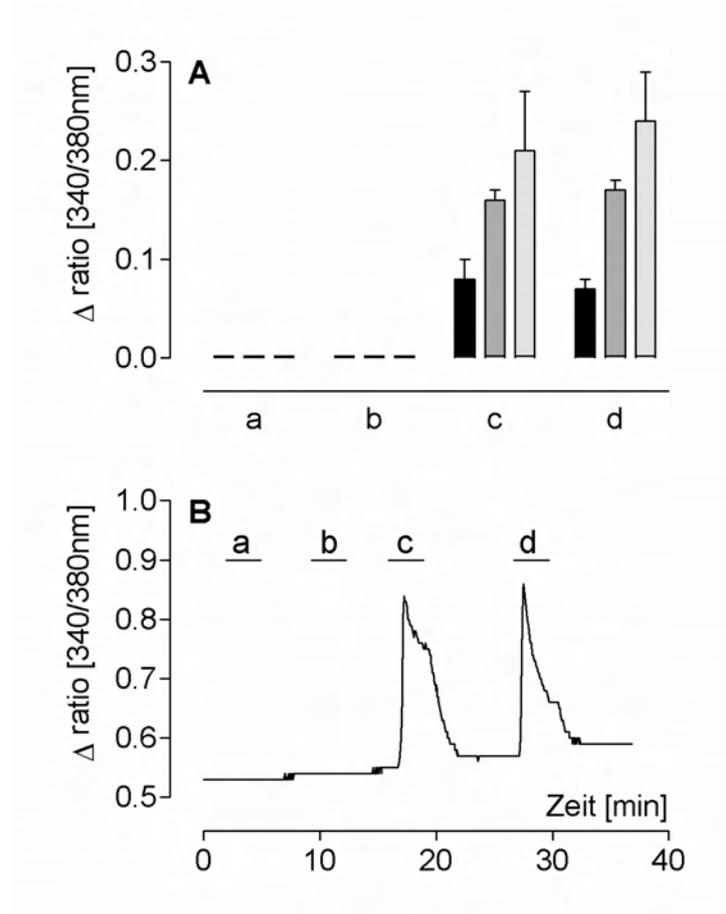


Abbildung 24: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit Bz-ATP (a) und (b) und 2Me-SATP (c) und (d)

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Superfusion mit Bz-ATP 10^{-7} M/L (a) und 10^{-6} M/L (b) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L (c) und 10^{-6} M/L (d) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M für Neurone (schwarz), Astrocyten (dunkelgrau) und Oligodendrocyten (hellgrau).
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit Bz-ATP 10^{-7} M/L (a) und 10^{-6} M/L (b) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L (c) und 10^{-6} M/L (d).

3.2.3. Stimulation der MnPO-Primärkultur mit P1-Agonisten (NECA, CCPA) und 2Me-SATP

In dieser Versuchsreihe wurde mit Hilfe der Ratio-Imaging Technik die funktionelle Expression von P1 Adenosinrezeptoren in Zellen der MnPO-Primärkultur anhand induzierter, intrazellulärer Calciumsignale untersucht. Die Superfusion des nicht Subtypselektiven P1-Agonisten NECA erfolgte in Konzentrationen von 10^{-6} M/L und 10^{-5} M/L. Im Anschluss folgte eine Applikation von 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L als „Kontroll-Stimulus“ für den möglichen Nachweis der funktionellen Co-Expression von P1- und P2X-Rezeptoren. Die Ergebnisse resultierten aus Messungen an 10 Mikrokammern aus 7 Zellpräparationen.

Von den insgesamt 36 untersuchten Neuronen reagierte keines auf eine Applikation von NECA, während 10 Neurone (27,78 %) auf den anschließenden Stimulus 2Me-SATP ein intrazelluläres Calciumsignal mit einer mittleren Erhöhung der Fluoreszenz Ratio von $0,21 \pm 0,06$ generierten (Abb. 25). Von den 117 in der Auswertung berücksichtigten, da durch 2Me-SATP aktivierbaren, Astrocyten antwortete lediglich einer (0,8 %) auf eine Superfusion mit NECA in beiden Konzentrationen mit einer Erhöhung der Δ -Ratiowerte um 0,28 bzw. 0,23. Die mittlere Ratioerhöhung aller 2Me-SATP responsiven Astrocyten nach NECA-Stimulation errechnete sich somit zu $0,003 \pm 0,003$ für beide Konzentrationen; in Abb. 25 wurde somit ein nicht NECA-responsiver Astrocyt als typisches Resultat der Versuchsserie dargestellt. Auf den Kontroll-Stimulus mit 2Me-SATP zeigten 81 Astrocyten (69,23 %) ein ausgeprägtes Calciumsignal mit einer Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio um $0,28 \pm 0,02$ (Abb. 25). Von den getesteten 21 Oligodendrocyten reagierte ebenfalls nur einer auf die höhere Konzentration des superfundierten P1-Agonisten mit einem Δ -Ratiowert von 0,17. Dadurch ergab sich eine gemittelte Antwort aller 2Me-SATP aktivierbaren Oligodendrocyten nach NECA-Stimulation von $< 0,05$. Insgesamt 10 Oligodendrocyten (47,6 % der getesteten) zeigten eine markante Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ mit Änderungen der Fluoreszenz Ratiowerte von $0,46 \pm 0,05$ (Abb. 25). Mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney U Rank Test ermittelt, ergaben sich somit stark signifikante Unterschiede ($2P \leq 0,001$) für den Vergleich der mit 2Me-SATP und NECA erzeugten Calciumsignale für beide Gliazelltypen der MnPO-Primärkultur.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der A1 Rezeptorsubtyp -spezifische Agonist CCPA in einer Konzentration von 10^{-6} M/L eingesetzt. Nach einer Regenerationsphase, in der die Zellen lediglich mit Messpuffer superfundiert wurden, erfolgte wiederum eine

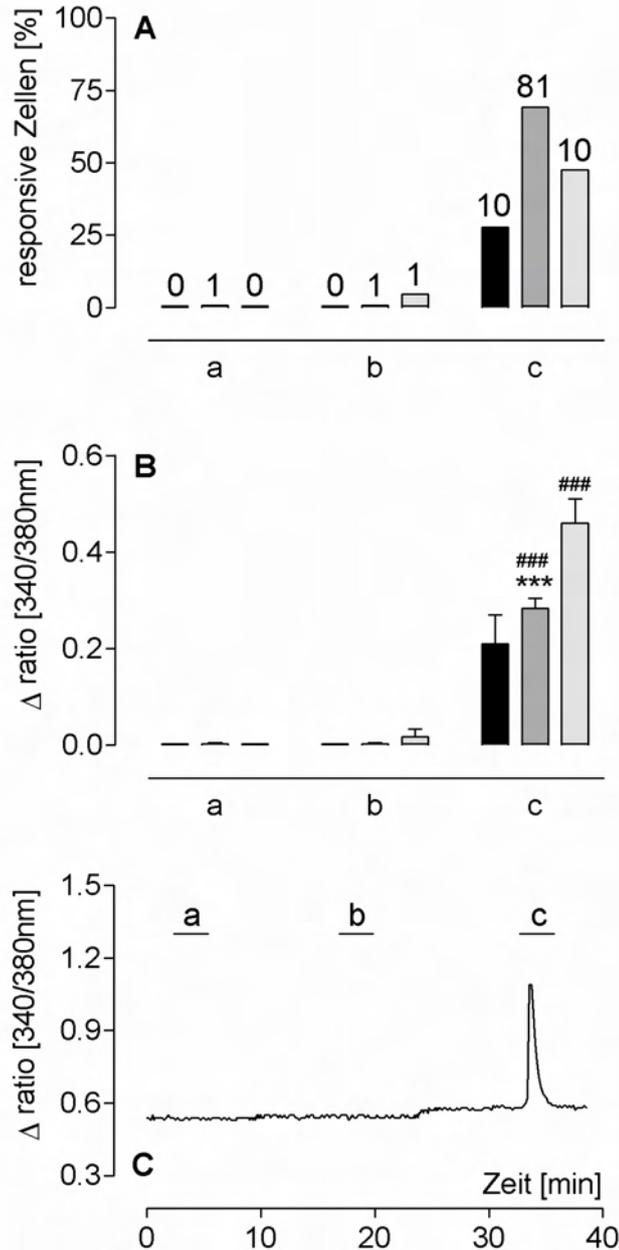


Abbildung 25: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit dem P1 Purinozeptor Agonist NECA (a, b) und 2Me-ATP (c)

- A:** Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der responsive Neurone (schwarz), Astrocyten (dunkelgrau) und Oligodendrocyten (hellgrau) nach Superfusions-Stimulation mit dem P1-Agonisten NECA (a) (10^{-6} M/L) und (b) (10^{-5} M/L) und 2Me-SATP (c) in einer Konzentration von 10^{-6} M/L.
- B:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Superfusion mit NECA (a) (10^{-6} M/L) und (b) (10^{-5} M/L) und 2Me-SATP (c) in einer Konzentration von 10^{-6} M/L als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhung zwischen (c) und (a) (**), bzw. (c) und (b) (###). Für beide gilt $2P \leq 0,001$.
- C:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit NECA (a) und (b) sowie 2Me-SATP (c) in den unter A und B aufgeführten Konzentrationen.

Superfusion mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L). In keiner der getesteten Zellen (fünf Neurone, 74 Astrocyten und 8 Oligodendrocyten) aus 7 Mikrokammern aus 3 Zellpräparationen konnte CCPA einen messbaren Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio hervorrufen. Auf den Kontroll-Stimulus mit 2Me-SATP reagierten drei Neurone (60 %) ($0,23 \pm 0,13$), 36 Astrocyten (48,7 %) und vier Oligodendrocyten (50 %) mit transienten Calciumsignalen bei Δ -Ratiowerten von $0,23 \pm 0,13$, $0,30 \pm 0,03$ respektive $0,17 \pm 0,04$). Auf eine Darstellung in Diagrammform wurde verzichtet

3.2.4. Dosisabhängigkeit der Aktivierung purinerge P2X-Rezeptoren in der MnPO-Primärkultur

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 2Me-SATP in den drei untersuchten Zelltypen des MnPO eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bewirkte, sollte in der nächsten Versuchsreihe untersucht werden, ob sich die 2Me-SATP-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ als dosisabhängig erweist. Der P2-Agonist wurde dazu sequenziell in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-6} M/L in Messpuffer, bei gleich bleibendem Regenerationsintervallen, superfundiert (siehe Kap. 2.4.3.2.4). Die nachfolgend dargestellten Daten beziehen sich auf 4 Zellpräparationen und Messungen an 12 Mikrokammern.

Bezüglich der Neurone gingen 31 Zellen in die abschließende Auswertung ein. Auf 2Me-SATP in steigenden Konzentrationen von 10^{-8} M/L, 3×10^{-8} M/L, 10^{-7} M/L und 10^{-6} M/L reagierten vier (12,9 %), respektive sieben (22,6 %), 10 (32,3 %) und 10 (32,3 %) Neurone mit einem intrazellulären Calciumsignal (Abb. 26, A). In die Berechnung der jeweiligen arithmetischen Mittel (\pm S.E.M.) gingen die Δ -Ratiowerte aller Neurone ein, die zumindest auf die höchste Konzentration (10^{-6} M/L) mit einer transienten Zunahme der $[Ca^{2+}]_{iz}$ antworteten ($n = 10$). Fehlende Aktivierungen bei niedrigeren 2Me-SATP Konzentrationen wurden als Nullwert in die Auswertung übernommen. Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratiowerte der untersuchten Neurone erhöhten sich nach Superfusion von 2Me-SATP in den Konzentrationen von 10^{-8} M/L, 3×10^{-8} M/L, 10^{-7} M/L und 10^{-6} M/L um $0,1 \pm 0,04$., $0,08 \pm 0,03$, $0,09 \pm 0,02$ respektive $0,10 \pm 0,02$ (Abb. 26 B). Einerseits konnte also bei steigender Konzentration des Agonisten im Superfusionsmedium eine zunehmende Rekrutierung von responsiven Neuronen verzeichnet werden. Andererseits ließ sich hinsichtlich der Höhe der jeweiligen Calciumsignale als Maß für die Zunahme der $[Ca^{2+}]_{iz}$ sowohl für das einzelne Neuron (Abb. 27 A), als auch die gemittelten Werte (Abb. 26 B) keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisen. Bei einigen Neuronen, wie dem in Abb. 27 A dargestellten, legte der Zeitverlauf mit vier sequenziellen Stimulationen zunehmender Konzentration des Agonisten sogar eine

leichte Desensibilisierung nahe. In einer weiteren Versuchsserie wurde daher das mögliche Desensibilisierungsverhalten aller drei Zelltypen der MnPO-Primärzellkultur nach repetetiver Stimulation mit äquimolarer Konzentration an 2Me-SATP untersucht (siehe Kap. 3.2.5).

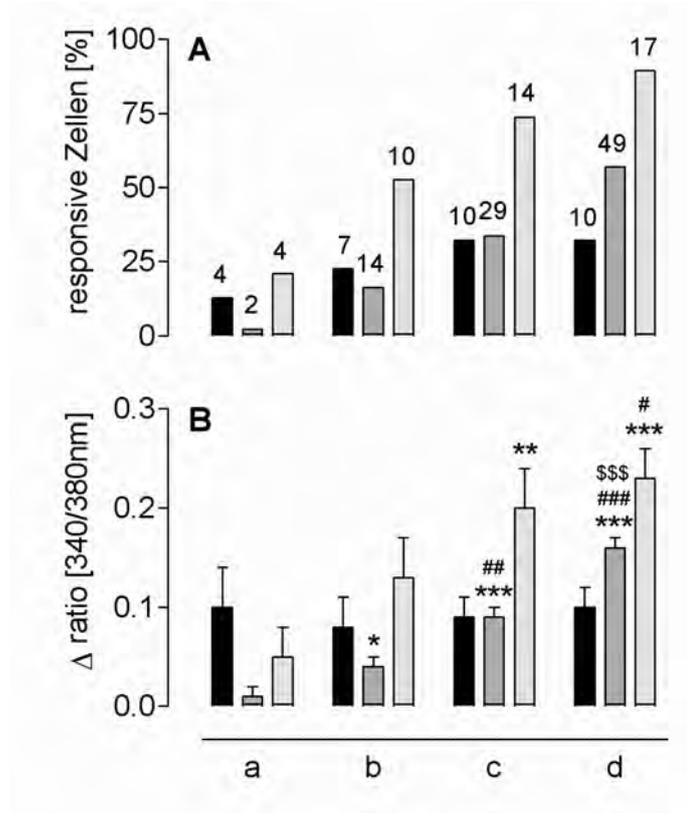


Abbildung 26: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP in steigenden Konzentrationen (Dosisabhängigkeit)

- A:** Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der responsiven Neurone (schwarz), Astrocyten (dunkelgrau) und Oligodendrocyten (hellgrau) nach Superfusions-Stimulation mit 2Me-SATP (a) (10^{-8} M/L), (b) (3×10^{-8} M/L), (c) (10^{-7} M/L) und (d) (10^{-6} M/L).
- B:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach Superfusion mit 2Me-SATP (a) (10^{-8} M/L), (b) (3×10^{-8} M/L), (c) (10^{-7} M/L) und (d) (10^{-6} M/L) als arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M. * / # / \$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhung für (d), (c) und (b) im Vergleich mit (a) (* $2P \leq 0,05$;*** $2P \leq 0,001$), bzw. zwischen (d) und (c) verglichen mit (b) (## $2P \leq 0,01$; ### $2P \leq 0,001$), sowie zwischen (d) und (c) (\$\$\$ $2P \leq 0,001$)

Klare Dosis-Wirkungsbeziehungen hingegen resultierten aus analogen Untersuchungen an MnPO-spezifischen Astrocyten und Oligodendrocyten; die Auswertung erfolgte mit den für Neurone beschriebenen Kriterien. Von 86 getesteten Astrocyten konnte in zwei Fällen (2,3 %) bei Superfusion mit 2×10^{-8} M/L 2Me-SATP eine signifikante Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ induziert werden, mit Zunahme der Δ -Ratiowerte von 0,24 bzw. 0,09.

Als arithmetisches Mittel aller 49 auf 10^{-6} M/L 2Me-SATP reagierenden Astrocyten (also inklusive 47 Nullwerten, siehe unten) manifestierte sich jedoch lediglich eine Ratioänderung von $0,01 \pm 0,01$. Auf die 3×10^{-8} M/L des P2 Rezeptor-Agonisten antworteten 14 Astrocyten (16,3 %) mit einer mittleren 340/380 nm Fluoreszenz Ratioänderung von $0,16 \pm 0,02$, wodurch sich bei Berücksichtigung weiterer 35

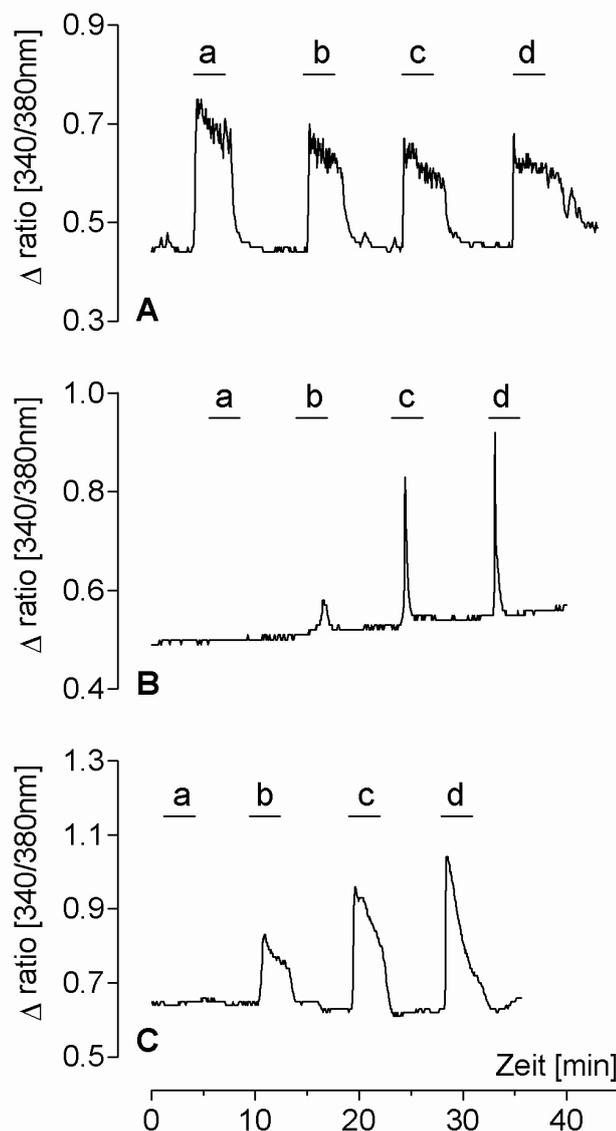


Abbildung 27: Dosis-abhängige, intrazelluläre Calciumsignale einzelner Zellen der Primärzellkultur des MnPO nach Stimulation mit 2Me-SATP

Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Zellen nach sequenzieller Superfusion mit 2Me-SATP (a) (10^{-8} M/L), (b) (3×10^{-8} M/L), (c) (10^{-7} M/L) und (d) (10^{-6} M/L)

- A:** Intrazelluläre Calciumsignale (340/380 nm Ratio) für ein einzelnes MnPO-Neuron
- B:** Intrazelluläre Calciumsignale (340/380 nm Ratio) für einen einzelnen MnPO-Astrocyt
- C:** Intrazelluläre Calciumsignale (340/380 nm Ratio) für einen einzelnen MnPO-Oligodendrocyt

Astrocyten (Nullwerte) als Mittelwert $0,04 \pm 0,01$ errechnete (Abb. 26 A,B). Superfusion der Primärkultur mit 2Me-SATP in Konzentrationen von 10^{-7} M/L bzw. 10^{-6} M/L verursachte in 29 (33,7 %) bzw. 49 (57 %) der Astrocyten ein Calciumsignal und hatte mittlere Anstiege der Fluoreszenz Ratio von $0,09 \pm 0,01$ (für 29 Astrocyten ohne Nullwerte $0,16 \pm 0,02$) bzw. $0,16 \pm 0,01$ zur Folge. Im Gegensatz zu den Neuronen konnten für die Astrocyten klare Dosis-Wirkungsbeziehungen sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils reaktiver Zellen als auch der Magnitude der intrazellulären Calciumsignale aufgezeigt werden (Abb. 26B; 27 B).

Die Endauswertung bei den Oligodendrocyten bezog sich auf 19 Zellen. Die Applikation von 2Me-SATP in niedriger Konzentration (10^{-8} M/L) induzierte in 4 Zellen (21,1 %) einen deutlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ in Form einer Ratioerhöhung von $0,22 \pm 0,09$, wodurch sich bei 17 durch 2Me-SATP in der hohen Konzentration von 10^{-6} M/L aktivierbaren Oligodendrocyten (d.h. 13 Nullwerte bei 10^{-8} M/L; siehe unten) eine mittlere Ratioänderung von $0,05 \pm 0,03$ ergab. Superfusionen der MnPO-Primärkultur mit 2Me-SATP in Konzentrationen von 3×10^{-8} M/L, 10^{-7} M/L respektive 10^{-6} M/L induzierten in 10 (52,6 %), 14 (73,7 %) respektive 17 (89,5 %) der getesteten Oligodendrocyten eine mittlere Erhöhung der Fluoreszenz Ratiowerte von $0,13 \pm 0,04$, $0,20 \pm 0,04$ respektive $0,23 \pm 0,03$ (unter Berücksichtigung der 9, 5 respektive 0 Nullwerte, die ohne Einbezug der Nullwerte mittlere Erhöhungen von $0,23 \pm 0,05$ bzw. $0,24 \pm 0,04$ aufwiesen). Der zeitliche Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration eines einzelnen Oligodendrocyten während sequentieller Superfusions-Stimulationen mit steigenden Konzentrationen an 2Me-SATP ist in Abb. 27 C dargestellt. Vergleichbar zum Antwortverhalten der Astrocyten konnte hinsichtlich der Anzahl responsiver Zellen als auch der Höhe der Calciumsignale eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt werden (Abb. 26 B; 27 C), wobei die Zellpopulation der Oligodendrocyten sich im direkten Vergleich zu den Neuronen und den Astrocyten als die reaktivste darstellt. Dies gilt sowohl für die Anzahl an reaktiven Zellen, als auch bei der Betrachtung der durchschnittlichen Fluoreszenz Ratio für jeden einzelnen Stimulus. Insgesamt sind , wie oben erörtert, deutliche Unterschiede zwischen den Zellen neuronalen Ursprungs verglichen mit den Gliazellen zu verzeichnen.

3.2.5. Repetitive, äquimolare Stimulationen der MnPO-Primärkultur mit 2Me-SATP

Als Voraussetzung für nachfolgende Versuchsreihen mit Antagonisten an ionotropen purinergen Rezeptoren musste geklärt werden, ob repetitive Stimulationen mit 2Me-SATP einer konstanten Konzentration bei den untersuchten Zellen zu einem Desensibilisierungsphänomen führten. Gleichzeitig wurde untersucht welchen Einfluss ein längeres Regenerationsintervall zwischen den Superfusionen auf die Reaktionen der einzelnen Zelltypen hat. Für diesen gesamten Versuchsblock wurden 10 Zellpräparationen durchgeführt, mit Messungen an insgesamt 20 Mikrokammern. Die Reaktionen der untersuchten Zellen stellten sich im Ergebnis als sehr inhomogen dar. Unabhängig vom Zelltyp traten sowohl Desensibilisierungen, als auch konstante Reaktionen nach sequentieller Applikation von 2Me-SATP auf. Daraufhin wurden 2 Gruppen an Reaktionen definiert.

(1) In die erste Gruppe wurde eine Zelle dann eingeordnet, wenn sie auf die sequentielle Applikation von 2Me-SATP nicht konstant dreimal mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio reagiert hatte, mindestens jedoch auf den ersten Stimulus ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ verzeichnet werden konnte. Diese Gruppe wird im Folgenden als „Desensibilisierungsgruppe“ bezeichnet.

(2) Zugehörig zur zweiten Gruppe war eine Zelle dann, wenn eine dreimalig wiederholte Stimulation mit 2Me-SATP auch zu einer dreimaligen Reaktion in Form eines Anstiegs der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio führte. Diese Gruppe wird künftig „repetitiv reaktive Gruppe“ genannt.

Im ersten Versuchsansatz wurden die Zellen dreimal mit einem Zeitabstand von 8 Min mit 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L superfundiert (9 mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen aus 5 Zellpräparationen). In die Auswertung dieser Versuchsreihe flossen insgesamt 60 Neurone ein. 14 (23,3 %) der identifizierten 60 Neurone konnten eine der beiden Gruppen zugeordnet werden.

„Desensibilisierungsgruppe“ (5 der 14 Neurone (35,7 %)):

Die Fluoreszenz Ratio erhöhte sich nach den drei Applikationen von 2Me-SATP um $0,29 \pm 0,07$ bei 5 Neuronen, nachfolgend um $0,07 \pm 0,04$ (2. Stimulation) bei nur noch drei reaktiven Neuronen und zwei gesetzten Nullwerten. Auf den dritten Stimulus hin, blieb ein Anstieg der Fluoreszenz Ratio aus. (Abbildung 28, A, a-c, schwarze Balken).

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (9 der 14 Neurone (64,3 %)):

Bei diesen neun Neuronen konnte eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ nach allen drei Applikationen beobachtet werden. Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio erhöhte sich

nach den drei Stimulationen mit 2Me-SATP um $0,24 \pm 0,05$, bzw. $0,17 \pm 0,05$ sowie $0,16 \pm 0,05$ (Abbildung 28, B, a-c, schwarze Balken). Statistisch weichen diese Daten nicht signifikant voneinander ab ($2P > 0,05$).

In der Gruppe der Neurone gibt es sowohl desensibilisierende, als auch konstant reaktive Zellen. Mehr als 50 % jedoch, lassen sich der zweiten Gruppe zuordnen. Im zweiten Versuchsansatz wurde die Pause zwischen zwei Superfusionen mit substanzhaltigem Messpuffer auf 15 Min hochgesetzt, bei gleichbleibender Konzentration des superfundierten Agonisten 2Me-SATP (10^{-6} M/L). Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob durch ein längeres Regenerationsintervall mehr Neurone der Gruppe der „repetitiv reaktiven Zellen“ zugeordnet werden können.

Auch im zweiten Versuchsansatz mit längerem Regenerationsintervall zwischen zwei Stimulationen wurde aufgrund der erzielten Ergebnisse die Gruppeneinteilung in „desensibilisierende Zellen“ und „repetitiv reaktive Zellen“ beibehalten. In die Evaluierung dieser Versuchsreihe (7 Zellpräparationen mit Messungen an 11 Mikrokammern) flossen insgesamt 93 Neurone ein, von denen 27 (29 %) einer der beiden oben definierten Gruppen zugeordnet werden konnten.

„Desensibilisierungsgruppe“ (13 der 27 Neurone (48,1 %)):

Die Fluoreszenz Ratio erhöhte sich nach der ersten 2Me-SATP-Applikation um $0,19 \pm 0,04$. Nach der zweiten Applikation war nur noch für drei Zellen ein Anstieg der Fluoreszenz Ratio zu verzeichnen, die durchschnittlich (inklusive 10 Nullwerte) bei $0,03 \pm 0,02$ lag, auf den dritten Stimulus hin konnte kein Anstieg der Fluoreszenz Ratio mehr ermittelt werden (Abbildung 30 A, a-c, schwarze Balken). Die statistische Auswertung zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Stimulation ($***2P \leq 0,001$).

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (14 der 27 Neurone (51,9 %)):

Wie schon in der ersten Versuchsreihe mit kürzerem Regenerationsintervall so konnte auch in dieser Versuchsserie für diese 14 Neurone eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ nach allen drei Applikationen beobachtet werden. Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio erreichte nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP durchschnittliche Werte von $0,3 \pm 0,05$ und nachfolgend zweimalig $0,19 \pm 0,02$ (Abbildung 30, B, a-c, schwarze Balken). Statistisch weichen diese Daten nicht signifikant voneinander ab ($2P > 0,05$). Verglichen mit dem ersten Versuchsansatz (kürzeres Regenerationsintervall) liegt die Anzahl der konstant reaktiven Zellen immer zwar noch knapp über 50 %, jedoch ist durch das längere Regenerationsintervall die prozentuale Anzahl von Neuronen in dieser Gruppe nicht angestiegen. Somit hat für die Zellgruppe der Neurone ein

längeres Regenerationsintervall keinen positiven Einfluss auf die Wiederholbarkeit der Antwort nach Applikation von 2Me-SATP.

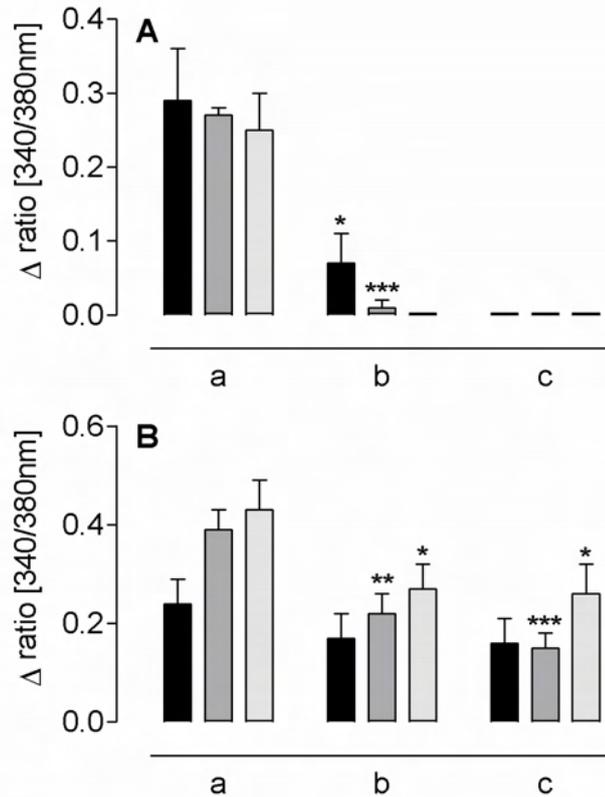


Abbildung 28: Repetitive Stimulation mit 2Me-SATP einer konstanten Konzentration (a – c = 10^{-6} M/L) und einem Regenerationsintervall von 8 Min zwischen zwei Stimulationen

- A:** „Desensibilisierungsgruppe“ – Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.
* kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhung von (b) verglichen mit (a) (* $2P \leq 0,05$; *** $2P \leq 0,001$).
- B:** „repetitiv reaktive Gruppe“ - Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.
* kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhung von (b) verglichen mit (a) (* $2P \leq 0,05$; ** $2P \leq 0,01$) und (c) verglichen mit (a) (* $2P \leq 0,05$; *** $2P \leq 0,001$)

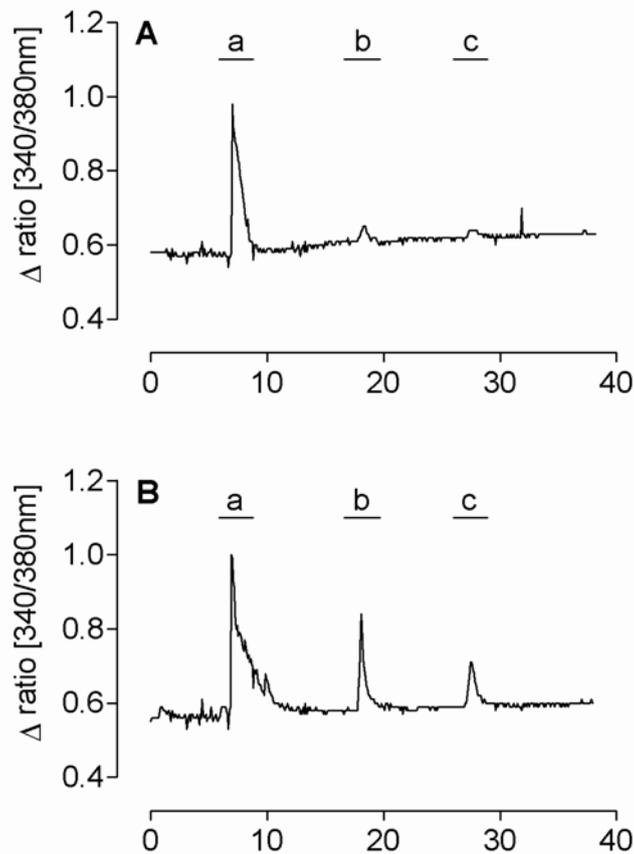


Abbildung 29: 340/380 nm Ratio Signal für Zellen der Primärzellkultur des MnPO nach repetitiver Stimulation mit 2Me-SATP in einer konstanten Konzentration (a-c 10^{-6} M/L) und einem Regenerationsintervall von 8 Min

- A:** „Desensibilisierungsgruppe“ – 340/380 nm Ratio Signal für einen einzelnen Astrocyten
B: „repetitiv reaktive Gruppe“ – 340/380 nm Ratio Signal für einen einzelnen Astrocyten

Auf eine repetitive Stimulation mit 2Me-SATP und einer Pause von 8 Min in Form einer Superfusion mit Messpuffer reagierten 69 (58,5 %) von 118 identifizierten Astrocyten.

„Desensibilisierungsgruppe“ (53 der 69 Astrocyten (76,8 %)):

Die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio erhöhte sich nach dreimaliger Applikation von 2Me-SATP um $0,27 \pm 0,01$ bei allen 53 Astrocyten, nachfolgend bei nur noch 5 Zellen (9,4 %) um $0,01 \pm 0,01$ und charakteristischem Basalniveau der Ratio (Anstieg $< 0,05$) nach abschließend dritter Stimulation (Abbildung 28, A, a-c, dunkelgraue Balken). Abbildung 29 (A) zeigt ein Beispiel eines einzelnen Astrocyten der „Desensibilisierungsgruppe“ in Form des 340/380 nm Ratio Signals.

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (16 der 69 Astrocyten (23,2 %)):

Schon prozentual zeigen sich hier deutliche Unterschiede im Vergleich mit der Gesamtgruppe der Neurone. Während nur knapp ein Viertel der Astrocyten auf eine repetitive Superfusion mit 2Me-SATP reagierte, waren dies bei den Neuronen weit über 50 %. Zudem waren bei den Neuronen keine statistisch signifikanten Abweichungen zu ermitteln, vergleicht man die Daten der einzelnen Stimulation der „repetitiv reaktiven Gruppe“ miteinander. Betrachtet man die durchschnittlichen Ratioerhöhungen der Astrocyten auf die drei nacheinander applizierten Stimuli ($0,39 \pm 0,04$, nachfolgend $0,22 \pm 0,04$, abschließend $0,15 \pm 0,03$) zeigte die statistische Auswertung dieser Daten hochsignifikant Abweichungen der Werte (Abbildung 28, B, a-c, dunkelgraue Balken, siehe Bildlegende). Abbildung 29 (B) zeigt ein Beispiel eines einzelnen Astrocyten der „repetitiv reaktiven Gruppe“ in Form des 340/380 nm Ratio Signals. An diesem Beispiel wird klar, dass eine dreimalige Antwort auf eine Superfusion von 2Me-SATP in einer konstanten Konzentration eine Desensibilisierung in Form eines deutlichen Rückgangs des Ratioanstiegs nicht ausschliesst.

Daher war der zweite Versuchsansatz mit längerem Regenerationsintervall für die Zellgruppe der Astrocyten in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen, ob eine 15minütige Pause zwischen den einzelnen Stimulationen zu prozentual mehr Astrocyten in der „repetitiv reaktiven Gruppe“ führen, zum anderen, ob sich die Mittelwerte der Fluoreszenz Ratio dieser Gruppe durch eine längere Erholungsphase zwischen den Stimulationen auf einem konstanten Niveau bewegen und somit eine klare Aussage über die Wiederholbarkeit der Antwort möglich ist. In die Analyse dieses Versuchsabschnittes wurden 124 Astrocyten, mit unten aufgeführter Gruppenverteilung von 46 dieser Gliazellen, übernommen

„Desensibilisierungsgruppe“ (16 der 46 Astrocyten (34,8 %)):

Die prozentuale Zugehörigkeit der Astrocyten zur „Desensibilisierungsgruppe“ reduzierte sich somit bei längerem Regenerationsintervall, verglichen mit dem Ersten Versuchsansatz um mehr als die Hälfte (76,8 % zu nun 34,8 %). Für diese 16 untersuchten Astrocyten erhöhte sich die 340/380 nm Fluoreszenz Ratio nach repetitiver Superfusion von 2Me-SATP um $0,27 \pm 0,03$ und nachfolgend $0,04 \pm 0,03$ (5 von 16 Zellen, entspricht 31,3 %). Auf die letzte Stimulation reagierte keiner der 16 Astrocyten dieser Gruppe (Abbildung 30, A, a-c, dunkelgraue Balken).

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (30 der 46 Astrocyten (65,2 %)):

65,2 % der Gliazellen astrocytären Ursprungs konnten aufgrund eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ auf eine dreimalige Applikation von 2Me-SATP der „repetitiv reaktiven Gruppe“ zugeordnet werden (Abbildung 30, B, a-c, dunkelgraue Balken). Im Vergleich zu den

Astrocyten der „repetitiv reaktiven Gruppe“ bei kürzerem Regenerationsintervall bedeutet das eine Steigerung um fast das dreifache. Dabei stieg die Fluoreszenz Ratio auf nachstehende Werte an: $0,29 \pm 0,04$, bzw. $0,23 \pm 0,03$ und $0,25 \pm 0,04$. Die statistische Auswertung dieser Daten zeigte keine signifikante Abweichung ($2P > 0,05$). Somit steht für die Zellgruppe der Astrocyten fest, dass ein längeres Regenerationsintervall zwischen zwei Applikationen von 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L sowohl zu einem prozentualen Anstieg an Zellen in der „repetitiv reaktiven Gruppe“ führt, als auch die erzielten Antworten keiner Desensibilisierung mehr unterliegen, sondern ein konstantes Niveau halten. Abbildung 31 (B) zeigt ein Beispiel eines einzelnen Astrocyten der „repetitiv reaktiven Gruppe“ in Form des 340/380 nm Ratio Signals.

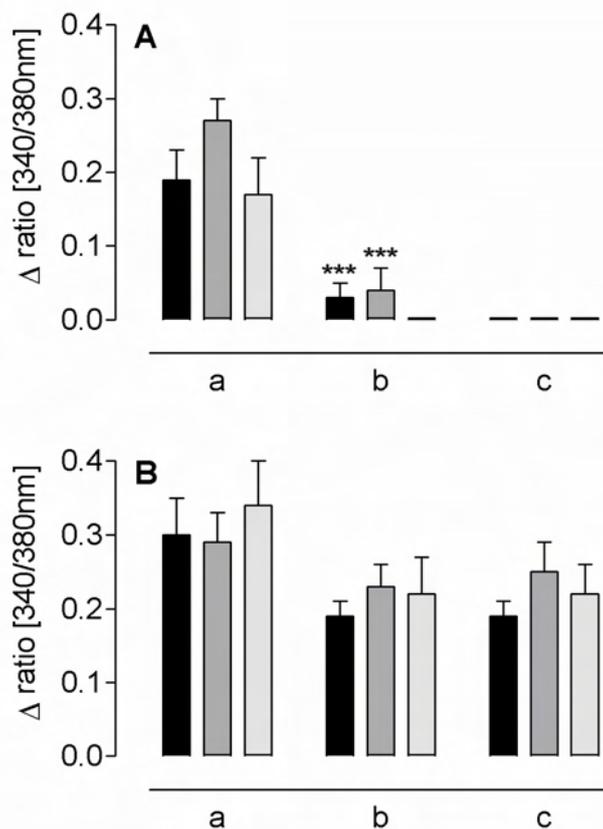


Abbildung 30: Repetitive Stimulation mit 2Me-SATP einer konstanten Konzentration (a – c = 10^{-6} M/L) und einem Regenerationsintervall von 15 Min zwischen zwei Stimulationen

- A:** „Desensibilisierungsgruppe“ – Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.
* kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhung von (b) verglichen mit (a) ($***2P \leq 0,001$).
- B:** „repetitiv reaktive Gruppe“ - Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.

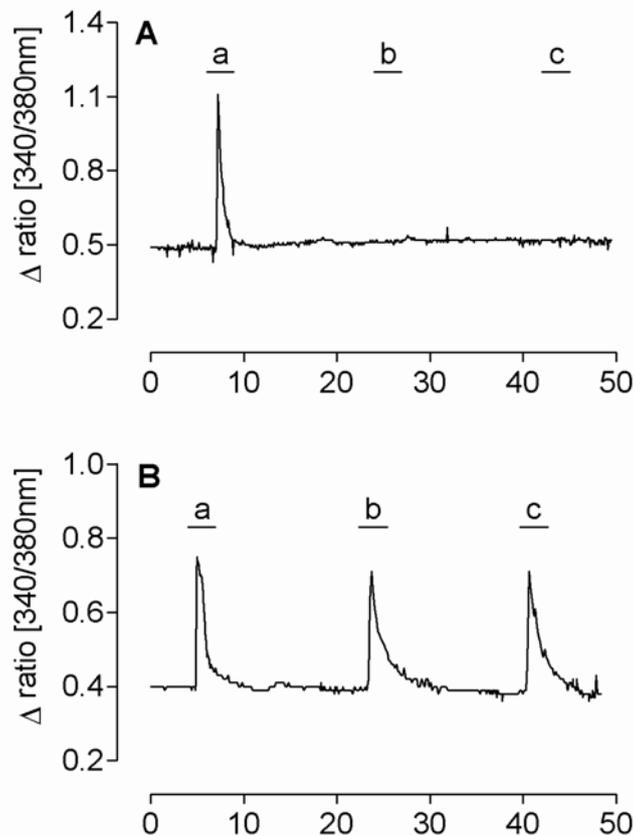


Abbildung 31: 340/380 nm Ratio Signal für Zellen der Primärzellkultur des MnPO nach repetitiver Stimulation mit 2Me-SATP in einer konstanten Konzentration (a-c 10^{-6} M/L) und einem Regenerationsintervall von 15 Min

- A:** „Desensibilisierungsgruppe“ – 340/380 nm Ratio Signal für einen einzelnen Oligodendrocyten
B: „repetitiv reaktive Gruppe“ – 340/380 nm Ratio Signal für einen einzelnen Astrocyten

Die Gruppe der Oligodendrocyten nimmt, für den ersten Versuchsansatz mit Messpuffersuperfusionen von 8 Min zwischen den Stimulationen mit 2Me-SATP, spezifisch für die Population der repetitiv reaktiven Zellen, eine Art Zwischenstellung zwischen den Astrocyten und den Neuronen ein, die nachfolgend erläutert wird. 22 (62,9 %) von 35 analysierten Oligodendrocyten konnten in eine der beiden determinierten Gruppen eingeordnet werden.

„Desensibilisierungsgruppe“ (8 der 22 Oligodendrocyten (36,4 %)):

Auf die erste Applikation von 2Me-SATP reagierten diese 8 Zellen mit einem durchschnittlichen Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,25 \pm 0,05$. Im Gegensatz zu den Neuronen und Astrocyten dieser Gruppe, reagierten die Oligodendrocyten jedoch nicht mehr auf einen zweiten und dritten Stimulus. (Abbildung 28, A, a-c, hellgraue Balken).

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (14 der 22 Oligodendrocyten (63,6 %)):

Ähnlich wie bei der Zellgruppe der Neurone waren prozentual mehr Oligodendrocyten aufgrund ihres wiederholbaren Anstiegs der Fluoreszenz Ratio auf einen wiederkehrenden Stimulus mit 2Me-SATP in der Gruppe der „repetitiv reaktiven Zellen“ zu finden. Jedoch bewegen sich die Mittelwerte der Fluoreszenz Ratio dieser Gruppe auf einem ähnlich inkonstanten Niveau wie die Werte der Astrocyten ($0,43 \pm 0,06$, anschließend $0,27 \pm 0,05$ und letztendlich $0,26 \pm 0,06$; vergleiche Abbildung 28, B, a-c, hellgraue Balken (Oligodendrocyten) und dunkelgraue Balken (Astrocyten)).

Auch bei dieser Zellgruppe lag das Ziel des zweiten Versuchsansatzes mit längerer Regenerationsphase darin, ein durchweg konstantes Niveau der Ratiowerte für die Gruppe der „repetitiv reaktiven Zellen“ zu erzielen, somit eine Wiederholbarkeit der Antwort belegen zu können und damit eine akzeptable Dauer des Regenerationsintervalles zwischen den Stimulationen für weiterführende Untersuchungen definiert zu haben. 12 (63,2 %) von 19 Oligodendrocyten konnten in eine der beiden Kategorien gruppiert werden.

„Desensibilisierungsgruppe“ (3 der 12 Oligodendrocyten (25,0 %)):

Auf die erste Applikation von 2Me-SATP reagierten diese 3 Zellen mit einem durchschnittlichen Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio von $0,17 \pm 0,05$. Wie auch schon in der „Desensibilisierungsgruppe“ mit nur 8minütigem Regenerationsintervall reagierten diese drei Zellen nicht mehr auf einen zweiten und dritten Stimulus (Abbildung 30, A, a-c, hellgraue Balken).

„Repetitiv reaktive Gruppe“ (9 der 12 Oligodendrocyten (75,0 %)):

Ähnlich der Zellpopulation der Neurone, änderte sich das Verhalten der Oligodendrocyten aufgrund eines längeren Regenerationsintervalles, zumindest bezogen auf den prozentualen Anteil der 3fach responsiven Zellen, nur marginal, jedoch im Gegensatz zu den Neuronen definitiv positiv hinsichtlich eines Zuwachses an Zellen in der repetitiv reaktiven Gruppe (nun 75,0 % im Vergleich zu 63,6 % bei 8minütiger Messpuffersuperfusion). Wie auch in der Zellgruppe der Astrocyten gelang es einen dreimalig relativ konstanten Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio zu erheben ($0,34 \pm 0,06$, sowie $0,22 \pm 0,05$ und $0,22 \pm 0,06$), siehe Abbildung 30, B, a-c, hellgraue Balken). Die statistische Auswertung der Daten zeigte nun keine signifikanten Abweichungen ($2P > 0,05$)

Ein längeres Regenerationsintervall wirkt sich somit deutlich positiv auf die Reproduzierbarkeit des Antwortverhaltens der Astrocyten und auch der Oligodendrocyten auf eine repetitive Superfusion von 2Me-SATP in einer konstanten

Konzentration aus. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Intervalle zwischen den Stimulationen bei nachfolgenden Versuchsreihen mit Antagonisten oder Calciumminimalpuffer entsprechend groß gewählt. Durch diese Maßnahme konnte davon ausgegangen werden, dass eine signifikant niedrigere Ratioänderung der Zellen durch die Wirkung des zusätzlich applizierten Blockers oder durch den Pufferwechsel zustande kommt.

3.2.6. Herkunft des Calciums nach Stimulation mit 2Me-SATP

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass 2Me-SATP in den allen Zelltypen der Primärkultur des MnPO eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bewirkte, stellte sich nun die Frage, ob dieser Anstieg ausschließlich durch den Einstrom extrazellulärer Calciumionen oder auch aus einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern resultiert. Eine reine Beteiligung von Calciumionen aus dem extrazellulären Milieu würde die alleinige Expression ionotroper purinerge Rezeptoren in neuro-glialen Zellen MnPO-Parenchym stärken, und das Vorhandensein metabotroper purinerge Rezeptoren nahezu ausschließen. Das Versuchsprotokoll ist unter Kapitel 2.4.3.2.6 ausführlich beschrieben. 74 Neurone, 110 Astrocyten und 23 Oligodendrocyten wurden in diesem Experiment identifiziert und untersucht, basierend auf 7 getesteten Mikrokammern aus insgesamt 5 Zellpräparationen.

Von 74 identifizierten Neuronen reagierten 10 (13,5 %) auf die Zugabe von 2Me-SATP (10^{-6} M/L) mit einer Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio um durchschnittlich $0,23 \pm 0,04$ (Abb. 32, A, a, schwarzer Balken). Nach einer Zellregenerationsphase und Umstellung der Superfusion von calciumhaltigen auf einen calciumfreien, EGTA-haltigen Messpuffer, welcher, um einen kompletten Austausch zu gewährleisten, für drei Min ohne Substanzapplikation superfundiert wurde, erfolgte eine erneute Stimulation der Zellen mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) unter calciumfreien Bedingungen. Keines der 10 untersuchten Neurone reagierte auf diesen Stimulus mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio (Abb. 32, A, b, schwarzer Balken). Sofort nach Stimulationsende wurde die Messpuffersuperfusion von calciumfreien Messpuffer wieder auf calciumhaltigen umgestellt. Die dritte Applikation von 2Me-SATP (10^{-6} M/L) bewirkte wieder einen Ratioanstieg in allen 10 untersuchten Neuronen, der im Mittel bei $0,17 \pm 0,02$ lag. Abb. 32, B, zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Neurons nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) unter calciumhaltigen (a und c) bzw. calciumfreien Bedingungen (b). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ basiert für den

Zelltyp der Neurone also eindeutig auf einem Einstrom extrazellulärer Calciumionen ins Zytosol der Zelle.

23 von 110 untersuchten Astrocyten (20,9 %) reagierten auf die erste Stimulation mit 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ um durchschnittlich $0,3 \pm 0,03$ (Abb. 32, A, a, dunkelgrauer Balken). Auch bei der Zellgruppe der Astrocyten scheint die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ hauptsächlich von einem Einstrom extrazellulärer Calciumionen herzurühren. Jedoch scheint hier bei 9 Zellen (39,1 %) eine Herkunft aus intrazellulären Speichern wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu spielen (gemittelter Anstieg der Fluoreszenz Ratio aller 23 Astrocyten um durchschnittlich $0,07 \pm 0,03$, siehe Abb. 32, A, b, dunkelgrauer Balken) Die dritte Stimulation mit 2Me-SATP, nach wiederholtem Austausch von calciumfreien gegen calciumhaltigen Messpuffer bewirkte wieder einen Ratioanstieg bei allen 23 Astrocyten um $0,22 \pm 0,03$ (Abb.32, A, c, dunkelgrauer Balken). Welche mögliche Signaltransduktion eine Beteiligung intrazellulärer Calciumspeicher induziert, wird in der Diskussion erörtert. Die Ratioänderungen nach Stimulation mit 2Me-SATP bei Anwesenheit extrazellulären Calciums sind jedoch immer noch signifikant höher, als unter calciumfreien Bedingungen.

Von 23 untersuchten und identifizierten Oligodendrocyten in dieser Versuchsserie konnte bei 14 (60,9 %) ein Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio auf eine Superfusion von 2Me-SATP (10^{-6} M/L) um $0,39 \pm 0,04$ verzeichnet werden, der unter calciumfreien Bedingungen nur noch bei 2 (14,3 % und $0,02 \pm 0,02$ im Gesamtdurchschnitt) Oligodendrocyten reproduziert werden konnte Die dritte Stimulation mit 2Me-SATP, nach wiederholtem Wechsel von calciumfreien auf calciumhaltigen Messpuffer bewirkte wieder einen Ratioanstieg bei allen 14 Oligodendrocyten um $0,23 \pm 0,04$ (Abb. 32, A, a-c, hellgraue Balken). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ basiert für die Oligodendrocyten fast ausschließlich auf einem Einstrom extrazellulären Calciums ins Zytosol der Zelle. Die Beteiligung intrazellulärer Calciumspeicher ist von untergeordneter Bedeutung.

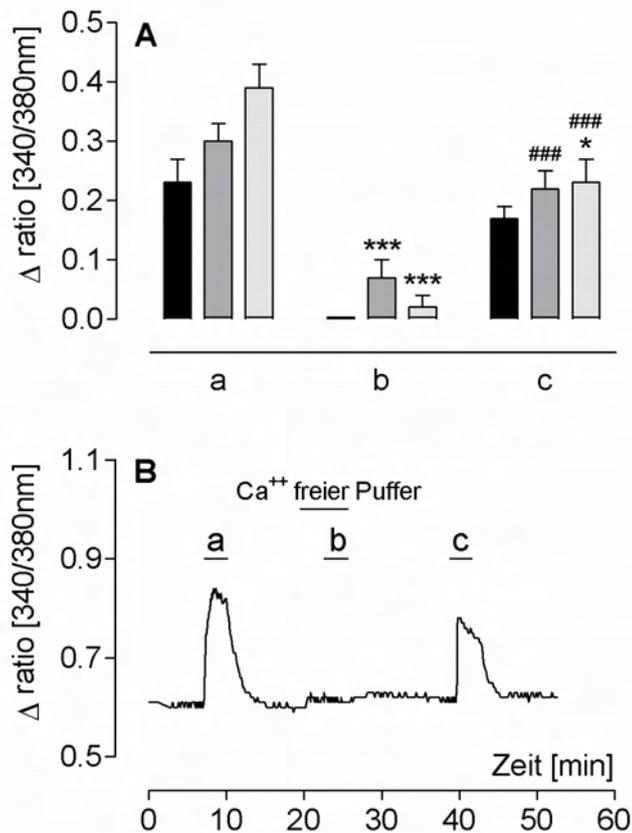


Abbildung 32: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L, a-c) bei Präsenz und Abwesenheit extrazellulärer Calciumionen

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-6} M/L ((a) und (c) in Anwesenheit von Calciumionen, (b) unter calciumfreien Bedingungen). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.
* kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) ($^{***}2P \leq 0,001$) bzw. von (c) verglichen mit (a) ($^{*}2P \leq 0,05$). $^{###}$ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (c) verglichen mit (b) ($^{###}2P \leq 0,001$).
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Neurons nach Stimulation mit 2Me-SATP bei An- und Abwesenheit extrazellulären Calciums

3.2.7. Reaktionsmuster der durch Applikation von 2Me-SATP induzierten Calciumsignale in den Zelltypen der Primärkultur des MnPO

Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels konnte in den vorangegangenen Versuchsserien nach Applikation von 2Me-SATP in allen drei Zelltypen der Primärkultur des MnPO nachgewiesen werden. Die durch 2Me-SATP induzierten Erhöhungen der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio konnten in drei wesentliche Muster

eingeteilt werden (Abb. 33, B). In die prozentuale Auswertung dieser Studie (Abb. 33, A) wurden nur die Signale der Zellen auf eine Stimulation mit 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L einbezogen. Erfolgte eine repetitive Applikation von 2Me-SATP in der oben genannten Konzentration, so wurde nur die Reaktion auf den ersten Stimulus ausgewertet. Insgesamt wurde bei 106 Neurone, 414 Astrocyten und 98 Oligodendrocyten der Typ der Ratioänderung beurteilt.

Typ A (Abb. 33, B, grün) ist gekennzeichnet durch einen raschen, spikeförmigen Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ erfolgte innerhalb weniger Sec auf den Maximalwert, die Abnahme der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bis auf den Basalwert fand innerhalb den ersten zwei Min nach Stimulation statt. So ist für diesen Typ des Antwortverhaltens ein Anstieg und Abfall der Fluoreszenz Ratio noch während der dreiminütigen Superfusion charakteristisch. Dieses Reaktionsmuster zeigte sich bei 29 (27,4 %) der untersuchten Neurone, 327 (79 %) Astrocyten und 44 (44,9 %) Oligodendrocyten (Abb. 33, A, a).

Typ B zeichnet sich ebenso wie Typ A durch einen raschen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ innerhalb von Sec mit nachfolgenden kleinen Oszillationen auf hohem Ratio-Niveau aus. Der Abfall der Fluoreszenz Ratio auf den Basalwert erfolgt erst nach beendeter Stimulation. Dieser Typ der Ratioänderung wurde bei 71 (67 %) der untersuchten Neurone, bei 3 (0,7 %) Astrocyten und bei 10 (10,2 %) Oligodendrocyten nachgewiesen (Abb. 33, A, b).

Typ C: Charakteristisch für dieses Profil ist ein biphasisches Reaktionsmuster, das bei 6 (5,7 %) Neuronen, 84 (20,3 %) Astrocyten und 44 (44,9 %) Oligodendrocyten beobachtet werden konnte (Abb 33, A, c). Die erste Phase ist durch einen sprunghaften Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio gekennzeichnet, die (ähnlich wie bei Typ A) innerhalb den ersten zwei Min abfällt. Der Abfall der Ratioänderung erfolgt jedoch im Unterschied zu Typ A nicht bis auf das Basalniveau, sondern nur etwa auf 50 - 60 % des Maximalwertes. Es schließt sich eine zweite Phase an, die sich in einem Plateau von etwa dreiminütiger Dauer mit anschließendem Abfall auf den Basalwert äußert. (Abb 33, B, c). Auch bei diesem Reaktionsmuster erreichen die Ratioänderungen der Zellen erst ca. zwei Min nach beendeter Superfusion von 2Me-SATP wieder ursprüngliche Basalwerte. Die unterschiedlichen Reaktionsmuster, vor allem Typ B und C deuten sowohl auf eine Aktivierung mehrerer Rezeptorsubtypen, als auch auf die mögliche Beteiligung intrazellulärer Calciumspeicher hin, worauf genauer in der Diskussion eingegangen wird.

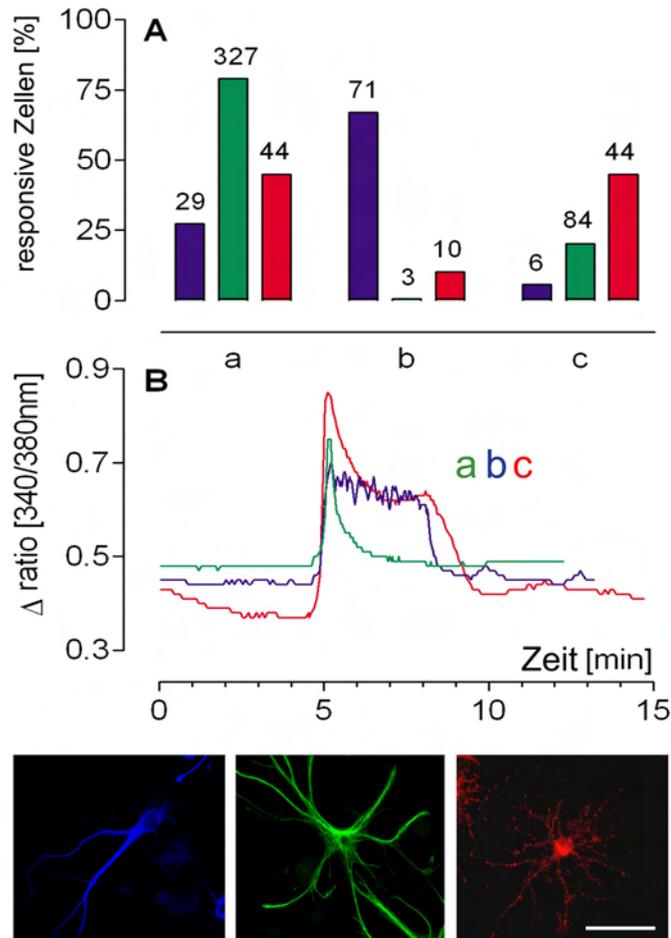


Abbildung 33: Reaktionsmuster der durch 2Me-SATP (10^{-6} M/L) induzierten Calciumsignale in den Zelltypen der Primärkultur des MnPO

- A:** Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der Reaktionsmuster eingeteilt nach Typ A-C (als Beschriftung der Abszisse; a-c). Blaue Balken: Neurone; grüne Balken: Astrocyten; rote Balken: Oligodendrocyten
- B:** Reaktionsmuster der Ratioänderungen; grün: Typ A – spikeförmige Reaktion; blau: Typ B – rascher Anstieg mit Oszillationen; rot: Typ C – biphasischer Typ mit raschem Anstieg und Plateauphase

Untere Reihe links: Neuron (blau)
 mitte: Astrocyt (grün)
 rechts: Oligodendrocyt (rot) Der Eichbalken entspricht 25µm

3.2.8. Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch PPADS

In einem weiteren Schritt wurde untersucht ob PPADS die durch 2Me-SATP vermittelte Änderung des $[Ca^{2+}]_{iz}$ unterdrücken kann und ob es sich dabei um einen reversiblen Prozess handelt. Die Stimulation mit 2Me-SATP erfolgte als Superfusion in einer Konzentration von 10^{-7} M/L (siehe Kapitel 2.4.3.2.7), wobei der Antagonist in einem ersten Versuchsansatz in einer Konzentration von 10^{-5} M/L appliziert wurde. In die

Auswertung kamen letztendlich nur die Zellen, die auch auf den abschließenden Stimulus mit 2Me-SATP reagiert hatten. Zunächst werden die Ergebnisse dargestellt, in der die Konzentration des Antagonisten 10^{-5} M/L betrug. Für alle noch folgenden Versuchsreihen mit Antagonisten werden die durchschnittlichen Änderungen der Fluoreszenz Ratio aus Übersichtsgründen nur noch tabellarisch aufgeführt. Insgesamt wurden in dieser Versuchsserie 183 Neurone, 240 Astrocyten und 48 Oligodendrocyten untersucht, welche aus 8 Zellpräparationen und Analysen von 20 Mikrokammern stammen.

Von den 183 indentifizierten Neuronen reagierten 24 (13,1 %) mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf die erste Applikation von 2Me-SATP (alle Werte als Mittelwert \pm S.E.M siehe Tabelle 3; sowie Abb. 34, A, a-c, schwarze Balken). Auf die folgende dreiminütige Superfusion von PPADS *per se* reagierte keine der untersuchten Zellen mit einer messbaren Änderung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio. Dies gilt für alle drei Zelltypen. Die anschließende Applikation von PPADS und 2Me-SATP gemeinsam bewirkte eine komplette Blockade der durch 2Me-SATP induzierbaren Ratioerhöhung in 50 % (12 Zellen) der untersuchten Neurone. Die anderen 50 % reagierten unter dem applizierten Blocker dennoch auf eine Stimulation mit 2Me-SATP, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Ratioerhöhung (Abb. 34, A, b, schwarzer Balken, arithmetischer Mittelwert aller 12 Neurone, inklusive 12 Nullwerten). Auf die abschließende Agonistensuperfusion erwiesen sich erneut alle 24 Nuerone als responsiv. Abb. 34, B zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Neurons nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) (a und c, 2Me-SATP *per se*) bzw. bei zusätzlicher Applikation von PPADS (b).

Tabelle 3: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. PPADS (10^{-5} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

	1. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	2. Stimulation PPADS (10^{-5} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	3. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,21 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02
Astrozyten	0,22 \pm 0,03	0	0,14 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,37 \pm 0,06	0	0,23 \pm 0,04

20 (8,3 %) der untersuchten Astrocyten zeigten auf die erste Superfusion von 2Me-SATP eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Nach einer Rezeptorblockade durch PPADS mit nachfolgender Stimulation der Astrocyten durch eine erneute Applikation von 2Me-SATP konnte bei keinem der 20 untersuchten Astrocyten daraufhin eine messbare Ratioerhöhung registriert werden. PPADS in einer Konzentration von 10^{-5} M/L war somit in der Lage in 100 % der Astrocyten eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio auf einen Stimulus mit 2Me-SATP in einer Konzentration von 10^{-7} M/L zu unterdrücken. Alle 20 Astrocyten verhielten sich auf den abschließenden Stimulus analog zur ersten Applikation, mit keiner statistisch signifikanten Änderung, d.h. $2P > 0,05$ (Ratioänderung aller Stimulationen siehe Abb. 34, A, a-c, dunkelgrauer Balken).

Ein ähnliches Bild stellt sich für die untersuchten und identifizierten Oligodendrocyten dar. 10 (20,8 %) der analysierten 48 Zellen reagierten auf den ersten Stimulus mit 2Me-SATP mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Wie auch bei den Astrocyten, war auf eine gleichzeitige Superfusion von PPADS und 2Me-SATP kein Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio zu verzeichnen. Somit blockierte PPADS in einer Konzentration von 10^{-5} M/L den durch 2Me-SATP (10^{-7} M/L) induzierbaren Einstrom von Calciumionen ins Zytosol der Zelle auch hier vollständig. Auf eine dritte Superfusion von 2Me-SATP war wieder bei allen 10 Zellen ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz Ratio zu ermitteln. Auch hier trat kein statistisch signifikanter Unterschied zur ersten Stimulation auf ($2P > 0,05$). Die durchschnittlichen Werte der Ratioänderungen für die erste und dritte Applikation von 2Me-SATP finden sich ebenso wie für die der Neurone und Astrocyten in Tabelle 3. Eine graphische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M befindet sich in Abb. 34 unter A als hellgraue Balken.

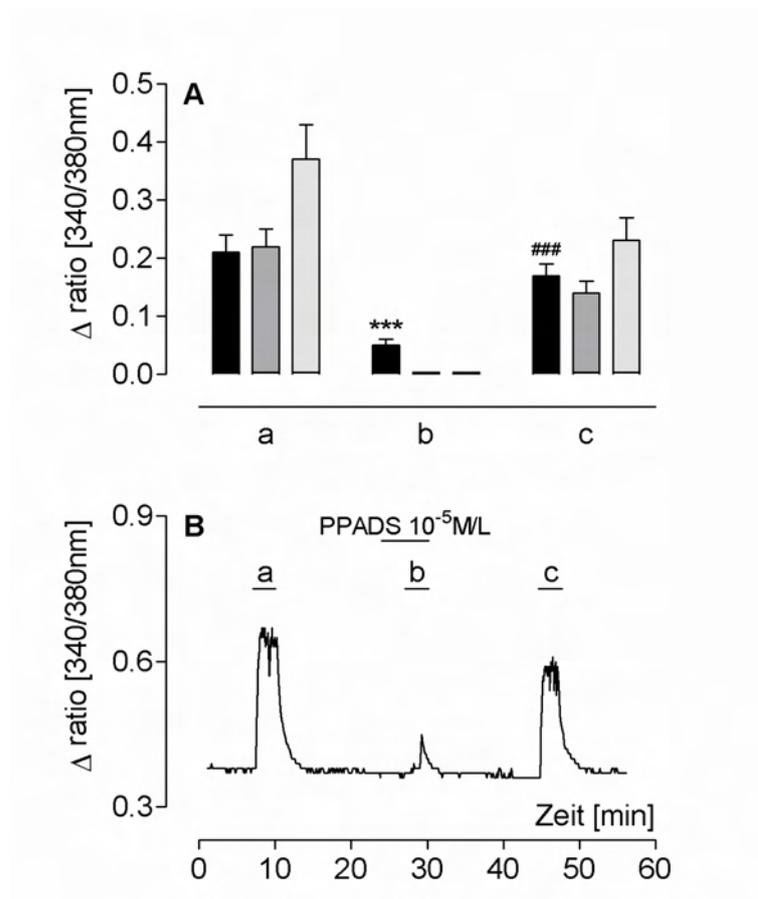


Abbildung 34: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und PPADS (10^{-5} M/L)

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und PPADS (b) Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt. */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,001$) bzw. von (c) verglichen mit (b) (### $2P \leq 0,001$)
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Neurons nach Stimulation mit 2Me-SATP ((a) – (c)) und PPADS (zusammen mit (b))

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Konzentration des Antagonisten um eine Zehnerpotenz herabgesetzt, um zu untersuchen wie sich eine niedrigere Konzentration des Inhibitors auf das Reaktionsvermögen der Zellen auswirkt.

In die Endauswertung der Superfusionsstudien mit dem Antagonisten PPADS in einer Konzentration von 10^{-6} M/L flossen insgesamt 80 Neurone, 55 Astrocyten und 1 Oligodendrocyt aus 2 Präparationen und 3 analysierten Mikrokammern ein.

8 (10 %) der insgesamt 80 Neurone reagierten mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf die erste Applikation von 2Me-SATP. Die anschließende Applikation von PPADS und 2Me-SATP gemeinsam bewirkte eine komplette Blockade der durch 2Me-SATP

induzierbaren Ratioerhöhung bei nur einem der 8 Neurone (12,5 %). Die restlichen 87,5 % reagierten unter dem applizierten Blocker dennoch auf eine Stimulation mit 2Me-SATP. Der gemittelte Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio für alle 8 Neurone war zwar geringer als der für die erste Stimulation errechnete Wert jedoch unterschieden sich die erhobenen Daten nicht so deutlich wie im vorangegangenen Versuchsabschnitt (PPADS 10^{-5} M/L). Eine abschließende Stimulation mit 2Me-SATP löst erneut Zellreaktionen in Form eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ bei allen 8 Neurone aus. Die durchschnittlichen Ratioänderungen, als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M, für alle untersuchten Zelltypen der Primärkultur des MnPO für diesen zweiten Versuchsansatz finden sich in Tabelle 4. Eine Grafik der arithmetischen Mittelwerte \pm S.E.M der Neurone befindet sich in Abb. 35 unter A als schwarze Balken.

Vergleicht man nun die untersuchten Neurone aus der oben beschriebenen ersten Studie, in der PPADS 10^{-5} M/L appliziert wurde, mit dieser (PPADS 10^{-6} M/L) so unterscheiden sich diese deutliche voneinander. Prozentual ließen sich mit der höheren Konzentration viermal mehr Neurone komplett in ihrer Reaktivität auf einen gleichzeitigen Stimulus mit dem ATP-Derivat hin inhibieren. Zusätzlich liegen die ermittelten Werte der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio für die niedrigere Konzentration von PPADS auf etwa einem Niveau, wohingegen sich die einzelnen Stimulationen in der Versuchsreihe mit der höheren Antagonistenkonzentration stark signifikant voneinander unterscheiden. Daraus folgt, dass PPADS in einer Konzentration von 10^{-6} M/L in Bezug auf die Neurone und die Methodik der Ratio-Imaging-Technik kaum eine bis keine inhibitorische Funktion mehr ausüben kann.

Tabelle 4: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. PPADS (10^{-6} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

	1. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	2. Stimulation PPADS (10^{-6} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	3. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,18 \pm 0,04	0,11 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02
Astrozyten	0,35 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	0,27 \pm 0,03
Oligodendrozyten	0,28	0	0,16

Für den Zelltyp der Astrocyten, stellen sich die erhobenen Daten etwas anders da. 18 (32,7 %) der untersuchten Astrocyten zeigten auf die erste Superfusion von 2Me-SATP eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Eine Superfusion von PPADS und 2Me-SATP induzierte noch in 12 (33,3 %) Astrocyten einen Anstieg der Fluoreszenz Ratio, jedoch mit einer vergleichsweise niedrigeren Amplitude, als unter alleiniger Superfusion von 2Me-SATP. Somit führte PPADS in einer Konzentration von 10^{-6} M/L nur bei 66,6 % der untersuchten Zellen zu einer vollständigen Blockade purinerner Rezeptoren. Im Vergleich mit der vorherigen Versuchsreihe sind das ein Drittel weniger. Alle 18 Astrocyten reagierten auch auf den abschließenden, dritten Stimulus, wieder mit einem Amplitudendurchschnitt, deren Werte vergleichbar mit denen des ersten Stimulus sind und in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zeigen ($2P > 0,05$). Abb. 35, A, a-c, dunkelgraue Balken stellt die Mittelwerte \pm S.E.M der Astrocytenreaktionen auf oben beschriebene Stimuli dar. Abb. 35, B zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) (a und c, 2Me-SATP *per se*) bzw. bei zusätzlicher Applikation von PPADS (10^{-6} M/L) (b).

Vom Zelltyp der Oligodendrocyten floss nur eine Zelle in die Auswertung dieser Versuchsreihe ein. Die entsprechenden Daten finden sich in Tabelle 4 sowie in Abb. 35, A, a-c als hellgraue Balken dargestellt. Diese Zelle reagiert unter Superfusion von PPADS und 2Me-SATP nicht mit einer Erhöhung der Fluoreszenz Ratio. Weitere vergleichende Aussagen zwischen dieser und der vorherigen Studie wären, aufgrund dieser Singularität des Ergebnisses rein spekulativ.

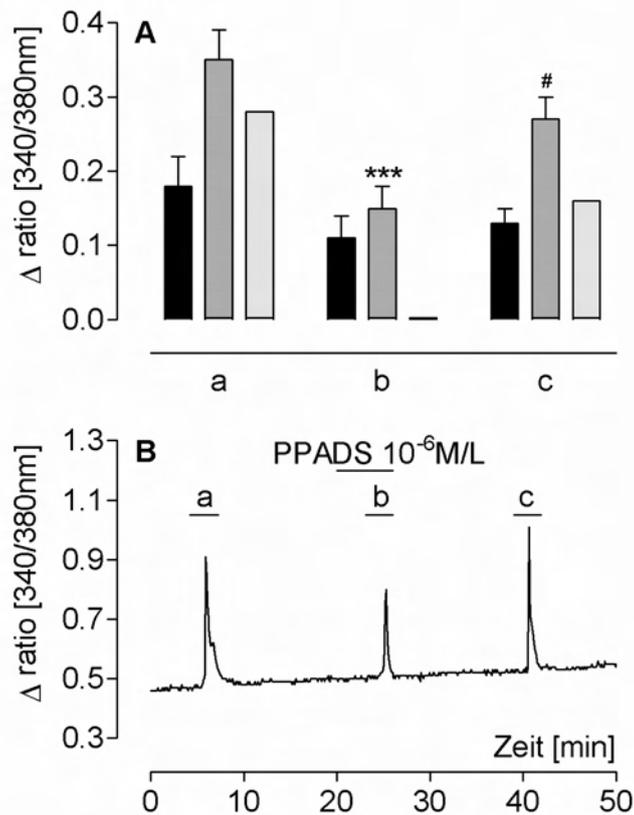


Abbildung 35: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und PPADS (10^{-6} M/L)

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und PPADS 10^{-6} M/L (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt. */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) (***) bzw. von (c) verglichen mit (b) (#).
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP ((a) – (c)) und PPADS (zusammen mit (b)).

3.2.9. Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch den P2X₁ und P2X₃ sowie den P2X_{2/3} spezifischen Antagonisten TNP-ATP

In einer weiteren Versuchsserie wurde untersucht welchen inhibitorischen Einfluss der Antagonist TNP-ATP auf die einzelnen Zelltypen der Primärkultur des MnPO unter einer Superfusion von 2Me-SATP hat und ob die Effekte ebenfalls reversibel sind. Die Spezifität von TNP-ATP für die purinergen Rezeptoren vom Subtyp P2X₁, P2X₃ und P2X_{2/3} erklärt sich anhand der niedrigen IC₅₀ Konzentration an eben diesen Subtypen, die für andere homo- oder heteromere P2X-Rezeptoren wesentlich höher liegt (siehe Kapitel 4). Für diese Versuchsreihe wurden drei verschiedene Ansätze gewählt, in denen der Antagonist in drei verschiedenen Konzentrationen (10⁻⁵ M/L, 10⁻⁶ M/L und 10⁻⁷ M/L) appliziert wurde. Ziel dieser Studie war es zu eruieren, ob der Antagonist auch in niedrigen Konzentrationen noch inhibitorisch wirkt und welche Konsequenzen sich daraus für die funktionelle Charakterisierung der Rezeptorsubtypen, mit Fokus auf die drei oben erwähnten Mitglieder der P2X-Rezeptorfamilie, ergeben. Das Versuchsprotokoll ist in Kapitel 2.4.3.1.12 beschrieben.

Das unter Superfusion von TNP-ATP durch 2Me-SATP induzierte Fluoreszenz Ratio Signal wurde in dieser Versuchsreihe genauer betrachtet, um die Reaktionen der Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antagonisten exakter vergleichen zu können. Hierfür wurden die untersuchten Zellen in *zwei Gruppen* eingeteilt:

(1) „stark geblockte Zellen“ und (2) „schwach geblockte Zellen“.

Ad (1): Eine Zelle wurde dann als „stark geblockt“ definiert, wenn sich die Ratioänderung auf eine Stimulation mit 2Me-SATP unter Superfusion von TNP-ATP um mehr als 50 % im Vergleich zur ersten Applikation von 2Me-SATP *per se* unterschied.

Ad (2): Im Gegensatz dazu galt eine Zelle als „schwach geblockt“ wenn die Erhöhung der Fluoreszenz Ratio auf eine Applikation von 2Me-SATP unter Superfusion von TNP-ATP im Vergleich zur ersten Applikation von 2Me-SATP alleine mehr als 50 % des ursprünglichen Niveaus erreichte. Somit wurden auch alle Zellen auf die die antagonistisch wirkende Substanz keinerlei Einfluss ausüben konnte der Kategorie „schwach geblockt“ zugeordnet.

Reagierte eine Zelle beispielsweise auf die erste Superfusion von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ von 0,3 und unter Applikation der inhibitorischen Substanz nur noch mit einer Ratioänderung von 0,1, so erreichte diese Zelle nur noch 33,3 % des ursprünglichen Niveaus und galt damit als „stark geblockt“.

Im ersten Versuchsansatz mit einer Antagonistenkonzentration von 10^{-5} M/L wurden insgesamt 180 Neurone, 233 Astrocyten und 44 Oligodendrocyten in 23 Mikrokammern gemessen, resultierend aus 11 Zellpräparationen. Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Neurone aus allen 3 Versuchseinsätzen aufgeführt. 20 (11,1 %) der untersuchten 180 Neurone zeigten auf die erste Stimulation mit 2Me-SATP einen Anstieg der Fluoreszenz Ratio. Eine Applikation von TNP-ATP *per se* hatte keine Auswirkung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit die Fluoreszenz Ratio. Auf die direkt im Anschluß folgende gemeinsame Superfusion von TNP-ATP und 2Me-SATP reagierten noch 13 (65 %) der 20 Neurone mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Nach einer 15minütigen Auswaschphase erfolgte wieder eine Stimulation mit 2Me-SATP, auf die wieder alle 20 Neurone mit einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz Ratio reagierten.

Basierend auf der oben beschriebenen Gruppeneinteilung konnten 50% der untersuchten Neurone als stark geblockt verifiziert werden, da sie in ihrer Reaktion auf den applizierten Stimulus entweder komplett (7 von 10 = 70 %), oder prozentual um über 50 % (3 von 10) gehemmt werden konnten. Die anderen 50 % (10 Neurone) wurden der Kategorie „schwach geblockt“ zugeordnet (Abb. 40, A, 10^{-5} M/L). Ihre Ratioänderung unter Superfusion des Blockers lag bei mindestens 50 % des ursprünglichen Wertes. In Tabelle 5 befinden sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Neurone. Diese Gesamtpopulation spiegelt die durchschnittlichen Ratioänderung der untersuchten Neurone, ohne Einteilung in eine der beiden Kategorien wider. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 36, A-C, a-c, schwarze Balken). Im Gegensatz zur Gruppe der stark geblockten Neurone waren in der Kategorie der schwach geblockten Neurone statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen zu ermitteln ($2P > 0,05$), somit gibt es in der Primärzellkultur des MnPO sowohl TNP-ATP sensitive, als auch nicht sensitive Neurone, bezogen auf eine Antagonistenkonzentration von 10^{-5} M/L.

Das Verhältnis der stark geblockten Neurone im Vergleich zu den schwach geblockten verschob sich bei einer Antagonistenkonzentration von 10^{-6} M/L (250 identifizierte Neurone, 215 Astrocyten und 34 Oligodendrocyten aus 7 Zellpräparationen, gemessen in 13 Mikrokammern) leicht zugunsten der schwach geblockten Neurone. Während im ersten Versuchsansatz (TNP-ATP 10^{-5} M/L) das Verhältnis mit jeweils 50 % in einer Gruppe noch ausgeglichen war, so konnten im zweiten Versuchsansatz (TNP-ATP 10^{-6} M/L) nur noch 44,4 % der Neurone zu der Gruppe der stark geblockten Zellen gezählt

werden (Abb. 40, A, 10^{-6} M/L). 18 Neurone (7,2 %) reagierten auf eine Applikation von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. 8 Neurone konnten der Gruppe der stark geblockten Zellen zugeordnet werden. Von diesen 8 Neuronen reagierten 5 (62,5 %) gar nicht mit einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio nach Applikation von 2Me-SATP unter Superfusion von TNP-ATP. Der Ratioanstieg der anderen drei Neurone dieser Gruppe erreichte mit durchschnittlich $0,06 \pm 0,03$ nur noch 46,2 % des ursprünglichen Niveaus. Für die 10 Neurone (55,6 %) der Gruppe der schwach geblockten Neurone zeigte die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede ($2P > 0,05$) (Abb. 37, B, a-c schwarze Balken). In Tabelle 6 sind sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Neurone aufgelistet. Der erzielte Wert unter Superfusion von TNP-ATP ist immer der gemittelte Anstieg der Fluoreszenz Ratio aller Zellen dieser Kategorie. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse, inklusive statistisch signifikanter Unterschiede, in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 37, A-C, a-c, schwarze Balken). Die statistische Auswertung für die Gesamtpopulation der untersuchten Neurone ist aufgrund der erhöhten Anzahl schwach geblockter Zellen nicht mehr ganz so eindeutig, wie im ersten Versuchsansatz (TNP-ATP 10^{-5} M/L), was die Bedeutung der vorgenommenen Gruppeneinteilung unterstreicht.

Im dritten Versuchsansatz wurde die Konzentration des Antagonisten gleich der des Agonisten gesetzt. Hier zeigten sich nun deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen der stark und schwach geblockten Neurone. Von 77 untersuchten Zellen (neben weiteren 70 Astrocyten und 38 Oligodendrocyten aus 4 Zellpräparationen und Messungen an 6 Mikrokammern) reagierten 19 (22,1 %) auf die erste Applikation von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Lediglich 2 Neurone (10,5 %) konnten zur Gruppe der stark geblockten Zellen gezählt werden. 17 Neurone (89,5 %) wurden in die Gruppe der schwach geblockten Neurone integriert (Abb. 40, A, 10^{-7} M/L). Wie schon in den vorangegangenen Versuchsansätzen (TNP-ATP 10^{-6} M/L und 10^{-5} M/L) gab es in dieser Gruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen ($2P > 0,05$) (Abb. 38, B, a-c, schwarze Balken). Die 2 stark geblockten Neurone nehmen auf das Ergebnis der Gesamtpopulation der untersuchten Neurone (Abb. 38, C, a-c, schwarze Balken) kaum einen Einfluss. Wäre hier keine Einteilung in stark und schwach geblockte Zellen vorgenommen worden, wäre ein Einfluss von TNP-ATP nicht zu erkennen gewesen. Die durchschnittlichen Änderungen der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Neurone als

arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. sind in Tabelle 7 erfasst. Die Interpretation dieser Ergebnisse, im Hinblick auf die funktionelle Expression ionotroper purinerge Rezeptorsubtypen, folgt in Kapitel 4.

Tabelle 5: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrozyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. TNP-ATP (10^{-5} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

STARK	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-5} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,28 \pm 0,05	0,05 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04
Astrozyten	0,27 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,30 \pm 0,03	0	0,24 \pm 0,04
SCHWACH	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-5} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,25 \pm 0,07	0,19 \pm 0,05	0,22 \pm 0,06
Astrozyten	0,23 \pm 0,05	0,19 \pm 0,05	0,20 \pm 0,05
Oligodendrozyten	0	0	0
GESAMT	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-5} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,26 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03
Astrozyten	0,27 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,30 \pm 0,03	0	0,24 \pm 0,04

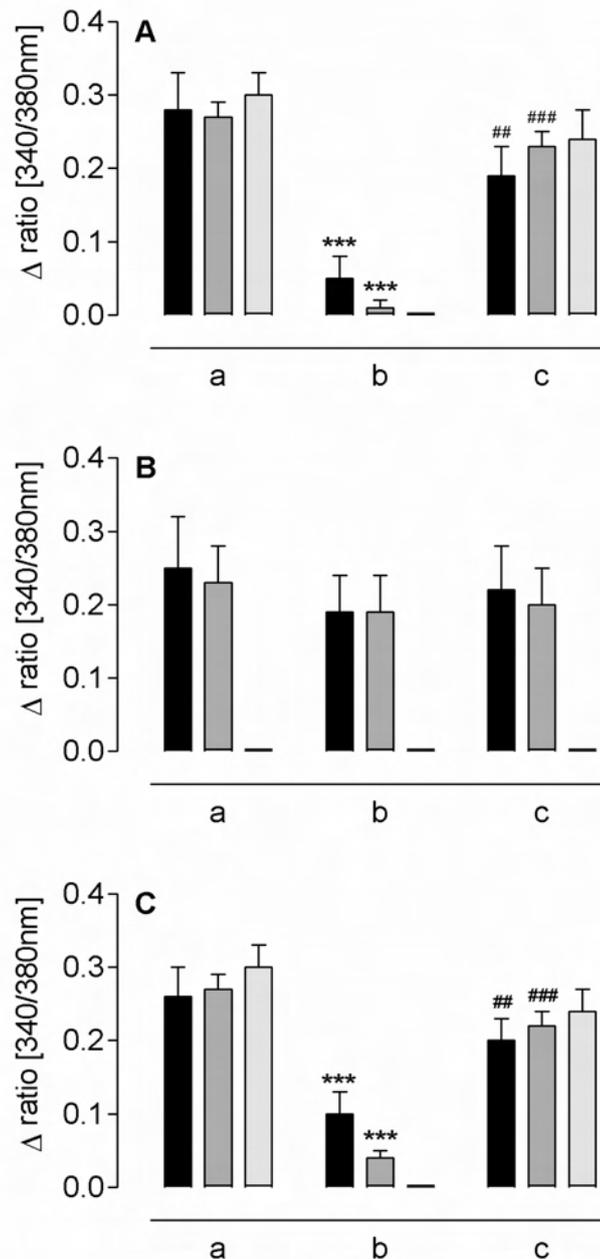


Abbildung 36: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und TNP-ATP (10^{-5} M/L)

Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und TNP-ATP 10^{-5} M/L (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

- A:** Stark geblockten Zellen: */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) (***) $2P \leq 0,001$) bzw. von (c) verglichen mit (b) (### $2P \leq 0,001$, ## $2P \leq 0,01$).
- B:** Schwach geblockten Zellen: Die statistische Auswertung zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationen ($2P > 0,05$)
- C:** Gesamtpopulation (stark und schwach geblockt): */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen (entspricht Legende unter A).

Die Reaktivität der untersuchten Astrocyten stellt sich wie folgt dar. Analog zu den Neuronen wurde auch hier die Einteilung in stark und schwach geblockte Zellen beibehalten. Im ersten Versuchsansatz wurde TNP-ATP in einer Konzentration von 10^{-5} M/L superfundiert. Auf die erste Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) reagierten 56 von 233 untersuchten Astrocyten (24 %) mit einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio. Nach Superfusion von TNP-ATP und 2Me-SATP konnte bei 42 Zellen (75 % der Gesamtpopulation bzw. 87,5 % der Zellen der Gruppe „stark geblockt“) keine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ ermittelt werden. Sie wurden klar in die Gruppe der stark geblockten Zellen eingeordnet. Weitere 6 Astrocyten reagierten zwar auf die Applikation von 2Me-SATP unter Superfusion des Blockers, jedoch erreichten diese 6 Astrocyten mit einer durchschnittlichen Ratioerhöhung von $0,11 \pm 0,04$ nur 40 % des Niveaus der durchschnittlichen Ratioerhöhung der ersten Stimulation. Daher wurden diese 6 Astrocyten ebenfalls die Gruppe „stark geblockte Zellen“ zugewiesen. Abb. 39, A zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten aus der Gruppe „stark geblockte Zellen“ nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) (a und c, 2Me-SATP *per se*) bzw. bei zusätzlicher Applikation von TNP-ATP (10^{-5} M/L) (b).

8 Astrocyten erreichten mit unter Superfusion des Blockers annähernd das Niveau der ersten Stimulation mit 2Me-SATP *per se*. Diese 8 Astrocyten bildeten damit die Gruppe der „schwach geblockten“ Zellen. Somit haben die stark geblockten Zellen einen Anteil von 85,7 % an der Gesamtpopulation, während die schwach geblockten Zellen mit 14,3 % deutlich in den Hintergrund treten (Abb. 40, B, 10^{-5} M/L). In Tabelle 5 befinden sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation (Definition siehe oben) der untersuchten Astrocyten. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 36, (A-C, a-c, dunkelgraue Balken).

Der Unterschied zwischen den untersuchten Astrocyten und den untersuchten Neuronen bezogen auf die Kategorisierung der ermittelten Reaktivitäten unter Superfusion einer hohen Antagonistenkonzentration ist enorm. Während nur 50 % der Neurone der Kategorie „stark geblockte Zellen“ zuzuordnen waren, lag der Anteil der Astrocyten bei 85,7 %. Diese Aussage relativiert sich jedoch bei der Betrachtung des zweiten Versuchsansatzes (TNP-ATP 10^{-6} M/L).

Von 215 Astrocyten reagierten 37 (17,2 %) auf die erste Stimulation mit 2Me-SATP mit einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio. Von diesen 37 Zellen fielen 17 in die Kategorie der stark geblockten Zellen und 20 in die Kategorie schwach geblockte Zellen. Das prozentuale Verhältnis von 45,9 % (stark geblockt) zu 54,1 % (schwach geblockt)

(Abb. 40, B, 10^{-6} M/L) entspricht fast exakt dem Verhältnis, das auch für den Zelltyp der Neurone ermittelt werden konnte. Von den 17 Astrocyten aus der Kategorie der stark geblockten Zellen reagierten 10 (58,8 %) nicht mehr auf eine Stimulation mit 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ unter Superfusion des Antagonisten. Im Vergleich zum ersten Versuchsansatz sind das zwar rund 30 % weniger Zellen, jedoch stellen sie mit über 50 % immer noch den Hauptanteil der Zellen der Gruppe „stark geblockt“.

In Tabelle 6 sind sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Astrocyten aufgelistet. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse, auch hier inklusive statistisch signifikanter Unterschiede, in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 37, A-C, a-c, dunkelgraue Balken). Die statistische Auswertung für die Gesamtpopulation der untersuchten Astrocyten ist, ähnlich wie bei der Population der Neurone, auch aufgrund der Zusammenfassung von zwei verschiedenen Gruppen (schwach und stark geblockte Zellen) nicht mehr ganz so eindeutig, wie im ersten Versuchsansatz (TNP-ATP 10^{-5} M/L). Die Werte der abschließenden Superfusion von 2Me-SATP erreichen nicht mehr das Niveau der ersten Applikation, so dass hier auch ein signifikanter Unterschied besteht (* $2P \leq 0,05$), der sich eventuell durch den langen Versuchsablauf und ein damit verbundenes *photo-bleaching* der Zellen erklären lässt. Ähnlich stellt sich die statistische Auswertung für die Kategorie der schwach geblockten Zellen dar. Im Gegensatz zu den bisher ermittelten Daten für sämtliche Gruppen an schwach geblockten Zellen bei unterschiedlichen Antagonistenkonzentrationen weisen hier die Werte der Stimulation mit 2Me-SATP unter Superfusion des Antagonisten im Vergleich zur ersten Superfusion von 2Me-SATP *per se* zum ersten Mal statistisch signifikante Unterschiede auf (* $2P \leq 0,05$). Dies zeigt sich auch für den Vergleich der Werte der dritten Stimulation im Vergleich zur ersten (* $2P \leq 0,05$). Obwohl ein möglichst langer Versuchsablauf somit für die pharmakologische Charakterisierung essentiell ist (vergleiche Kapitel 3.2.5), stellt er dennoch vermutlich den limitierenden Faktor der mikrospektrofluorimetrischen Versuche dar.

Im dritten und letzten Versuchsansatz wurde die Konzentration des Antagonisten gleich der des Agonisten gesetzt, d.h. beide Substanzen wurden in einer Konzentration von 10^{-7} M/L superfundiert. Analog zur Zellpopulation der Neurone überwog auch beim Zelltyp der Astrocyten nun deutlich der Anteil an schwach geblockten Zellen. Von insgesamt 70 untersuchten Zellen reagierten 17 (24,3 %) auf die erste Applikation von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. 6 Astrocyten (35,3 %) konnten in die Gruppe der stark geblockten Zellen eingegliedert werden. 11 Astrocyten (64,7 %)

wurden in die Gruppe der schwach geblockten Astrocyten integriert (Abb. 40, B, 10^{-7} M/L). Abb. 39, C zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten aus der Gruppe „schwach geblockte Zellen“ nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) (a und c, 2Me-SATP *per se*) bzw. bei zusätzlicher Applikation von TNP-ATP (10^{-5} M/L) (b). Von den 6 Astrocyten aus der Kategorie der stark geblockten Zellen reagierten 3 (50 %) nicht mehr auf eine Stimulation mit 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ unter Superfusion des Antagonisten. In Tabelle 7 sind sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Astrocyten aufgelistet. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 38, A-C, a-c, dunkelgraue Balken. Die statistische Auswertung für die Gesamtpopulation der untersuchten Astrocyten ist fast analog zu der Auswertung für die Kategorie der schwach geblockten Astrocyten (vergleiche Abb. 38 B und C dunkelgraue Balken). Die durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio des abschließenden Stimulus erreicht nicht annähernd das Niveau des ersten Stimulus. Im direkten Vergleich treten hier hochsignifikante Unterschiede auf ($***2P \leq 0,001$) Die Werte unter Superfusion von TNP-ATP und 2Me-SATP verglichen mit denen der ersten Superfusion von 2Me-SATP *per se* unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander ($**2P \leq 0,01$).

Tabelle 6: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. TNP-ATP (10^{-6} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

STARK	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-6} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,13 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
Astrozyten	0,19 \pm 0,03	0,05 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,21 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
SCHWACH	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-6} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,22 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02
Astrozyten	0,24 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01
Oligodendrozyten	0,33 \pm 0,07	0,24 \pm 0,04	0,25 \pm 0,06
GESAMT	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-6} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,18 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02
Astrozyten	0,21 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01
Oligodendrozyten	0,25 \pm 0,03	0,09 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02

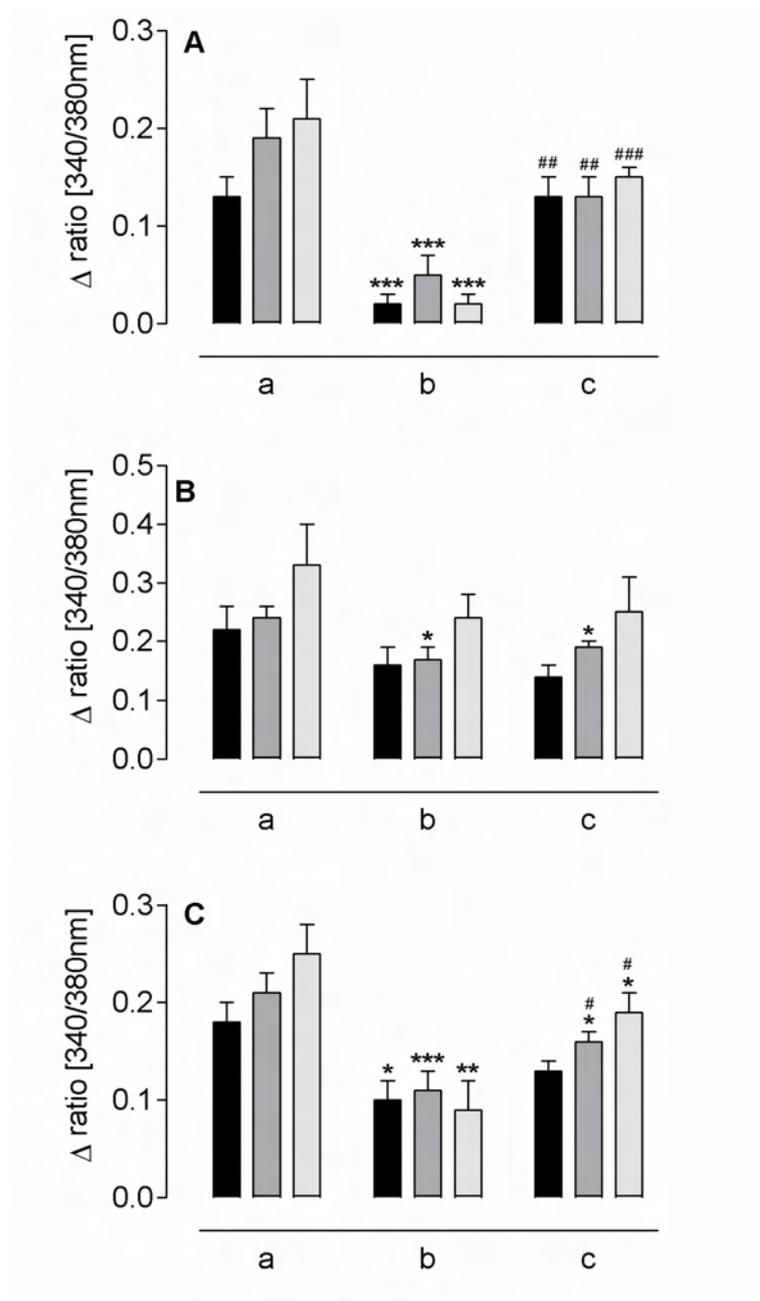


Abbildung 37: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und TNP-ATP (10^{-6} M/L)

Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und TNP-ATP 10^{-6} M/L (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

- A:** Stark geblockten Zellen: */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,001$) bzw. von (c) verglichen mit (b) (### $2P \leq 0,001$, ## $2P \leq 0,01$).
- B:** Schwach geblockten Zellen: * kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) bzw. (c) verglichen mit (a) (* $2P \leq 0,05$).
- C:** Gesamtpopulation (stark und schwach geblockt): */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) bzw. (c) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,001$, ** $2P \leq 0,01$, * $2P \leq 0,05$) sowie von (c) verglichen mit (b) (# $2P \leq 0,05$).

Ebenso wie die Zellpopulationen der Neurone und der Astrocyten wurden auch die Oligodendrocyten in stark und schwach geblockte Zellen eingeteilt. Im ersten Versuchsansatz, in dem TNP-ATP in einer Konzentration von 10^{-5} M/L superfundiert wurde, reagierten 12 (27,3 %) von insgesamt 44 untersuchten Oligodendrocyten auf den ersten Stimulus mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) mit einem Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio. Diese 12 Oligodendrocyten wurden alle in die Kategorie der stark geblockten Zellen eingeordnet, da für keine der untersuchten Zellen dieses Zelltyps unter einer Superfusion von TNP-ATP auf die Applikation von 2Me-SATP eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ zu verzeichnen war. Somit liegt der Anteil an stark geblockten Oligodendrocyten bei 100 % (Abb. 40, C, 10^{-5} M/L). Demzufolge ist die Gesamtpopulation an responsiven Oligodendrocyten gleich der der stark geblockten Oligodendrocyten (vergleiche Abb. 36, A-C, a-c, hellgraue Balken). In Tabelle 5 befinden sich deren durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M.

Im zweiten Versuchsansatz mit TNP-ATP in einer Konzentration von 10^{-6} M/L wurden insgesamt 34 Oligodendrocyten untersucht und ausgewertet. 12 Oligodendrocyten reagierten auf den ersten Stimulus mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Zwei Drittel (8 Zellen) wurden der Gruppe der stark geblockten Zellen zugeordnet, das andere Drittel wurde aufgrund der oben beschriebenen Kriterien in die Kategorie „schwach geblockte Zellen“ eingeordnet (Abb. 40, C, 10^{-6} M/L). Im Vergleich mit den Zellpopulationen der Neurone und Astrocyten, lag der prozentuale Anteil an stark geblockten Oligodendrocyten bei einer Antagonistenkonzentration von 10^{-6} M/L immer noch weit über 50 % der untersuchten Gesamtpopulation, wohingegen der Anteil an stark geblockten Neuronen und Astrocyten mit 44,4 % bzw. 45,9 % deutlich geringer war. 5 der 8 Oligodendrocyten (62,5 %) reagierten unter Superfusion von TNP-ATP nicht mehr mit einem Anstieg der Fluoreszenz Ratio. Der Ratioanstieg der anderen drei Oligodendrocyten dieser Gruppe erreichte mit durchschnittlich $0,06 \pm 0,03$ nur noch 28,6 % des ursprünglichen Niveaus. Abb. 39, B zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Oligodendrocyten aus der Gruppe „stark geblockte Zellen“ nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) (a und c, 2Me-SATP *per se*) bzw. bei zusätzlicher Applikation von TNP-ATP (10^{-5} M/L) (b). Die Ratioamplituden der vier Oligodendrocyten (33,3 %), welche die Gruppe der schwach geblockten Zellen repräsentieren, bewegen sich in ihren durchschnittlichen Maxima auf etwa einem Niveau ($2P > 0,05$). In Tabelle 6 sind sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Oligodendrocyten aufgelistet.

Der erzielte Wert unter Superfusion von TNP-ATP ist immer der gemittelte Anstieg der Fluoreszenz Ratio aller Zellen dieser Kategorie. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 37, A-C, a-c, hellgraue Balken.

Im dritten und letzten Versuchsansatz dieser Versuchsreihe, mit gleicher A- und Antagonistenkonzentration und bekanntem Protokoll flossen 38 Oligodendrocyten in die Endauswertung ein, von denen 18 (47,4 %) auf die erste Applikation von 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten und daher die Gesamtpopulation an responsiven Zellen repräsentieren. Das Verhältnis von stark zu schwach geblockten Zellen, liegt bei 27,8 % zu 72,2 %. Während bei höheren TNP-ATP-Konzentrationen (10^{-5} M/L und 10^{-6} M/L) der Anteil an stark geblockten Oligodendrocyten prozentual weit über dem der Neurone und der Astrocyten lag, so nehmen sie in diesem letzten Versuchsansatz eine Position zwischen den Neuronen und Astrocyten ein. (siehe Abb. 40, A-C, 10^{-5} M/L – 10^{-7} M/L). Die Gruppe der stark geblockten Zellen beinhaltet 5 Oligodendrocyten, von denen vier (80 %) unter Superfusion von TNP-ATP nicht mehr auf eine Applikation von 2Me-SATP reagierten. Die Gruppe der schwach geblockten Oligodendrocyten setzt sich aus 13 Zellen zusammen. Zwischen den Werten der einzelnen Stimulationen besteht statistisch kein signifikanter Unterschied ($2P > 0,05$). Betrachtet man die graphische Darstellung der Gesamtpopulation an untersuchten Oligodendrocyten, ohne Kategorisierung der untersuchten Zellen, so scheint TNP-ATP (10^{-7} M/L) einen geringen bis keinen Einfluss auf die Supression des durch 2Me-SATP induzierten Ratiosignals zu haben. Dieser Eindruck wird vor allem durch die Betrachtung der durchschnittlichen Ratioerhöhung auf den abschließenden Stimulus im Vergleich zum ersten Stimulus vermittelt. Sie erreicht nicht annähernd das Niveau der Ratioerhöhung auf den ersten Stimulus ($*2P \leq 0,05$). Somit relativieren sich auch die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten Werten auf eine Applikation von 2Me-SATP unter Superfusion von TNP-ATP verglichen mit denen der ersten Stimulation ($*2P \leq 0,05$). Auch hier erschwert möglicherweise das *photo-bleaching* der Zellen, bedingt durch den langen Versuchsablauf die Interpretation der Ergebnisse. In Tabelle 7 sind sich die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für die Kategorie der stark und schwach geblockten Zellen, sowie die Gesamtpopulation der untersuchten Oligodendrocyten aufgelistet. Das Balkendiagramm in Abb. 37, A-C, a-c, hellgraue Balken erläutert die Ergebnisse in Graphenform.

Tabelle 7: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrozyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. TNP-ATP (10^{-7} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

STARK	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-7} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,26	0,07	0,15
Astrozyten	0,22 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,21 \pm 0,05	0,02 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02
SCHWACH	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-7} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,22 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02
Astrozyten	0,28 \pm 0,04	0,18 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
Oligodendrozyten	0,31 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03
GESAMT	<u>1. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>2. Stimulation</u> TNP-ATP (10^{-7} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	<u>3. Stimulation</u> 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,22 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01
Astrozyten	0,25 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01
Oligodendrozyten	0,28 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03

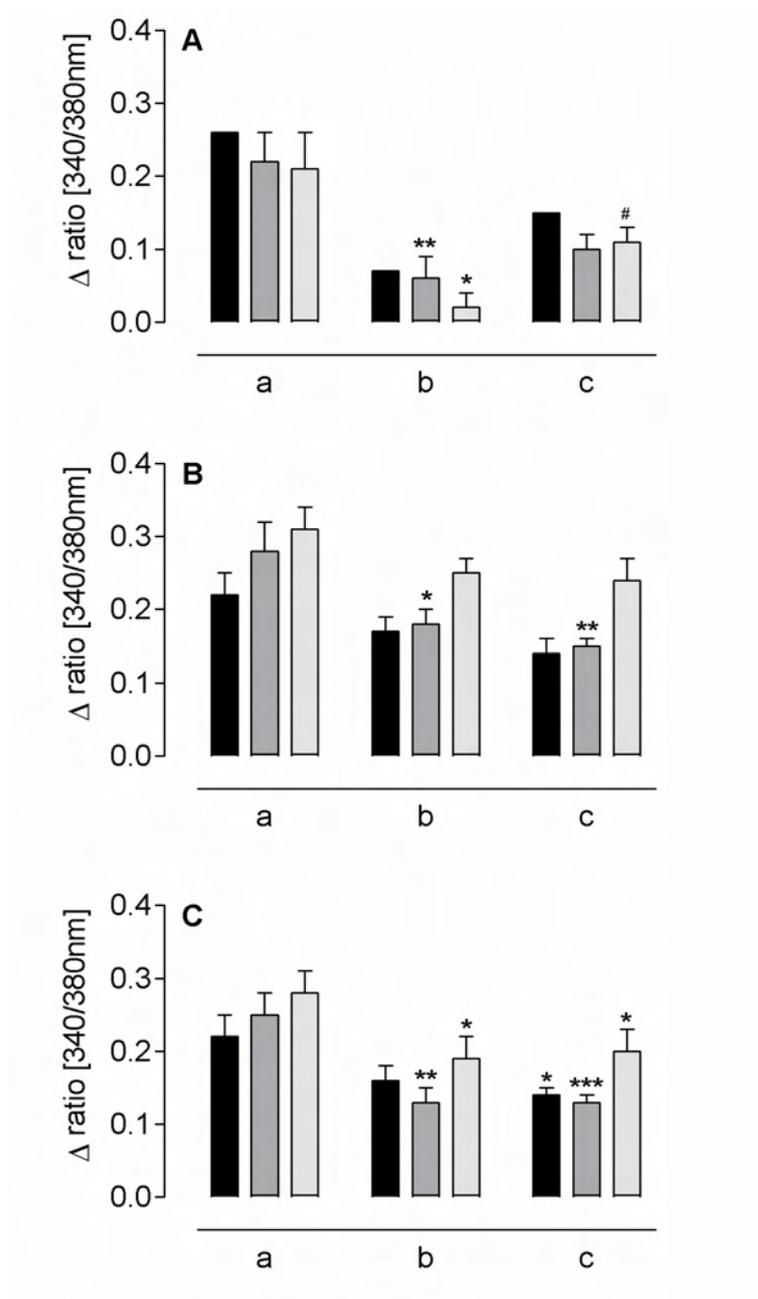


Abbildung 38: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und TNP-ATP (10^{-6} M/L)

Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrocyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und TNP-ATP 10^{-7} M/L (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

- A:** Stark geblockten Zellen: */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,01$, * $2P \leq 0,05$) bzw. von (c) verglichen mit (b) (# $2P \leq 0,05$).
- B:** Schwach geblockten Zellen: * kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) bzw. (c) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,01$, * $2P \leq 0,05$).
- C:** Gesamtpopulation (stark und schwach geblockt): * kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) bzw. (c) verglichen mit (a) (** $3P \leq 0,001$, ** $2P \leq 0,01$, * $2P \leq 0,05$).

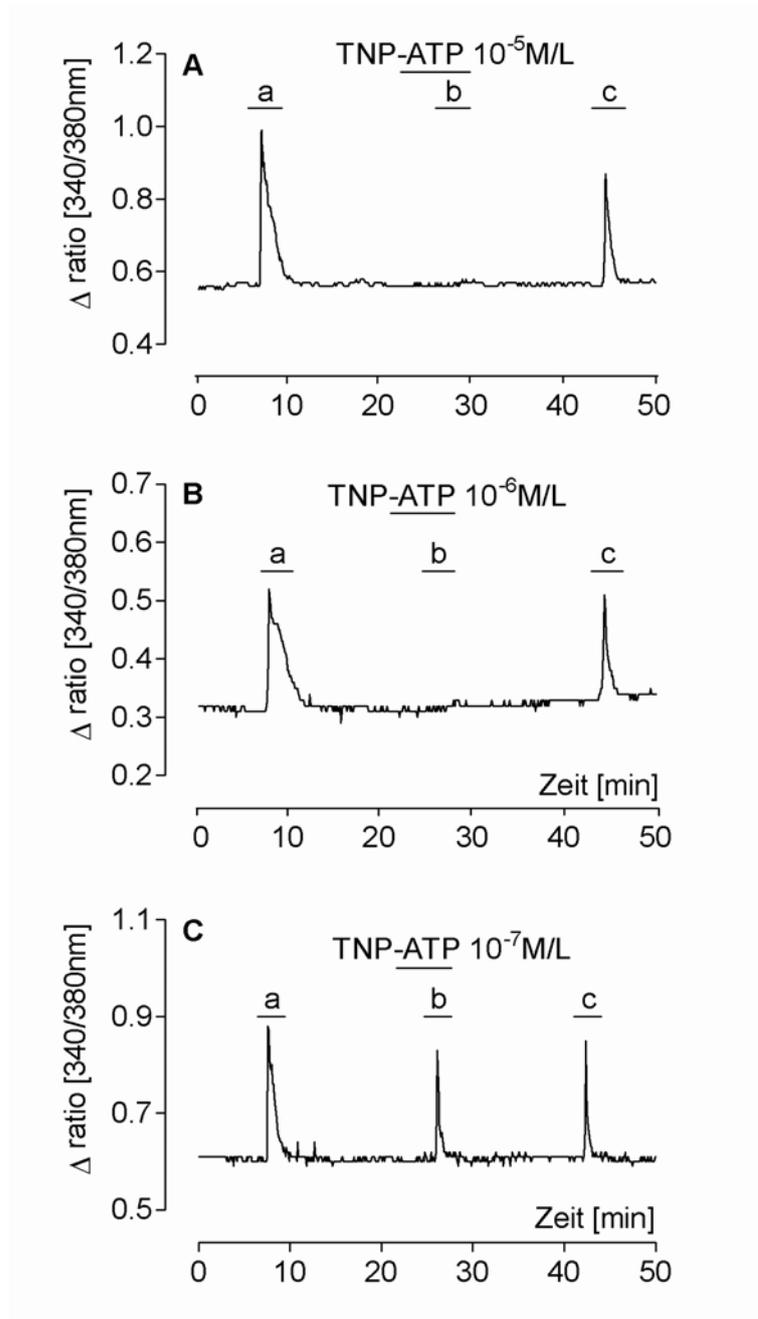


Abbildung 39: 340/380 nm Ratio Signal für Zellen der Primärzellkultur des MnPO nach Stimulation mit 2Me-SATP ((a) – (c)) und TNP-ATP (unter (b))

- A:** Beispiel eines einzelnen, stark supprimierten Astrocyten nach Applikation von TNP-ATP (10^{-5} M/L). Dieser spezielle Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 42$ Zellen
- B:** Beispiel eines einzelnen, stark geblockten Oligodendrocyten nach Applikation von TNP-ATP (10^{-6} M/L). Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 5$ Zellen
- C:** Beispiel eines einzelnen, schwach supprimierten Astrocyten nach Applikation von TNP-ATP (10^{-7} M/L). Der Kurvenverlauf spiegelt das Antwortverhalten von $n = 11$ Zellen wider.

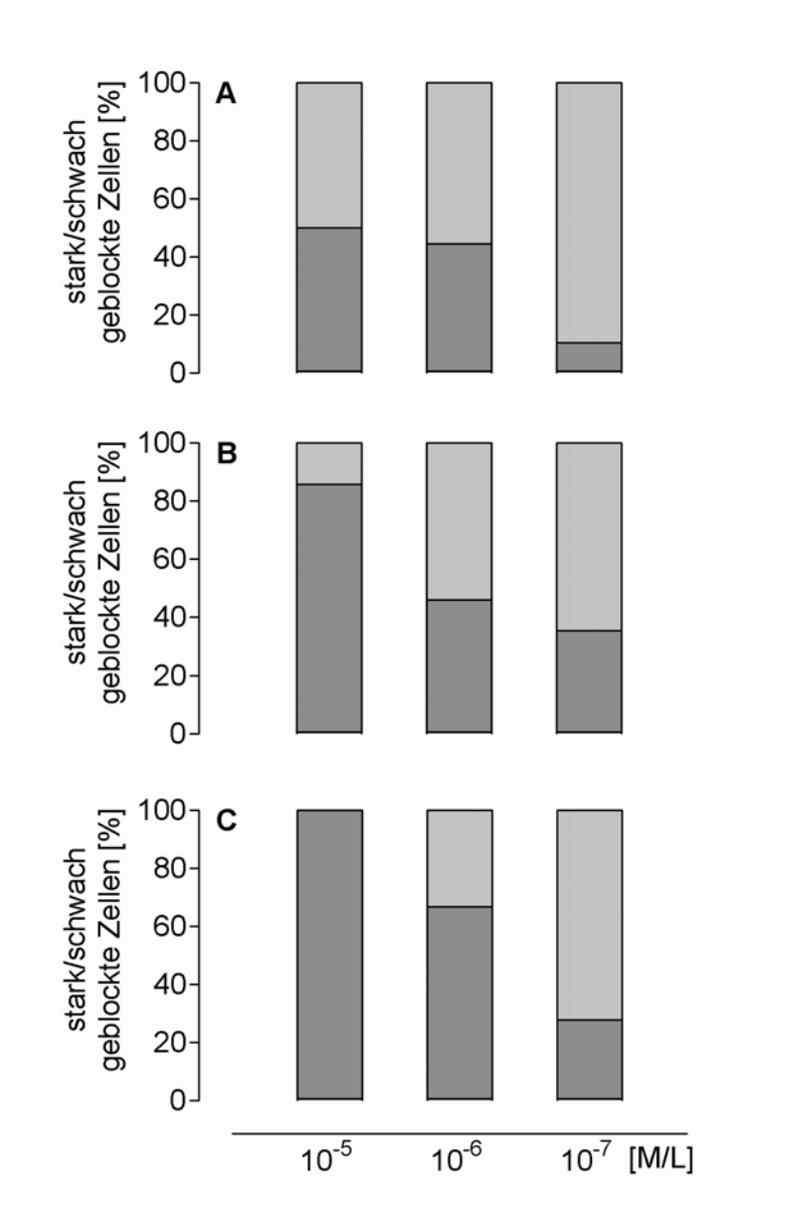


Abbildung 40: Prozentuale Einteilung der Gesamtpopulation an untersuchten Zellen der Primärkultur des MnPO in stark geblockte Zellen (dunkelgrauer Balkenanteil) und schwach geblockte Zellen (hellgrauer Balkenanteil) für die drei Versuchsansätze mit dem Antagonisten TNP-ATP (10^{-5} M/L, 10^{-6} M/L und 10^{-7} M/L)

- A:** Prozentuale Einteilung der responsiven Neurone (10^{-5} M/L: n = 20; 10^{-6} M/L: n=18; 10^{-7} M/L: n = 19)
- B:** Prozentuale Einteilung der responsiven Astrocyten (10^{-5} M/L: n = 56; 10^{-6} M/L: n=37; 10^{-7} M/L: n = 17)
- C:** Prozentuale Einteilung der responsiven Oligodendrocyten (10^{-5} M/L: n = 12; 10^{-6} M/L: n=12; 10^{-7} M/L: n = 18)

3.2.10. Antagonisierung der durch 2Me-SATP vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch den P2X₂- und P2Y-spezifischen Antagonisten Rb2

In einer letzten Antagonisierungsstudie wurde die Wirkung von Rb2 auf die durch 2Me-SATP vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ untersucht. In zwei verschiedenen Versuchsansätzen wurde Rb2 in einer Konzentration von 10^{-6} M/L und 10^{-7} M/L superfundiert. Der gesamte Versuchsablauf erfolgte nach bewährtem Protokoll (vergleiche Kapitel 2.4.3.2.9) Insgesamt wurden in der ersten Versuchsserie (Rb2 10^{-6} M/L) 152 Neurone, 133 Astrocyten und 19 Oligodendrocyten aus 4 Zellpräparationen und 8 mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen analysiert. In Tabelle 8 sind die durchschnittlichen Ratioänderungen als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M. für beide Versuchsansätze und alle untersuchten Zelltypen aufgelistet.

Von den 152 indentifizierten Neuronen reagierten 9 (5,9 %) mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf die erste Applikation von 2Me-SATP. Die anschließende Applikation von Rb2 und 2Me-SATP gemeinsam bewirkte eine komplette Blockade der durch 2Me-SATP induzierbaren Ratioerhöhung in drei (33 %) der untersuchten Neurone. Im Vergleich mit den komplett inhibierten Neuronen aus den Versuchsreihen mit PPADS (10^{-6} M/L) sind das fast dreimal so viele (PPADS 10^{-6} M/L 12,5 % komplett supprimierte Neurone), in bezug auf TNP-ATP immer noch 20 % mehr. Auf die abschließende Stimulation mit 2Me-SATP reagierten wieder alle 9 Neurone mit einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz Ratio. Die unter Superfusion von Rb2 erzielten Ratioerhöhungen nach Applikation von 2Me-SATP unterscheiden sich signifikant von denen der ersten Stimulation (* $2P \leq 0,05$) Eine graphische Darstellung der in Tabelle 8 aufgeführten Werte zeigt Abb. 41, A, a-c.

Im zweiten Versuchsansatz dieser Versuchsreihe wurden sowohl Agonist (2Me-SATP) als auch Antagonist (Rb2) in einer Konzentration von 10^{-7} M/L superfundiert. Aus 2 Zellpräparationen und 5 mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen resultierten 77 analysierte Neurone, 45 Astrocyten und 20 Oligodendrocyten. Von 77 untersuchten Neuronen flossen 10 in die Endauswertung ein. Ein Neuron (10 %) reagierte unter Superfusion von Rb2 nicht mehr auf eine Stimulation mit 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$. Auf eine graphische Darstellung dieses zweiten Versuchsansatzes wurde für alle Zellpopulationen verzichtet.

Zusätzlich wurden in der ersten Versuchsserie (Rb2 10^{-6} M/L) 133 Astrocyten untersucht, von denen 21,8 % (29 Zellen) auf eine Stimulation mit 2Me-SATP einen Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio zeigten. Unter Superfusion von Rb2

reagierten nur noch 8 Zellen (27,6 %) auf eine Applikation von 2Me-SATP. Der durchschnittliche Ratioanstieg für diese 8 Zellen lag bei $0,11 \pm 0,04$. In Tabelle 8 ist der gemittelte Ratioanstieg aller 29 untersuchten Zellen erfasst. Im Umkehrschluss bedeutet das eine komplette Blockade der Ratioerhöhung für 72,4 % (21 Zellen) der 29 untersuchten Astrocyten. Somit ist der Anteil an komplett inhibierten Astrocyten unter einer Superfusion von Rb2 mehr als doppelt so hoch, wie unter einer Superfusion von PPADS (10^{-6} M/L) und fast dreimal so hoch wie unter Superfusion von TNP-ATP (10^{-6} M/L). Abb. 41, B, zeigt das 340/380 nm Ratiosignal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) und Rb2 (10^{-6} M/L).

Im zweiten Versuchsansatz dieser Versuchsreihe wurden sowohl Agonist (2Me-SATP) als auch Antagonist (Rb2) in einer Konzentration von 10^{-7} M/L superfundiert. Von 45 untersuchten Astrocyten flossen 5 in die Endauswertung ein. Ein Astrocyt (20 %) reagierte unter Superfusion von Rb2 nicht mehr auf eine Stimulation mit 2Me-SATP mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$.

Von 19 untersuchten Oligodendrocyten flossen nur drei Zellen (15,8 %) in die Endauswertung ein. Nur einer der drei Oligodendrocyten reagierte unter Superfusion von Rb2 (10^{-6} M/L) auf eine Applikation von 2Me-SATP mit einem Anstieg der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio. Ein Vergleich zwischen den einzelnen Antagonisten hätte aufgrund der geringeren Anzahl an untersuchten Oligodendrocyten wenig Aussagekraft.

Im zweiten Versuchsansatz dieser Versuchsreihe in der sowohl der Agonist (2Me-SATP), als auch der Antagonist (Rb2) in einer Konzentration von 10^{-7} M/L superfundiert wurden, bewirkte die erste Applikation von 2Me-SATP bei 7 von 20 untersuchten Oligodendrocyten (35%) einen messbaren Anstieg der Fluoreszenz Ratio. Eine vollständige Inhibition des Ratiosignals unter Superfusion von Rb2 nach Applikation von 2Me-SATP konnte nur für eine Zelle nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Durchschnittliche Ratioänderungen (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der untersuchten Neurone, Astrozyten und Oligodendrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L) bzw. Rb2 (10^{-6} M/L bzw. 10^{-7} M/L) und 2Me-SATP (10^{-7} M/L)

Rb2 10^{-6} M/L	1. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	2. Stimulation Rb2 (10^{-6} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	3. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,17 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03
Astrozyten	0,21 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
Oligodendrozyten	0,20 \pm 0,03	0,06 \pm 0,06	0,09 \pm 0,02
Rb2 10^{-7} M/L	1. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	2. Stimulation Rb2 (10^{-7} M/L) + 2Me-SATP (10^{-7} M/L)	3. Stimulation 2Me-SATP (10^{-7} M/L)
Neurone	0,20 \pm 0,04	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01
Astrozyten	0,23 \pm 0,05	0,12 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02
Oligodendrozyten	0,26 \pm 0,03	0,12 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05

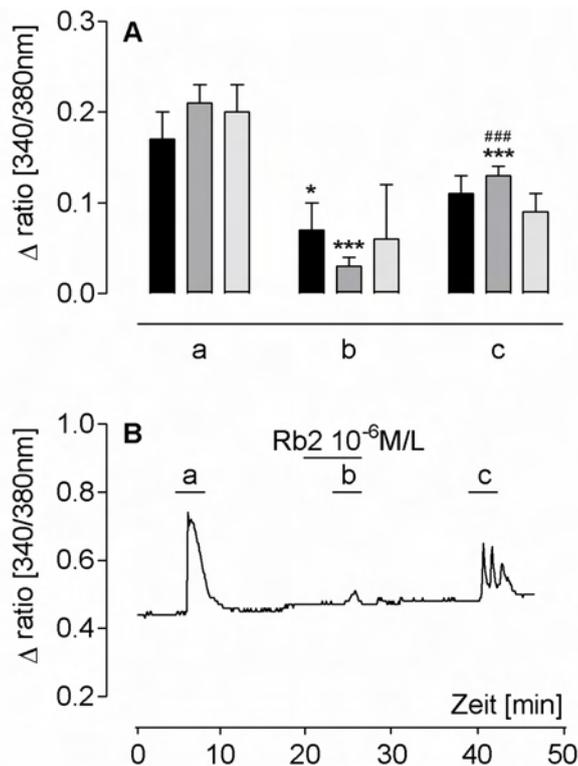


Abbildung 41: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und Rb2 (10^{-6} M/L)

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Neurone (schwarze Balken), Astrozyten (dunkelgraue Balken) und Oligodendrocyten (hellgraue Balken) nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und Rb2 (10^{-6} M/L) (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt. */# kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) und (c) verglichen mit (a) ($***2P \leq 0,001$ / $*2P \leq 0,05$) bzw. von (c) verglichen mit (b) ($###2P \leq 0,001$).
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP ((a) –(c)) und Rb2 (zusammen mit (b))

3.2.11. Einfluss von Zink als Potentiator oder Inhibitor auf die durch 2Me-SATP vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$

Zink potentiert die ATPerge Aktivierung u.a. an homomeren P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Rezeptoren und inhibiert diese an P2X₁- und P2X₇-Purinoceptoren (King and Townsend-Nicholson 2003). Daher war der unter Kapitel 2.4.3.2.10 beschriebene Versuchsansatz ein weiteres Mittel der Wahl die Expression purinerge Rezeptoren funktionell näher zu charakterisieren. Insgesamt wurden 117 Neurone, 87 Astrocyten und 3 Oligodendrocyten aus 3 Zellpräparationen und Messungen an 5 Mikrokammern untersucht.

Fünf Neurone (4,3 %) reagierten auf die erste Superfusion von 2Me-SATP mit einem durchschnittlichen Anstieg der Fluoreszenz Ratio von $0,21 \pm 0,07$. Auf die nachfolgende Superfusion von Zink *per se* reagierten zwei Neurone mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ (durchschnittliche Ratioerhöhung für diese beiden Neurone 0,22; unter Einbezug von 5 Nullwerten $0,09 \pm 0,06$). Zink *per se* beeinflusst jedoch nur den Ratioanstieg der Neurone. Keiner der untersuchten Astrocyten oder Oligodendrocyten reagierte mit einem 340/380 nm Ratiosignal auf eine Superfusion von Zink. Dieser Ratioanstieg durch Zink potenzierte sich durch die gemeinsame Superfusion von 2Me-SATP und Zink. Im Vergleich zur alleinigen Superfusion von Zink erhöhte sich der Ratioanstieg dieser zwei Neurone um 36,4 % (auf 0,30) nach Applikation beider Substanzen. Ein Neurone reagierte weder auf den ersten noch auf den letzten Stimulus mit 2Me-SATP, jedoch bewirkte in diesem Einzelfall die gemeinsame Applikation von Zink und 2Me-SATP eine Erhöhung der Fluoreszenz Ratio um 0,07. In einem Fall hatte Zink keinen Einfluss auf die Fluoreszenz Ratio, d.h. die Amplitudemaxima der Fluoreszenz Ratio auf die repetitive Applikation von 2Me-SATP, auch unter Superfusion von Zink, blieben auf einem Niveau. Bei einem weiteren untersuchten Neuron unterdrückte die Applikation von Zink einen Anstieg der Fluoreszenz Ratio nach Superfusion von 2Me-SATP vollständig.

Von 87 untersuchten Astrocyten wurden 10 in die Endauswertung einbezogen. Ähnlich den Neuronen so wurden auch hier verschiedene Reaktionsmuster auf die Applikation von Zink registriert. Auf zwei Astrocyten blieb eine gemeinsame Superfusion von Zink und 2Me-SATP wirkungslos. Im Vergleich zum ersten und abschließenden Stimulus änderte sich der Anstieg der Fluoreszenz Ratio auf die Superfusion beider Substanzen nicht, sondern erreichte eine vergleichbare Höhe. Ein Astrocyt reagierte weder auf den ersten noch auf den letzten Stimulus mit 2Me-SATP, jedoch bewirkte in diesem Einzelfall die gemeinsame Applikation von Zink und 2Me-SATP eine Erhöhung der

Fluoreszenz Ratio um 0,12. Auf 7 Astrocyten hatte die gemeinsame Superfusion von Zink und 2Me-SATP eine antagonistische Wirkung. Drei Astrocyten (42,9 %) reagierten unter Superfusion von Zink nicht mehr auf eine Applikation von 2Me-SATP. Der gemittelte Anstieg (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio aller 7 Astrocyten betrug $0,25 \pm 0,05$ für die erste Applikation von 2Me-SATP. Unter Superfusion von Zink und 2Me-SATP konnte ein Ratioanstieg von $0,05 \pm 0,02$ (entspricht nur noch 20% der ersten Applikation) verzeichnet werden. Auf die abschließende Superfusion von 2Me-SATP beträgt der Anstieg der Fluoreszenz Ratio $0,11 \pm 0,03$ (erneuter Anstieg um 54,5 %). Eine graphische Darstellung der Ergebnisse für die supprimierten Astrocyten in Form eines Balkendiagramms zeigt Abb. 42, A. Abb. 42, B zeigt das 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen, durch die Superfusion von Zink, antagonisierten Astrocyten nach dreimaliger Stimulation mit 2Me-SATP.

In der Gruppe der Oligodendrocyten erwies sich Zink in drei von drei Fällen als leicht inhibitorisch auf die Fluoreszenz Ratio der Zellen nach Stimulation mit 2Me-SATP. Die gemittelte Fluoreszenz Ratio der ersten Stimulation mit 2Me-SATP betrug $0,15 \pm 0,02$, unter Superfusion von Zink nach Applikation von 2Me-SATP war ein Ratioanstieg von $0,11 \pm 0,02$ zu verzeichnen und auf den abschließenden Stimulus mit 2Me-SATP reagierten die untersuchten Oligodendrocyten mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ von $0,13 \pm 0,01$. Im statistischen Vergleich sind diese Unterschiede nicht signifikant ($2P > 0,05$).

Diese Daten zeigen, dass Zink unterschiedliche modulatorische Wirkung in Kombination mit 2Me-SATP an purinergen Rezeptoren der Primärzellkultur des MnPO hat und funktionell unterschiedliche Rezeptorsubtypen im MnPO der Ratte exprimiert sein müssen. Eine genauere Analyse der hier dargestellten Daten erfolgt in Kapitel 4.

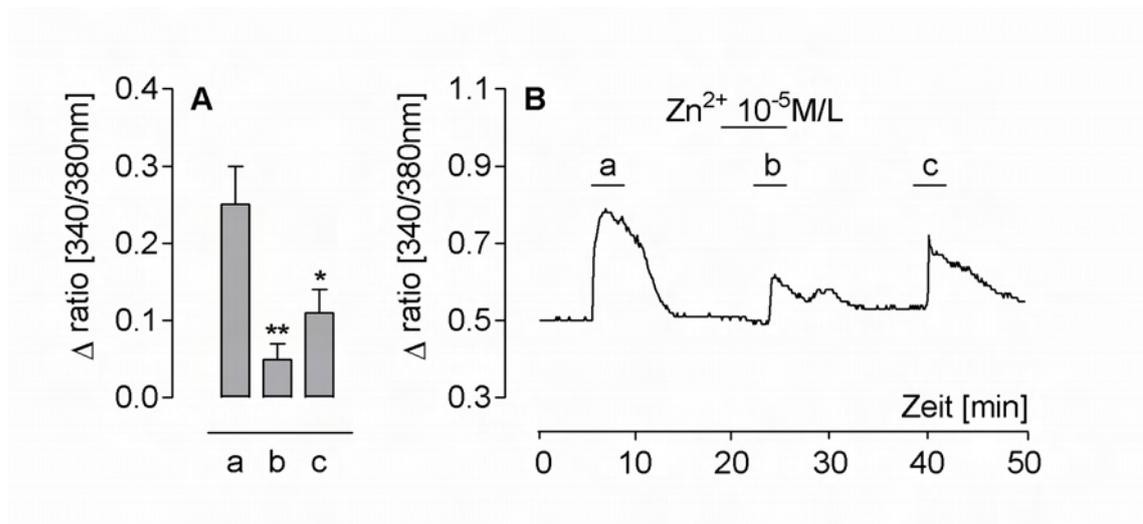


Abbildung 42: Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit 2Me-SATP (10^{-7} M/L, a-c) sowie 2Me-SATP und Zink (10^{-5} M/L)

- A:** Durchschnittliche Erhöhung der 340/380 nm Fluoreszenz Ratio der untersuchten Astrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP 10^{-7} M/L ((a) und (c)) sowie 2Me-SATP 10^{-7} M/L und Zn^{2+} (10^{-5} M/L) (b). Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M dargestellt. * kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratioerhöhungen von (b) und (c) verglichen mit (a) (** $2P \leq 0,01$ /* $2P \leq 0,05$)
- B:** 340/380 nm Ratio Signal eines einzelnen Astrocyten nach Stimulation mit 2Me-SATP ((a) –(c)) und Zink (zusammen mit (b))

3.3. Immunhisto- und –cytochemischer Nachweis ionotroper purinergerezeptoren

Immuncytochemische Untersuchungen in der neonatalen MnPO-Primärkultur sowie immunhistochemische Studien an Perfusions-fixierten, coronalen Gehirnschnitten der adulten Ratte für die Purinozeptor-Subtypen P2X₃, P2X₅, P2X₆ und P2X₇ haben für keinen der neuroglialen Zelltypen im/aus dem Bereich des MnPO zu eindeutigen, positiven Ergebnissen geführt. Dabei wurden in erster Linie polyklonale, kommerziell erhältliche Antiseren eingesetzt. Spezifische Markierungen sowohl in der Primärkultur als auch im Gehirnschnitt konnten hingegen für die Subtypen P2X₁, P2X₂ bzw. P2X₄ erarbeitet werden, wie im Folgenden dargestellt. Die Antigen-Spezifität der Immun-Markierung wurde entweder mittels Versuchsdurchführung in Abwesenheit des primären Antiserums oder durch vorheriges „Absättigen“ des primären Antiserums mit gereinigtem, kommerziell erhältlichem Antigen nachgewiesen.

3.3.1. Expression des P2X₁-Rezeptors

Mit Hilfe der in Kap. 2.4.4 beschriebenen indirekten Immunfluoreszenz konnte in Perfusions-fixierten, coronalen Gehirnschnitten adulter Ratten im Bereich des MnPO und der anteroventralen, periventriculären Zone (AV3V-Region) spezifische Immunreaktivität für den P2X₁-Purinozeptor nachgewiesen werden (Abb. 43). Zum größten Teil fanden sich neuronale, möglicherweise auch gliale Zellausläufer und Punctata, in geringerem Umfang auch klar erkennbare neuronale Zellkörper in allen Substrukturen des MnPO wie anteriorem (aMnPO), dorsalem (dMnPO) und ventralem MnPO (vMnPO), sowie der AV3V-Region markiert. In der MnPO-Primärkultur neonataler Ratten ermöglichte die immunocytochemische Mehrfachmarkierung die eindeutige Zuordnung P2X₁-spezifischer, zellulärer Immunreaktivität für MAP(2a+2b) immunpositive Neurone (Abb. 44 g – l), GFAP immunpositive Astrocyten (Abb. 44 a – f) und CNPase immunpositive Oligodendrocyten (Abb. 44 m – r), nicht jedoch ED-1 immunpositive Mikrogliazellen. In allen Zellkulturkammern aus mehreren Zellpräparationen erwiesen sich mehr als 50 % jedes Zelltyps als P2X₁-immunpositiv. Während die immunreaktive Markierung bei Astrocyten für Zellkörper sowie nahezu alle Zellausläufer detektierbar war, ergab sich für Neurone und Oligodendrocyten in erster Linie ein Rezeptornachweis für die Perikaryen sowie prägnante, ebenfalls MAP(2a+2b) bzw. CNPase - immunpositive Zellfortsätze, wobei für die Neurone Axon und Dendriten nicht zu differenzieren waren. Die Negativkontrollen nach Absättigung des P2X₁-spezifischen Primär-Antiserums mit reinem, synthetischen Antigen zeigten keine Immunreaktion (Abb. 44). Zudem demonstrierte die Versuchsdurchführung in Abwesenheit des jeweiligen Primär-Antiserums ebenfalls keine Immunreaktivität, was eine unspezifische Bindung der Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper ausschloss (nicht gezeigt).

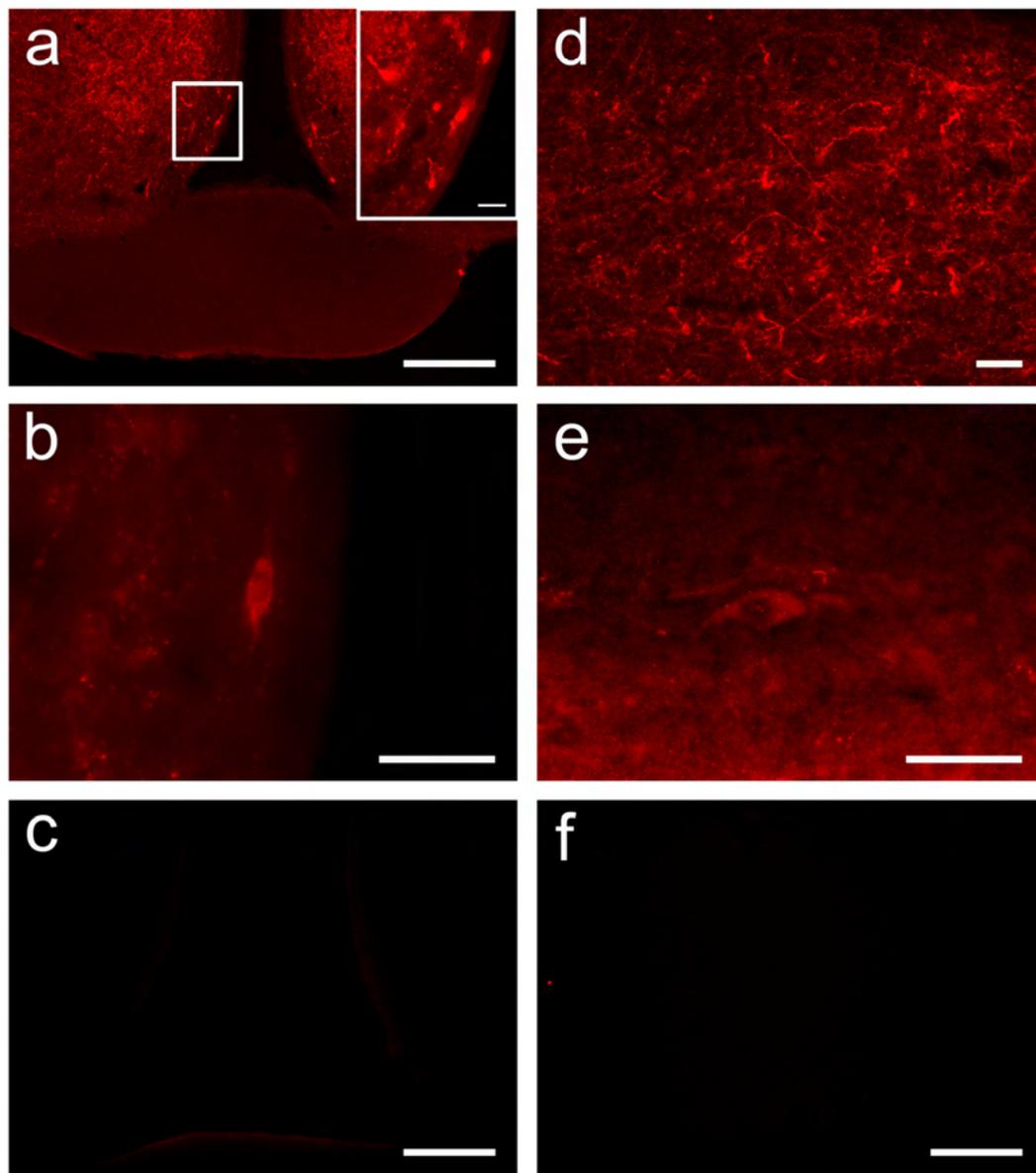


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis des P2X₁-Rezeptors im MnPO und der AV3V-Region des anterioren Hypothalamus

Linke Spalte: Nachweis des P2X₁-Rezeptors in der AV3V-Region

a: Übersichtsbild: Cy3-donkey anti-rabbit IgG markierte Fasern und einzelne Zellkörper zeigen die Lokalisation des durch ein primäres Antiserum (rabbit IgG) markierten P2X₁-Rezeptors. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt eine digitale Vergrößerung des markierten Bereiches.

b: Immunfluoreszenz-Darstellung einer einzelnen P2X₁-immunpositiven Zelle aus dem Bereich der AV3V-Region.

c: Negativkontrolle im Bereich der AV3V-Region durch Prä-Adsorption des primären P2X₁-Antiserums mit Antigen.

Rechte Spalte: Nachweis des P2X₁-Rezeptors im MnPO

d: Cy3-donkey anti-rabbit IgG markierte P2X₁-positive Fasern im Bereich des aMnPO

e: Immunfluoreszenz-Darstellung eines einzelnen P2X₁-positiven Neurons aus dem Bereich des vMnPO.

f: Negativkontrolle im Bereich des aMnPO durch Prä-Adsorption des primären P2X₁-Antiserums mit Antigen.

(Eichbalken repräsentiert 100µm in a, c und f, 25µm in a (Ausschnitt), b, d und e)

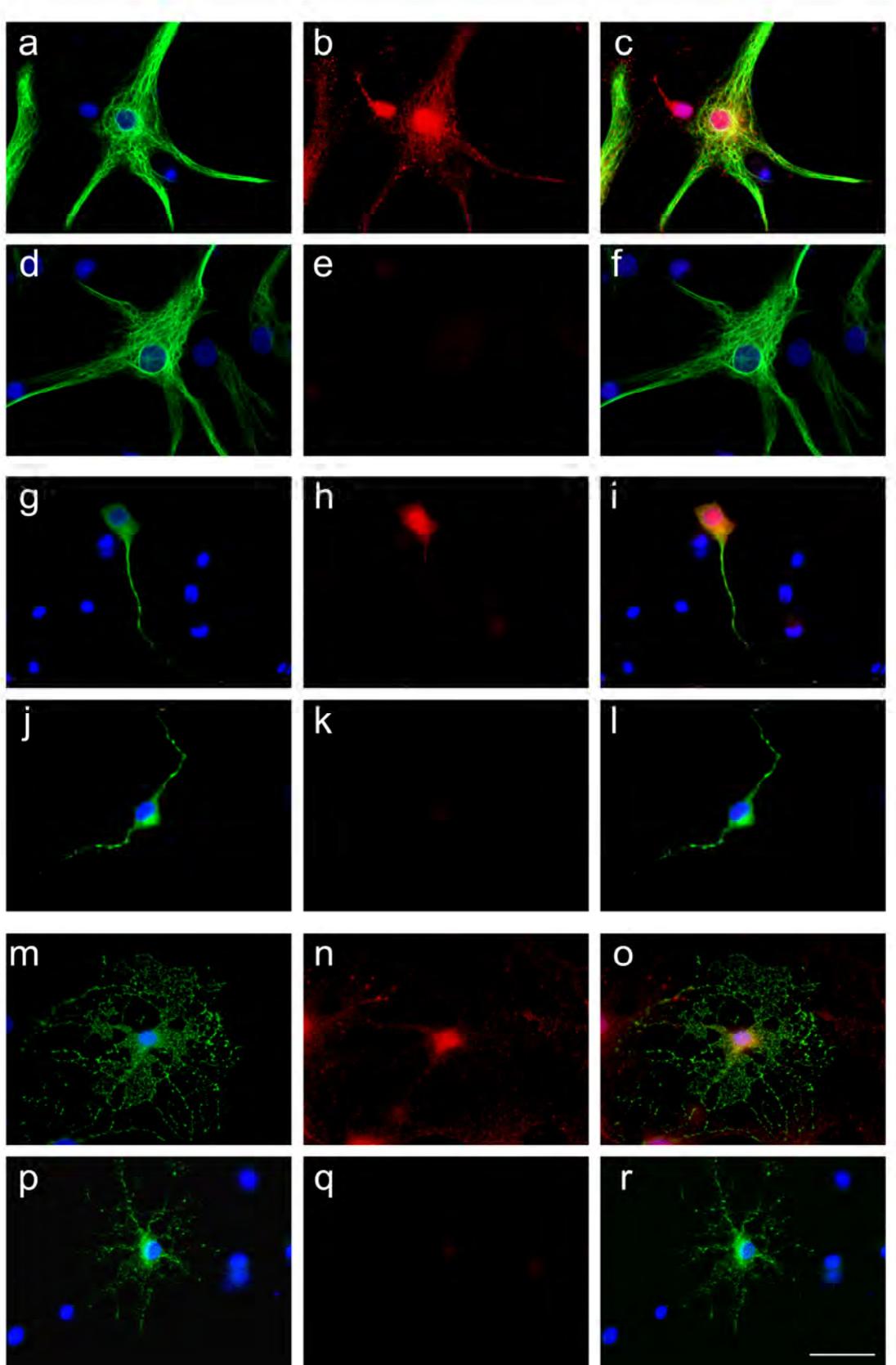


Abbildung 44: Immuncytochemischer Nachweis des P2X₁-Rezeptors in den Zellen der Primärkultur des MnPO

- a-c: Immuncytochemische Co-lokalisierung von GFAP und dem P2X₁-Rezeptor**
- a:** Identifizierung eines einzelnen Astrocyten durch Markierung mit mouse anti-GFAP als Primär-Antiserum und Alexa-488-goat anti-mouse IgG als sekundärem Antikörper (grün), Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau)
- b:** Nachweis der P2X₁-Rezeptorexpression durch Markierung mit rabbit anti-P2X₁ als Primär-Antiserum und Cy3-donkey anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (rot)
- c:** Überlagerung von a und b
- d-f: Negativkontrolle** durch Prä-Adsorption des primären P2X₁-Antiserums mit Antigen
- g-i: Immuncytochemische Co-lokalisierung von MAP(2a+b) und dem P2X₁-Rezeptor**
- g:** Identifizierung eines einzelnen Neurons durch Markierung mit mouse anti-MAP(2a+b) als Primär-Antiserum und Alexa-488-goat anti-mouse IgG als sekundärem Antikörper (grün), Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau).
- h:** Nachweis der P2X₁-Rezeptorexpression durch Markierung mit rabbit anti-P2X₁ als Primär-Antiserum und Cy3-donkey anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (rot).
- i:** Überlagerung von g und h.
- j-l: Negativkontrolle** durch Prä-Adsorption des primären P2X₁-Antiserums mit Antigen
- m-o: Immuncytochemische Co-lokalisierung von CNPase und dem P2X₁-Rezeptor**
- m:** Identifizierung eines einzelnen Oligodendrocyten durch Markierung mit mouse anti-CNPase als Primär-Antiserum und Alexa-488-goat anti-mouse IgG als sekundärem Antikörper (grün), Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau).
- n:** Nachweis der P2X₁-Rezeptorexpression durch Markierung mit rabbit anti-P2X₁ als Primär-Antiserum und Cy3-donkey anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (rot).
- o:** Überlagerung von m und n.
- p-r: Negativkontrolle** durch Prä-Adsorption des primären P2X₁-Antiserums mit Antigen (Der Eichbalken in r repräsentiert eine Strecke von 25µm)

3.3.2. Expression des P2X₂-Purinozeptors

Der Nachweis zellulärer P2X₂-Purinozeptor Expression konnte erfolgreich mit einem polyklonalen Antiserum aus dem Kaninchen (Abcam 8726) bei einer Verdünnung von 1 : 1000 sowohl für den coronalen Gehirnschnitt als auch die MnPO-Primärkultur erzielt werden. Die zelluläre Expression des P2X₂ in hypothalamischen Kerngebieten wie PVN, SON, ARC oder *Area postrema* stimmte dabei mit den von Kanjhan et al. (1999) publizierten Verteilungsmustern überein. Hinsichtlich des MnPO ergab sich eine markante Markierung zahlreicher, kleinvolumiger Neurone vor allem für den dMnPO sowie die periventrikuläre Zone des vMnPO, wohingegen der aMnPO lediglich eine marginale Immunreaktivität für den P2X₁-Purinozeptor zu verzeichnen hatte (Abb. 45 C, D). Vor allem periventrikulär im Bereich der AV3V-Region sowie des vMnPO konnten einzelne, klar identifizierbare Astrocyten als P2X₂-immunreaktiv charakterisiert werden (nicht gezeigt). In der primären MnPO-Kultur exprimierten mehr als 50 % aller MAP(2a+2b) positiven Neurone (aus insgesamt drei Zellpräparationen) den P2X₂-Purinozeptor. Anders als für MAP(2a+2b) erwies sich die P2X₂-Markierung als auf die Perikaryen

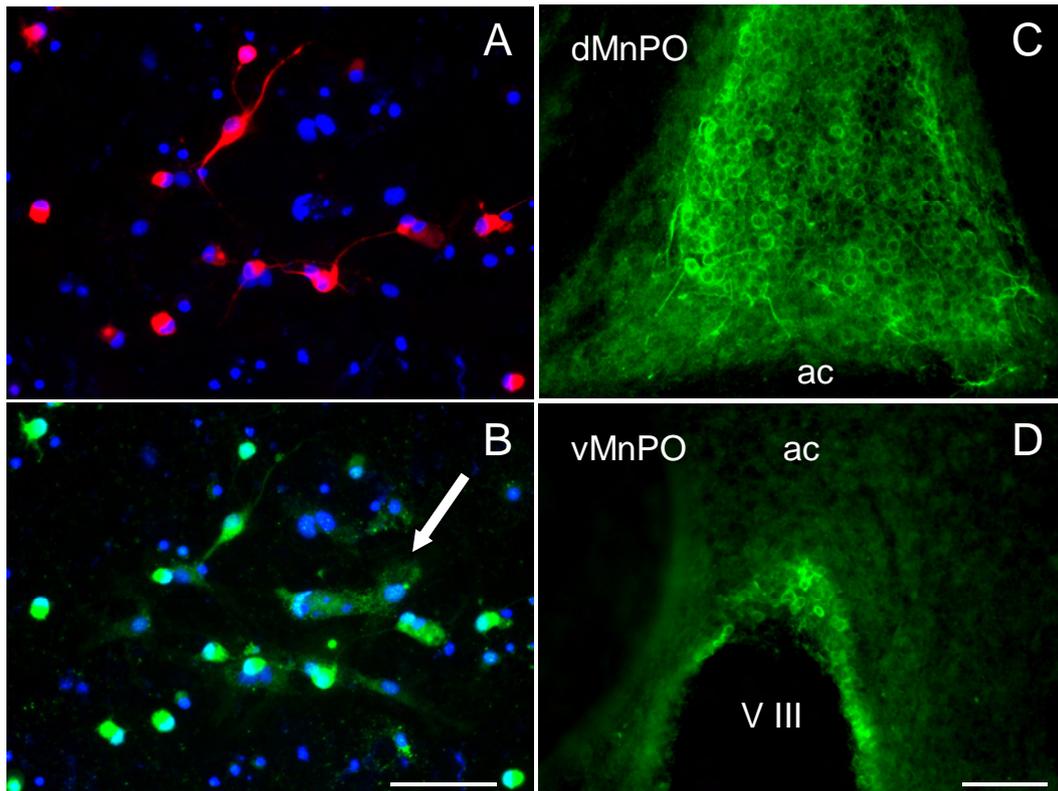


Abbildung 45: Immunhistochemischer und -cytochemischer Nachweis des P2X₂-Rezeptors im MnPO sowie der Primärkultur des MnPO

A und B: MnPO-Primärkultur

A: Identifizierung mehrerer Neurone durch Markierung mit mouse anti-MAP(2a+b) als Primär-Antiserum und Cy3-donkey anti-mouse IgG als sekundärem Antikörper (rot), Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau).

B: Nachweis der P2X₂-Rezeptor Expression durch Markierung mit rabbit anti-P2X₂ als Primär-Antiserum (1:1000) und Alexa-488 goat anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (grün), Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Der Pfeil kennzeichnet einen P2X₂-immunpositiven Astrocyten.

C und D: Coronaler Gehirnschnitt auf der Ebene des dMnPO/vMnPO

Identifizierung zahlreicher, kleinzelliger Neurone in coronalen Gehirnschnitten (40µm) nach der „free-floating“ Technik durch Markierung mit rabbit anti-P2X₂ als Primär-Antiserum (1:1000) und Alexa-488 goat anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (grün).

Abkürzungen: ac = *Commissura anterior*, dMnPO = dorsaler MnPO, vMnPO = ventraler MnPO, V III = dritter Ventrikel

(Eichbalken repräsentieren 20µm in A,C = 20 µm und 50µm in B, D)

beschränkt. Wie schon für den Gehirnschnitt geschildert, konnten ebenfalls einzelne Astrocyten als P2X₂-immunpositiv markiert werden (Abb. 45; A ,B). Die Negativkontrollen in Abwesenheit des jeweiligen Primär-Antiserums/Antikörpers bzw. nach Prä-Inkubation des P2X₂-spezifischen Primär-Antiserums mit reinem, synthetischen Antigen zeigten keine Immunreaktion (nicht gezeigt).

3.3.3. Expression des P2X₄-Purinozeptors

Die Expression des P2X₄-Rezeptors auf Proteinebene stellt sich stark gefäßassoziiert und sehr moderat dar (Abb. 46). Vereinzelt sind Zellen im MnPO markiert. Eine Co-Lokalisation mit neuronalen und glialen Markerproteinen erfolgte mittels Mehrfachmarkierung (Kapitel 2.4.4.3) an Präparaten der primären Zellkultur. Sowohl Neurone, als auch Astrocyten und Oligodendrocyten zeigten keine positiven Signale. Der P2X₄-Rezeptor wird nur in Mikroglia exprimiert (Abb. 47). Das Signal des P2X₄-Rezeptors ist eindeutig im Zytoplasma dieses Zelltyps lokalisiert. Dieser Befund stellt einen wichtigen Teilaspekt für die noch folgenden Versuche (siehe Kapitel 3.4) dar und wird in der Diskussion erläutert.

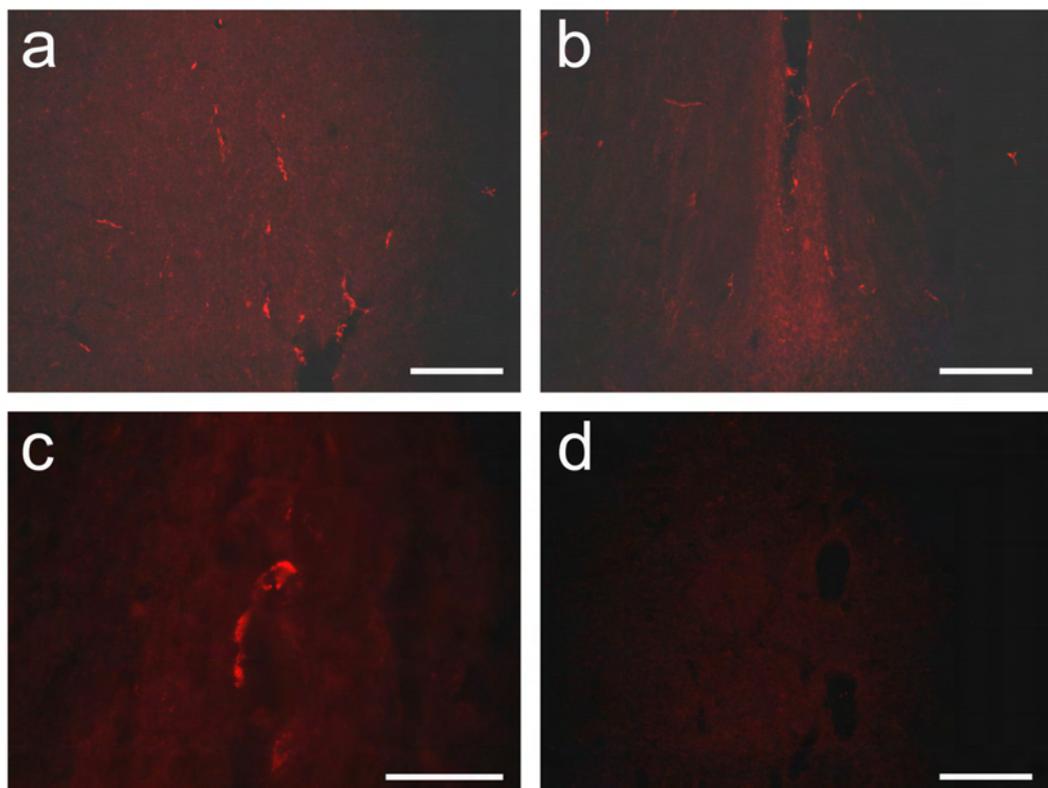


Abbildung 46: Immunhistochemischer Nachweis des P2X₄-Rezeptors im MnPO

- a:** Nachweis der P2X₄-Rezeptor Expression im Bereich des aMnPO mit rabbit anti-P2X₄ als Primär-Antiserum und Cy3 donkey anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (rot) (Eichbalken 25µm)
- b:** P2X₄-immunpositive Zellen im Bereich des dMnPO (Eichbalken 25µm)
- c:** Immunfluoreszenz-Darstellung einer einzelnen P2X₄-positiven Zelle aus dem Bereich des dMnPO (Eichbalken: 25µm)
- d:** Negativkontrolle im Bereich des aMnPO durch Prä-Adsorption des primären P2X₄-Antiserums mit Antigen
(Eichbalken repräsentiert 25µm in **a**, **b** und **c** sowie 100µm in **d**)

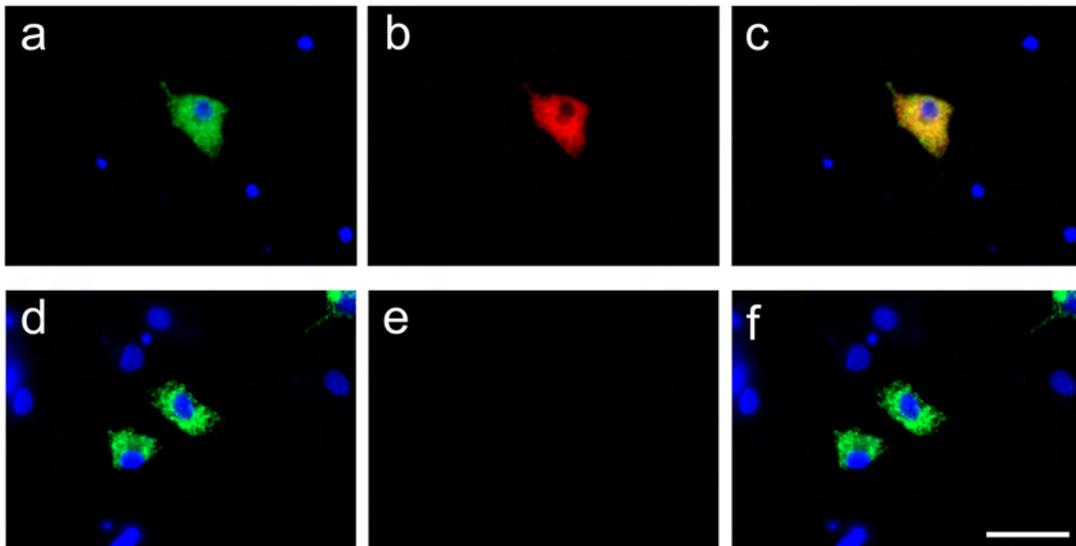


Abbildung 47: Immunocytochemischer Nachweis des P2X₄-Rezeptors in Mikroglia der Primärzellkultur des MnPO

- a:** Immunreaktive Mikrogliazelle durch Markierung mit mouse anti-ratCD163 als Primär-Antiserum und Alexa-488 goat anti-mouse IgG als sekundärem Antikörper
- b:** Nachweis der P2X₄-Rezeptor Expression mit rabbit anti-P2X₄ als Primär-Antiserum und Cy3 donkey anti-rabbit IgG als sekundärem Antikörper (rot).
- c:** Überlagerung von a und b
- d-f:** Negativkontrolle durch Prä-Adsorption des primären P2X₄-Antiserums mit Antigen

(Eichbalken in f repräsentiert 25µm)

3.3.4. Abschließende Betrachtung

Der Versuch des Immunhisto- bzw. cytochemischen Nachweises erfolgte für alle Subtypen purinergere P2X-Rezeptoren. Für P2X₃ sowie P2X₅, P2X₆ und P2X₇ konnte sowohl im Schnitt als auch in der primären Zellkultur kein sicheres Ergebnis erzielt werden.

3.4. Auswirkung von Agonisten und Antagonisten an purinergen Rezeptoren auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

3.4.1. ATP und 2Me-SATP induzieren die Freisetzung von TNF- α

Entsprechend des in Kapitel 2.4.5.2 beschriebenen Versuchsansatzes wurden die Zellen der Primärkultur des MnPO für sechs Std mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATP (jeweils $n = 6$ Zellpräparationen) bzw. 2Me-SATP (jeweils $n = 4$ Zellpräparationen) stimuliert (3×10^{-5} M/L, 10^{-4} M/L, 3×10^{-4} M/L, 10^{-3} M/L, 3×10^{-3} M/L). Sowohl ATP als auch 2Me-SATP induzierten dosisabhängig eine Abgabe von bioaktivem TNF- α in das Zellkulturmedium. Die Mittelwerte der einzelnen Stimulationen befinden sich in Tabelle 9, eine graphische Darstellung der ermittelten TNF- α zeigt Abb. 48 als Mittelwerte \pm S.E.M (I: ATP; II: 2Me-SATP). Die statistische Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung für ATP zeigt signifikante Unterschiede zwischen den TNF- α -Werten des Kontrollstimulus verglichen mit 10^{-3} M/L sowie 3×10^{-3} M/L ATP ($P \leq 0,001$) und zwischen den ermittelten Konzentrationen an TNF- α die durch 3×10^{-5} M/L ATP induziert wurden verglichen mit den Werten durch 10^{-3} M/L ($P \leq 0,01$) sowie 3×10^{-3} M/L ATP ($P \leq 0,001$). Steigende Konzentrationen an 2Me-SATP induzieren ebenfalls die Abgabe von TNF- α in den Überstand der primären Zellkultur, jedoch weisen die hier ermittelten Daten eine sehr breite Streuung auf, so dass die Auswertung keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigte.

Tabelle 9: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem TNF- α (arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M) nach Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit ATP und 2Me-SATP für sechs Std

	TNF- α (pg/ml) Stimulation mit ATP	TNF- α (pg/ml) Stimulation mit 2Me-SATP
Kontrolle	66,2 \pm 32,1	256,5 \pm 46,1
3×10^{-5} M/L	116,3 \pm 69,8	275,8 \pm 103,5
10^{-4} M/L	549,2 \pm 137,1	335,8 \pm 72,0
3×10^{-4} M/L	696,2 \pm 100,3	476,8 \pm 115,2
10^{-3} M/L	1077,0 \pm 191,9	555,5 \pm 172,0
3×10^{-3} M/L	1210,0 \pm 247,8	689,0 \pm 275,2

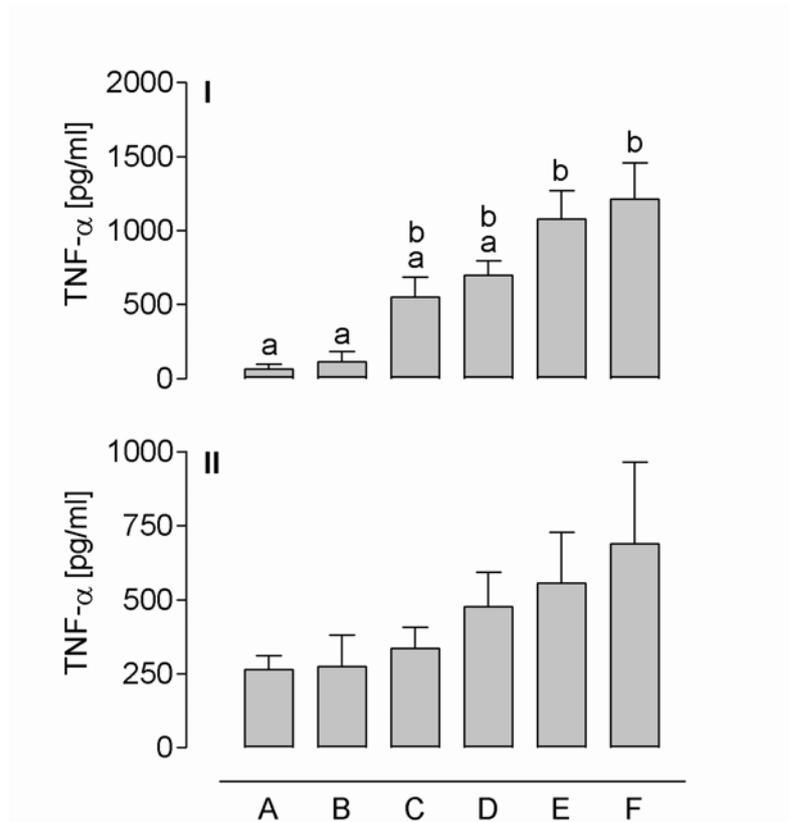


Abbildung 48: TNF- α -Konzentration nach Stimulation der Primärzellkultur mit ATP (I) und 2Me-SATP (II) für 6 Std

- I:** ATP induziert dosisabhängig eine Freisetzung von TNF- α ; A: Kontrolle; B: 3×10^{-5} M/L; C: 10^{-4} M/L; D: 3×10^{-4} M/L; E: 10^{-3} M/L; F: 3×10^{-3} M/L; unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen (A verglichen mit E und F $P \leq 0,001$; B verglichen mit E $P \leq 0,01$, B verglichen mit F $P \leq 0,001$). Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.
- II:** 2Me-SATP induziert dosisabhängig eine Freisetzung von TNF- α ; A: Kontrolle; B: 3×10^{-5} M/L; C: 10^{-4} M/L; D: 3×10^{-4} M/L; E: 10^{-3} M/L; F: 3×10^{-3} M/L; es waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($P > 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

3.4.2. ATP induziert zeitabhängig eine Freisetzung von TNF- α

Die Stimulation der Primärzellkultur erfolgte für 1,5 Std, 3 Std, 6 Std und 12 Std mit jeweils 10^{-3} M/L ATP ($n = 5$). Für jeden Zeitpunkt wurde eine Kontrolle in Form eines einfachen Mediumwechsels angefertigt. Ein signifikanter Anstieg der TNF- α -Konzentrationen war nach sechs Std zu verzeichnen. Ein längerer Inkubationszeitraum (12 Std) führte zu keinem weiteren Anstieg, sondern wieder zu einem Abfall, möglicherweise bedingt durch eine fortgeschrittene extrazelluläre Hydrolyse des ATP. Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (K) und dem jeweils zeitpunktzugehörigen Stimulus (K 6 verglichen mit ATP 6 $P \leq 0,001$ und K 12 verglichen mit ATP 12 $P \leq 0,05$). Die Mittelwerte der einzelnen

Stimulationen befinden sich in Tabelle 10, eine graphische Darstellung der TNF- α -Werte zeigt Abb. 49 als Mittelwerte \pm S.E.M.

Tabelle 10: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem TNF- α (arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M) nach zeitabhängiger Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit ATP (10^{-3} M/L)

	TNF- α (pg/ml) Kontrolle	TNF- α (pg/ml) Stimulation mit ATP
1,5 Std	n.d.	362,0 \pm 47,5
3,0 Std	77,0 \pm 44,0	326,5 \pm 66,2
6,0 Std	66,2 \pm 32,1	1077,0 \pm 191,9
12,0 Std	163,2 \pm 70,9	637,8 \pm 124,4

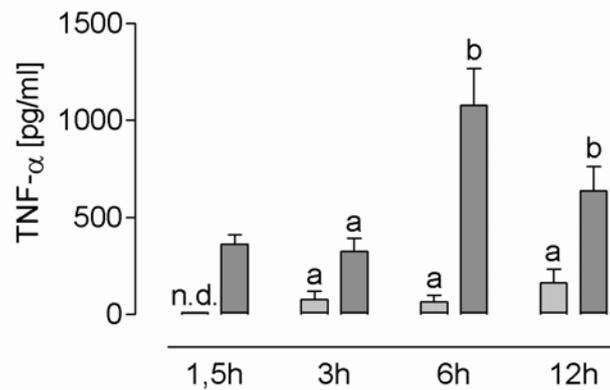


Abbildung 49: TNF- α -Werte infolge zeitabhängiger Stimulation der Primärzellkultur mit ATP (10^{-3} M/L)

Die Stimulation erfolgte in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitrahmen. Hellgraue Säulen bezeichnen die Werte der Kontrollen, dunkelgraue die Konzentrationen an TNF- α infolge einer Stimulation mit ATP. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem Stimulus zu den jeweiligen Zeitpunkten (6h $P \leq 0,001$; 12h $P \leq 0,05$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt.

3.4.3. PPADS und TNP-ATP hemmen die durch LPS induzierte Freisetzung von TNF- α

Die einzelnen primärkulturhaltigen Zellkulturkammern (jeweils $n = 7$) wurden für 1,5 Std mit PPADS (10^{-5} M/L), TNP-ATP (10^{-5} M/L), ATP (10^{-3} M/L), LPS (100 μ g/ml), PPADS (10^{-5} M/L) und LPS (100 μ g/ml) sowie TNP-ATP (10^{-5} M/L) und LPS stimuliert. In den Ansätzen mit PPADS und LPS sowie TNP-ATP und LPS erfolgte eine Vorinkubation des Antagonisten für 0,5 Std. Als Kontrolle dienten $n = 7$ Primärkulturen, bei denen ein

einfacher Mediumwechsel vorgenommen wurde. Die gemeinsame Inkubation von PPADS und LPS führte zwar zu einer niedrigen Freisetzung von bioaktivem TNF- α , verglichen mit dem Stimulationsansatz mit LPS *per se*, die statistische Auswertung zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) (siehe Abb. 50; I; D und E). TNP-ATP hingegen war in der Lage die durch LPS induzierte TNF- α -Freisetzung signifikant zu inhibieren ($P \leq 0,05$) (siehe Abb. 50; II; D und E). Das führt zu der These, dass es infolge einer LPS-Inkubation neben einer Freisetzung an TNF- α , sekundär zu einer ATP-Freisetzung kommt, welche positiv rückkoppelnde Effekte auf die TNF- α -Abgabe ins Zellkulturmedium haben könnte. Die Mittelwerte der einzelnen Stimulationen befinden sich in Tabelle 11, eine graphische Darstellung der TNF- α -Werte zeigt Abb. 50 als Mittelwerte \pm S.E.M. Weiterhin zeigte die statistische Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den TNF- α -Konzentrationen induziert durch LPS verglichen mit denen durch PPADS, TNP-ATP sowie ATP ($P \leq 0,001$).

Tabelle 11: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem TNF- α (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) nach Stimulation der Primärzellkultur des MnPO für 1,5 Std mit PPADS (10^{-5} M/L), TNP-ATP (10^{-5} M/L), ATP (10^{-3} M/L), LPS (100 μ g/ml), LPS und PPADS bzw. TNP-ATP sowie dem unstimulierten Kontrollansatz

	TNF- α (pg/ml) Stimulation für 1,5 Std
Kontrolle	n.d.
PPADS (10^{-5} M/L)	267,1 \pm 106,2
TNP-ATP(10^{-5} M/L)	84,3 \pm 51,7
ATP (10^{-3} M/L)	362,0 \pm 47,5
LPS (100 μ g/ml)	7148,7 \pm 1887,2
LPS + PPADS	3635,6 \pm 629,5
LPS + TNP-ATP	2723,0 \pm 290,4

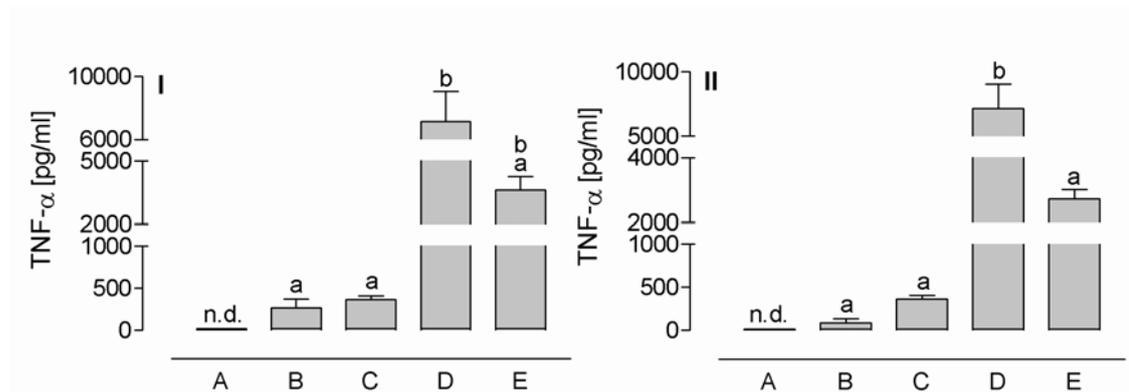


Abbildung 50: Micromolare PPADS- und TNP-ATP-Konzentrationen attenuieren die durch LPS bedingte Freisetzung von TNF-α

I: A: Kontrolle; B: PPADS 10⁻⁵ M/L; C: ATP 10⁻³ M/L; D: LPS 100 μg/ml; E: PPADS 10⁻⁵ M/L + LPS 100 μg/ml.

II: A: Kontrolle; B: TNP-ATP 10⁻⁵ M/L; C: ATP 10⁻³ M/L; D: LPS 100 μg/ml; E: TNP-ATP 10⁻⁵ M/L + LPS 100 μg/ml.

Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen (siehe Text). Die Daten sind als Mittelwert ± S.E.M dargestellt.

3.4.4. ATP und 2Me-SATP induzieren die Freisetzung von IL-6

Die in Kapitel 3.4.1 erwähnten Stimulationsansätze wurden ebenfalls auf ihren Gehalt an IL-6 untersucht. Sowohl ATP als auch 2Me-SATP induzierten dosisabhängig eine Abgabe von bioaktivem IL-6 in den Überstand der primären Zellkultur. Die Mittelwerte der einzelnen Stimulationen befinden sich in Tabelle 12, eine graphische Darstellung der ermittelten IL-6 Werte zeigt Abb. 51 als Mittelwert ± S.E.M (I: ATP; II: 2Me-SATP). Die statistische Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung für ATP zeigt signifikante Unterschiede zwischen den IL-6-Werten des Kontrollstimulus verglichen mit 10⁻³ M/L ($P \leq 0,05$) sowie 3x10⁻³ M/L ATP ($P \leq 0,01$) und zwischen den ermittelten Konzentrationen an IL-6 die durch 3x10⁻⁵ M/L ATP induziert wurden verglichen mit den Werten durch 10⁻³ M/L ($P \leq 0,05$) sowie 3x10⁻³ M/L ATP ($P \leq 0,01$). Steigende Konzentrationen an 2Me-SATP induzieren ebenfalls die Abgabe von IL-6 in das Nährmedium der primären Zellkultur, jedoch ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung jedoch nicht so deutlich im direkten Vergleich zu den Stimulationsansätzen mit ATP. Die Stimulation mit 10⁻³ M/L 2Me-SATP induziert die höchste Freisetzung an IL-6, eine höhere 2Me-SATP-Konzentration (3x10⁻³ M/L) führt nicht zu einem weiteren Anstieg der IL-6 Werte, im Gegenteil, die Konzentration an IL-6 fällt wieder ab und 3x10⁻³ M/L 2Me-SATP erweist sich gegenüber 3x10⁻⁴ M/L 2Me-SATP als nahezu equipotent. Die

hier ermittelten IL-6 Konzentrationen weisen eine sehr breite Streuung auf, so dass die Auswertung keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigte.

Tabelle 12: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem IL-6 (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) nach Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit ATP und 2Me-SATP für sechs Std

	<u>IL-6 (IU/ml)</u> <u>Stimulation mit</u> <u>ATP</u>	<u>IL-6 (IU/ml)</u> <u>Stimulation mit</u> <u>2Me-SATP</u>
Kontrolle	66,7 \pm 9,6	25,3 \pm 14,5
3x10 ⁻⁵ M/L	63,2 \pm 8,9	56,3 \pm 24,7
10 ⁻⁴ M/L	109,7 \pm 27,4	44,0 \pm 19,1
3x10 ⁻⁴ M/L	142,7 \pm 18,4	80,8 \pm 28,1
10 ⁻³ M/L	210,0 \pm 35,9	187,8 \pm 98,4
3x10 ⁻³ M/L	234,2 \pm 51,4	87,5 \pm 12,1

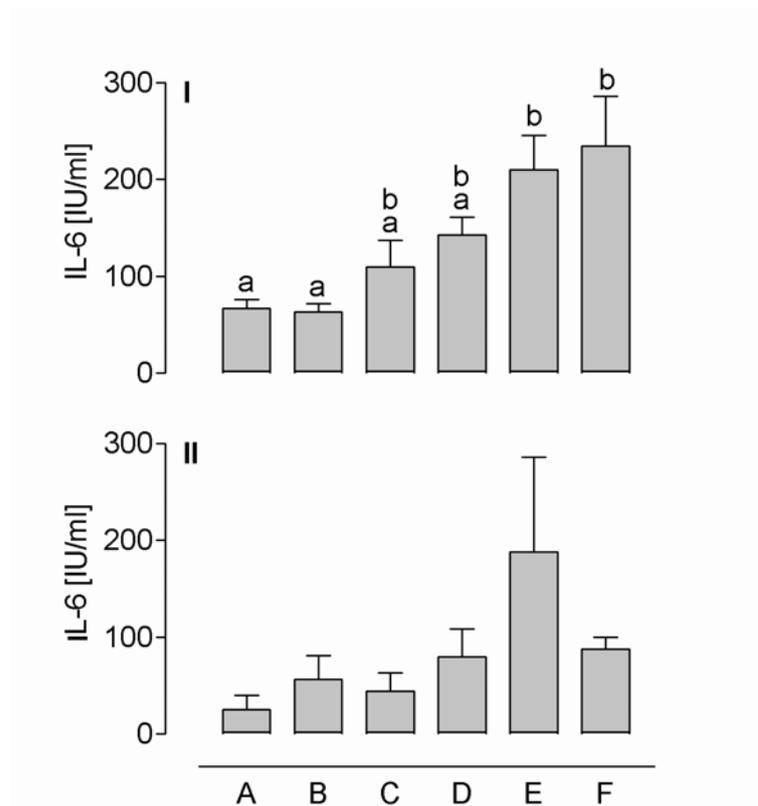


Abbildung 51: IL-6-Konzentration nach Stimulation der Primärzellkultur mit ATP (I) und 2Me-SATP (II) für 6 Std

- I:** ATP induziert dosisabhängig eine Freisetzung von IL-6; A: Kontrolle; B: 3×10^{-5} M/L; C: 10^{-4} M/L; D: 3×10^{-4} M/L; E: 10^{-3} M/L; F: 3×10^{-3} M/L; unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen (A und B verglichen mit E $P \leq 0,05$; A und B verglichen mit F $P \leq 0,01$). Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.
- II:** 2Me-SATP induziert dosisabhängig eine Freisetzung von TNF- α ; A: Kontrolle; B: 3×10^{-5} M/L; C: 10^{-4} M/L; D: 3×10^{-4} M/L; E: 10^{-3} M/L; F: 3×10^{-3} M/L; es waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($P > 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

3.4.5. ATP induziert zeitabhängig eine Freisetzung von IL-6

Die unter Kapitel 3.4.2 beschriebenen Mediumüberstände der Primärzellkultur wurden zusätzlich auf eine Freisetzung von bioaktivem IL-6 untersucht. Bereits nach 1,5 Std war eine deutliche Erhöhung der IL-6-Werte nach Stimulation mit ATP (10^{-3} M/L) im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen ($P \leq 0,001$). Eine Verdoppelung (drei Std) des Inkubationszeitraumes führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Werte im Vergleich zur zeitpunktzugehörigen Kontrolle (K 3 verglichen mit ATP 3 $P \leq 0,01$). Eine sechsstündige Inkubation mit ATP resultierte zwar tendenziell in höheren IL-6 Konzentrationen gegenüber den unstimulierten Kontrollkulturen, jedoch unterschieden

sich die Werte statistisch nicht signifikant voneinander. Die IL-6 Werte der drei beschriebenen Stimulationszeitpunkte (1,5, 3 und 6 Std) zeigen tendenziell einen leichten Abfall. Nach 12 Std hingegen waren die höchsten Konzentrationen an bioaktivem IL-6 zu verzeichnen, was auf eine verzögerte Freisetzung infolge vorgeschalteter Signalkaskaden und/oder Freisetzung primärer Botenstoffe hinweist (siehe Kapitel 4). Die Mittelwerte der einzelnen Stimulationen befinden sich in Tabelle 13, eine graphische Darstellung der TNF- α -Werte zeigt Abb. 52 als Mittelwerte \pm S.E.M.

Tabelle 13: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem IL-6 (arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M) nach zeitabhängiger Stimulation der Primärzellkultur des MnPO mit ATP (10^{-3} M/L)

	IL-6 (IU/ml) Kontrolle	IL-6 (IU/ml) Stimulation mit ATP
1,5 Std	54,4 \pm 14,3	300,3 \pm 55,6
3,0 Std	46,0 \pm 6,7	266,0 \pm 32,7
6,0 Std	66,7 \pm 9,6	210,0 \pm 35,9
12,0 Std	56,2 \pm 17,5	490,8 \pm 55,6

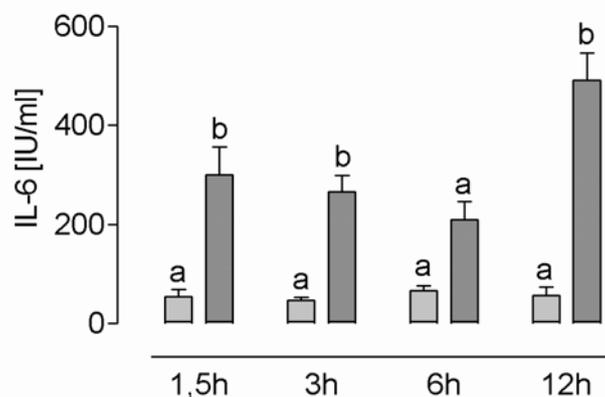


Abbildung 52: IL-6 Werte infolge zeitabhängiger Stimulation der Primärzellkultur mit ATP (10^{-3} M/L)

Die Stimulation erfolgte in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitrahmen. Hellgraue Säulen bezeichnen die Werte der Kontrollen, dunklegraue die Konzentrationen an IL-6 infolge einer Stimulation mit ATP. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem Stimulus zu den jeweiligen Zeitpunkten (1,5h $P \leq 0,001$; 3h $P \leq 0,01$; 12h $P \leq 0,001$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt.

3.4.6. PPADS und TNP-ATP hemmen die durch LPS induzierte Freisetzung von IL-6

Die unter Abschnitt 3.4.3 auf eine Freisetzung von TNF- α untersuchten Überstände der stimulierten Primärzellkulturen wurden ebenfalls auf ihren Gehalt an IL-6 analysiert. Die gemeinsame Inkubation von PPADS und LPS führte zwar zu einer um 39,5 % niedrigeren Freisetzung von bioaktivem IL-6, verglichen mit dem Stimulationsansatz mit LPS *per se*, die statistische Auswertung zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) (siehe Abb. 53; I; D und E). TNP-ATP hingegen war in der Lage die durch LPS induzierte IL-6-Freisetzung signifikant ($P \leq 0,05$) und um 59,4 % zu inhibieren (siehe Abb. 53; II; D und E). Die Mittelwerte der einzelnen Stimulationen befinden sich in Tabelle 14, eine graphische Darstellung der des gesamten Versuchsansatzes zeigt Abb. 53 als Mittelwert \pm S.E.M. Weiterhin zeigte die statistische Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den IL-6-Konzentrationen induziert durch LPS verglichen mit denen durch PPADS, TNP-ATP, den unstimulierten Kontrollansätzen ($P \leq 0,001$) sowie denen infolge einer Inkubation der Primärzellkulturen mit ATP gemessenen IL-6-Werten im Überstand ($P \leq 0,001$).

Tabelle 14: Durchschnittliche Konzentrationen an bioaktivem IL-6 (arithmetischer Mittelwert \pm S.E.M) nach Stimulation der Primärzellkultur des MnPO für 1,5 Std mit PPADS (10^{-5} M/l), TNP-ATP (10^{-5} M/l), ATP (10^{-3} M/l), LPS (100 μ g/ml), LPS und PPADS bzw. TNP-ATP sowie dem unstimulierten Kontrollansatz

	IL-6 (IU/ml) Stimulation für 1,5 Std
Kontrolle	54,4 \pm 14,3
PPADS (10^{-5} M/l)	74,6 \pm 28,7
TNP-ATP (10^{-5} M/l)	58,3 \pm 10,9
ATP (10^{-3} M/l)	300,3 \pm 55,6
LPS (100 μ g/ml)	2230,7 \pm 522,7
LPS + PPADS	1348,9 \pm 519,9
LPS + TNP-ATP	904,6 \pm 405,9

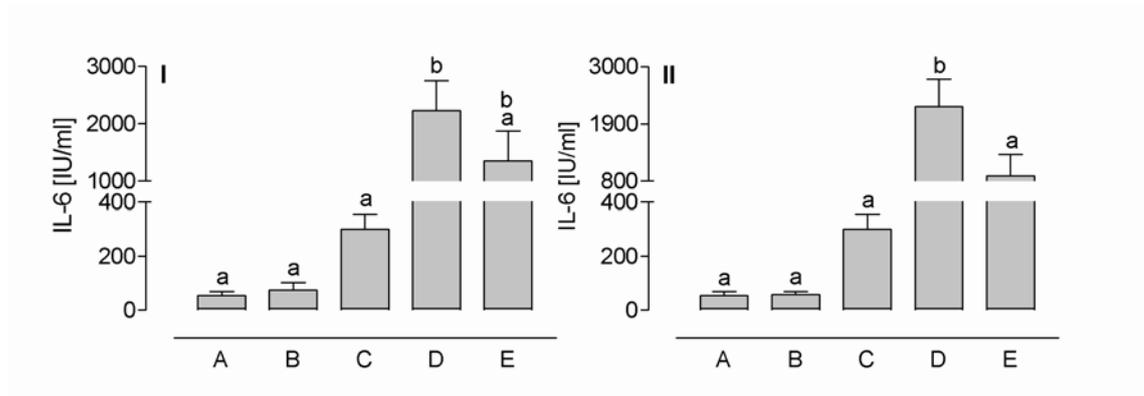


Abbildung 53: Micromolare PPADS- und TNP-ATP-Konzentrationen attenuieren die durch LPS bedingte Freisetzung von IL-6

I: A: Kontrolle; B: PPADS 10^{-5} M/L; C: ATP 10^{-3} M/L; D: LPS $100\mu\text{g/ml}$; E: PPADS 10^{-5} M/L + LPS $100\mu\text{g/ml}$.

II: A: Kontrolle; B: TNP-ATP 10^{-5} M/L; C: ATP 10^{-3} M/L; D: LPS $100\mu\text{g/ml}$; E: TNP-ATP 10^{-5} M/L + LPS $100\mu\text{g/ml}$.

Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen (siehe Text). Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M dargestellt.

4. Diskussion

Der *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO) spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen der Aufrechterhaltung wichtiger Lebensfunktionen und dient der Integration afferenter Signale peripherer und zentraler Thermosensoren zur Konstanzhaltung der Körperkerntemperatur (Gerstberger et al. 2001, Lazarus et al. 2007) sowie Osmo- und Dehnungssensoren für die Homöostase des Extrazellularraumes hinsichtlich Tonizität und Volumen (McAllen et al. 1990, McKinley et al. 2004). Zudem ist er integraler Bestandteil des neuroglialen Systems zur Regulation des Schlaf-/Wachverhaltens (Gong et al. 2000, 2005) und in geringerem Maße auch an der hypothalamischen Steuerung der Nahrungsaufnahme beteiligt (Briski and Sylvester 1999). Erste Hinweise auf die Existenz ionotroper purinerner Rezeptoren (P2X₂, P2X₄ und P2X₆) in unmittelbarer Nähe zum MnPO der Ratte stammen aus *in situ* Hybridisierungsstudien sowie immunhistochemischen Untersuchungen an Gehirnschnitten drei Wochen alter Tiere (Collo et al. 1996; Xiang et al. 1998b). Der Nachweis purinerner Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im Bereich des Diencephalon wirft die Frage nach der funktionellen Expression purinerner Rezeptoren in den neuroglialen Komponenten des MnPO sowie deren Beteiligung an den vorgestellten Regulationsmechanismen des Hypothalamus auf.

4.1. Charakterisierung purinerner Rezeptoren im MnPO

Unter Berücksichtigung der erhobenen Daten aus molekularbiologischen, immunhisto- und -cytochemischen sowie mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen soll nachfolgend die differentielle Expression ionotrop und eingeschränkt metabotrop purinerner Rezeptor-Subtypen in Neuronen und Gliazellen des MnPO diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression aller bekannten P2X-Purinozeptoren sowohl im MnPO neonataler als auch adulter Wistar - Ratten auf mRNA Ebene demonstriert werden. Die Ergebnisse der QRT-PCR für MnPO-Gewebe neonataler und adulter Ratten erlaubten jedoch keine Differenzierung der Purinozeptor-Expression bezüglich der verschiedenen Zelltypen des MnPO, und ein Nachweis für die neurogliale Primärkultur des MnPO konnte aus technischen Gründen nicht erarbeitet werden. Dabei traten deutliche Unterschiede hinsichtlich der indirekt nachgewiesenen mRNA Menge für die sieben Rezeptor-Subtypen auf, bezogen auf den jeweils am niedrigsten exprimierten Rezeptor-Subtyp. Für den MnPO adulter Tiere galt: P2X₄ > P2X₇ > P2X₂ > P2X₃ = P2X₅ = P2X₆ > P2X₁. Im MnPO neonataler Tiere gestaltete sich die quantitative Erfassung der Expressionsmuster wie folgt: P2X₂ > P2X₄ > P2X₇ > P2X₆ >> P2X₁ = P2X₃ > P2X₅, wobei ontogenetische Veränderungen als eine der wichtigsten Ursachen nahe

liegen. Molekularbiologisch konnte eine „down“-Regulation der mRNAs für P2X₂ und P2X₃ im *Nucleus ambiguus* des Hirnstammes von juvenilen, verglichen mit neonatalen Ratten festgestellt werden (Brosenitsch et al. 2005). Am dritten postnatalen Tag (P3) waren in Purkinje-Zellen des *Cerebellum* der Ratte alle P2X-Rezeptoren (außer P2X₃) exprimiert (Xiang and Burnstock 2005b). Am Tag P7 war immunhistochemisch eine relative „up“-Regulation von P2X₅ und P2X₆ festzustellen.

Allgemein gilt bislang für das Gehirn der Ratte, dass P2X₃-Purinozeptoren schon während früher ontogenetischer Entwicklungsstadien (embryonaler Tag 11 = E11) exprimiert werden, mit markanter Reduktion im adulten Stadium. Die Subtypen P2X₂ und P2X₇ werden an E14 erstmals synthetisiert, wohingegen P2X₄, P2X₅ und P2X₆ erst in postnatalen Stadien zur Expression kommen. Hinsichtlich der ontogenetischen Entwicklung zentralnervöser P2X₁ Expression liegen keine gesicherten Nachweise vor (Cheung et al. 2005). Das für den MnPO erhobene Expressionsmuster ionotroper purinergere Rezeptoren stimmt hinreichend mit den in der Literatur beschriebenen Befunden für andere neurogliale Strukturen bzw. das gesamte ZNS überein. Die hohe Expressionsrate von P2X₂ im MnPO neonataler Tiere verschiebt sich im MnPO adulter Ratten zugunsten des P2X₄-Rezeptor-Subtyps, für den ein vermehrtes Auftreten im ZNS erst ab dem postnatalen Stadium beschrieben ist (Cheung et al. 2005). Die gering ausgeprägte Expression von P2X₅ und P2X₆ im MnPO geht ebenfalls konform mit den Daten von Cheung und Mitarbeitern, da deren Expression erst ab P7 beschrieben ist.

Darüber hinaus werden P2X₅ und P2X₆ auch bei adulten Tieren nur geringfügig bis moderat im ZNS exprimiert, eventuell zurückführbar auf Prozesse der „down“-Regulation. Der vor allem im peripher-sensorischen System (Spinalganglien) beschriebene P2X₃-Purinozeptor fand sich sowohl im neonatalen als auch adulten Stadium als lediglich marginal bis moderat im MnPO exprimiert, was sich mit den Daten in der Literatur deckt. So wird dem P2X₃ vor allem eine Rolle in der embryonalen Neurogenese des ZNS und PNS zugeschrieben, einhergehend mit einer „down“-Regulation schon in der neonatalen, vor allem aber adulten Lebensphase von Ratte und Maus (Boldogkoi et al. 2002, Cheung et al. 2005, Burnstock 2007a). Diese Daten beziehen sich jedoch nur auf neuronale Zellkomponenten des ZNS (und PNS).

Die Ontogenese purinergere Rezeptoren in Astrocyten, Oligodendrocyten und Mikroglia wurde nicht berücksichtigt. Über die Expression purinergere Rezeptoren in Gliazellen während der späten embryonalen und frühen postnatalen Phase, wenn mikrogliale Vorläuferzellen in das sich entwickelnde ZNS diapedieren, war *dato* ebenfalls nur

wenig Information erhältlich (Perry et al. 1985, Perry and Gordon 1988; Ashwell 1991, Milligan et al. 1991). Xiang et al. (2005a, b) zeigten erstmals mittels RT-PCR und Immunhisto- bzw. -cytochemie, dass Mikrogliazellen des *Cortex cerebri* von Ratten ab dem Embryonaltag E13 die Purinozeptoren P2X₁, P2X₄ und P2X₇ exprimierten, wobei P2X₁ und P2X₄ von allen ED-1 immunpositiven, P2X₇ hingegen nur von 30 % der ED-1 immunpositiven Mikrogliazellen synthetisiert wurden (Xiang and Burnstock 2005a). Ab dem Tag P30 waren keine P2X₁-positiven Mikroglia mehr zu verzeichnen, und die P2X₇-positiven Zellen ließen nur noch eine Co-Lokalisation mit Isolectin B4 zu, einem mikroglialen Marker, der eine Unterscheidung in ruhende und aktivierte Zellen nicht ermöglicht (Perry and Gordon 1988, Yagi et al. 1999, Streit 2002). Eine Co-Lokalisation mit ED-1 als spezifischem Antigen für aktivierte Mikroglia (Domaradzka-Pytel et al. 2000, Zhang et al. 2005) war im Subarachnoidalraum und vasculär-assoziiert für P2X₄-positive Zellen festzustellen. Diese Ergebnisse decken sich zum einen mit dem hohen Vorkommen von P2X₄ (und nachfolgend P2X₇) auf mRNA Ebene sowohl im MnPO adulter als auch neonataler Tiere, zum anderen mit den immuncyto- und histochemischen Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von P2X₄ in der vorliegenden Arbeit (siehe Kap. 3.3.3). Über die Expression von P2X-Rezeptoren in Astrocyten und Oligodendrocyten während der Ontogenese liegen *dato* keine Nachweise vor.

Die Pharmakologie der P2X-Rezeptorfamilie erwies und erweist sich als äußerst komplex, bei publizierter Präsenz einer Myriade an mehr oder weniger spezifischen Antagonisten und vor allem Agonisten (Ralevic and Burnstock 1998, North 2002, King and Townsend-Nicholson 2003, Gever et al. 2006, Alexander et al 2008). Die funktionelle Charakterisierung bezieht sich auf rekombinant in verschiedenen Zelllinien oder anderen biologischen Systemen exprimierte Rezeptorproteine, sowie auf in etablierten Zelllinien meist muriner oder humaner Herkunft nachweisbare Purinozeptoren (King and Townsend-Nicholson 2003; Burnstock 2007). Ob sich diese pharmakologische Klassifikation auf native Zellen und Gewebe oder gar den Gesamtorganismus übertragen lässt, ist in der heutigen Zeit Gegenstand intensiver Forschung an Purinozeptoren. Aufgrund der zum Teil unterschiedlichen Zelltyp-spezifischen Reaktionen auf die Applikation der verwendeten Agonisten und Antagonisten wird die P2X Expression in Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten im Folgenden gesondert betrachtet.

4.1.1. Neurone

Immunhistochemie am coronalen Gehirnschnitt sowie Immuncytochemie in der MnPO-Primärkultur erbrachten den Nachweis der P2X₁- und P2X₂- Purinozeptor Expression

im Bereich des MnPO bzw. in der MnPO-Primärkultur durch den Einsatz polyklonaler, Subtyp-spezifischer Antiseren. P2X₃ – P2X₇ Purinozeptorproteine konnten nicht detektiert werden, wobei ein negatives Ergebnis in der Immunhisto- bzw. cytochemie ohne große Aussagekraft ist (Harlow and Lane 1988). Mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben erste Hinweise auf die funktionelle Expression von P2X-Rezeptoren in Neuronen des MnPO. Die Musteranalyse der intrazellulären Calciumsignale hatte als Ergebnis, dass etwa 70 % der MnPO-intrinsischen Neurone während Applikation der Agonisten ATP oder Me-SATP nach kurzer lag-Phase mit einem raschen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten, mit nachfolgend kleinen Ratio-Oszillationen auf hohem Niveau. Erst nach beendeter Stimulation, also ohne Desensibilisierungseffekte, wurde das Calciumsignal auf sein Ausgangsniveau zellulär zurückgeführt (Kap. 3.2.7). Diese Art der Kinetik ist typisch für in HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*) und/oder *Xenopus* Oocyten rekombinant exprimierte P2X₂-, P2X₄- oder P2X₅-Rezeptoren, demonstriert durch elektrophysiologische Untersuchungen (*whole-cell patch clamp* oder *outside-out patch* Studien) (Bo et al. 1995, Buell et al. 1996, Ding and Sachs 1999, Haines et al. 1999). P2X₂ scheint zudem den am weitesten verbreiteten ionotropen Purinozeptor in hypothalamischen Neuronen zu repräsentieren. So konnte seine Expression in Neuronen des DMH (Matsumoto et al. 2004), des ARC (Wakamori and Sorimachi 2004), des VMH (Sorimachi et al. 2001) und des LH (Wollmann et al. 2005) sowie neurohypophysären Axonen des PVN/SON (Troade et al. 1998, Loesch et al. 1999) immunhistochemisch nachgewiesen, bzw. aufgrund elektrophysiologischer und/oder mikrospektrofluorimetrischer Untersuchungen im Vergleich mit den Charakteristika rekombinant exprimierter P2X₂-Rezeptoren postuliert werden.

ATP und seine Analoga ATP- γ -S und 2Me-SATP repräsentieren mit EC₅₀ Werten von 5,1 – 6,3 die potentesten Agonisten an rekombinant exprimierten P2X₂-Rezeptoren (Evans et al. 1995, Bianchi et al. 1999, Lynch et al. 1999). Bz-ATP erweist sich als wenig potent (Evans et al. 1995); α,β me-ATP, β,γ me-ATP sowie ADP und UTP sind in Konzentrationen unter 100 – 300 μ M/L inaktiv an P2X₂-Purinozeptoren (Brake et al. 1994, Evans et al. 1995, Bianchi et al. 1999). Diese Daten stimmen mit den erhobenen Befunden an Neuronen des MnPO überein. Im ersten Versuchsansatz konnte die Äquipotenz von ATP und 2Me-SATP hinsichtlich der Generierung eines intrazellulären Calciumsignals aufgezeigt werden. Superfusions-Stimulationen sowohl mit α,β me-ATP als auch Bz-ATP in Konzentrationen von 10⁻⁶ M/L hatten keinen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge (vergleiche Kap. 3.2.2). Die Insensitivität der MnPO Neurone auf eine Applikation von α,β me-ATP spricht gegen eine funktionelle Expression von P2X₁- und P2X₃-

Rezeptoren in MnPO-Neuronen. An diesen beiden Rezeptor-Subtypen stellt α,β me-ATP einen potenten Agonisten ($pEC_{50} \approx 6$) dar (Valera et al. 1994, Evans et al. 1995, Bianchi et al. 1999).

Bz-ATP wird nicht nur als spezifisch für die Aktivierung von P2X₇-Purinozeptoren ($pEC_{50} = 5,2 - 5,7$) beschrieben (Surprenant et al. 1996, Rassendren et al. 1997, Chessell et al. 1998, Hibell et al. 2000), sondern es repräsentiert auch einen der selektivsten Agonisten an rekombinanten P2X₁- ($pEC_{50} = 8,74$) und P2X₃-Rezeptoren ($pEC_{50} = 7,1 - 7,5$) mit einer über 100fach höheren Potenz im Vergleich mit α,β me-ATP (Bianchi et al. 1999, Neelands et al. 2003). P2X₇ ist unter allen P2X-Rezeptoren derjenige mit der geringsten Sensitivität für endogene Nukleotide. So liegt der pEC_{50} für ATP gerade mal bei 3,7 – 4,1 (Surprenant et al. 1996, Rassendren et al. 1997, Chessell et al. 1998, Hibell et al. 2000). In so hohen Konzentrationen wurden die in dieser Arbeit verwendeten Agonisten in den mikrospektrofluorimetrischen Versuchen jedoch nicht eingesetzt. Zudem zeigten die Daten der QRT-PCR eine nicht vernachlässigbare Transkription von P2X₇, so dass dessen funktionelle Expression in MnPO-Neuronen nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Andererseits wird die Expression von P2X₇ im Bereich des ZNS/PNS hauptsächlich für verschiedene Typen von Gliazellen wie Mikroglia, Astrocyten, Oligodendrocyten und Schwann-Zellen beschrieben (Collo et al. 1997, Buell et al. 1998, Burnstock and Knight 2004, Bulanova et al. 2005).

P2X₅ stellt den Ergebnissen der QRT-PCR nach den am niedrigsten exprimierten Purinozeptor Subtyp im MnPO neonataler Ratten dar. Zusätzlich ist an rekombinant exprimierten rP2X₅ der elektrophysiologisch detektierbare Strom nach Aktivierung durch ATP im Vergleich zu anderen Rezeptoren mit ähnlicher Kinetik (P2X₄ und P2X₂) relativ schwach (Garcia-Guzman et al. 1996, Haines et al. 1999). Der Anstieg der Fluoreszenz Ratio in Neuronen des MnPO nach Applikation von ATP oder 2Me-SATP erwies sich stets als äußerst robust, wodurch eine Beteiligung von P2X₅ an den generierten intrazellulären Calciumsignalen ausgeschlossen werden kann.

Für P2X₂-Rezeptoren ist zusätzlich eine Potenzierung der durch ATP induzierten Ströme nach Applikation von Zn²⁺ in physiologischen Konzentrationen ($10^{-6} - 10^{-5}$ M/L) zu verzeichnen (Friday and Hume 2008). Dies gilt auch für homomere P2X₄- und heteromere P2X_{4/6}-Rezeptoren (Brake et al. 1994, Soto et al. 1996, Nakazawa et al. 1997, Nakazawa and Ohno 1997, Wildman et al. 1998, Xiong et al. 1999) und beruht auf elektrophysiologischen Untersuchungen an rekombinant exprimierten Rezeptoren in

HEK293-Zellen und/oder *Xenopus* Oocyten. 2003 wurden erstmals die modulativen Eigenschaften von Zn^{2+} und ATP an isolierten Neuronen des hypothalamischen TM der Ratte untersucht (Vorobjev et al. 2003b). In dieser *patch-clamp* Studie im *whole cell* Modus erwiesen sich die durch Zinkionen induzierten Effekte als konzentrationsabhängig. In niedrigen Konzentrationen (10^{-5} - 10^{-4} M/L) potenzierte Zink die durch ATP induzierten Ströme, inhibierte diese jedoch in höheren Konzentrationen ($\geq 10^{-3}$ M/L). Die Untersuchungen von Vorobjev et al. (2003b) zeigten keine Potenzierung der maximal durch ATP Applikation induzierten Ionenströme durch P2X-Rezeptoren, sondern eine Linksverschiebung der benötigten ATP-Konzentration für die Rezeptoraktivierung. Diese Linksverschiebung durch Zn^{2+} wurde auch für rekombinant exprimierte P2X₂-Rezeptoren (*Xenopus* Oocyten) beobachtet (Wildman et al. 1998), zeigte sich jedoch abhängig von der Präinkubation der *Xenopus* Oocyten in Zn^{2+} -haltigem, extrazellulärem Medium. Schon eine Präinkubation von 42 ± 3 sec reichte aus, um die potentiell agonistische Wirkung in eine inhibitorische umzukehren. Für die allosterische Modulation von Zink an P2X₂-Rezeptoren werden Histidine (His¹²⁰ und His²¹³) als potentielle Bindungsstellen für Zinkionen diskutiert (Brake et al. 1994, Wildman et al. 1998, Clyne et al. 2002); diese Hypothese wurde kürzlich durch die nachgewiesene Beteiligung von extrazellulären Glutamat-Einheiten erweitert (Friday and Hume 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte, wen auch nur für zwei MnPO-Neurone, eine Potenzierung des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{iz}$ anhand einer Co-Applikation von Zn^{2+} in niedriger Konzentration um nahezu 40 % registriert werden. Die dreiminütige Präinkubation von Zn^{2+} *per se* wurde gewählt, um einen eventuellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ durch Zn^{2+} mit dem Anstieg durch Zn^{2+} und 2Me-SATP alleine vergleichen zu können. Eine Linksverschiebung der benötigten ATP Konzentration wurde nicht untersucht. Die in diesem Versuchsansatz ermittelte Erhöhung der Amplitude steht den in den *patch-clamp* Studien erhobenen Befunden (keine Amplitudenerhöhung über den maximal induzierbaren Wert durch ATP *per se*) konträr gegenüber. Eine Erklärung hierfür liegt vermutlich im unterschiedlichen Versuchsansatz, da in dieser Arbeit alle pharmakologischen Studien mittels mikrospektrofluorimetrischer Techniken und mit Applikation des Agonisten 2Me-SATP durchgeführt wurden.

An aus dem Gehirn der Ratte klonierten und rekombinant in HEK293-Zellen und/oder *Xenopus* Oocyten exprimierten P2X₄-Rezeptoren lag der pEC_{50} für 2Me-SATP etwa bei 4.0 (Soto et al. 1996, Garcia-Guzman et al. 1997), bei gleichzeitiger Insensitivität von P2X₄ gegenüber dem generellen P2-Rezeptor Antagonisten PPADS, selbst in hohen Konzentrationen ($pIC_{50} > 4$) (Buell et al. 1996, Soto et al. 1996, Jones et al. 2000). Die in den Ratio-Imaging Versuchen der vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzten Kon-

zentrationen an 2Me-SATP und PPADS lagen um das 10 – 1000fache niedriger. Demnach gilt die neuronale Expression von P2X₄ im MnPO als relativ unwahrscheinlich. Bis dato sind keine für P2X₂-Rezeptoren selektive oder hochpotente Antagonisten bekannt. PPADS und TNP-ATP stellen äquipotente Antagonisten der durch ATP induzierten Ströme durch P2X₂ dar (pIC₅₀ 5,4 – 5,9), wobei deren Affinität an P2X₂ deutlich geringer ausgeprägt ist als an homomeren P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren (Alexander et al. 2008). Die Affinität von *reactive blue 2* (Rb2) an P2X₂ ist unwesentlich höher (um etwa das 5fache) im Vergleich zu TNP-ATP und PPADS (King et al. 1997, Virginio et al. 1998, Bianchi et al. 1999, Lynch et al. 1999, King and Townsend-Nicholson 2003). Vergleicht man die Antagonisten-Studien dieser Arbeit miteinander, so fällt dennoch auf, dass Rb2 im Vergleich zu TNP-ATP und PPADS in einer Konzentration von 10⁻⁶ M/L die durch 2Me-SATP induzierten Calciumströme am potentesten zu supprimieren vermochte (13% komplett inhibierte Neurone durch PPADS; 27 % durch TNP-ATP und 33 % durch Rb2). Dies kann als weiterer Hinweis für die dominante Expression von P2X₂ in Neuronen des MnPO angesehen werden. Mit steigenden Antagonisten-Konzentrationen (PPADS und TNP-ATP 10⁻⁷ M/L – 10⁻⁵ M/L) unter Superfusion einer stets gleich bleibenden, submaximalen Konzentration des P2 Agonisten 2Me-SATP (10⁻⁷ M/L) erhöhte sich die prozentuale Anzahl an vollständig inhibierbaren Neuronen, und die mittlere Amplitude der Fluoreszenz Δ-Ratiowerte nahm zunehmend ab. Dies indiziert die Blockade von neuronalen P2X₂-Rezeptoren in der MnPO-Primärkultur. Auch die purinerge Aktivierung von rekombinant exprimierten und nativen neuronalen, hypothalamischen P2X₂-Rezeptoren anderer Kerngebiete konnte sowohl durch TNP-ATP als auch PPADS in höheren Konzentrationen nahezu vollkommen unterdrückt werden (King et al. 1997, Troadec et al. 1998, Virginio et al. 1998, Sorimachi et al. 2001, Wakamori and Sorimachi 2004, Wollmann et al. 2005).

Auch die Studie repetitiver Stimulationen mit 2Me-ATP in submaximaler Konzentration lieferte Hinweise für eine markante P2X₂ Expression in der MnPO-Primärkultur. In beiden Versuchsansätzen mit 8- bzw 15-minütigen „Regenerationsphasen“ zwischen den einzelnen dreiminütigen Stimulationsperioden ließ sich der Hauptanteil der Neurone der repetitiv reaktivierbaren Zellkategorie zuordnen, gleichbedeutend mit fehlender Desensibilisierung. Sowohl P2X₁- als auch P2X₃-Purinozeptoren zeichnen sich durch eine rasche Aktivierung nach Stimulation mit ATP, einen Abfall der Amplitude noch während der Stimulation sowie einer Refraktärzeit von etwa 15 min für eine reproduzierbare Antwort aus, wohingegen für P2X₂ diese Erholungsphase in der Literatur nicht beschrieben ist (Khakh et al. 2001b, North 2002, Wollmann et al. 2005). Diese Refraktärzeit ist

durch mehrere Ursachen bedingt. Zum einen ist in der Literatur die Internalisierung des Rezeptors beschrieben: Entweder wird der Rezeptor durch anhaltend hohe Konzentrationen des Agonisten ins Zytosol der Zielzelle transloziert (Dutton et al. 2000, Ennion and Evans 2001), oder die Bindung des Agonisten verläuft so hochaffin, dass dadurch ein lang anhaltender, geschlossen nicht-aktivierbarer Zustand des Rezeptors induziert wird (Rettinger and Schmalzing 2003).

Immuncytochemisch konnte unter Verwendung polyklonaler Antiseren aus dem Kaninchen sowohl in coronalen Gehirnschnitten adulter Ratten, als auch in der neuroglialen Primärkultur des MnPO die Expression des P2X₁- und des P2X₂-Purinozeptors, nicht jedoch anderer Subtypen (P2X₃ – P2X₇) aufgezeigt werden. Die Markierung immunpositiver Fasern und Varikositäten sowie einiger Perikaryen für den P2X₁-Rezeptor war im Gehirnschnitt vorwiegend in der präoptischen Region sowie dem anterioren MnPO lokalisiert. Zahlreiche Perikaryen kleinzelliger Neurone im dorsalen MnPO sowie der ventrikelnahen Zone des ventralen MnPO zeigten markante Expression des P2X₂-Purinozeptors. In der Primärkultur ließen sich beide Subtypen eindeutig neuronal lokalisieren. Die Tatsache, dass auf mRNA Ebene zahlreiche Spleiss-Varianten für humane und tierische (Ratte und Meerschweinchen) P2X₂-Untereinheiten bekannt sind (Brandle et al. 1997, Simon et al. 1997, Koshimizu et al. 1998, Chen et al. 2000a), die alle in der Lage sind funktionelle Homo- oder Heteromere mit anderen Spleiss-Varianten oder anderen P2X-Untereinheiten zu bilden, erschwert die Detektion auf Proteinebene. Die Deletion auf mRNA Ebene finden sich vor allem in dem Abschnitt, der für den intrazellulären C-Terminus kodiert (Brandle et al. 1997). Zahlreiche kommerziell erhältliche Antikörper sind gegen eine 13 Aminosäuren lange Sequenz des C-Terminus gerichtet. Bei Deletionen in diesem Bereich wäre eine immunhistochemische Detektion eventuell nur noch eingeschränkt möglich. Dieses Problem wurde bei den Untersuchungen mittels QRT-PCR in der vorliegenden Studie umgangen, indem Primer und Sonden ausgewählt wurden, die gegen konservierte Sequenzen gerichtet sind.

Die mikrospektrofluorimetrischen sowie die immunhisto- und -cytochemischen Untersuchungen dieser Arbeit geben Anlass zu der Hypothese, dass neben der ausgeprägten Expression neuronaler P2X₂-Purinozeptoren weitere ionotrope purinerge Rezeptoren, in Neuronen des MnPO exprimiert wurden. So konnte für die Stimulation der Neurone, bezogen auf die Höhe der Fluoreszenz Δ -Ratiowerte, bei Stimulation mit 2Me-SATP im Konzentrationsbereich von 10^{-8} – 10^{-6} M/L, keine Dosisabhängigkeit demonstriert werden. Der niedrigste pEC₅₀-Wert für 2Me-SATP wurde mit einem Wert von etwa 7 für

rekombinant in 1321N1-Zellen (Zelllinie eines humanen Astrocytoms) exprimierte P2X₁-Rezeptoren ermittelt (Bianchi et al. 1999). Möglicherweise aktivierten niedrige Konzentrationen an 2Me-SATP in Neuronen zunächst P2X₁-Rezeptoren, höhere Konzentrationen dann zusätzlich P2X₂-Rezeptoren, wodurch *summa summarum* der Prozentsatz an responsiven Zellen stieg, ohne jedoch die Höhe der Fluoreszenz Ratio maßgeblich zu beeinflussen. Für die funktionelle Existenz von P2X₁ und/oder P2X₃ spricht zusätzlich, dass ein nicht unerheblicher Prozentsatz an MnPO-Neuronen im Versuchsansatz mit repetitiver Stimulation mit 2Me-SATP ein Desensibilisierungsphänomen aufwies, unabhängig von der Länge des Regenerationsintervalles. Darüber hinaus induzierten niedrige Konzentrationen des Purinozeptor Antagonisten TNP-ATP (10⁻⁷ M/L), wenn auch nur zu einem Prozentsatz von 10,5 %, eine Blockade des Anstiegs der Fluoreszenz Ratio in Neuronen des MnPO auf eine Stimulation mit 2Me-SATP. Diese niedrigen pIC₅₀-Werte (≤ 7) sind eigentlich charakteristisch für P2X₁, P2X₃ und P2X_{2/3}, nachgewiesen durch elektrophysiologische Untersuchungen an nativen P2X₁-Rezeptoren in isolierten arteriellen glatten Muskelzellen der Ratte, rekombinant in HEK293-Zellen exprimierten P2X₁-, P2X₃- und P2X_{2/3}-, sowie nativen P2X₃-Rezeptoren im *Ganglion nodosum* der Ratte (Lewis et al. 1998, Thomas et al. 1998, Virginio et al. 1998). Zusätzlich zeichnete sich das Reaktionsprofil von 27 % der untersuchten Neurone durch einen raschen Anstieg der Fluoreszenz Ratio auf eine Applikation von 2Me-SATP aus, mit einem Abfall des Calciumsignals noch vor Beendigung des Stimulus (vergleiche Kap. 3.2.7). Dieses Charakteristikum ist ebenfalls charakteristisch für die Expression von P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren in nativem Gewebe (DRG) oder heterologen Expressionssystemen (Valera et al. 1994, Bianchi et al. 1999, Burgard et al. 1999). Der immunhisto- und -cytochemische Nachweis von P2X₁ sowohl in der Primärkultur als auch im coronalen Gehirnschnitt demonstrierte zudem dessen Expression auf Proteinebene in den Neuronen des MnPO. Dennoch steht die Insensitivität der Neurone gegenüber einer Applikation von α,βme-ATP den aufgeführten Hinweisen auf eine funktionelle Expression von homo- oder heteromeren P2X₁-Rezeptoren zusätzlich zu derjenigen von P2X₂-Rezeptoren konträr gegenüber. Hinsichtlich der Expression eines homomeren P2X₁-Rezeptors mit charakteristischem Reaktionsprofil (schnelle Aktivierung und Desensibilisierung mit entsprechender Refraktärzeit), der sich zudem nicht mit α,βme-ATP aktivieren lässt, liegen in der Fachliteratur *dato* keine Daten vor. Denkbar wäre auch die Existenz von P2X_{1/2} Heteromeren, für welche eine Zusammensetzung aus zwei Untereinheiten vom Subtyp P2X₂ und einer Untereinheit vom Subtyp P2X₁ postuliert wird (Roberts et al 2006), mit einer gemischten Reaktionskinetik bestehend aus einer schnellen Aktivierung mit Übergang in eine Plateauphase (Brown et al. 2002, Aschrafi et al. 2004, Calvert and Evans 2004). Diese Art von Reak-

tionsprofil wurde in 5,7 % der Neurone des MnPO beobachtet (vergleiche Kap. 3.2.7). Dennoch ist auch für diesen ionotropen purinergen Rezeptor eine Aktivierung durch α,β me-ATP beschrieben (Brown et al. 2002).

Es zeigt sich einmal mehr, dass nicht alle an rekombinant exprimierten Rezeptoren erhobenen pharmakologischen Befunde auf natives Gewebe, bzw. eine primäre Zellkultur übertragbar sind. Dies wurde auch schon in *in vitro* Untersuchungen demonstriert. An aus Rattenarterien isolierten glatten Muskelzellen ist TNP-ATP in elektro-physiologischen Experimenten im nanomolaren Bereich ein potenter Antagonist der durch α,β me-ATP induzierten Ströme. Für die Suppression der Kontraktilität der glatten Muskelzellen im Gewebeverband, induziert durch Applikation von α,β me-ATP, wurde jedoch eine Konzentration von TNP-ATP im mikromolaren Bereich benötigt (Lewis et al. 1998). Eine Expression metabotroper purinergere Rezeptoren (P2Y- und Adenosinrezeptoren) in Neuronen des MnPO kann, aufgrund der fehlenden Responsivität gegenüber einer Superfusion von NECA und CCPA sowie der vollständigen Inhibition des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nach Depletion des Calciums im extrazellulären Medium, ausgeschlossen werden.

4.1.2. Astrocyten

In der vorliegenden Arbeit gelang der immunocytochemische Nachweis der Expression des Purinozeptor Subtyps P2X₁ in Astrocyten der MnPO-Primärkultur, während sich im Gehirnschnitt lediglich einige periventriculäre Astrocyten des ventralen MnPO als P2X₂-immunpositiv erwiesen. Keiner der Purinozeptoren P2X₃ – P2X₇ konnte astroglial eindeutig demonstriert werden, weder in der Primärkultur noch im Gehirnschnitt. Sowohl P2X₁ als auch P2X₂ konnten für *Cerebellum* (Kanjhan et al. 1996), Rückenmark (Kanjhan et al. 1999) oder Hippocampus (Kukley et al. 2001), P2X₇ in zahlreichen Regionen des ZNS sowie Komponenten des PNS nachgewiesen werden. Die physiologische Bedeutung astroglialer P2 Rezeptoren bleibt *dato* dagegen „nahezu uncharakterisiert“ (Fischer et al. 2009; Verkhrasky et al. 2009). Unter anderem konnten Espallergues und Mitarbeiter (2007) im Bereich des Hypothalamus in ersten Schritten die Beteiligung astrocytärer P2-Rezeptoren bei der Noradrenalin-medierte Regulation der Vasopressin-Freisetzung im SON der Ratte aufzeigen. Für die Astrocyten der MnPO-Primärkultur wiesen die Ergebnisse der mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit einerseits, ähnlich wie für die Neurone, auf die funktionelle Expression des P2X₂-Purinozeptors hin. Andererseits ergaben sich signifikante Unterschiede im Antwortverhalten von Neuronen und Astrocyten, welche zumindest die Co-

Expression von P2X₁- oder P2X₁-ähnlichen Purinozeptoren nahe legt. So reagierten nahezu 80 % der untersuchten Astrocyten auf Stimulation mit 2Me-SATP mit einem raschen Anstieg der Fluoreszenz Ratio, die noch während der dreiminütigen Superfusionsphase wieder auf den Basalwert abfiel. Wie schon bei der Diskussion der Rezeptorexpression in Neuronen erwähnt, ist dieses Reaktionsprofil charakteristisch für P2X₁- und P2X₃-Purinozeptoren (Valera et al. 1994, Bianchi et al. 1999, Burgard et al. 1999). Die Hypothese einer funktionellen Expression von möglicherweise P2X₁-Purinozeptoren in Astrocyten des MnPO wird durch den Befund gestützt, dass repetitive Superfusions-Stimulation mit 2Me-SATP bei einem jeweiligen Regenerationsintervall von acht min bei 77 % der untersuchten Astrocyten zu einer Desensibilisierung führten; lediglich 23 % erwiesen sich als repetitiv stimulierbar. Bei einer Erholungsphase von 15 min zwischen den Stimulationen zeigten 65 % der Astrocyten einen reproduzierbaren Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf wiederholte Stimulation (siehe auch Kap. 4.1.1).

Desweiteren konnte schon mit niedrigen Konzentrationen von TNP-ATP (10^{-7} M/L) eine deutliche Anzahl an Astrocyten stark in ihrer Responsivität auf eine Stimulation mit 2Me-SATP inhibiert werden. Wie schon erwähnt, repräsentiert TNP-ATP im nanomolaren Bereich einen potenten Antagonisten an P2X₁-, P2X₃- und P2X_{2/3}- Purinozeptoren (Lewis et al. 1998, Thomas et al. 1998, Virginio et al. 1998). Im Vergleich mit den untersuchten Neuronen und Oligodendrocyten der MnPO-Primärkultur (siehe Kap. 4.1.1 und 4.1.3) fungierte TNP-ATP (10^{-7} M/L) an Rezeptoren der Astrocyten als potentester Inhibitor. Der Anteil an Astrocyten mit ausgeprägter Signal-Suppression lag bei 35 % gegenüber 28 % bei Oligodendrocyten und 11 % bei Neuronen.

Zweiwertige Zinkionen (Zn^{2+}) bedingen eine partielle Inhibition Agonist-induzierter Aktivierung von P2X₁ und P2X₇, und verstärken andererseits die durch P2X₂ oder P2X₃ hervorgerufene(n) zelluläre Depolarisation bzw. Calciumsignale (Virginio et al. 1997, Wildman et al. 1999, 2002). An rekombinant in HEK293-Zellen oder *Xenopus* Oocyten exprimierten purinergen Rezeptoren der Ratte vom Subtyp P2X₁- und P2X₇- fungierte Zn^{2+} als allosterischer Modulator und war somit in der Lage, die Wirksamkeit von ATP an eben diesen Rezeptoren zu inhibieren ($pIC_{50} = 6$ an P2X₁ sowie 4,9 an P2X₇). In niedriger Konzentration bewirkte Zn^{2+} auch in 70 % der untersuchten MnPO-Astrocyten eine deutliche Suppression des durch 2Me-SATP induzierten, intrazellulären Calciumsignals. Die Tatsache, dass Zn^{2+} unterschiedliche modulatorische Funktionen an P2X₁ und P2X₃ bewirkt, ermöglichte es gleichzeitig, eine Beteiligung eines astroglialen P2X₃ Rezeptor-Subtyps nahezu auszuschließen (Wildmann et al. 1999).

Wie schon erwähnt (Kap. 4.1.1), repräsentiert Bz-ATP, basierend auf elektrophysiologischen Studien, einen potenten Agonisten ($pEC_{50} = 5,2 - 5,7$) an rekombinant in HEK 293- oder NTW8-Zellen (permanente Zelllinie muriner Mikroglia) exprimierten P2X₇-Rezeptoren von Ratte, Mensch und Maus (Surprenant et al. 1996, Rassendren et al. 1997, Chessell et al. 1998, Hibell et al. 2000), kann aber auch mit rekombinant exprimierten P2X₁-Purinozeptoren interagieren (Bianchi et al. 1999, Neelands et al. 2003). Die Superfusion der neuroglialen Primärzellkultur des MnPO mit Bz-ATP bewirkte keinerlei Anstieg der Fluoreszenz Ratio in Astrocyten. Die ausgeprägte Insensitivität sowohl gegenüber α,β me-ATP als auch Bz-ATP stellt die funktionelle Expression von P2X₁ in Astrocyten des MnPO trotz einiger zuvor erwähnter, P2X₁-typischer Charakteristika in Frage. Bislang gilt α,β me-ATP ausschließlich als Agonist an ionotropen Rezeptoren der Subtypen P2X₁ bzw. P2X₃. In vergleichbaren Untersuchungen an Astrocyten des SON, durchgeführt an intakten, coronalen Gehirnschnitten juveniler Ratten, konnten intrazelluläre Calciumsignale ebenfalls durch ATP und 2Me-SATP, nicht jedoch α,β me-ATP, Bz-ATP oder Adenosin hervorgerufen werden. PPADS und Rb2 bewirkten eine signifikante Reduktion der durch ATP induzierten Calciumsignale. Bei nahezu identischen Reaktionsmustern zu den für MnPO-Astrocyten erhaltenen Daten wurde der zugrunde liegende Purinozeptor aufgrund der ebenfalls agonistischen Aktivität von ADP der metabotropen Subfamilie der P2Y-Purinozeptoren zugeschrieben (Espallergues et al. 2007). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass α,β me-ATP auch selektiv für einen atypischen, metabotrop purinergen Rezeptor im Colon des Meeresschweinchens, dem Duodenum der Ratte, sowie in Astrocyten des NAC und des Cortex der Ratte sein könnte (Windscheif et al. 1995, Abbracchio et al. 1999, Franke et al. 2001b). TNP-ATP als P2X₁₋₄ spezifischer Antagonist wurde in der Studie von Espallergues et al. (2007) nicht getestet.

In Astrocyten des *Nucleus accumbens* (NAC) des Rattengehirns war der P2X₁-Purinozeptor auf Proteinebene zunächst nicht nachweisbar (Franke et al. 2001a). Erst die gezielte Läsion des NAC, zur Untersuchung der traumatisch bedingten Astrogliose, bedingte eine „up“-Regulation der P2X₁ Expression und somit die Möglichkeit des immunhistochemischen Nachweises von P2X₁. Die immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten im MnPO sowie der AV3V-Region adulter Ratten die Expression von P2X₁ vor allem assoziiert mit neuronalen Fasern, während der P2X₂-Subtyp in einigen periventriculären Astrocyten im Bereich des ventralen MnPO detektiert werden konnte. Umgekehrt zeigten zahlreiche Astrocyten der MnPO-Primärkultur Immunreaktivität für den P2X₁-, nur wenige jedoch für den P2X₂-Rezeptor. Transformationsprozesse in den Astrocyten induziert durch den Prozess der

Kultivierung oder modifizierte Epitopverfügbarkeit inklusive (De-)Maskierung der membranständigen Rezeptoren stellen klassische, nahe liegende Erklärungen dar (Harlow and Lane 1988).

Im Gegensatz zu ionotropen wurden funktionelle metabotrope, purinerge Rezeptoren in Astrocyten schon mehrfach nachgewiesen, wie beispielsweise P2Y₁, P2Y₂ und P2Y₄ in Astrocyten-reichen Präparaten des *Nervus opticus* der Ratte sowie Astrocyten des Cortex und des *Hippocampus* mittels RT-PCR und/oder immuncyto- und histochemischen sowie mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen (Lenz et al. 1998, James and Butt 2001, Koizumi et al. 2002, Zhu and Kimelberg 2004) sowie P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ in isolierten Astrocyten des *Cerebellum* der Ratte mittels RT-PCR und/oder Immuncytochemie sowie der Ca²⁺-Imaging Technik (Carrasquero et al. 2005). Über die Expression metabotroper P2-Rezeptoren in Astrocyten des Hypothalamus ist bislang wenig bekannt, wie etwa die schon beschriebene Charakterisierung eines P2Y₁-Purinozeptors in Astrocyten des SON im Zusammenhang mit regulierter Vasopressin-Freisetzung (Espellargues et al. 2007). Auch die Calcium-Imaging Versuche aus dieser Arbeit an Astrocyten geben Grund zur Annahme, dass P2Y-Rezeptoren eine nicht unwesentliche Rolle in Astrocyten des MnPO spielen. In der Versuchsreihe zur Ermittlung der Calciumquelle für den durch 2Me-SATP hervorgerufenen Anstieg der [Ca²⁺]_{iz} musste für nahezu 40 % der Astrocyten neben dem Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum ein intrazellulärer Speicher postuliert werden. Dies repräsentiert unter anderem ein Charakteristikum für P2Y_{1,2,4,6,11}-Rezeptoren, bei denen nach Ligandenbindung *via* Koppelung an G_{q/11} Proteine die Phospholipase C stimuliert wird und somit über Bildung von IP₃ eine Mobilisation von Calcium aus dem ER initiiert wird (Ralevic and Burnstock 1998). Gleichzeitig ließen sich durch Superfusion von Rb2 (10⁻⁶ M/L) und gleichzeitiger Applikation von 2Me-SATP (10⁻⁷ M/l) 72 % der untersuchten Astrocyten vollständig in ihrer Reaktivität gegenüber 2Me-SATP supprimieren. Dieser Effekt ließ sich nicht alleinig auf die Blockade von P2X₂-Rezeptoren zurückzuführen, da nur wenige Astrocyten das für P2X₂-Rezeptoren charakteristische Reaktionsprofil aufwiesen. Wie schon erwähnt, stellt Rb2 auch einen potenten Antagonisten an P2Y₁-, P2Y₄-, P2Y₆- und P2Y₁₂-Rezeptoren dar (pIC₅₀ = 4,3 – 4,7), welche z.B. in PC12-Zellen (aus Nebennierentumor der Ratte) oder C6 Gliomazellen der Ratte (permanente Tumorzelllinien aus Astrocyten) exprimiert werden (Inoue et al. 1991, Nakazawa et al. 1991, Bean 1992, Burnstock 2007b). Lediglich für den rekombinant exprimierten P2Y₁-Subtyp wurde auch eine hohe Sensitivität für die Aktivierung durch 2Me-SATP (pEC₅₀ = 8,5 – 6,9) beschrieben (Webb et al. 1993, Ralevic and Burnstock 1998). Zusätzlich zeigen 20 % der untersuchten Astrocyten

nach Stimulation mit 2Me-SATP ein biphasisches Reaktionsprofil, möglicherweise induziert durch gleichzeitige bzw. sequentielle Aktivierung ionotroper (Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum durch die Ionenkanalpore der P2X-Rezeptoren) und metabotroper purinergere Rezeptoren (Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern). Solch ein Reaktionsprofil mit der zugrunde liegenden Beteiligung intra- und extrazellulärer Calciumressourcen wurde für eine Primärzellkultur von Astrocyten aus dem *Hippocampus* neonataler Ratten demonstriert (Koizumi et al. 2002). Dabei war der initiale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$ auf Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, die Plateauphase auf einem Einstrom extrazellulärer Calciumionen zurückzuführen. Demnach scheint für die Mehrzahl der Astrocyten der MnPO-Primärkultur die funktionelle Expression von P2X₁- und P2Y₁-, sowie in geringerem Umfang P2X₂- Purinozeptoren wahrscheinlich.

PPADS in hohen Konzentrationen (10^{-5} M/L) induzierte eine 100 % Blockade der durch 2Me-SATP induzierbaren Antwort in MnPO-Astrocyten, was zwar keine Differenzierung der beteiligten Rezeptor-Subtypen zulässt, zumindest aber die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle ausschließt, welche ebenfalls in Astrocyten exprimiert werden (Latour et al. 2003, D'Ascenzo et al. 2004). Adenosinrezeptoren scheinen in Astrocyten des MnPO eher eine sehr geringe Rolle zu spielen, da die Superfusion mit NECA lediglich in einem Astrocyt einen Anstieg der Fluoreszenz Ratio induzierte.

4.1.3. Oligodendrocyten

Die Oligodendrocyten (ODs) der MnPO-Primärkultur stellten sich sowohl prozentual, bezogen auf die Anzahl der getesteten Zellen, als auch hinsichtlich der Amplitude der generierten intrazellulären Calciumsignale als reaktivste Zellgruppe dar. Auf eine Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-6} M/L) reagierten etwa 62 % der analysierten Oligodendrocyten, bei 51 % Responsivität der Astrocyten und 25 % der Neurone. Ähnlich wie für Astrocyten diskutiert, deuten die pharmakologischen Untersuchungen auf eine funktionelle Expression sowohl von P2X₁- als auch P2X₂-Purinozeptoren hin, ohne die Beteiligung von P2Y-Rezeptoren ausschließen zu können. Jeweils 45 % der responsiven Oligodendrocyten reagierten auf Stimulation mit 2Me-SATP mit einem für P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren charakteristischen Profil (rascher Anstieg der Fluoreszenz Ratio, die noch während der Superfusionsphase wieder auf den Basiswert abfiel) (Valera et al. 1994, Bianchi et al. 1999, Burgard et al. 1999). Weitere 45 % wiesen ein biphasisches Antwortverhalten auf, möglicherweise bedingt durch die zusätzliche Aktivierung metabotroper purinergere Rezeptoren und 10 % zeigten ein Profil, welches auf die

Expression nicht-desensibilisierender, ionotroper Rezeptoren (P2X₂, P2X₄ und P2X₅) hindeutete. Wie schon für die beiden anderen Zelltypen angedeutet, stellt jedoch die absolute Insensitivität gegenüber α,β me-ATP das wichtig-ste Argument gegen eine Präsenz klassischer P2X₁-Purinozeptoren dar.

Die meisten der ohnehin wenigen funktionellen Studien zur Expression purinerner Rezeptorproteine wurden an OD-spezifischen Vorläuferzellen (Wang et al. 2009) oder ODs kompakter Faserstrukturen wie *Corpus callosum* oder *Nervus opticus* durchgeführt (James and Butt 2002, Verkhrasky et al. 2009). Für letzteres Modell wurde ebenfalls die Expression von P2X₁ und/oder P2X₃ diskutiert, basierend auf der agonistischen Aktivität von α,β me-ATP, wobei in diesen mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen ein Anstieg der Fluoreszenz Ratio erst bei einer Applikation von α,β me-ATP -Konzentration von $10^{-4} - 10^{-3}$ M/L detektiert werden konnte (James and Butt 2001, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit an MnPO-Oligodendrocyten eingesetzten Konzentrationen an α,β me-ATP waren 100-1000fach niedriger; somit stellte sich eine mögliche Aktivierung von P2X₁ und/oder P2X₃ als nahezu unmöglich dar. Wiederum als Argumente für eine P2X₁-Expression können andererseits (1) die leicht supprimierende Wirkung von Zn²⁺ auf die durch 2Me-SATP hervorgerufenen Calciumsignale sowie der immunocytochemische Nachweis P2X₁-markierter ODs in der MnPO-Primärkultur herangezogen werden. Aufgrund der Insensitivität gegenüber Bz-ATP sowie der Tatsache, dass Zn²⁺ an purinergen Rezeptoren der ODs antagonistische Wirkung entfaltet, kann eine funktionelle Expression der Purinozeptor Subtypen P2X₃ und P2X₇, wie schon für Neurone und Astrocyten, nahezu ausgeschlossen werden. Ebenso induzierte TNP-ATP schon in niedrigen Konzentrationen eine starke Blockade des durch 2Me-SATP hervorgerufenen Anstiegs der Fluoreszenz Ratio -ein weiterer Hinweis auf die mögliche Expression von P2X₁ (Virginio et al. 1998).

Die Fachliteratur liefert zahlreiche Hinweise auf eine verstärkte Expression metabotroper P2Y-Rezeptoren (vor allem P2Y₁) in kultivierten ODs aus dem *Cortex* und dem *Corpus callosum* neonataler Mäuse, der Retina der Ratte (Kirischuk et al. 1995) sowie des *Nervus opticus* der Ratte (Moran-Jimenez and Matute 2000, James and Butt 2001), welche mittels confokaler Mikrospektrofluorimetrie und Einsatz spezifischer Agonisten und Antagonisten sowie immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten. P2Y-Rezeptoren lassen sich ferner wie folgt einteilen: Adenin-Nukleotid (ADP und ATP) -sensitive Rezeptoren (P2Y_{1,11,12,13}), Uracil-Nukleotid (UTP und UDP) -sensitive Rezeptoren (hP2Y₄ und P2Y₆), Rezeptoren mit gemischter Sensitivität (P2Y₂ und rP2Y₄) und Rezeptoren, die durch UDP-Glukose und -Galaktose aktiviert werden

(P2Y₁₄) (Ralevic and Burnstock 1998, Communi et al. 2001, Abbracchio et al. 2003). Von diesen Rezeptoren ist für die Charakterisierung metabotroper purinergere Rezeptoren in ODs des MnPO der Ratte theoretisch nur P2Y₁ interessant, da dieser Rezeptor über Koppelung an G_{q/11} Proteine die Phospholipase C stimuliert, und somit über Bildung von IP₃ eine Mobilisation von Calcium aus dem ER initiiert (Ralevic and Burnstock 1998), sowie eine hohe Sensitivität gegenüber einer Aktivierung durch 2Me-SATP aufweist, die möglicherweise durch Rb2 inhibiert werden kann (Bean 1992, Webb et al. 1993, Ralevic and Burnstock 1998). Für die Expression metabotroper purinergere Rezeptoren (wahrscheinlich P2Y₁) spricht das biphasische Reaktionsprofil bei Stimulation mit 2Me-SATP sowie der hohe Prozentsatz (64 %) selbst bei kurzer Regenerationszeit wiederholt stimulierbarer Oligodendrocyten. Diese Gruppe an ODs scheint somit P2X₂ und/oder P2Y₁ funktionell zu exprimieren. Für beide Rezeptor-Subtypen ist im Gegensatz zu P1X₁ und P2X₃ keine nennenswerte Desensibilisierung auf eine wiederholte Applikation eines Agonisten beschrieben (Bean 1992, Webb et al. 1993, Ralevic and Burnstock 1998, Dutton et al. 2000, Ennion and Evans 2001, Khakh et al. 2001a, North 2002, Wollmann et al. 2005). Andererseits spricht die Tatsache, dass TNP-ATP (10⁻⁵ M/L) in der Lage war, das durch 2Me-SATP hervorgerufene Calciumsignal nahezu vollständig zu unterdrücken, gegen die Expression metabotroper purinergere Rezeptoren, da eine Sensitivität metabotroper Purinozeptoren für diesen Antagonisten bislang nicht in der Literatur beschrieben ist. Wie schon für die Astrocyten diskutiert, kann davon ausgegangen werden, dass etwa in den Oligodendrocyten exprimierte, Membran-intrinsische Calciumkanäle (Blankenfeld et al. 1992, Agrawal et al. 2000, Chen et al. 2000b) nicht an der Agonist-induzierten Erhöhung der [Ca²⁺]_{iz} beteiligt waren, da auch der generelle P2-Rezeptor Antagonist PPADS in höheren Konzentrationen wirksam war.

Vergleichbare Calciumsignale bei wiederholter Stimulation in Oligodendrocyten der MnPO-Primärkultur könnten neben der Beteiligung von P2Y₁ Rezeptoren auch P2X₂, P2X₄ oder P2X₅ vermittelt sein (Bo et al. 1995, Buell et al. 1996, Ding and Sachs 1999, Haines et al. 1999). Dabei stellte P2X₅ auf mRNA Ebene im MnPO neonataler Ratten den am niedrigsten exprimierten Rezeptor-Subtyp dar; zudem lassen sich die starken Calciumsignale bei Superfusion mit 2Me-SATP nicht mit den für P2X₅ Aktivierung in elektrophysiologischen Studien beschriebenen schwachen Calciumströmen in Einklang bringen (Garcia-Guzman et al. 1996, Haines et al. 1999). Die geringe Sensitivität von P2X₄ gegenüber einer Aktivierung durch 2Me-SATP sowie einer Blockade durch PPADS spricht ebenfalls nicht für eine Expression dieses Subtyps in ODs des MnPO (Blankenfeld et al. 1992, Buell et al. 1996, Soto et al. 1996, Garcia-Guzman et al. 1997,

Agrawal et al. 2000, Chen et al. 2000b, Jones et al. 2000). Die Sensitivität der ODs gegenüber einer Blockade des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ durch Rb2 auf eine Applikation von 2Me-SATP hingegen liefert einen weiteren Hinweis für die Existenz des P2X₂-Rezeptor-Subtyps, wobei jedoch schon erwähnte Kreuzreaktivität von Rb2 mit metabotropen purinergen Rezeptoren zu berücksichtigen ist.

P1 Purinozeptoren mit Adenosin als endogenem Liganden konnten lediglich für einen Oligodendrocyt in der MnPO-Primärkultur nachgewiesen werden. Adenosinrezeptoren scheinen hauptsächlich in unreifen OD-Vorläuferzellen exprimiert zu werden, wo sie an den physiologischen Prozessen der Migration, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind (Othman et al. 2003, Agresti et al. 2005), und werden in reifen ODs herunterreguliert (Stevens et al. 2002, Butt 2006). Für die immunocytochemische Identifizierung der ODs aus den mikrospektrofluorimetrischen Untersuchungen wurde ein Antikörper gewählt, der gegen die cyclische Nukleotidphosphodiesterase (CNPase) gerichtet ist. Diese Enzym wird jedoch ausschließlich in reifen ODs exprimiert (Polito and Reynolds 2005, Butt 2006).

4.2 Purinerge Rezeptoren immunkompetenter Zellen des MnPO im Zusammenhang mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

In einer primären Zellkultur neonataler Mikrogliazellen, isoliert aus dem Gesamthirn der Ratte, konnte gezeigt werden, dass deren purinerge Stimulation (ATP) eine vermehrte Expression von TNF- α mRNA und nachfolgende Freisetzung von bioaktivem TNF- α zu induzieren vermochte (Hide et al. 2000, Suzuki et al. 2004). Gleiches gilt für die Abgabe von IL-6 aus murinen MG5-Zellen in den Zellkulturüberstand nach Stimulation mit ATP (Shigemoto-Mogami et al. 2001). Die zeit- und konzentrationsabhängige Freisetzung von TNF- α und IL-6 aufgrund einer Inkubation mit ATP konnte in dieser Arbeit erstmals demonstriert werden und ist aufgrund der Tatsache, dass die POA und der MnPO zentrale Regionen der Thermoregulation darstellen, möglicherweise von signifikanter Bedeutung für die Rolle von ATP als Neuromodulator für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Rahmen der zentralen Fiebergenese. Die ermittelten Zytokinkonzentrationen im Überstand unstimulierter Zellen des MnPO repräsentieren wahrscheinlich eine durch die Kultivierung bedingte, marginale Aktivierung der produzierenden Zellen, im wesentlichen der Mikrogliazellen. Daher lassen sich größere Kollektive an „ruhenden“ Mikrogliazellen *in vitro* weder in Kultur noch im Gehirnschnitt

untersuchen (Farber and Kettenmann 2006). Die zeitabhängige Stimulation der MnPO-angereicherten Primärkultur mit ATP bewirkte die maximale Freisetzung an TNF- α nach sechs Std, wohingegen die IL-6-Werte erst nach 12 Std Maximalwerte erreichten. Diese zeitversetzte Abgabe korreliert mit den in der Literatur vorhandenen Daten (Hide et al. 2000, Shigemoto-Mogami et al. 2001). Diese Sequenz unterstützt die Hypothese, dass ATP die Abgabe von IL-6 sekundär, infolge der Freisetzung von TNF- α und IL-1 β induziert, was sowohl in Untersuchungen an primären Astrocyten-Kulturen neonataler Ratten als auch humanen Fibroblasten demonstriert werden konnte (Zhang et al. 1990, Norris et al. 1994). Dennoch gelang es bislang nicht, diesen Zusammenhang auf eine reine Mikrogliazellkultur zu übertragen. Die Inkubation von Mikroglia, isoliert aus dem Gehirn neonataler Mäuse, mit TNF- α führte nicht zu einer Freisetzung von IL-6, für eine reine Astrocyten-Kultur hingegen gelang der Nachweis (Sawada et al. 1992). Weiterhin konnte die Freisetzung von IL-1 β als potenter Induktor für die Transkription des IL-6 Gens durch Applikation von ATP (10^{-3} M/L) in MG5-Zellen nicht induziert werden (Lee et al. 2003; Inoue 2002). Dies lässt auf eine Interaktion von Astrocyten und Mikroglia der MnPO-Primärkultur bei der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach Applikation von ATP schließen. Wahrscheinlich wird TNF- α primär aus Mikroglia freigesetzt und induziert sekundär die IL-6 Freisetzung aus Astrocyten. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass ATP *per se* die Freisetzung von TNF- α aus corticalen Astrocyten neonataler Ratten nicht induzieren konnte (Kucher and Neary 2005). Darüber hinaus konnte in einer neuroglialen Primärkultur der *Area postrema* neonataler Ratten demonstriert werden, dass membrangebundener TNF- α nach Stimulation mit LPS immunocytochemisch im perinukleären Golgi-Apparat lediglich der Mikrogliazellen nachgewiesen wurde (Wuchert et al. 2008).

Die durch ATP induzierte Freisetzung von TNF- α und IL-6 in der neuroglialen Primärzellkultur des MnPO wirft einmal mehr die Frage nach den beteiligten Rezeptor-Subtypen auf. Eine detaillierte, mikrospektrofluorimetrische Untersuchung von Mikroglia der primären MnPO-Zellkultur zur pharmakologischen Rezeptorcharakterisierung war nicht möglich, da aus bislang unbekanntem Gründen Fura-2 AM als Calciumchelator nicht von Mikrogliazellen des MnPO aufgenommen wurde, bzw. keine intrazelluläre Esterspaltung stattfand. Dieses Phänomen ist für Mikroglia anderer Gehirnregionen in der Literatur beschrieben (Farber and Kettenmann 2006). Im folgenden soll der Zusammenhang zwischen der Freisetzung von TNF- α und IL-6 aufgrund einer Stimulation mit LPS, sowie der Attenuierung der LPS-induzierten Zytokinsekretion durch P2-Antagonisten (PPADS und TNP-ATP) unter Berücksichtigung der beteiligten Rezeptor-Subtypen diskutiert werden.

LPS als Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien repräsentiert das am besten charakterisierte „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ zur experimentellen Auslösung von Fieber und zum Einsatz in Entzündungsmodellen. *In vivo* bindet LPS an ein Akute-Phase Protein (LPS-Bindungsprotein; LPB) (Tobias et al. 1986, Raetz et al. 1991), und der so entstandene Komplex interagiert mit einem Membran-gebundenen Rezeptor (*cluster of differentiation* 14; CD14) (Wright 1999) immunkompetenter Zielzellen. Das Fehlen einer transmembranalen Signaldomäne wird durch das Vorhandensein des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) kompensiert. Wichtig für die Interaktion von LPS mit TLR4 ist die Strukturkomponente des Lipids A, welches den reaktiven Teil des LPS darstellt (Rietschel et al. 1994, Miller et al. 2005). Bindung von LPS und CD14 an TLR4 induziert die Rekrutierung eines zytosolischen Adapterproteins (Produkt des *myeloid differentiation primary response gene* 88; MyD88) und initiiert so über eine nachgeschaltete, hochkomplexe Signalkaskade welche u.a. die Aktivierung der *IL-1-receptor associated kinase* (IRAK) und deren Assoziation mit *TNF receptor-associated factor-6* (TRAF) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert, wodurch letztendlich u.a. IL-1 β und TNF- α vermehrt synthetisiert werden.

Sowohl TLR4 als auch CD14 werden konstitutiv im Gehirn exprimiert, vor allem in Mikrogliazellen der CVOs, Zellen des *Plexus chorioideus* und den Leptomeningen (Becher et al. 1996, Nadeau and Rivest 2000, Laflamme and Rivest 2001, Bsibsi et al. 2002, Lehnardt et al. 2002, 2003, Rivest 2003, Chakravarty and Herkenham 2005). Ob TLR4 auch in der POA und dem MnPO exprimiert wird, ist bislang nicht bekannt (Conti et al. 2004). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich Hinweise auf die Expression von TLR4 in Zellen der MnPO-Primärkultur ableiten, da LPS eine markante Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 induzierte. Bei einer Übertragung auf *in vivo* Verhältnisse stellt sich dabei das Problem der endothelialen Blut-Hirn Schranke (BHS) als Barriere für LPS (Meister and Hakansson 2001). Peripher von aktivierten Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion gebildeter TNF- α könnte zu einer Permeabilisierung der BHS führen und so sekundär den Übertritt von LPS aus der Zirkulation in den MnPO ermöglichen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass TNF- α über die Bildung von PGE₂ eine Veränderung des Zytoskeletts von primären, mikrovaskulären Endothelzellen im ZNS induzierte (Mark et al. 2001). Auch die passive Diffusion von LPS über die BHS im Zustand einer schweren Endotoxämie wird diskutiert, ist jedoch bislang nicht belegt (Rivest 2003).

In den experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit lies sich die durch LPS induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch PPADS, vor allem aber TNP-ATP attenuieren, wobei sich TNP-ATP als der potentere Inhibitor erwies. Die Interaktion von LPS mit dem purinergen System könnte wie folgt erklärt werden. LPS ist nicht nur in der Lage, über den oben beschriebenen Signalweg die Zytokinfreisetzung zu forcieren, sondern bewirkt *in vitro* zusätzlich eine Freisetzung von ATP, wie für die permanente Makrophagenzelllinie *raw 264.7* mithilfe eines Luciferin-Luciferase Assays gemessen (Sperlagh et al. 1998b). Auch die vermehrte Expression purinergere Rezeptoren (v.a. P2X₄) in primären Mikrogliazellen aus dem Gehirn neonataler Ratten nach Inkubation mit LPS ist in der Literatur beschrieben (Guo et al. 2006). Dies führt zu der Hypothese, dass die Inkubation der primären Zellkultur aus dem MnPO neonataler Ratten mit LPS sowohl zu einer Freisetzung von ATP als auch zu einer vermehrten Expression purinergere Rezeptoren in Mikrogliazellen des MnPO führte. Die partielle Reduktion der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung durch PPADS oder TNP-ATP verdeutlicht, dass das durch LPS freigesetzte ATP *per se* in der Lage war, die Sekretion von TNF- α und nachfolgend IL-6 den Überstand der primären Zellkultur zu forcieren.

Immuncytochemisch konnte der P2X₄-Purinozeptor eindeutig in perivaskulären Mikrogliazellen im Gehirnschnitt sowie ED-1 immunpositiven Mikrogliazellen der Primärkultur lokalisiert werden. P2X₄ stellte zudem nach P2X₂ den am stärksten auf mRNA Ebene exprimierten ionotropen Rezeptor-Subtyp im Bereich des MnPO dar. Wie schon dargestellt, konnten funktionelle mikrospektrofluorimetrische Untersuchungen an den Mikrogliazellen nicht durchgeführt werden. Aufgrund der Insensitivität des P2X₄-Purinozeptors der Ratte gegenüber einer Stimulation mit 2Me-SATP (pEC₅₀ ca. 4) und einer Blockade durch PPADS (pIC₅₀ > 4) gilt die mögliche Expression des P2X₄ in Neuronen, Astrocyten oder Oligodendrocyten der MnPO-Primärkultur als unwahrscheinlich (Buell et al. 1996, Soto et al. 1996, Garcia-Guzman et al. 1997, Jones et al. 2000, Tsuda et al. 2003). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich die Expression des P2X₄ auf Mikroglia des MnPO beschränkte.

Dennoch scheint P2X₄ nicht der alleinige, für die durch ATP initiierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verantwortliche Rezeptor-Subtyp gewesen zu sein, wie durch die partielle, wenn auch statistisch nicht signifikante, Hemmung der durch LPS hervorgerufenen Sekretion durch PPADS angedeutet, welches nur geringe Affinität für den P2X₄-Rezeptor-Subtyp aufweist. Nach P2X₄ zeigte sich P2X₇ im MnPO neonataler Ratten auf mRNA Ebene markant exprimiert. Nach Ausschluss signifikanter Expression funktioneller P2X₇-Purinozeptoren für Neurone (Kap. 4.1.1), Astrocyten (Kap. 4.1.2)

und Oligodendrocyten (Kap. 4.1.3) müsste die molekularbiologisch nachgewiesene P2X₇ Expression in erster Linie mikroglialen Ursprungs gewesen sein. Die ausgeprägte Biosynthese des P2X₇-Rezeptor-Subtyps in Mikrogliazellen des Rattengehirns wurde auch von Inoue (2006) beschrieben. PPADS weist für diesen Rezeptor-Subtyp eine moderate ($pIC_{50} = 4,5$), TNP-ATP eine höhere Affinität auf (Surprenant et al. 1996; Virginio et al. 1998, Tsuda et al. 2003, Inoue 2006). In der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentration blockierte TNP-ATP sowohl P2X₄- als auch P2X₇-Rezeptoren.

Die geringfügige sekretagoge Wirkung der beiden P2X-Rezeptor Antagonisten PPADS und TNP-ATP *per se* bezüglich der beiden proinflammatorischen Zytokine könnte analog zu Befunden von Hide et al. (2000) für den P2X₇ spezifischen Antagonisten oATP auf einer teilweisen Degranulation des jeweiligen Inhibitors während der langen Inkubationszeit von insgesamt zwei Std zurückzuführen gewesen sein. Zumindest für TNP-ATP als Trinitrophenyl-Derivat des ATP könnte dies zutreffen.

Um den Bezug zur *in vivo* Situation während eines infektiösen oder inflammatorischen Geschehens herzustellen, kann man sich vorstellen, dass ATP durch die intracerebrale Freisetzung proinflammatorischer Zytokine eine bedeutende Rolle im Rahmen der Fiebergenese spielt. Die Zytokine wirken parakrin auf thermosensitive Neurone der POA, wodurch eine Abnahme der Aktivität warmsensitiver- und Zunahme der Impulsfrequenz kaltsensitiver Neurone induziert wird, wie *in vitro* für TNF und IL-6 an Gehirnschnitten von Ratten und Meerschweinchen gezeigt werden konnte (Nakashima et al. 1991, Xin and Blatteis 1992). Diese Effekte konnten durch Einsatz von Inhibitoren der Cyclooxygenase supprimiert werden, wodurch der Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Zytokinen und der durch diese induzierten Freisetzung von PGE₂ als finale Mediator der Fiebergenese und somit Induktor der hypothalamischen Soll-Wert Verstellung der Körpertemperatur verdeutlicht wird. Trotz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse *in vitro* bleibt die Frage weiterhin bestehen, ob nun ATP *in vivo* aktiv an der Fiebergenese beteiligt ist. In Kap. 1.6.3 der Einleitung wurde diese kontroverse Diskussion bereits erläutert. Möglicherweise hat ATP, abhängig von der freigesetzten Konzentration und dem Zeitintervall, sowie den beteiligten Rezeptorsub- und Zelltypen bifunktionale Effekte. Die Tatsache, dass Ektonukleotidasen im ZNS eine starke Expression aufweisen (Smith and Kirley 1998, Braun et al. 2000, 2003, Braun and Zimmermann 2001, Shukla et al. 2005, Vorhoff et al. 2005) und somit möglicherweise auch metabotrope P2- und P1-Rezeptoren funktionell und (patho-)physiologisch eine Rolle spielen, erschwert die Aufklärung zusätzlich. Die Konzentrations-Abhängig-

keit konnte bereits für eine primäre cortikale Astrocytenkultur der Ratte demonstriert werden. Hohe Konzentrationen an ATP (10^{-3} M/L) in Gegenwart von LPS attenuierten die Freisetzung von TNF- α , wohingegen niedrigere ATP-Konzentrationen (10^{-4} – 10^{-5} M/L) die durch LPS induzierbare TNF- α Sekretion potenzierten. ATP *per se* war wie schon erwähnt ineffektiv (Kucher and Neary 2005). Die Autoren postulieren, dass Astrocyten den Schweregrad der Inflammation oder des Traumas über die freigesetzte ATP-Konzentration wahrnehmen können, und über die jeweils beteiligten purinergen Rezeptor-Subtypen inflammatorische oder antiinflammatorische Funktion ausüben.

4.3. Ausblick

Die Daten dieser Arbeit liefern erste Hinweise für die Expression purinerner Rezeptoren in Neuronen, Astrocyten, Oligodendrocyten und Mikroglia im MnPO. Diese Ergebnisse gilt es in weiteren Studien zu vervollständigen. Beispielsweise nimmt der pH-Wert der extrazellulären Lösung einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung verschiedener Purinozeptor-Subtypen. Die gesteigerte Antwort auf ATP nach Azidifizierung des homomeren P2X₂-Rezeptors ist einzigartig (King et al. 1996, Stoop et al. 1997), wohingegen ein saurer pH-Wert die Aktivität homomerer P2X_{1,3,4,5,7} hemmt (Michel et al. 1999, Wildman et al. 1999, 2002, Gever et al. 2006, Samways and Egan 2007). Um die Expression von P2X₄ in Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten vollständig auszuschließen, müssten Versuche zur modulatorischen Funktion von Ivermectin durchgeführt werden, welches die durch ATP induzierten Ströme an P2X₄ potenziert (Priel and Silberberg 2004, Lalo et al. 2007). Um die Existenz von P2X₇ in Mikrogliazellen des MnPO letztendlich klären zu können, müsste der gewählte Versuchsansatz zur TNF- α und IL-6 Freisetzung mit P2X₇ spezifischen Agonisten (Bz-ATP) bzw. LPS plus Antagonisten (BBG) wiederholt werden (Suzuki et al. 2004).

Etwa 90 % der in der Literatur vorhandenen Daten beziehen sich auf Untersuchungen mittels *patch-clamp* Technik. Die Verifizierung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse durch ergänzende elektrophysiologische Untersuchungstechniken wäre eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung einzelner Rezeptor-Subtypen im MnPO der Ratte. Gleichzeitig bieten *single-cell* RT-PCR Analysen einen guten methodischen Ansatzpunkt, um die Expression ionotroper purinerner Rezeptoren auf Einzelzellniveau genauer zu charakterisieren. Die Coexistenz ionotroper und metabotroper purinerner Rezeptoren in Astrocyten und Oligodendrocyten ist in dieser Arbeit indiziert worden. Eine eindeutige Charakterisierung von P2Y-Rezeptor-Subtypen wurde jedoch nicht durchgeführt. Um das oft postulierte Vorkommen von P2Y₁ zu untermauern, müssten

Studien mit spezifischen P2Y-Rezeptor Antagonisten wie MRS 2279 (King 2002, Jacobson et al. 2004) durchgeführt werden.

Nach Abschluss einer molekularbiologischen und pharmakologischen Charakterisierung purinergere Rezeptoren *in vitro* wären spezifische *in vivo* Versuche notwendig, um die funktionelle Bedeutung purinergere Rezeptoren im MnPO genau zu untersuchen. Denkbar wären beispielsweise telemetrische Versuchsansätze mit lokal intracerebraler Applikation spezifischer Agonisten oder Antagonisten im Bereich des MnPO per Mikrodialyse oder die Mikroinjektion von *antisense* Oligodeoxynukleotiden bzw. siRNA zur lokalen Ausschaltung der Transkription oder Translation der für spezifische Rezeptor-Subtypen kodierenden mRNAs. Dadurch sollte es möglich sein, die Bedeutung des purinergere Systems auf der Ebene des MnPO für die Regulation der Körperkerntemperatur, des Schlaf-/Wachverhaltens, der Nahrungsaufnahme sowie der Körperflüssigkeits-Homöostase zu untersuchen. Weitere Ansatzpunkte wären die gezielte Manipulation dieser autonomen Regelkreise (beispielsweise durch Injektion von Pyrogenen, Futter-, Wasser- oder Schlafdeprivation) und anschließende molekular- oder zellbiologische Untersuchungen des MnPO auf eine vermehrte oder verminderte Expression einzelner Purinozeptor-Subtypen.

5. Zusammenfassung

Der Hypothalamus stellt eine reziprok mit dem limbischen System sowie zahlreichen pontinen und medullären Kerngebieten vernetzte, phylogenetisch archaische Komponente des Diencephalon dar und gilt als dem vegetativen Nervensystem übergeordnetes primäres Regelzentrum für die Homöostase wichtiger Körperfunktionen. Als Bestandteil der den anterioren Hypothalamus rostral begrenzenden *Lamina terminalis* spielt der *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO) eine vorrangige Rolle bei der Integration afferenter Signale bezüglich der Konstanthaltung von Körperkerntemperatur und Salz- und Wasserhaushalt der extrazellulären Körperflüssigkeit. Zudem ist er integraler Bestandteil der Regulation des Schlaf-/Wachverhaltens und in geringerem Maße auch an der Steuerung der Nahrungsaufnahme beteiligt.

Zahlreiche Studien deuten daraufhin, dass ionotrope (P2X) und metabotrope (P1 und P2Y) sog. purinerge Rezeptoren (= Purinozeptoren) mit ATP, ADP, UTP und/oder Adenosin als endogenen Liganden auf der neuroanatomischen Stufe des Hypothalamus eine wesentliche Rolle als Transmitter bei der schnellen Neurotransmission im Rahmen dieser autonomen, neuronalen Regelkreise spielen. Die funktionelle Expression purinergischer Rezeptoren im Bereich des MnPO ist in der Literatur bislang nicht beschrieben; daher erfolgte in der vorliegenden experimentellen Arbeit eine detaillierte pharmakologische, molekularbiologische sowie immunhisto- und immunocytochemische Charakterisierung ionotroper Purinozeptoren im MnPO.

- (1) Hinsichtlich der Expression verschiedener Purinozeptor-Subtypen der P2X-Familie (P2X₁ – P2X₇) im Bereich des MnPO konnten mittels QRT-PCR geringfügige ontogenetische Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Tieren demonstriert werden. So ergab die quantitative Analyse, dass für das MnPO-Parenchym neonataler Ratten vor allem die mRNAs für P2X₂ und P2X₄, gefolgt von P2X₇ und P2X₆, vorrangig nachweisbar waren, bei marginaler Expression der Subtypen P2X₃ und P2X₅. Im MnPO adulter Tiere hingegen zeigte P2X₄, gefolgt von P2X₇ und P2X₃, die höchsten Expressionsraten.
- (2) Immunhistochemisch konnte in coronalen Gehirnschnitten transkardial perfusionsfixierter, adulter Ratten die Expression der Purinozeptor-Subtypen P2X₁ und P2X₂ in Neuronen, teilweise auch Astrocyten des MnPO, sowie P2X₄ in perivaskulären Mikrogliazellen detektiert werden. Der Zelltyp-spezifische Nachweis für die Expression spezifischer P2X-Purinozeptor-Subtypen wurde zudem durch die Etablierung einer MnPO-Primärkultur aus Gehirnen neonataler Ratten durch immunocytochemische Mehrfachmarkierungen ermöglicht. P2X₁-Purinozeptoren wurden von zahlrei-

chen MnPO-spezifischen Neuronen, Astrocyten sowie Oligodendrocyten, nicht jedoch Mikrogliazellen exprimiert, wohingegen der P2X₂-Rezeptor-Subtyp vorrangig in Neuronen sowie vereinzelt Astrocyten nachweisbar war. Der P2X₄-Purinozeptor wurde ausschließlich in Mikrogliazellen immunocytochemisch nachgewiesen.

- (3) In pharmakologischen Studien an Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten der etablierten MnPO-Primärkultur, welche für die kontinuierliche Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$) mit dem Calciumchelator Fura-2 beladen wurden, wurde durch den Einsatz unterschiedlicher, oft Rezeptor-Subtyp spezifischer Agonisten und Antagonisten das Profil ionotroper purinerge Rezeptoren auf Einzelzellniveau mikrospektrofluorimetrisch charakterisiert. Mikrogliazellen mußten aufgrund marginaler zellulärer Fura-2 AM Aufnahme von der Studie ausgeschlossen werden. Als wichtigster, genereller Agonist für die Aktivierung eines Calciumstromes durch alle P2X-Purinozeptoren wurde neben ATP das 2Me-SATP-Analog in Superfusions-Stimulationsexperimenten eingesetzt.
- (a) Neurone der MnPO-Primärkultur zeigten bei Superfusions-Stimulation mit 2Me-SATP (10^{-8} - 10^{-6} M/L) hinsichtlich der $[Ca^{2+}]_{iz}$ keine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung, welche bei Astrocyten und Oligodendrocyten eindeutig nachweisbar war. Während für Neurone und Oligodendrocyten der Agonist-induzierte Calciumstrom vollständig von extrazellulär erfolgte, muss für Astrocyten die zusätzliche Beteiligung intrazellulärer Speicher angenommen werden.
- (b) Die meisten Neurone der MnPO-Primärkultur demonstrierten einen raschen Anstieg der Agonist-induzierten Calciumsignale ohne Desensibilisierungs-Effekte, sowie den Nachweis einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ ohne Dekrement bei repetitiver, äquimolarer 2Me-SATP Stimulation mit selbst kurzen Zeitintervallen. In vielen Zellen der Neuroglia hingegen konnte schon während der Superfusions-Stimulation eine Desensibilisierung der entsprechenden Purinozeptoren verzeichnet werden. Darüber hinaus konnte die Responsivität gegenüber repetitiver Stimulation durch eine Verlängerung der Zeitintervalle zwischen aufeinander folgenden Agonist-Applikationen für Astrocyten und Oligodendrocyten positiv beeinflusst werden.
- (c) In keiner der drei Zellgruppen der MnPO-Primärkultur konnte durch P2X₁/P2X₃-spezifische ($\alpha\beta$ me-ATP), P2X₇-spezifische (Bz-ATP) sowie Adenosinrezeptorspezifische (NECA, CCPA) Agonisten ein intrazelluläres Calciumsignal ausgelöst werden.
- (d) In Gegenwart zweiwertiger Zn²⁺-Ionen (10^{-5} M/L) als allosterische Modulatoren erfolgte eine Potenzierung des durch 2Me-SATP induzierten Calciumstroms bei Neuronen, sowie eine partielle Hemmung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ bei Astrocyten und einge-

schränkt auch Oligodendrocyten. Alle drei Zelltypen der MnPO-Primärkultur wiesen eine Hemmung der Agonist-induzierten intrazellulären Calciumsignale durch die Purinozeptor Antagonisten mit folgender Potenz-Hierarchie auf: RB2 > TNP-ATP = PPADS.

- (4) Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-6 werden in erster Linie von Mikrogliazellen und/oder Astrocyten exprimiert. Die Inkubation der MnPO-Primärkulturen mit ATP oder 2Me-SATP induzierte sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig eine Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 ins Kulturmedium, wie durch Zytokin-spezifische Bioassays ermittelt. Darüber hinaus konnte die durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Zytokinsekretion in Gegenwart der Purinozeptor Antagonisten PPADS oder TNP-ATP partiell unterdrückt werden.
- (5) Für Neurone des MnPO der Ratte kann aufgrund der durch QRT-PCR sowie Immunhisto- und -cytochemie ermittelten Expressionsmuster purinerge Rezeptor-Subtypen, sowie der detaillierten Charakterisierung der exprimierten Purinozeptoren die Prävalenz eines funktionellen P2X₂-Rezeptors postuliert werden. Zellen der Neuroglia könnten neben dem P2X₂-Rezeptor Purinozeptoren mit P2X₁-ähnlicher Charakteristik sowie metabotrope purinerge Rezeptoren wie etwa P2Y₁ funktionell exprimieren. An Mikrogliazellen des MnPO schließlich vermag endogenes ATP, P2X₄-Purinozeptor vermittelt, proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-6 freizusetzen.

5. Summary

The hypothalamus represents a phylogenetically archaic component of the diencephalon, which is reciprocally interconnected with the Limbic system as well as numerous pontine and medullary nuclei. Functionally it acts as the main supraspinal headmaster to control and regulate the autonomic nervous system with the aim to maintain homeostasis of important body functions. As an integral component of the *lamina terminalis* bordering the anterior hypothalamus, the median preoptic nucleus (MnPO) plays an eminent role in integrating afferent signal information important for the maintenance of body core temperature and extracellular fluid homeostasis. In addition, the MnPO contributes to the regulation of the wake-sleep cycle and is at least partially involved in the complex hypothalamic network controlling food intake.

Numerous studies strongly indicate, that ionotropic (P2X) and metabotropic (P1 and P2Y) purinergic receptors (= purinoceptors), using ATP, ADP, UTP or adenosine as endogenous ligands, play a significant role as transmitters for fast neurotransmission at the level of hypothalamic nuclei involved within the above mentioned autonomic circuitries. Functional expression of purinergic receptors within the MnPO has not been demonstrated yet. Therefore the thesis presented dealt with the detailed pharmacological, molecular biological and immunocytochemical characterization of ionotropic purinoceptors of MnPO origin.

- (1) With regard to the expression of various purinoceptor subtypes of the P2X family within the MnPO, quantitative RT-PCR analysis revealed minor differences between the expression patterns derived from MnPO tissues of neonatal *versus* adult animals. The MnPO parenchyma of neonatal rats primarily contained mRNAs coding for P2X₂ and P2X₄, followed by P2X₇ and P2X₆, with marginal expression of the subtypes P2X₃ and P2X₅. Within the MnPO of adult rats, on the other hand, P2X₄, followed by P2X₇ and P2X₃ showed the highest expression rates.
- (2) Employing immunohistochemistry on coronal sections derived from transcidentally perfusion-fixed adult rat brains, P2X₁ and P2X₂ could be detected in neurons, and to a limited extent also astrocytes of the MnPO, as well as P2X₄ in perivascular microglial cells. Cell type –specific proofs for the expression of certain P2X purinoceptor subtypes was made possible by the establishment of a MnPO primary culture system from neonatal rat brains. The P2X₁ receptor proved to be expressed by numerous MnPO-intrinsic neurons, astrocytes as well as oligodendrocytes, but not by microglial cells. The P2X₂ receptor subtype, on the other hand, was primarily

expressed in neurons, and a few astrocytes. The P2X₄ receptor subtype could exclusively be demonstrated in microglial cells of the MnPO primary culture system.

- (3) In detailed pharmacological studies performed on neurons, astrocytes and oligodendrocytes of the established MnPO primary culture, after the cells being loaded with the calcium sensitive fluorescence dye Fura-2 to be able to continuously follow intracellular calcium signalling upon purinergic stimulation, the expression profile of various purinoceptor subtypes was investigated. Subtype-specific agonists and antagonists were employed for the microspectrofluorimetric analysis of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{iz}$). Due to only marginal uptake of the Fura-2 into the cytosol, microglial cells had to be excluded from analysis. As the prime agonist for the activation of calcium currents, the ATP analogue 2Me-SATP was employed in addition to the endogenous ligand ATP in superfusion stimulation experiments.
- (a) Neurons of the MnPO primary culture did not show a clear-cut dose-response relationship with regard to the rise in $[Ca^{2+}]_{iz}$ evoked by superfusion stimulation with 2Me-SATP (10^{-8} – 10^{-6} M/L), whereas astrocytes and oligodendrocytes did. With regard to neurons and oligodendrocytes, the rise in intracellular calcium proved to be exclusively due to influx of extracellular calcium, whereas an additional intracellular calcium store must be taken into consideration for the signalling in astrocytes.
- (b) Most of the MnPO neurons demonstrated a fast rise in $[Ca^{2+}]_{iz}$ without signs of desensitization due to stimulation with the agonist 2Me-SATP. In addition, repetitive equimolar stimulations even with short time intervals did not reveal decrement. For numerous neuroglial cells, however, desensitization developed already during ongoing agonist superfusion stimulation. Responsiveness to repetitive stimulations could be influenced in a positive sense when time intervals between single stimuli were enlarged.
- (c) In none of the three cell groups of the MnPO primary culture system, P2X₁-receptor specific (α,β me-ATP), P2X₇-receptor specific (Bz-ATP) or adenosine receptor specific (NECA, CCPA) agonists were able to elicit intracellular calcium signalling.
- (d) In the presence of two-valent Zn²⁺ ions (10^{-5} M/L), acting as an allosteric modulator of receptor-ligand binding, calcium currents induced by the agonist 2Me-SATP proved to be potentiated for neurons, but inhibited for neuroglial cells such as astrocytes and oligodendrocytes. All three cell types showed marked inhibition of agonist induced calcium signalling in the presence of purinoceptor antagonists with a hierarchy of potencies as follows: RB2 > TNP-ATP > PPADS,

- (4) Proinflammatory cytokines such as TNF- α or IL-6 are primarily biosynthesized by astrocytes and microglial cells. Incubation of MnPO primary culture dishes with ATP or 2Me-SATP induced time as well as concentration dependent release of both proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, into the supernatant, as determined by cytokine-specific bioassay systems. Furthermore, cytokine release stimulated by bacterial lipopolysaccharide (LPS) could partially be suppressed by the purinoceptor antagonists PPADS and TNP-ATP.
- (5) For neurons of the rat MnPO, the functional expression of primarily P2X₂ purinoceptors may be postulated based on QRT-PCR analysis of MnPO tissue, the immunocytochemical staining both in brains sections and the MnPO primary culture system, as well as the detailed pharmacological characterization by calcium-based microspectrofluorimetry. Neuroglial cells might, in addition to P2X₂, also express functional purinoceptors of the P2X₁ or P2X₁-like subtype. In addition, the participation of metabotropic purinergic receptors such as P2Y₁ cannot be ruled out. With regard to the microglial cells of the MnPO, endogenous ATP might, P2X₄ purinoceptor-mediated, induce the release of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6.

6. Abkürzungsverzeichnis

α,β me-ATP	α,β -Methylenadenosin 5`-triphosphat
ABC	ATP binding cassette
AC	anteriore Kommissur
aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ADH	antidiuretisches Hormon
AGRP	Agouti gene related protein
AMP	Adenosin 5`-monophosphat
Ang II	Angiotensin II
ANS	autonomes Nervensystem
AP	<i>Area postrema</i>
APR	Akute-Phase-Reaktion
ARAS	aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem
ARW	Anregungswellenlänge
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
AS	Aminosäure
ARW	Anregungswellenlänge
ATP	Adenosin 5`triphosphat
AV3V	anterio-ventrale Region des dritten Ventrikel
BAT	Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue)
BBG	Brilliant Blue G
BF	basales Vorderhirn
BHS	Blut-Hirn Schranke
BrdU	Bromdesoxyuridin
Bz-ATP	2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin 5'-triphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin 5`-monophosphat
CART	Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript
CCK	Cholecystokinin
CCPA	2-Chloro-N6-Cyclopentyladenosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	zyklisches Guanosin 5`-monophosphat
CNPase	zyklische Nukleotidphosphodiesterase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Zyklooxygenase
CREB	cAMP-responsives Element-bindendes Protein
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CVO's	zirkumventrikuläre Organe
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'-6-Diamidin-2`-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRG	dorsal root ganglion
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
E-NPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatasen/-phosphodiesterasen
ENT	equilibrative nucleosid transporter
E-NTPDase	Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-related kinases

EZF	extrazelluläre Flüssigkeit
FURA-2 AM	FURA-2 Acetoxymethylester
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBSS	Geys balanced salt solution
GCS	<i>Ganglion cervicale superior</i>
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GN	<i>Ganglion nodosum</i>
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GT	<i>Ganglion trigeminale</i>
HBSS	Hanks balanced salt solution
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
ICE	Interleukin-1 β converting enzyme
icv	intracerebroventrikulär
ih	intrahypothalamisch
IL	Interleukin
INF	Interferon
ip	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
iv	intravenös
JAK	Janus Kinase
KT	Körpertemperatur
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LH	lateraler Hypothalamus
LIF	leukemia inhibitory factor
LPBN	<i>Nucleus lateralis parabrachialis</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LPT	<i>Nucleus tegmentalis posterolateralis</i>
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MCH	melanin concentrating hormone
MCP-1	monozyte chemoattractant protein-1
MC-R	Melanocortin-Rezeptoren
MDR	multi drug resistance transporter
MDT	Magen-Darm-Trakt
ME	<i>Eminetia mediana</i>
2Me-SATP	2-Methylthioadenosin 5'-triphosphat
MMLV	moloney murine leukemia virus
MNC	magnozellige neurosekretorische Zellen
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
MS	multiple Sklerose
α -MSH	α -Melanocyten-stimulierenden Hormons
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAC	<i>Nucleus accumbens</i>
NECA	Adenosin-5'-N-Ethylcarboxamid
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ -exchanger regulatory factor
NHS	normal horse serum
NMR	<i>Nucleus raphe medianus</i>
NTG	<i>Nucleus trigeminale</i>
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotide-binding oligomerization domain 2

NPY	Neuropeptid Y
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
oATP	oxidiertes Adenosin 5`-triphosphat
OC	<i>Chiasma opticum</i>
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
P1	metabotroper Adenosinrezeptor
P2X	ionotroper purinerner Rezeptor
P2Y	metabotroper purinerner Rezeptor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PB	Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
POA	mediale präoptische Region
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-Azo (Benzol-2,4-Disulfonsäure)
PPT	<i>Nucleus tegmentalis pedunculopontinus</i>
PRV	Pseudorabies Virus
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
Rb2	reactive blue 2
REM	rapid eye movement
ROI	region of interest
RSNA	renale sympathische Nervenaktivität
(Q)RT-PCR	(quantitative) reverse Transkriptase PCR
sc	subcutan
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SCO	<i>Organum subcommissurale</i>
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SPZ	subparaventriculäre Zone
STAT	signal transducer and activator of transcription
TACE	tumornekrosis factor- α converting enzyme
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	<i>Nucleus tuberomammillare</i>
TNP-ATP	2`,3`-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) Adenosin-5`-triphosphat
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TRP	transient receptor potential
UDP	Uridin 5`-diphosphat
UT	Umgebungstemperatur
UTP	Uridin 5`triphosphat
UV	ultraviolett
VLPO	<i>Nucleus ventrolateralis praeopticus</i>
VMH	ventromedialer Hypothalamus
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp. 1987.** Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17: 1411-1416.
- Abbracchio, M. P., and G. Burnstock. 1994.** Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475.
- Abbracchio, M. P., and S. Ceruti. 2006.** Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal* 2: 595-604.
- Abbracchio, M. P., R. Brambilla, S. Ceruti, and F. Cattabeni. 1999.** Signalling mechanisms involved in P2Y receptor-mediated reactive astrogliosis. *Prog Brain Res* 120: 333-342.
- Abbracchio, M. P., S. Ceruti, R. Langfelder, F. Cattabeni, M. J. Saffrey, and G. Burnstock. 1995.** Effects of ATP analogues and basic fibroblast growth factor on astroglial cell differentiation in primary cultures of rat striatum. *Int J Dev Neurosci* 13: 685-693.
- Abbracchio, M. P., S. Ceruti, C. Bolego, L. Puglisi, G. Burnstock, and F. Cattabeni. 1995a.** Trophic roles of P2 purinoceptors in central nervous system astroglial cells, *In Proceedings of the Ciba Foundation Symposium 198 on: P2 Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanism*, Wiley Press, Chichester. pp. 141-147.
- Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, M. T. Miras-Portugal, B. F. King, C. Gachet, K. A. Jacobson, G. A. Weisman, and G. Burnstock. 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., G. Burnstock, J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. A. Jacobson, and G. A. Weisman. 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.
- Abraham, E. H., A. G. Prat, L. Gerweck, T. Seneveratne, R. J. Arceci, R. Kramer, G. Guidotti, and H. F. Cantiello. 1993.** The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 312-316.
- Abrahamson, E. E., R. K. Leak, and R. Y. Moore. 2001.** The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12: 435-440.
- Adachi, A., A. Niijima, and H. L. Jacobs. 1976.** An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol* 231: 1043-1049.
- Agrawal, S. K., R. Nashmi, and M. G. Fehlings. 2000.** Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. *Neuroscience* 99: 179-188.
- Agresti, C., M. E. Meomartini, S. Amadio, E. Ambrosini, C. Volonte, F. Aloisi, and S. Visentin. 2005.** ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 157-165.
- Alam, M. N., D. McGinty, and R. Szymusiak. 1995.** Neuronal discharge of preoptic/anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep. *Am J Physiol* 269: R1240-1249.
- Alam, M. N., D. McGinty, and R. Szymusiak. 1997.** Thermosensitive neurons of the diagonal band in rats: relation to wakefulness and non-rapid eye movement sleep. *Brain Res* 752: 81-89.
- Alexander, S. P., A. Mathie, and J. A. Peters. 2008.** Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 2: S1-S209.

- Anderson, R., M. J. Sheehan, and P. Strong. 1994.** Characterization of the adenosine receptors mediating hypothermia in the conscious mouse. *Br J Pharmacol* 113: 1386-1390.
- Andrews, W. H., and J. Orbach. 1974.** Sodium receptors activating some nerves of perfused rabbit livers. *Am J Physiol* 227: 1273-1275.
- Aschrafi, A., S. Sadtler, C. Niculescu, J. Rettinger, and G. Schmalzing. 2004.** Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342: 333-343.
- Ashford, M. L., P. R. Boden, and J. M. Treherne. 1990.** Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch* 415: 479-483.
- Ashwell, K. 1991.** The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58: 1-12.
- Aston-Jones, G., and F. E. Bloom. 1981.** Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1: 876-886.
- Baertschi, A. J., and P. G. Vallet. 1981.** Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *J Physiol* 315: 217-230.
- Bagdade, J. D., E. L. Bierman, and D. Porte, Jr. 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.
- Bamshad, M., C. K. Song, and T. J. Bartness. 1999.** CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276: R1569-R1578.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, and R. D. Broadwell. 1995.** Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2: 241-248.
- Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan, and L. M. Maness. 1996.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305-311.
- Bard, J. A., M. W. Walker, T. A. Branchek, and R. L. Weinschenk. 1995.** Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. *J Biol Chem* 270: 26762-26765.
- Barone, F. C., B. Arvin, R. F. White, A. Miller, C. L. Webb, R. N. Willette, P. G. Lysko, and G. Z. Feuerstein. 1997.** Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28: 1233-1244.
- Barres, B. A. 1991.** New roles for glia. *J Neurosci* 11: 3685-3694.
- Barros, R. C., L. G. Branco, and E. C. Carnio. 2006.** Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 153: 115-125.
- Bar-Yehuda, S., M. H. Silverman, W. D. Kerns, A. Ochaion, S. Cohen, and P. Fishman. 2007.** The anti-inflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists: a novel targeted therapy for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 1601-1613.
- Basheer, R., L. Halldner, L. Alanko, R. W. McCarley, B. B. Fredholm, and T. Porkka-Heiskanen. 2001.** Opposite changes in adenosine A1 and A2A receptor mRNA in the rat following sleep deprivation. *Neuroreport* 12: 1577-1580.
- Baskin, D. G., J. F. Breininger, and M. W. Schwartz. 1999.** Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-833.
- Baylor, S. M., and S. Hollingworth. 2000.** Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca²⁺] signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol Sci* 15: 19-26.
- Bean, B. P. 1992.** Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13: 87-90.

- Becher, B., V. Fedorowicz, and J. P. Antel. 1996.** Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res* 45: 375-381.
- Beck, B. 2006.** Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Phil Trans R Soc B* 361: 1159-1185.
- Beck, B., and S. Richey. 1999.** Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 119-122.
- Benington, J. H., and H. C. Heller. 1995.** Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45: 347-360.
- Bennett, I. L., Jr., and P. B. Beeson. 1953.** Studies on the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. *J Exp Med* 98: 493-508.
- Bergen, H. T., N. Monkman, and C. V. Mobbs. 1996.** Injection with gold thioglucose impairs sensitivity to glucose: evidence that glucose-responsive neurons are important for long-term regulation of body weight. *Brain Res* 734: 332-336.
- Berridge, C. W., and S. L. Foote. 1996.** Enhancement of behavioral and electroencephalographic indices of waking following stimulation of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region of the basal forebrain. *J Neurosci* 16: 6999-7009.
- Bianchi, B. R., K. J. Lynch, E. Touma, W. Niforatos, E. C. Burgard, K. M. Alexander, H. S. Park, H. Yu, R. Metzger, E. Kowaluk, M. F. Jarvis, and T. van Biesen. 1999.** Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376: 127-138.
- Bianco, F., M. Fumagalli, E. Pravettoni, N. D'Ambrosi, C. Volonte, M. Matteoli, M. P. Abbraccio, and C. Verderio. 2005.** Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 144-156.
- Bicego, K. C., R. C. Barros, and L. G. Branco. 2007.** Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147: 616-639.
- Bicknell, R. J. 1988.** Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *J Exp Biol* 139: 51-65.
- Bie, P. 1980.** Osmoreceptors, vasopressin, and control of renal water excretion. *Physiol Rev* 60: 961-1048.
- Bigonnesse, F., S. A. Levesque, F. Kukulski, J. Lecka, S. C. Robson, M. J. Fernandes, and J. Seigny. 2004.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43: 5511-5519.
- Billington, C. J., J. E. Briggs, S. Harker, M. Grace, and A. S. Levine. 1994.** Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266: R1765-R1770.
- Bisset, G. W., and H. S. Chowdrey. 1988.** Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol* 73: 811-872.
- Blankenfeld, G., A. Verhkratsky, and H. Kettenmann. 1992.** Ca²⁺ channels expression in oligodendroglial lineage. *Eur J Neurosci* 4: 1035-1048.
- Blatteis, C. M. 2000.** The afferent signalling of fever. *J Physiol* 526 Pt 3: 470.
- Blatteis, C. M. 2006.** Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther* 111: 194-223.
- Blatteis, C. M., N. Quan, L. Xin, and A. L. Ungar. 1990.** Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull* 25: 895-901.
- Bo, X., Y. Zhang, M. Nassar, G. Burnstock, and R. Schoepfer. 1995.** A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 375: 129-133.

- Bogdanov, Y. D., L. Dale, B. F. King, N. Whittock, and G. Burnstock. 1997.** Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J Biol Chem* 272: 12583-12590.
- Boldogkoi, Z., B. Schutz, J. Sallach, and A. Zimmer. 2002.** P2X(3) receptor expression at early stage of mouse embryogenesis. *Mech Dev* 118: 255-260.
- Bolego, C., S. Ceruti, R. Brambilla, L. Puglisi, F. Cattabeni, G. Burnstock, and M. P. Abbracchio. 1997.** Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis. *Br J Pharmacol* 121: 1692-1699.
- Boone, M., and P. M. D. Deen. 2008.** Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch* 456: 1005-1024.
- Borbely, A. A. 1982.** A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1: 195-204.
- Boucein, C., H. Kettenmann, and C. Nolte. 2000.** Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci* 12: 2049-2058.
- Boue-Grabot, E., V. Archambault, and P. Seguela. 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.
- Boulant, J. A. 1981.** Hypothalamic mechanisms in thermoregulation. *Fed Proc* 40: 2843-2850.
- Boulant, J. A. 1998.** Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci* 856: 108-115.
- Boulant, J. A. 1998a.** Neural thermal reception and regulation of body temperature, *In* C. Blatteis [ed.], *Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation*. World Scientific, Singapore. pp. 93-105.
- Boulant, J. A. 2000.** Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 5: S157-S161.
- Boulant, J. A., and J. B. Dean. 1986.** Temperature receptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 48: 639-654.
- Bourque, C., and S. H. Oliet (1997).** Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 59: 601-619.
- Bourque, C. W. 2008.** Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Rev Neurosci* 9: 519-531.
- Bourque, C. W., S. H. Oliet, and D. Richard. 1994.** Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15: 231-274.
- Bradbury, E. J., G. Burnstock, and S. B. McMahon. 1998.** The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 12: 256-268.
- Bradbury, M. W. 1984.** The structure and function of the blood-brain barrier. *Fed Proc* 43: 186-190.
- Brake, A. J., and D. Julius. 1996.** Signaling by extracellular nucleotides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 519-541.
- Brake, A. J., M. J. Wagenbach, and D. Julius. 1994.** New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523.
- Brambilla, R., G. Burnstock, A. Bonazzi, S. Ceruti, F. Cattabeni, and M. P. Abbracchio. 1999.** Cyclo-oxygenase-2 mediates P2Y receptor-induced reactive astrogliosis. *Br J Pharmacol* 126: 563-567.
- Brambilla, R., J. T. Neary, F. Cattabeni, L. Cottini, G. D'Ippolito, P. C. Schiller, and M. P. Abbracchio. 2002.** Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J Neurochem* 83: 1285-1296.
- Brambilla, R., J. T. Neary, M. Fumagalli, L. Cottini, F. Cattabeni, P. R. Schiller, and M. P. Abbracchio. 2003.** 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.
- Brandle, U., P. Spielmanns, R. Osteroth, J. Sim, A. Surprenant, G. Buell, J. P. Ruppersberg, P. K. Plinkert, H. P. Zenner, and E. Glowatzki. 1997.** Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404: 294-298.
- Braun, N., J. Sevigny, S. K. Mishra, S. C. Robson, S. W. Barth, R. Gerstberger, K. Hammer, and H. Zimmermann. 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., J. Sevigny, S. C. Robson, K. Enjvoji, O. Guckelberger, K. Hammer, F. Di Virgilio, and H. Zimmermann. 2000.** Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci* 12: 4357-4366.
- Bray, G. A. 1996.** Static theories in a dynamic world: a glucodynamic theory of food intake. *Obes Res* 4: 489-492.
- Briski, K. P., and P. W. Sylvester. 1999.** Site-specific induction of Fos immunoreactivity in preoptic and hypothalamic NADPH-positive neurons during glucoprivation. *Neuroendocrinology* 69: 181-190.
- Broberger, C., M. Landry, H. Wong, J. N. Walsh, and T. Hokfelt. 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.
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, and T. Hokfelt. 1998.** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043-15048.
- Bronstein, D. M., M. K. Schafer, S. J. Watson, and H. Akil. 1992.** Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res* 587: 269-275.
- Brosenitsch, T. A., T. Adachi, J. Lipski, G. D. Housley, and G. D. Funk. 2005.** Developmental downregulation of P2X3 receptors in motoneurons of the compact formation of the nucleus ambiguus. *Eur J Neurosci* 22: 809-824.
- Brown, S. G., A. Townsend-Nicholson, K. A. Jacobson, G. Burnstock, and B. F. King. 2002.** Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 673-680.
- Brück, K. 1985.** Wärmehaushalt und Temperaturregulation. In R. F. Schmidt, Thews, G. [ed.], *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 583-601.
- Bsibsi, M., R. Ravid, D. Gveric, and J. M. van Noort. 2002.** Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 1013-1021.
- Buell, G., C. Lewis, G. Collo, R. A. North, and A. Surprenant. 1996.** An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15: 55-62.
- Buell, G., I. P. Chessell, A. D. Michel, G. Collo, M. Salazzo, S. Herren, D. Gretener, C. Grahames, R. Kaur, M. H. Kosco-Vilbois, and P. P. Humphrey. 1998.** Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood* 92: 3521-3528.
- Bulanova, E., V. Budagian, Z. Orinska, M. Hein, F. Petersen, L. Thon, D. Adam, and S. Bulfone-Paus. 2005.** Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol* 174: 3880-3890.

- Buller, K. M., S. Khanna, J. R. Sibbald, and T. A. Day. 1996.** Central noradrenergic neurons signal via ATP to elicit vasopressin responses to haemorrhage. *Neuroscience* 73: 637-642.
- Bunge, R. P., M. B. Bunge, and M. Cochran. 1978.** Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin-forming cells. *Neurology* 28: 59-67.
- Burgard, E. C., W. Niforatos, T. van Biesen, K. J. Lynch, E. Touma, R. E. Metzger, E. A. Kowaluk, and M. F. Jarvis. 1999.** P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 82: 1590-1598.
- Burnstock, G. 1972.** Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581.
- Burnstock, G. 1976.** Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62: 491-503.
- Burnstock, G. 1978.** A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. *In* R. W. Straub, Bolis, L. [ed.], *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York. pp. 107-118.
- 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. 2006.** Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58: 58-86.
- 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., and C. Kennedy. 1985.** Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440.
- Burnstock, G., and G. E. Knight. 2004.** Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31-304.
- Burnstock, G., G. Campbell, D. Satchell, and A. Smythe. 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.
- Butt, A. M. 2006.** Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 54: 666-675.
- Butzkueven, H., J. G. Zhang, M. Soilu-Hanninen, H. Hochrein, F. Chionh, K. A. Shipham, B. Emery, A. M. Turnley, S. Petratos, M. Ernst, P. F. Bartlett, and T. J. Kilpatrick. 2002.** LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 8: 613-619.
- Buvinic, S., R. Briones, and J. P. Huidobro-Toro. 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., P. S. Widdowson, J. Harrold, S. Wilson, R. E. Buckingham, J. R. Arch, M. Tadayyon, J. C. Clapham, J. Wilding, and G. Williams. 1999.** Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48: 2132-2137.
- Calvert, J. A., and R. J. Evans. 2004.** Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Mol Pharmacol* 65: 139-148.
- Camacho, A., and M. I. Phillips. 1981.** Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Neurosci Lett* 25: 201-204.
- Card, J. P., J. C. Sved, B. Craig, M. Raizada, J. Vazquez, and A. F. Sved. 2006.** Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol* 499: 840-859.
- Cardullo, R. A., S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, and D. E. Wolf. 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., E. G. Delicado, A. I. Jimenez, R. Perez-Sen, and M. T. Miras-Portugal. 2005.** Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal* 1: 153-159.
- Castrop, H. 2007.** Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 189: 3-14.
- Chakfe, Y., R. Seguin, J. P. Antel, C. Morissette, D. Malo, D. Henderson, and P. Seguela. 2002.** ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci* 22: 3061-3069.
- Chakravarty, S., and M. Herkenham. 2005.** Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* 25: 1788-1796.
- Chehab, F. F., M. E. Lim, and R. Lu. 1996.** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12: 318-320.
- Chemelli, R. M., J. T. Willie, C. M. Sinton, J. K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J. A. Richardson, S. C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T. E. Fitch, M. Nakazato, R. E. Hammer, C. B. Saper, and M. Yanagisawa. 1999.** Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98: 437-451.
- Chen, C., M. S. Parker, A. P. Barnes, P. Deininger, and R. P. Bobbin. 2000a.** Functional expression of three P2X(2) receptor splice variants from guinea pig cochlea. *J Neurophysiol* 83: 1502-1509.
- Chen, S., Y. Q. Ren, R. Bing, and D. E. Hillman. 2000b.** Alpha 1E subunit of the R-type calcium channel is associated with myelinogenesis. *J Neurocytol* 29: 719-728.
- Cheneval, D., P. Ramage, T. Kastelic, T. Szelestenyi, H. Niggli, R. Hemmig, M. Bachmann, and A. MacKenzie. 1998.** Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing. *J Biol Chem* 273: 17846-17851.
- Chessell, I. P., A. D. Michel, and P. P. Humphrey. 1997.** Properties of the pore-forming P2X7 purinoceptor in mouse NTW8 microglial cells. *Br J Pharmacol* 121: 1429-1437.
- Chessell, I. P., J. Simon, A. D. Hibell, A. D. Michel, E. A. Barnard, and P. P. Humphrey. 1998.** Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* 439: 26-30.
- Cheung, C. C., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 1997.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138: 4489-4492.
- Cheung, K. K., W. Y. Chan, and G. Burnstock. 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.
- Chevrier, C., L. Bourdon, and F. Canini. 2006.** Cosignaling of adenosine and adenosine triphosphate in hypobaric hypoxia-induced hypothermia. *Am J Physiol* 290: R595-R600.
- Choi, H. B., J. K. Ryu, S. U. Kim, and J. G. McLarnon. 2007.** Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci* 27: 4957-4968.
- Choi-Kwon, S., and A. J. Baertschi. 1991.** Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. *Am J Physiol* 261: E18-E25.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Chou, T. C., A. A. Bjorkum, S. E. Gaus, J. Lu, T. E. Scammell, and C. B. Saper. 2002.** Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22: 977-990.

- Chou, T. C., T. E. Scammell, J. J. Gooley, S. E. Gaus, C. B. Saper, and J. Lu. 2003.** Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23: 10691-10702.
- Chow, Y. W., and H. L. Wang. 1998.** Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 70: 2606-2612.
- Ciriello, J., and F. R. Calaresu. 1980.** Monosynaptic pathway from cardiovascular neurons in the nucleus tractus solitarii to the paraventricular nucleus in the cat. *Brain Res* 193: 529-533.
- Clark, D. J., and J. E. Fewell. 1994.** Body-core temperature decreases during hypoxic hypoxia in Long-Evans and Brattleboro rats. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1528-1531.
- Clyne, J. D., L. D. LaPointe, and R. I. Hume. 2002.** The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J Physiol* 539: 347-359.
- Cockayne, D. A., P. M. Dunn, Y. Zhong, W. Rong, S. G. Hamilton, G. E. Knight, H. Z. Ruan, B. Ma, P. Yip, P. Nunn, S. B. McMahon, G. Burnstock, and A. P. Ford. 2005.** P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567: 621-639.
- Cockayne, D. A., S. G. Hamilton, Q. M. Zhu, P. M. Dunn, Y. Zhong, S. Novakovic, A. B. Malmberg, G. Cain, A. Berson, L. Kassotakis, L. Hedley, W. G. Lachnit, G. Burnstock, S. B. McMahon, and A. P. Ford. 2000.** Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011-1015.
- Coco, S., F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli, and C. Verderio. 2003.** Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278: 1354-1362.
- Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R. A. North, and G. Buell. 1997.** Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36: 1277-1283.
- Collo, G., R. A. North, E. Kawashima, E. Merlo-Pich, S. Neidhart, A. Surprenant, and G. Buell. 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., B. Robaye, and J. M. Boeynaems. 1999.** Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol* 128: 1199-1206.
- Communi, D., N. S. Gonzalez, M. Detheux, S. Brezillon, V. Lannoy, M. Parmentier, and J. M. Boeynaems. 2001.** Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 276: 41479-41485.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer, and et al. 1996.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.
- Conti, B., I. Tabarean, C. Andrei, and T. Bartfai. 2004.** Cytokines and fever. *Front Biosci* 9: 1433-1449.
- Coons, A. H. 1958.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1: 399-422.
- Cottrell, G. T., and A. V. Ferguson. 2004.** Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept* 117: 11-23.
- Cruz, H. J., E. M. Dias, J. L. Moreira, and M. J. Carrondo. 1997.** Cell-dislodging methods under serum-free conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 482-488.
- Cunningham, E. T., Jr., and P. E. Sawchenko. 1988.** Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274: 60-76.

- Dallman, M. F., A. M. Strack, S. F. Akana, M. J. Bradbury, E. S. Hanson, K. A. Scribner, and M. Smith. 1993.** Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* 14: 303-347.
- D'Ambrosi, N., B. Murra, F. Cavaliere, S. Amadio, G. Bernardi, G. Burnstock, and C. Volonte. 2001.** Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells. *Neuroscience* 108: 527-534.
- Dantzer, R. 2001a.** Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933: 222-234.
- Dantzer, R. 2001b.** Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15: 7-24.
- Darby, M., J. B. Kuzmiski, W. Panenka, D. Feighan, and B. A. MacVicar. 2003.** ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol* 89: 1870-1877.
- D'Ascenzo, M., M. Vairano, C. Andreassi, P. Navarra, G. B. Azzena, and C. Grassi. 2004.** Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R- (Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 45: 354-363.
- Day, T. A., and L. P. Renaud. 1984.** Electrophysiological evidence that noradrenergic afferents selectively facilitate the activity of supraoptic vasopressin neurons. *Brain Res* 303: 233-240.
- Day, T. A., J. R. Sibbald, and S. Khanna. 1993.** ATP mediates an excitatory noradrenergic neuron input to supraoptic vasopressin cells. *Brain Res* 607: 341-344.
- Dement, W., and N. Kleitman. 1957.** Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 9: 673-690.
- Denlinger, L. C., P. L. Fiset, J. A. Sommer, J. J. Watters, U. Prabhu, G. R. Dubyak, R. A. Proctor, and P. J. Bertics. 2001.** Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167: 1871-1876.
- Deurveilher, S., and K. Semba. 2003.** Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. *Brain Res* 987: 100-106.
- Deurveilher, S., and K. Semba. 2005.** Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130: 165-183.
- DiBona, G. F. 2000.** Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 36: 1083-1088.
- Dijk, D. J., and C. Cajochen. 1997.** Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms* 12: 627-635.
- Dimicco, J. A., and D. V. Zaretsky. 2007.** The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol* 292: R47-R63.
- Ding, S., and F. Sachs. 1999.** Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol* 113: 695-720.
- Dixon, A. K., A. K. Gubit, D. J. Sirinathsingji, P. J. Richardson, and T. C. Freeman. 1996.** Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118: 1461-1468.
- Domaradzka-Pytel, B., B. Ludkiewicz, H. Jagalska-Majewska, and J. Morys. 2000.** Immunohistochemical study of microglial and astroglial cells during postnatal development of rat striatum. *Folia Morphol (Warsz)* 58: 315-323.
- Dröbner, K., and D. Gemsa. 2000.** Wörterbuch der Immunologie. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin.

- Drury, A. N., and A. Szent-Gyorgyi. 1929.** The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237.
- Duan, S., C. M. Anderson, E. C. Keung, Y. Chen, and R. A. Swanson. 2003.** P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23: 1320-1328.
- Dubyak, G. R., and C. el-Moatassim. 1993.** Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-C606.
- Dumuis, A., J. P. Pin, and K. Oomargari. 1989.** ATP-evoked calcium mobilisation and prostanoid release from astrocytes. *J Neurochem* 52: 971-977.
- Dunn, P. M., Y. Zhong, and G. Burnstock. 2001.** P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* 65: 107-134.
- Dunn-Meynell, A. A., E. Govek, and B. E. Levin. 1997a.** Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Res* 748: 100-106.
- Dunn-Meynell, A. A., V. H. Routh, J. J. McArdle, and B. E. Levin. 1997b.** Low-affinity sulfonylurea binding sites reside on neuronal cell bodies in the brain. *Brain Res* 745: 1-9.
- Dunwiddie, T. V., and S. A. Masino. 2001.** The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55.
- Dunwiddie, T. V., L. Diao, and W. R. Proctor. 1997.** Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7673-7682.
- Dupre, R. K., and T. L. Owen. 1992.** Behavioral thermoregulation by hypoxic rats. *J Exp Zool* 262: 230-235.
- Dutton, J. L., P. Poronnik, G. H. Li, C. A. Holding, R. A. Worthington, R. J. Vandenberg, D. I. Cook, J. A. Barden, and M. R. Bennett. 2000.** P2X(1) receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39: 2054-2066.
- Edwards, G. L., J. T. Cunningham, T. G. Beltz, and A. K. Johnson. 1989.** Neuropeptide Y-immunoreactive cells in the caudal medulla project to the median preoptic nucleus. *Neurosci Lett* 105: 19-26.
- Egawa, M., H. Yoshimatsu, and G. A. Bray. 1991.** Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260: R328-R334.
- Ek, M., M. Kurosawa, T. Lundberg, and A. Ericsson. 1998.** Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 18: 9471-9479.
- Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 1998a.** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-1385.
- Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 1999.** Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.
- Elias, C. F., C. B. Saper, E. Maratos-Flier, N. A. Tritos, C. Lee, J. Kelly, J. B. Tatro, G. E. Hoffman, M. M. Ollmann, G. S. Barsh, T. Sakurai, M. Yanagisawa, and J. K. Elmquist. 1998b.** Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402: 442-459.
- Elmquist, J. K., C. F. Elias, and C. B. Saper. 1999.** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.
- Elmquist, J. K., E. Maratos-Flier, C. B. Saper, and J. S. Flier. 1998.** Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1: 445-450.

- Ennion, S. J., and R. J. Evans. 2001.** Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens. *FEBS Lett* 489: 154-158.
- Erb, L., Z. Liao, C. I. Seye, and G. A. Weisman. 2006.** P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452: 552-562.
- Espallergues, J., O. Solovieva, V. Técher, K. Bauer, G. Alonso, A. Vincent, and N. Hussy. 2007.** Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neurosci* 148: 712-723.
- Espevik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986.** A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95: 99-105.
- Evans, R. J., C. Lewis, G. Buell, S. Valera, R. A. North, and A. Surprenant. 1995.** Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48: 178-183.
- Ewart-Toland, A., K. Mounzih, J. Qiu, and F. F. Chehab. 1999.** Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* 140: 732-738.
- Farber, K., and H. Kettenmann. 2005.** Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 133-143.
- Farber, K., and H. Kettenmann. 2006.** Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch* 452: 615-621.
- Feldberg, W., and S. L. Sherwood. 1954.** Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J Physiol* 123: 148-167.
- Ferrari, D., S. Wesselborg, M. K. Bauer, and K. Schulze-Osthoff. 1997a.** Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* 139: 1635-1643.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau, and F. Di Virgilio. 1997b.** Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185: 579-582.
- Ferrari, D., M. Villalba, P. Chiozzi, S. Falzoni, P. Ricciardi-Castagnoli, and F. Di Virgilio. 1996.** Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol* 156: 1531-1539.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O. R. Baricordi, and F. Di Virgilio. 1997c.** Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159: 1451-1458.
- Fields, R. D., and B. Stevens-Graham. 2002.** New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556-562.
- Fischer, W., K. Appelt, M. Grohmann, H. Franke, W. Nörenberg, and P. Illes. 2009.** Increase of intracellular Ca²⁺ by P2X and P2Y receptor-subtypes in cultured cortical astroglia of the rat. *Neurosci* (Epub ahead of print).
- Fiske, C. H., and Y. Subbarow. 1929.** Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science* 70: 381-382.
- Florenzano, F., M. T. Viscomi, V. Mercaldo, P. Longone, G. Bernardi, C. Bagni, M. Molinari, and P. Carrive. 2006.** P2X2R purinergic receptor subunit mRNA and protein are expressed by all hypothalamic hypocretin/orexin neurons. *J Comp Neurol* 498: 58-67.
- Fornal, C., S. Auerbach, and B. L. Jacobs. 1985.** Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. *Exp Neurol* 88: 590-608.
- Frangakis, M. V., and H. K. Kimelberg. 1984.** Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 9: 1689-1698.
- Frangakis, M. V., W. J. Koopman, H. Kiyono, S. M. Michalek, and J. R. McGhee. 1982.** An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods* 48: 33-44.

- Franke, H., U. Krugel, and P. Illes. 1999.** P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28: 190-200.
- Franke, H., J. Grosche, H. Schadlich, U. Krugel, C. Allgaier, and P. Illes. 2001a.** P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108: 421-429.
- Franke, H., U. Krugel, R. Schmidt, J. Grosche, A. Reichenbach, and P. Illes. 2001b.** P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. *Br J Pharmacol* 134: 1180-1189.
- Freake, H. C., and J. H. Oppenheimer. 1995.** Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr* 15: 263-291.
- Fredholm, B. B., K. Battig, J. Holmen, A. Nehlig, and E. E. Zvartau. 1999.** Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51: 83-133.
- Fredholm, B. B., I. J. AP, K. A. Jacobson, K. N. Klotz, and J. Linden. 2001.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552.
- Freshney, R. I. 1990.** Tierische Zellkulturen - Ein Methoden-Handbuch. de Gruyter, Berlin.
- Freund, S., M. Ungerer, and M. J. Lohse. 1994.** A1 adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350: 49-56.
- Friday, S. C., and R. I. Hume. 2008.** Contribution of extracellular negatively charged residues to ATP action and zinc modulation of rat P2X2 receptors. *J Neurochem* 105: 1264-1275
- Frost, E. E., R. Milner, and C. Ffrench-Constant. 2000.** Migration assays for oligodendrocyte precursor cells. *Methods Mol Biol* 139: 265-278.
- Fukuda, M., T. Ono, H. Nishino, and K. Sasaki. 1984.** Independent glucose effects on rat hypothalamic neurons: an in vitro study. *J Auton Nerv Syst* 10: 373-381.
- Fumagalli, M., R. Brambilla, N. D'Ambrosi, C. Volonte, M. Matteoli, C. Verderio, and M. P. Abbracchio. 2003.** Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218-223.
- Gallopin, T., P. H. Luppi, B. Cauli, Y. Urade, J. Rossier, O. Hayaishi, B. Lambolez, and P. Fort. 2005.** The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134: 1377-1390.
- Gao, B., and R. Y. Moore. 1996.** Glutamic acid decarboxylase message isoforms in human suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 11: 172-179.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, B. Laube, and W. Stuhmer. 1996.** Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett* 388: 123-127.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, J. M. Gomez-Hernandez, P. E. Lund, and W. Stuhmer. 1997.** Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol* 51: 109-118.
- Garden, G. A., and T. Moller. 2006.** Microglia biology in health and disease, *J Neuro-immune Pharmacol* 1: 127-137.
- Garlicki, J., P. K. Konturek, J. Majka, N. Kwiecien, and S. J. Konturek. 1990.** Cholecystinin receptors and vagal nerves in control of food intake in rats. *Am J Physiol* 258: E40-E45.
- Gaus, S. E., R. E. Strecker, B. A. Tate, R. A. Parker, and C. B. Saper. 2002.** Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* 115: 285-294.
- Gaykema, R. P., I. Dijkstra, and F. J. Tilders. 1995.** Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* 136: 4717-4720.

- Gebicke-Haerter, P. J., F. Christoffel, J. Timmer, H. Northoff, M. Berger, and D. Van Calker. 1996.** Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int* 29: 37-42.
- Gebke, E., A. R. Muller, M. Jurzak, and R. Gerstberger. 1998.** Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85: 509-520.
- Gebke, E., A. R. Muller, U. Pehl, and R. Gerstberger. 2000.** Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* 97: 371-381.
- Gentle, M. J. 1989.** Cutaneous sensory afferents recorded from the nervus intramandibularis of *Gallus gallus* var *domesticus*. *J Comp Physiol [A]* 164: 763-774.
- Gerashchenko, D., C. Blanco-Centurion, M. A. Greco, and P. J. Shiromani. 2003.** Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2-saporin on sleep in Long-Evans rats. *Neuroscience* 116: 223-235.
- Gerstberger, R., A. R. Muller, and T. Hübschle (1997).** Hypothalamic control of osmo-regulation. *In Perspectives in Avian Endocrinology* (Etches, R. and S. Harvey (eds), The Endocrine Society Press, England. pp. 289-303.
- Gerstberger, R. 1999.** Nitric oxide and body temperature control. *News Physiol Sci* 14: 30-36.
- Gerstberger, R., M. Horowitz, K. Hudl, S. W. Barth, P. Panagiotis, and T. Hübschle. 2001.** Differential activation of rat hypothalamic neurons by heat exposure and dehydration. *In M. Kosaka, T. Sugahara, K. L. Schmidt, and E. Simon [eds.], Thermotherapy: Principles and Practice - Applications in Neoplasia, Inflammation and Pain.* Springer Press, Tokyo. pp. 43-62.
- Gever, J. R., D. A. Cockayne, M. P. Dillon, G. Burnstock, and A. P. Ford. 2006.** Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452: 513-537.
- Gillespie, J. H. 1934.** The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80: 345-359.
- Goldbach, J. M., J. Roth, and E. Zeisberger. 1997.** Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am J Physiol* 272: R675-R681.
- Golozoubova, V., E. Hohtola, A. Matthias, A. Jacobsson, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2001.** Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb J* 15: 2048-2050.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Gualix, M. T. Miras-Portugal, and J. Pintor. 2000.** Adenosine 5'-tetrphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology* 39: 2381-2390.
- Gong, H., R. Szymusiak, J. King, T. Steininger, and D. McGinty. 2000.** Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming. *Am J Physiol Regul I* 279: R2079-R2088.
- Gong, H., C. Angara, K. T. Chew, F. Xu, D. McGinty, and R. Szymusiak. 2005.** Distribution of neurons in the preoptic hypothalamus that project to both the perifornical lateral hypothalamus and the locus coeruleus. *Sleep* 28: A33-A42.
- Gourine, A. V., N. Dale, V. N. Gourine, and K. M. Spyer. 2004.** Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front Biosci* 9: 1011-1022.
- Gourine, A. V., E. V. Melenchuk, D. M. Poputnikov, V. N. Gourine, and K. M. Spyer. 2002.** Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br J Pharmacol* 135: 2047-2055.
- Gourine, A. V., N. Dale, E. Llaudet, D. M. Poputnikov, K. M. Spyer, and V. N. Gourine. 2007.** Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol* 585: 305-316.
- Gourine, A. V., D. M. Poputnikov, N. Zhernosek, E. V. Melenchuk, R. Gerstberger, K. M. Spyer, and V. N. Gourine. 2005.** P2 receptor blockade attenuates fever

- and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br J Pharmacol* 146: 139-145.
- Grazi, V. M., and R. R. Miselis. 1980.** Afferent and efferent projections of the nucleus medianus: an HRP study. *Soc. Neurosci. Abstr.* 6: 127.
- Griffin, J. D. 2004.** Central thermosensitivity and the integrative responses of hypothalamic neurons. *J Therm Biol* 29: 327-331.
- Griffin, J. D., M. L. Kaple, A. R. Chow, and J. A. Boulant. 1996.** Cellular mechanisms for neuronal thermosensitivity in the rat hypothalamus. *J Physiol* 492: 231-242.
- Griffond, B., P. Y. Risold, C. Jacquemard, C. Colard, and D. Fellmann. 1999.** Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262: 77-80.
- Groschel-Stewart, U., M. Bardini, T. Robson, and G. Burnstock. 1999.** Localisation of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cell Tissue Res* 296: 599-605.
- Grundemar, L., J. L. Krstenansky, and R. Hakanson. 1993.** Activation of neuropeptide Y1 and neuropeptide Y2 receptors by substituted and truncated neuropeptide Y analogs: identification of signal epitopes. *Eur J Pharmacol* 232: 271-278.
- Grygorczyk, R., J. A. Tabcharani, and J. W. Hanrahan. 1996.** CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance. *J Membr Biol* 151: 139-148.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. 1985.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- Gu, G. B., and R. B. Simerly. 1997.** Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol* 384: 142-164.
- Gualix, J., J. Pintor, and M. T. Miras-Portugal. 1999.** Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 73: 1098-2004.
- Gumustekin, K., B. Seven, N. Karabulut, O. Aktas, N. Gursan, S. Aslan, M. Keles, E. Varoglu, and S. Dane. 2004.** Effects of sleep deprivation, nicotine, and selenium on wound healing in rats. *Int J Neurosci* 114: 1433-1442.
- Guo, L. H., K. T. Guo, H. P. Wendel, and H. J. Schluesener. 2006.** Combinations of TLR and NOD2 ligands stimulate rat microglial P2X4R expression. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1156-1162.
- Guo, W., X. Xu, X. Gao, B. Burnstock, C. HE; and Z. Xiang. 2008.** Expression of P2X₅ receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156: 673-692.
- Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. Bennett, A. C. Charles, and S. B. Kater. 1999.** ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19: 520-528.
- Gvilia, I., F. Xu, D. McGinty, and R. Szymusiak. 2006.** Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26: 9426-9433.
- Haberich, F. J. 1968.** Osmoreception in the portal circulation. *Fed Proc* 27: 1137-1141.
- Hagan, J. J., R. A. Leslie, S. Patel, M. L. Evans, T. A. Wattam, S. Holmes, C. D. Benham, S. G. Taylor, C. Routledge, P. Hemmati, R. P. Munton, T. E. Ashmeade, A. S. Shah, J. P. Hatcher, P. D. Hatcher, D. N. Jones, M. I. Smith, D. C. Piper, A. J. Hunter, R. A. Porter, and N. Upton. 1999.** Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10911-10916.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. 1998.** Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-272.
- Haines, W. R., G. E. Torres, M. M. Voigt, and T. M. Egan. 1999.** Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol Pharmacol* 56: 720-727.

- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
- Hall, R. A., L. S. Ostedgaard, R. T. Premont, J. T. Blitzer, N. Rahman, M. J. Welsh, and R. J. Lefkowitz. 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.
- Hallanger, A. E., A. I. Levey, H. J. Lee, D. B. Rye, and B. H. Wainer. 1987. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262: 105-124.
- Hammarberg, C., G. Schulte, and B. B. Fredholm. 2003. Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J Neurochem* 86: 1051-1054.
- Hammel, H. T. 1965. Neurones and temperature regulation. AMRL-TR-65-232. *Amrl Tr*: 1-32.
- Hammel, H. T. 1968. Regulation of internal body temperature. *Annu Rev Physiol* 30: 641-710.
- Hanisch, U. K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies - A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.
- Harnisch, U.-K., and H. Kettenmann. 2007. Microglia: active sensors and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci* 10: 1387-1394.
- Harré, E. M., J. Roth, R. Gerstberger, and T. Hubschle. 2003. Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980: 151-155.
- Hashimoto, M., T. Ueno, and M. Iriki. 1994. What roles does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? *Pflugers Arch* 429: 50-57.
- Hasko, G., C. Szabo, Z. H. Nemeth, V. Kvetan, S. M. Pastores, and E. S. Vizi. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157: 4634-4640.
- Hasko, G., D. G. Kuhel, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, E. A. Deitch, J. G. Mabley, A. Marton, and C. Szabo. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J* 14: 2065-2074.
- Hassinger, T. D., P. B. Guthrie, P. B. Atkinson, M. V. Bennett, and S. B. Kater. 1996. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13268-13273.
- Haydon, P. G. 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185-193.
- Haynes, A. C., B. Jackson, P. Overend, R. E. Buckingham, S. Wilson, M. Tadayyon, and J. R. Arch. 1999. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20: 1099-1105.
- He, M., and K. D. McCarthy. 1994. Oligodendroglial signal transduction systems are developmentally regulated. *J Neurochem* 63: 501-508.
- Heine, P., N. Braun, A. Heilbronn, and H. Zimmermann. 1999. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 262: 102-107.
- Heldmaier, G., and G. Neuweiler. 2004. *Temperaturwirkungen und Thermoregulation, In Vergleichende Tierphysiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 93-149
- Hensel, H. 1981. Thermoreception and temperature regulation. *Monogr Physiol Soc* 38: 1-321.

- Heppelmann, B., J. Gallar, B. Trost, R. F. Schmidt, and C. Belmonte. 2001.** Three-dimensional reconstruction of scleral cold thermoreceptors of the cat eye. *J Comp Neurol* 441: 148-154.
- Hernesniemi, J., E. Kawana, H. Bruppacher, and C. Sandri. 1972.** Afferent connections of the subfornical organ and of the supraoptic crest. *Acta Anat (Basel)* 81: 321-336.
- Herzog, H., Y. J. Hort, H. J. Ball, G. Hayes, J. Shine, and L. A. Selbie. 1992.** Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5794-5798.
- Heurteaux, C., I. Lauritzen, C. Widmann, and M. Lazdunski. 1995.** Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4666-4670.
- Hibell, A. D., E. J. Kidd, I. P. Chessell, P. P. Humphrey, and A. D. Michel. 2000.** Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol* 130: 167-173.
- Hide, I., M. Tanaka, A. Inoue, K. Nakajima, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata. 2000.** Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75: 965-972.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith. 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10: 413-417.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11: 1026-1030.
- Hinman, L. E., and P. J. Sammak. 1998.** Intensity modulation of pseudocolor images. *Biotechniques* 25: 124-128.
- Hiruma, H., and C. W. Bourque. 1995.** P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *J Physiol* 489: 805-811.
- Hoebel, B. G., L. Hernandez, D. H. Schwartz, G. P. Mark, and G. A. Hunter. 1989.** Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 575: 171-191; discussion 192-193.
- Hofer, H. 1958.** Zur Morphologie der zirkumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Zool Anz (Suppl)* 22: 203-251.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7276-7280.
- Holton, P. 1959.** The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145: 494-504.
- Homma, Y., S. J. Brull, and J. M. Zhang. 2002.** A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. *Pain* 95: 239-246.
- Honda, K., H. Negoro, R. E. Dyball, T. Higuchi, and S. Takano. 1990.** The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between the supraoptic and other diencephalic nuclei. *J Physiol* 431: 225-241.
- Honda, K., H. Aradachi, T. Higuchi, s. Takano, and H. Negoro. 1992.** Activation of para-ventricular neurosecretory cells by local osmotic stimulation of the median preoptic nucleus. *Brain Res* 594: 335-338.
- Honda, S., Y. Sasaki, K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Nakamura, K. Inoue, and S. Kohsaka. 2001.** Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21: 1975-1982.
- Hong, Z. Y., Z. L. Huang, W. M. Qu, N. Eguchi, Y. Urade, and O. Hayaishi. 2005.** An adenosine A receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats. *J Neurochem* 92: 1542-1549.

- Hori, T., T. Nakashima, S. Take, Y. Kaizuka, T. Mori, and T. Katafuchi. 1991.** Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Res Bull* 27: 309-313.
- Horne, J. A. 1988.** Why we sleep - The function of sleep in humans and other mammals. Oxford Univ Press, New York, Oxford.
- Horvath, T. L., S. Diano, and A. N. van den Pol. 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.
- Houpt, K. A. 1982.** Gastrointestinal factors in hunger and satiety. *Neurosci Biobehav Rev* 6: 145-164.
- Hoyle, C. H., C. Chapple, and G. Burnstock. 1989.** Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P2X-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol* 174: 115-118.
- Ida, T., K. Nakahara, T. Katayama, N. Murakami, and M. Nakazato. 1999.** Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res* 821: 526-529.
- Illes, P., and J. Alexandre Ribeiro. 2004.** Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 483: 5-17.
- 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. 2008.** Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Lifer Sci* 65: 3074-3080.
- Inoue, K., M. Tsuda, and S. Koizumi. 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.
- Inoue, K., M. Denda, H. Tozaki, K. Fujishita, and S. Koizumi. 2005.** Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 124: 756-763.
- Inoue, K., K. Nakazawa, M. Ohara-Imaizumi, T. Obama, K. Fujimori, and A. Takanaka. 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.
- Iredale, P. A., S. P. Alexander, and S. J. Hill. 1994.** Coupling of a transfected human brain A1 adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilisation via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 111: 1252-1256.
- Ishibashi, T., K. A. Dakin, B. Stevens, P. R. Lee, S. V. Kozlov, C. L. Stewart, and R. D. Fields. 2006.** Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49: 823-832.
- Ishikawa, T., M. Miyagi, S. Ohtori, Y. Aoki, T. Ozawa, H. Doya, T. Saito, H. Moriya, and K. Takahashi. 2005.** Characteristics of sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Eur Spine J* 14: 559-564.
- Jacobson, K. A., S. Costanzi, M. Ohno, B. V. Joshi, P. Besada, B. Xu, and S. Tchilibon. 2004.** Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Curr Top Med Chem* 4: 805-819.
- Jacques-Silva, M. C., R. Rodnight, G. Lenz, Z. Liao, Q. Kong, M. Tran, Y. Kang, F. A. Gonzalez, G. A. Weisman, and J. T. Neary. 2004.** P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol* 141: 1106-1117.
- James, G., and A. M. Butt. 2001.** P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. *Cell Calcium* 30: 251-259.
- James, G., and A. M. Butt. 2002.** P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 447: 247-260.
- Janeway, C. A., and P. Travers. 1997.** Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

- Jarvis, M. F., and M. Williams. 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.
- Jewell, P. A., and E. B. Verney. 1957.** An experimental attempt to determine the site of the neurohypophysial osmoreceptors in the dog. *Phil Trans Roy Soc B* 240: 197-324.
- Jin, J., W. Tomlinson, I. P. Kirk, Y. B. Kim, R. G. Humphries, and S. P. Kunapuli. 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., T. W. Bailey, B. Y. Li, J. H. Schild, and M. C. Andresen. 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., and R. Schlichter. 1999.** Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2: 241-245.
- Jo, Y. H., and L. W. Role. 2002.** Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci* 22: 4794-4804.
- Johnson, J. M. 2007.** Mechanisms of vasoconstriction with direct skin cooling in humans. *Am J Physiol* 292: H1690-H1691.
- Jones, B. E. 1993.** The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. *Prog Brain Res* 98: 61-71.
- Jones, B. E. 2003.** Arousal systems. *Front Biosci* 8: S438-S451.
- Jones, C. A., C. Vial, L. A. Sellers, P. P. Humphrey, R. J. Evans, and I. P. Chessell. 2004.** Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol Pharmacol* 65: 979-985.
- Jones, C. A., I. P. Chessell, J. Simon, E. A. Barnard, K. J. Miller, A. D. Michel, and P. P. Humphrey. 2000.** Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol* 129: 388-394.
- Juranyi, Z., B. Sperlagh, and E. S. Vizi. 1999.** Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Brain Res* 823: 183-190.
- Jurzak, M., A. R. Muller, and R. Gerstberger. 1995.** Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience* 65: 1145-1159.
- Jurzak, M., A. R. Muller, H. A. Schmid, and R. Gerstberger. 1994.** Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res* 662: 198-208.
- Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath, and P. S. Kalra. 1999.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100.
- Kanjhan, R., G. D. Housley, P. R. Thorne, D. L. Christie, D. J. Palmer, L. Luo, and A. F. Ryan. 1996.** Localization of ATP-gated ion channels in cerebellum using P2X2-R subunit-specific antisera. *Neuroreport* 7: 2665-2669.
- Kanjhan, R., G. D. Housley, L. D. Burton, D. L. Christie, A. Kippenberger, P. R. Thorne, L. Luo, and A. F. Ryan. 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.
- Kannan, H., and K. Koizumi. 1981.** Pathways between the nucleus tractus solitarius and neurosecretory neurons of the supraoptic nucleus: electrophysiological studies. *Brain Res* 213: 17-28.
- Kanosue, K., M. Yanase-Fujiwara, and T. Hosono. 1994.** Hypothalamic network for thermoregulatory vasomotor control. *Am J Physiol* 267: R283-R288.
- Kanosue, K. H., T.; Zhang, Y-H.; Chen, X-M. 1998.** Neuronal networks controlling thermoregulatory effectors, *In* H. S. Sharma, J. Westman [eds.], *Brain Function in Hot Environment*. Progress in Brain Research. Elsevier Science. pp. 49-62.

- Kapoor, J. R., and C. D. Sladek. 2000.** Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J Neurosci* 20: 8868-8875.
- Kappers, J. A. 1960.** The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52: 163-215.
- Kastritsis, C. H., and K. D. McCarthy. 1993.** Oligodendroglial lineage cells express neuroligand receptors. *Glia* 8: 106-113.
- Kelley, K. W., R. M. Bluthe, R. Dantzer, J. H. Zhou, W. H. Shen, R. W. Johnson, and S. R. Broussard. 2003.** Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1: S112-S118.
- Kemp, D. J., D. B. Smith, S. J. Foote, N. Samaras, and M. G. Peterson. 1989.** Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2423-2427.
- Kent, S., R. M. Bluthe, K. W. Kelley, and R. Dantzer. 1992.** Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13: 24-28.
- Khakh, B. S., and R. A. North. 2006.** P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442: 527-532.
- Khakh, B. S., W. B. Smith, C. S. Chiu, D. Ju, N. Davidson, and H. A. Lester. 2001a.** Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X2-green fluorescent protein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5288-5293.
- Khakh, B. S., G. Burnstock, C. Kennedy, B. F. King, R. A. North, P. Seguela, M. Voigt, and P. P. Humphrey. 2001b.** International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53: 107-118.
- Kidd, E. J., C. B. Grahames, J. Simon, A. D. Michel, E. A. Barnard, and P. P. Humphrey. 1995.** Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol* 48: 569-573.
- King, B. F. 2002.** 2-Chloro-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y1 receptor antagonist: commentary on Boyer et al. *Br J Pharmacol* 135: 1839-1840.
- King, B. F., and A. Townsend-Nicholson. 2003.** Nucleotide and Nucleoside Receptors. *Tocris Reviews* 23: 1-11.
- King, B. F., L. E. Ziganshina, J. Pintor, and G. Burnstock. 1996.** Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol* 117: 1371-1373.
- King, B. F., S. S. Wildman, L. E. Ziganshina, J. Pintor, and G. Burnstock. 1997.** Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br J Pharmacol* 121: 1445-1453.
- King, M. S., and A. J. Baertschi. 1991.** Central neural pathway mediating splanchnic osmosensation. *Brain Res* 550: 268-278.
- King, M. S., and A. J. Baertschi. 1992.** Ventral pontine catecholaminergic pathway mediates the vasopressin response to splanchnic osmostimulation in conscious rats. *Brain Res* 580: 81-91.
- King, P. J., P. S. Widdowson, H. N. Doods, and G. Williams. 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., G. Williams, H. Doods, and P. S. Widdowson. 2000.** Effect of a selective neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist, BIIIE0246 on neuropeptide Y release. *Eur J Pharmacol* 396: R1-R3.
- Kirschuk, S., J. Scherer, H. Kettenmann, and A. Verkhratsky. 1995.** Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca²⁺ release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J Physiol* 483 (Pt 1): 41-57.
- Kirsch, G. E., J. Codina, L. Birnbaumer, and A. M. Brown. 1990.** Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 259: H820-H826.

- Kishi, E., A. Takahashi, H. Ishimaru, Y. Ikarashi, and Y. Maruyama. 2001.** Development of obesity and neurochemical backing in aurothioglucose-treated mice. *Auton Neurosci* 92: 21-27.
- Kittner, H., H. Franke, J. I. Harsch, I. M. El-Ashmawy, B. Seidel, U. Krugel, and P. Illes. 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.
- Klein, D. C. 1985.** Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 117: 38-56.
- Klir, J. J., J. L. McClellan, and M. J. Kluger. 1994.** Interleukin-1 beta causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol* 266: R1845-R1848.
- Klir, J. J., J. Roth, Z. Szelenyi, J. L. McClellan, and M. J. Kluger. 1993.** Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am J Physiol* 265: R512-R517.
- Klotz, K. N. 2000.** Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 382-391.
- Klotz, K. N., J. Hessling, J. Hegler, C. Owman, B. Kull, B. B. Fredholm, and M. J. Lohse. 1998.** Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 1-9.
- Knott, T. K., H. G. Marrero, E. E. Custer, and J. R. Lemos. 2008.** Endogenous ATP potentiates only vasopressin secretion from neurohypophyseal terminals. *J Cell Physiol* 217: 155-161.
- Kobashi, M., and A. Adachi. 1985.** Convergence of hepatic osmoreceptive inputs on sodium-responsive units within the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol* 54: 212-219.
- Kobayashi, K., T. Fukuoka, H. Yamanaka, Y. Dai, K. Obata, A. Tokunaga, and K. Noguchi. 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.
- Koganezawa, T., T. Ishikawa, Y. Fujita, T. Yamashita, T. Tajima, M. Honda, and K. Nakayama. 2006.** Local regulation of skin blood flow during cooling involving presynaptic P2 purinoceptors in rats. *Br J Pharmacol* 148: 579-586.
- Koizumi, S., Y. Saito, K. Nakazawa, K. Nakajima, J. I. Sawada, S. Kohsaka, P. Illes, and K. Inoue. 2002.** Spatial and temporal aspects of Ca²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci* 72: 431-442.
- Kolaj, M., E. Coderre, and L.P. Renaud. 2008.** Orexin peptides enhance median preoptic nucleus neuronal excitability via polysynaptic membrane depolarization and enhancement of glutamatergic afferents. *Neuroscience* 155: 1212-1220.
- Kong, J., P. N. Shepel, C. P. Holden, M. Mackiewicz, A. I. Pack, and J. D. Geiger. 2002.** Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci* 22: 5581-5587.
- Konsman, J. P., G. N. Luheshi, R. M. Bluthé, and R. Dantzer. 2000.** The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci* 12: 4434-4446.
- Kopp, E. B., and R. Medzhitov. 1999.** The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18.
- Koshimizu, T., M. Tomic, F. Van Goor, and S. S. Stojilkovic. 1998.** Functional role of alternative splicing in pituitary P2X2 receptor-channel activation and desensitization. *Mol Endocrinol* 12: 901-913.
- Kow, L. M., and D. W. Pfaff. 1991.** The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 359-364.
- Krauchi, K., and A. Wirz-Justice. 2001.** Circadian clues to sleep onset mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 25: S92-S96.

- Kreutzberg, G. W. 1996.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen, and S. Hastrup. 1998.** Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
- Kucher, B. M., and J. T. Neary. 2005.** Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor- α release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem* 92: 525-535.
- Kukley, M., J. A. Barden, C. Steinhauser, and R. Jabs. 2001.** Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36: 11-21.
- Kukulski, F., S. A. Levesque, E. G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A. F. Knowles, S. C. Robson, T. L. Kirley, and J. Sevigny. 2005.** Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1: 193-204.
- Kumar, S., R. Szymusiak, T. Bashir, N. Suntsova, S. Rai, D. McGinty, and M. N. Alam. 2008.** Inactivation of median preoptic nucleus causes c-Fos expression in hypocretin- and serotonin-containing neurons in anaesthetized rat. *Brain Res.* 1234: 66-77.
- Labasi, J. M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. M. Payette, W. Brissette, J. R. Wicks, L. Audoly, and C. A. Gabel. 2002.** Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168: 6436-6445.
- Laflamme, N., and S. Rivest. 2001.** Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J* 15: 155-163.
- Laflamme, N., S. Lacroix, and S. Rivest. 1999.** An essential role of interleukin-1 β in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci* 19: 10923-10930.
- Langhans, W., T. Lutz, and E. Scharrer. 2005.** Regulation der Nahrungsaufnahme, *In* v. Engelhardt, W., and G. Breves (eds.), *Physiologie der Haustiere*, 2nd edition, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 601-613.
- Lalo, U., A. Verkhatsky, and Y. Pankratov. 2007.** Ivermectin potentiates ATP-induced ion currents in cortical neurones: evidence for functional expression of P2X4 receptors? *Neurosci Lett* 421: 158-162.
- Lambrecht, G. 2000.** Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 340-350.
- Lansdorp, P. M., L. A. Aarden, J. Calafat, and W. P. Zeiljemaker. 1986.** A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 132: 105-113.
- Larsen, P. J. 1999.** Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* 46: 296-304.
- Latini, S., and F. Pedata. 2001.** Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-484.
- Latour, I., J. Hamid, A. M. Beedle, G. W. Zamponi, and B. A. Macvicar. 2003.** Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia* 41: 347-353.
- Lavoie, E. G., F. Kukulski, S. A. Levesque, J. Lecka, and J. Sevigny. 2004.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol* 67: 1917-1926.
- Lazarus, M., K. Yoshida, R. Coppari, C. E. Bass, T. Mochizuki, B. B. Lowell, and C. B. Saper. 2007.** EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci* 10: 1131-1133.
- Le Feuvre, R., D. Brough, and N. Rothwell. 2002.** Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 447: 261-269.

- Lee, H. Y., M. Bardini, and G. Burnstock. 2000. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol* 163: 2002-2007.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, and et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746.
- Lee, M. G., O. K. Hassani, and B. E. Jones. 2005a. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25: 6716-6720.
- Lee, M. G., O. K. Hassani, A. Alonso, and B. E. Jones. 2005b. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25: 4365-4369.
- Lee, S. C., W. Liu, D. W. Dickson, C. F. Brosnan, and J. W. Berman. 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150: 2659-2667.
- Lee, S. Y., S. C. Wolff, R. A. Nicholas, and S. M. O'Grady. 2003. P2Y receptors modulate ion channel function through interactions involving the C-terminal domain. *Mol Pharmacol* 63: 878-885.
- Lehnardt, S., L. Massillon, P. Follett, F. E. Jensen, R. Ratan, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe, and T. Vartanian. 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8514-8519.
- Lehnardt, S., C. Lachance, S. Patrizi, S. Lefebvre, P. L. Follett, F. E. Jensen, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe, and T. Vartanian. 2002. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22: 2478-2486.
- Leibowitz, S. F., and J. T. Alexander. 1991. Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns. *Peptides* 12: 1251-1260.
- Lenz, G., Z. Luo, J. Avruch, R. Rodnight, and J. T. Neary. 1998. P2Y purinergic receptor subtypes recruit different MEK activators in astrocytes. *Faseb J* 12: A1469-A1474.
- Levi, F., and U. Schibler. 2007. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 593-628.
- Lewis, C., S. Neidhart, C. Holy, R. A. North, G. Buell, and A. Surprenant. 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435.
- Lewis, C. J., A. Surprenant, and R. J. Evans. 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, C., M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. 1996. Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J Biol Chem* 271: 11623-11626.
- Li, Q., M. Olesky, R. K. Palmer, T. K. Harden, and R. A. Nicholas. 1998. Evidence that the p2y3 receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y6 receptor. *Mol Pharmacol* 54: 541-546.
- Liddell, E., and I. Weeks. 1996. Immunolocalisation. *In* I. Weeks [ed.], *Antikörpertechniken*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. pp. 101-128
- Lin, J. W., M. Sugimori, R. R. Llinas, T. L. McGuinness, and P. Greengard. 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., J. Faraco, R. Li, H. Kadotani, W. Rogers, X. Lin, X. Qiu, P. J. de Jong, S. Nishino, and E. Mignot. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98: 365-376.

- Linden, J., T. Thai, H. Figler, X. Jin, and A. S. Robeva. 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.
- Lippman, F. 1941.** Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Enzymology* 1: 99-102.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lloyd, H. G., and B. B. Fredholm. 1995.** Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int* 26: 387-395.
- Loesch, A., S. Miah, and G. Burnstock. 1999.** Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *J Neurocytol* 28: 495-504.
- Lohman, K. 1929.** Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 17: 624-625.
- Londos, C., D. M. Cooper, and J. Wolff. 1980.** Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2551-2554.
- Lottspeich, F., and H. Zorbas. 1998.** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Lu, D., D. Willard, I. R. Patel, S. Kadwell, L. Overton, T. Kost, M. Luther, W. Chen, R. P. Woychik, W. O. Wilkison, and et al. 1994.** Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- Lu, J., Y. H. Zhang, T. C. Chou, S. E. Gaus, J. K. Elmquist, P. Shiromani, and C. B. Saper. 2001.** Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci* 21: 4864-4874.
- Lustig, K. D., A. K. Shiau, A. J. Brake, and D. Julius. 1993.** Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5113-5117.
- Lynch, K. J., E. Touma, W. Niforatos, K. L. Kage, E. C. Burgard, T. van Biesen, E. A. Kowaluk, and M. F. Jarvis. 1999.** Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1171-1181.
- Ma, B., H. Z. Ruan, G. Burnstock, and P. M. Dunn. 2005.** Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. *Neuropharmacology* 48: 766-777.
- Ma, B., H. Z. Ruan, D. A. Cockayne, A. P. Ford, G. Burnstock, and P. M. Dunn. 2004.** Identification of P2X receptors in cultured mouse and rat parasympathetic otic ganglion neurones including P2X knockout studies. *Neuropharmacology* 46: 1039-1048.
- Magoun, H. W., H. F., J. R. Brobeck, and S. W. Ranson. 1938.** Activation of heat loss mechanisms by local heating of the brain. *J Neurophysiol* 1: 101-114.
- Mangiapane, M. L., T. N. Thrasher, L. C. Keil, J. B. Simpson, and W. F. Ganong. 1984.** Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res Bull* 13: 43-47.
- Marcus, J. N., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, R. M. Chemelli, C. B. Saper, M. Yanagisawa, and J. K. Elmquist. 2001.** Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435: 6-25.
- Mark, K. S., W. J. Trickler, and D. W. Miller. 2001.** Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1051-1058.
- Marty, N., M. Dallaporrta, and B. Thorens. 2007.** Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology* 22: 241-251.

- Matsumoto, N., M. Sorimachi, and N. Akaike. 2004.** Excitatory effects of ATP on rat dorsomedial hypothalamic neurons. *Brain Res* 1009: 234-237.
- Matsumura, K., and S. Kobayashi. 2004.** Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci* 9: 2819-2826.
- Matsuoka, I., and S. Ohkubo. 2004.** ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci* 94: 95-99.
- Matuszek, M. T., and I. T. Gagalo. 1997.** The antipyretic activity of adenosine agonists. *Gen Pharmacol* 29: 371-374.
- May, C. N., and R. M. McAllen. 1997.** Baroreceptor-independent renal nerve inhibition by intracerebroventricular angiotensin II in conscious sheep. *Am J Physiol* 273: R560-R567.
- McAllen, R. M., and W. W. Blessing. 1987.** Neurons (presumably A1-cells) projecting from the caudal ventrolateral medulla to the region of the supraoptic nucleus respond to baroreceptor inputs in the rabbit. *Neurosci Lett* 73: 247-252.
- McAllen, R. M., G. L. Pennington, and M. J. McKinley. 1990.** Osmoresponsive units in sheep median preoptic nucleus. *Am J Physiol* 259: R593-R600.
- McKinley, M. J., D. A. Denton, and R. S. Weisinger. 1978.** Sensors for antidiuresis and thirst--osmoreceptors or CSF sodium detectors? *Brain Res* 141: 89-103.
- McKinley, M. J., M. L. Mathai, G. Pennington, M. Rundgren, and L. Vivas. 1999.** Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol* 276: R673-R683.
- McKinley, M. J., R. M. McAllen, F. A. O. Mendelsohn, A. M. Allen, S. Y. Chai, and B. J. Oldfield. 1990.** Circumventricular organs: neuroendocrine interface between the brain and the hamel milieu. *Front Neuroendocrinol* 11: 91-127.
- McKinley, M. J., R. M. McAllen, P. Davern, M. E. Giles, J. Penschow, N. Sunn, A. Uschakov, and B. J. Oldfield. 2003.** The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172: III-XII, 1-122.
- McKinley, M. J., M. Congiu, D. A. Denton, R. G. Park, J. Penschow, J. B. Simpson, E. Tarjan, R. S. Weisinger, and R. D. Wright. 1984.** The anterior wall of the third cerebral ventricle and homeostatic responses to dehydration. *J Physiol (Paris)* 79: 421-427.
- McKinley, M. J., M. L. Mathai, R. M. McAllen, R. C. McClear, R. R. Miselis, G. L. Pennington, L. Vivas, J. D. Wade, and B. J. Oldfield. 2004.** Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol* 16: 340-347.
- McLear, R. C., B. J. Oldfield, L. W. Enquist, D. E. Pleasure, and R. R. Miselis. 1992.** Characterisations of the projections to the neurohypophysis by transneuronal passage of pseudorabies virus. *Abstract Soc Neurosci* 18: 824.
- Megson, A. C., J. M. Dickenson, A. Townsend-Nicholson, and S. J. Hill. 1995.** Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 115: 1415-1424.
- Mehta, V. B., J. Hart, and M. D. Wewers. 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., and M. L. Hakansson. 2001.** Leptin receptors in hypothalamus and circumventricular organs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 610-617.
- Meistrell, M. E., 3rd, G. I. Botchkina, H. Wang, E. Di Santo, K. M. Cockcroft, O. Bloom, J. M. Vishnubhakat, P. Ghezzi, and K. J. Tracey. 1997.** Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 8: 341-348.
- Meomartini, M. E., S. Amadio, S. Visentin, L. Franchini, F. Aloisi, C. Volonta, and C. Agresti. 2003.** Expression and functional analysis of P2 receptors in oligodendrocytes. *Glia* 43: 59-63.

- Mercer, J. G., K. M. Moar, and N. Hoggard. 1998.** Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology* 139: 29-34.
- Merkel, L. A., R. W. Lappe, L. M. Rivera, B. F. Cox, and M. H. Perrone. 1992.** Demonstration of vasorelaxant activity with an A1-selective adenosine agonist in porcine coronary artery: involvement of potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 437-443.
- Mezey, E., J. Z. Kiss, G. P. Mueller, R. Eskay, T. L. O'Donohue, and M. Palkovits. 1985.** Distribution of the pro-opiomelanocortin derived peptides, adrenocorticotrope hormone, alpha-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin (ACTH, alpha-MSH, beta-END) in the rat hypothalamus. *Brain Res* 328: 341-347.
- Michel, A. D., I. P. Chessell, and P. P. Humphrey. 1999.** Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 102-109.
- Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader. 2005.** LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3: 36-46.
- Milligan, C. E., T. J. Cunningham, and P. Levitt. 1991.** Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 314: 125-135.
- Miselis, R. R., R. E. Shapiro, and P. J. Hand. 1979.** Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. *Science* 205: 1022-1025.
- Mizuno, Y., and Y. Oomura. 1984.** Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 307: 109-116.
- Montero, J. M., and J. B. Fes. 1982.** Purification and characterization of bovine brain 5'-nucleotidase. *J Neurochem* 39: 982-989.
- Moore, R. Y. 1978.** Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl*: 47-58.
- Morairty, S., D. Rainnie, R. McCarley, and R. Greene. 2004.** Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience* 123: 451-457.
- Moran-Jimenez, M. J., and C. Matute. 2000.** Immunohistochemical localization of the P2Y(1) purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 78: 50-58.
- Morel, N., and F. M. Meunier. 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.
- Morgan, J. I., and T. Curran. 1989.** Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12: 459-462.
- Morgan, S. J., and D. C. Darling. 1994.** *Kultur tierischer Zellen*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Mori, M., H. Tsushima, and T. Matsuda. 1992.** Antidiuretic effects of purinoceptor agonists injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of water-loaded, ethanol-anesthetized rats. *Neuropharmacology* 31: 585-592.
- Mori, M., H. Tsushima, and T. Matsuda. 1994.** Antidiuretic effects of ATP induced by microinjection into the hypothalamic supraoptic nucleus in water-loaded and ethanol-anesthetized rats. *Jpn J Pharmacol* 66: 445-450.
- Morrison, S. F. 2004.** Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci* 19: 67-74.
- Mortola, J. P., and E. L. Seifert. 2000.** Hypoxic depression of circadian rhythms in adult rats. *J Appl Physiol* 88: 365-368.
- Morton, G. J. 2007.** Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol* 583: 437-443.
- Moruzzi, G., and H. W. Magoun. 1949.** Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1: 455-473.

- Moss, M. L., S. L. Jin, J. D. Becherer, D. M. Bickett, W. Burkhart, W. J. Chen, D. Hassler, M. T. Leesnitzer, G. McGeehan, M. Milla, M. Moyer, W. Rocque, T. Seaton, F. Schoenen, J. Warner, and D. Willard. 1997.** Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol* 72: 127-129.
- Mülhardt, C. 2002.** *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Muller, C. E. 2002.** P2-pyrimidinergetic receptors and their ligands. *Curr Pharm Des* 8: 2353-2369.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Mulryan, K., D. P. Gitterman, C. J. Lewis, C. Vial, B. J. Leckie, A. L. Cobb, J. E. Brown, E. C. Conley, G. Buell, C. A. Pritchard, and R. J. Evans. 2000.** Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403: 86-89.
- Muroya, S., T. Yada, S. Shioda, and M. Takigawa. 1999.** Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci Lett* 264: 113-116.
- Muroya, S., H. Funahashi, A. Yamanaka, D. Kohno, K. Uramura, T. Nambu, M. Shibahara, M. Kuramochi, M. Takigawa, M. Yanagisawa, T. Sakurai, S. Shioda, and T. Yada. 2004.** Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci* 19: 1524-1534.
- Murphy, S., B. Pearce, J. Jeremy, and P. Dandona. 1988.** Astrocytes as eicosanoid-producing cells. *Glia* 1: 241-245.
- Nadeau, S., and S. Rivest. 2000.** Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 20: 3456-3468.
- Nagashima, K., S. Nakai, M. Tanaka, and K. Kanosue. 2000.** Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 85: 18-25.
- Nakamori, T., A. Morimoto, K. Yamaguchi, T. Watanabe, N. C. Long, and N. Murakami. 1993.** Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) is a brain site to produce interleukin-1 beta during fever. *Brain Res* 618: 155-159.
- Nakamura, K., and S. Morrison. 2008a.** Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J Physiol*. 64: 618-625
- Nakamura, K., and S. F. Morrison. 2008b.** A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 11: 62-71.
- Nakashima, T., T. Kiyohara, and T. Hori. 1991.** Tumor necrosis factor-beta specifically inhibits the activity of preoptic warm-sensitive neurons in tissue slices. *Neurosci Lett* 128: 97-100.
- Nakatsuka, T., and J. G. Gu. 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., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, and S. Matsukura. 2001.** A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.
- Nakazawa, K., and Y. Ohno. 1997.** Effects of neuroamines and divalent cations on cloned and mutated ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 325: 101-108.
- Nakazawa, K., K. Inoue, K. Fujimori, and A. Takanaka. 1991.** Effects of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch* 418: 214-219.
- Nakazawa, K., M. Liu, K. Inoue, and Y. Ohno. 1997.** Potent inhibition by trivalent cations of ATP-gated channels. *Eur J Pharmacol* 325: 237-243.
- Nakhostine, N., and D. Lamontagne. 1993.** Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K⁺ channel activation. *Am J Physiol* 265: H1289-H1293.

- Naslund, E., and P. M. Hellstrom. 2007.** Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav* 92: 256-262.
- Neary, J. T., and Y. Kang. 2005.** Signaling from P2 nucleotide receptors to protein kinase cascades induced by CNS injury: implications for reactive gliosis and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31: 95-103.
- Neary, J. T., Y. Kang, K. A. Willoughby, and E. F. Ellis. 2003.** Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci* 23: 2348-2356.
- Neary, J. T., C. van Breemen, E. Forster, L. O. Norenberg, and M. D. Norenberg. 1988.** ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1410-1416.
- Neary, J. T., M. P. Rathbone, F. Cattabeni, M. P. Abbracchio, and G. Burnstock. 1996.** Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci* 19: 13-18.
- Neary, J. T., Y. Kang, Y. Bu, E. Yu, K. Akong, and C. M. Peters. 1999.** Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J Neurosci* 19: 4211-4220.
- Necker, R. 1977.** Thermal sensitivity of different skin areas in pigeons. *J. Comp. Physiol.* 116: 239-246.
- Nedergaard, J., V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, and B. Cannon. 2001.** UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504: 82-106.
- Neelands, T. R., E. C. Burgard, M. E. Uchic, H. A. McDonald, W. Niforatos, C. R. Faltynek, K. J. Lynch, and M. F. Jarvis. 2003.** 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor. *Br J Pharmacol* 140: 202-210.
- Newman, E. A. 2003.** Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23: 1659-1666.
- Newman, E. A. 2004.** Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47: 268-274.
- Newman, E. A., and K. R. Zahs. 1997.** Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275: 844-847.
- Nicke, A., H. G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing. 1998.** P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17: 3016-3028.
- Nickel, R., A. Schummer, and E. Seiferle. 1991.** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV, Nervensystem, Sinnesorgane und endokrine Drüsen. 3. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Niiijima, A. 1969.** Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science* 166: 1519-1520.
- Nogueiras, R., M. H. Tschöp, and J. M. Zigman. 2008.** Central nervous system regulation of energy metabolism; Ghrelin versus Leptin. *Ann N Y Acad Sci* 1126: 14-19.
- Norris, J. G., L. P. Tang, S. M. Sparacio, and E. N. Benveniste. 1994.** Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 152: 841-850.
- North, R. A. 1996.** P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp* 198: 91-105; discussion 105-109.
- North, R. A. 2002.** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067.
- Ohno-Shosaku, T., and C. Yamamoto. 1992.** Identification of an ATP-sensitive K⁺ channel in rat cultured cortical neurons. *Pflugers Arch* 422: 260-266.

- Ohta, T., A. Kubota, M. Murakami, K. Otsuguro, and S. Ito. 2005. P2X2 receptors are essential for $[Ca^{2+}]_i$ increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol* 289: G935-G948.
- Okazawa, M., K. Takao, A. Hori, T. Shiraki, K. Matsumura, and S. Kobayashi. 2002. Ionic basis of cold receptors acting as thermostats. *J Neurosci* 22: 3994-4001.
- Olah, M. E., and G. L. Stiles. 2000. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther* 85: 55-75.
- Oldfield, B. J., and M. J. McKinley. 1995. Circumventricular organs. In G. Paxinos [ed.], *The rat nervous system*, 2nd edition ed. Academic press, San Diego. pp. 391-401.
- Oldfield, B. J., D. K. Hards, and M. J. McKinley. 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.
- Oldfield, B. J., D. K. Hards, and M. J. McKinley. 1992. Neurons in the median preoptic nucleus of the rat with collateral branches to the subfornical organ and supraoptic nucleus. *Brain Res* 586: 86-90.
- Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang, J. A. Kerns, Y. Chen, I. Gantz, and G. S. Barsh. 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
- Ongini, E., and B. B. Fredholm. 1996. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17: 364-372.
- Ootsuka, Y., W. W. Blessing, and R. M. McAllen. 2004. Inhibition of rostral medullary raphe neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries. *Neurosci Lett* 357: 58-62.
- Ota, M., J. T. Crofton, G. T. Festavan, and L. Share. 1993. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. *Neuroendocrinology* 57: 955-959.
- Othman, T., H. Yan, and S. A. Rivkees. 2003. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia* 44: 166-172.
- Palea, S., C. Pietra, D. G. Trist, W. Artibani, A. Calpista, and M. Corsi. 1995. Evidence for the presence of both pre- and postjunctional P2-purinoceptor subtypes in human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol* 114: 35-40.
- Panenka, W., H. Jijon, L. M. Herx, J. N. Armstrong, D. Feighan, T. Wei, V. W. Yong, R. M. Ransohoff, and B. A. MacVicar. 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., U. Lalo, A. Verkhratsky, and R. A. North. 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452: 589-597.
- Parvathenani, L. K., S. Tertyshnikova, C. R. Greco, S. B. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278: 13309-13317.
- Pascual, O., K. B. Casper, C. Kubera, J. Zhang, R. Revilla-Sanchez, J. Y. Sul, H. Takano, S. J. Moss, K. McCarthy, and P. G. Haydon. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310: 113-116.
- Pasyk, E. A., and J. K. Foskett. 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J Biol Chem* 272: 7746-7751.
- Patapoutian, A., A. M. Peier, G. M. Story, and V. Viswanath. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4: 529-539.

- Patronas, P., M. Horowitz, E. Simon, and R. Gerstberger. 1998.** Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain Res* 798: 127-139.
- Pauwels, R. A., and G. F. Joos. 1995.** Characterization of the adenosine receptors in the airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329: 151-160.
- Paxinos, G., and C. Watson. 2004.** The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th Edition, Academic Press, San Diego.
- Peakman, M. C., and S. J. Hill. 1995.** Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* 115: 801-810.
- Pénicaud, L., X. Fioramonti, A. Lorsignol, A. Bénani, and C. Leleup. 2007.** Brain glucose sensing. *Bull Acad Natl Med* 191: 923-931.
- Penzlin, H. 2005.** Lehrbuch der Tierphysiologie, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Perl, E. R. 1990.** Central projections of thermoreceptors. *In* K. Voigt [ed.], *Thermoreception and Temperature Regulation*. Springer Verlag, Berlin. pp. 89-106.
- Perregaux, D. G., and C. A. Gabel. 1998.** Post-translational processing of murine IL-1: evidence that ATP-induced release of IL-1 alpha and IL-1 beta occurs via a similar mechanism. *J Immunol* 160: 2469-2477.
- Perry, V. H., and S. Gordon. 1988.** Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273-277.
- Perry, V. H., D. A. Hume, and S. Gordon. 1985.** Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15: 313-326.
- Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. van den Pol, L. de Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe, and T. S. Kilduff. 1998.** Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996-10015.
- Polito, A., and R. Reynolds. 2005.** NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207: 707-716.
- Porkka-Heiskanen, T., L. Alanko, A. Kalinchuk, and D. Stenberg. 2002.** Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* 6: 321-332.
- Porkka-Heiskanen, T., R. E. Strecker, M. Thakkar, A. A. Bjorkum, R. W. Greene, and R. W. McCarley. 1997.** Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276: 1265-1268.
- Portas, C. M., M. Thakkar, D. G. Rainnie, R. W. Greene, and R. W. McCarley. 1997.** Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79: 225-235.
- Poulain, D. A., and D. T. Theodosis. 1988.** Electrical activity of peptidergic neurons and its relation to hormone release. *In* A. J. S. Summerlee [ed.], *Neurosecretion: Cellular Aspects of the Production and Release of Neuropeptides*. Plenum, New York. pp. 181-189.
- Priel, A., and S. D. Silberberg. 2004.** Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123: 281-293.
- Pusztai, P., B. Sarman, E. Ruzicska, J. Toke, K. Racz, A. Somogyi, and Z. Tulayssay. 2008.** Ghrelin: a new peptide regulating the neurohormonal system, energy homeostasis and glucose metabolism. *Diab Metab Res Rev* 24: 343-352.
- Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek, and E. Maratos-Flier. 1996.** A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Radulovacki, M. 1985.** Role of adenosine in sleep in rats. *Rev Clin Basic Pharm* 5: 327-339.

- Radulovacki, M., R. M. Virus, M. Djuricic-Nedelson, and R. D. Green. 1984.** Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 228: 268-274.
- Raetz, C. R., R. J. Ulevitch, S. D. Wright, C. H. Sibley, A. Ding, and C. F. Nathan. 1991.** Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb J* 5: 2652-2660.
- Ralevic, V., and G. Burnstock. 1998.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
- Raouf, R., A. J. Chabot-Dore, A. R. Ase, D. Blais, and P. Seguela. 2007.** Differential regulation of microglial P2X4 and P2X7 ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology* 53: 496-504.
- Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North, and A. Surprenant. 1997.** The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272: 5482-5486.
- Rathner, J. A., and R. M. McAllen. 1999.** Differential control of sympathetic drive to the rat tail artery and kidney by medullary premotor cell groups. *Brain Res* 834: 196-199.
- Rauch, M., T. Riediger, H. A. Schmid, and E. Simon. 2000.** Orexin A activates leptin-responsive neurons in the arcuate nucleus. *Pflugers Arch* 440: 699-703.
- Rechtschaffen, A., M. A. Gilliland, B. M. Bergmann, and J. B. Winter. 1983.** Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 221: 182-184.
- Reiser, G. 1995.** Ca(2+)- and nitric oxide-dependent stimulation of cyclic GMP synthesis in neuronal cell line induced by P2-purinergic/pyrimidinergic receptor. *J Neurochem* 64: 61-68.
- Reisin, I. L., A. G. Prat, E. H. Abraham, J. F. Amara, R. J. Gregory, D. A. Ausiello, and H. F. Cantiello. 1994.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 269: 20584-20591.
- Renaud, L. P., and Bourque, C. W. 1991.** Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36: 131-169.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, and T. Ebisawa. 1994.** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, J. H. Stehle, and S. A. Rivkees. 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., L. Guerra, A. Bagorda, L. Debellis, R. Cardone, A. H. Li, K. A. Jacobson, and V. Casavola. 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., and G. Schmalzing. 2003.** Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121: 451-461.
- Richardson, G. S. 2005.** The human circadian system in normal and disordered sleep. *J Clin Psychiatry* 66 Suppl 9: 3-9; quiz 42-43.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992.** The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410.
- Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Di Padova, and et al. 1994.** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8: 217-225.
- Ritter, R. C., P. G. Slusser, and S. Stone. 1981.** Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. *Science* 213: 451-452.
- Ritter, S., R. C. Ritter, and C. D. Barnes. 1992.** *Neuroanatomy & Physiology of Abdominal Vagal Afferents*. CRC. Ann Arbor.

- Rivest, S. 2003.** Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 17: 13-19.
- Roberts, W. W., and T. C. Robinson. 1969.** Relaxation and sleep induced by warming of preoptic region and anterior hypothalamus in cats. *Exp Neurol* 25: 282-294.
- Roberst, J. A., C. Vial, H. R. Digby, K. C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas, and R. J. Evans. 2006.** Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452: 486-500.
- Robertshaw, D. 1989.** Central and peripheral osmoreceptors. *Acta Physiol Scand Suppl* 583: 151-156.
- Robertson, S. J., and F. A. Edwards. 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.
- Roe, M. W., J. J. Lemasters, and B. Herman. 1990.** Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11: 63-73.
- Romanovsky, A. A. 2007.** Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol* 292: R37-R46.
- Romanovsky, A. A., A. I. Ivanov, and Y. P. Shimansky. 2002.** Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* 92: 2667-2679.
- Romanovsky, A. A., C. T. Simons, M. Szekely, and V. A. Kulchitsky. 1997.** The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol* 273: R407-R413.
- Rong, W., and G. Burnstock. 2004.** Activation of ureter nociceptors by exogenous and endogenous ATP in guinea pig. *Neuropharmacology* 47: 1093-1101.
- Rosendahl, M. S., S. C. Ko, D. L. Long, M. T. Brewer, B. Rosenzweig, E. Hedl, L. Anderson, S. M. Pyle, J. Moreland, M. A. Meyers, T. Kohno, D. Lyons, and H. S. Lichenstein. 1997.** Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem* 272: 24588-24593.
- Ross, W. N. 1989.** Changes in intracellular calcium during neuron activity. *Annu Rev Physiol* 51: 491-506.
- Roth, J. 1998.** Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress. *Prog Brain Res* 115: 177-192.
- Roth, J. 2003.** Energie- und Wärmehaushalt, Temperaturregulation. *In* R.F. Schmidt, K. Unsickerer [eds.], *Lehrbuch Vorklinik, Teil C, Anatomie, Biochemie und Physiologie der inneren Organe*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln. pp. 419-35.
- Roth, J., C. A. Conn, M. J. Kluger, and E. Zeisberger. 1993.** Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol* 265: R653-R658.
- Roth, J., E. M. Harre, C. Rummel, R. Gerstberger, and T. Hubschle. 2004.** Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* 9: 290-300.
- Roth, J., C. Rummel, S. W. Barth, R. Gerstberger, and T. Hubschle. 2006.** Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin* 24: 421-439,v.
- Rothwell, N. J., and S. J. Hopkins. 1995.** Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18: 130-136.
- Ruan, H. Z., L. A. Birder, W. C. de Groat, C. Tai, J. Roppolo, C. A. Buffington, and G. Burnstock. 2005.** Localization of P2X and P2Y receptors in dorsal root ganglia of the cat. *J Histochem Cytochem* 53: 1273-82.
- Rubio, M. E., and F. Soto. 2001.** Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21: 641-653.
- Rummel, C., C. Sachot, S. Poole, and G. N. Luheshi. 2006.** Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol* 291: R1316-R1326.

- Ryten, M., P. M. Dunn, J. T. Neary, and G. Burnstock. 2002.** ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J Cell Biol* 158: 345-355.
- Saad, W. A., I. F. M. S. Guarda, L. A. De Arruda, G. Garcia, L. I. Gutierrez, W. A. Saad, S. simoes, and R. S. Guarda. 2004.** Lateral hypothalamic lesions influences water and salt intake, and sodium and urine excretion, and arteial blood pressure induced by L-NAME and FK 409 injections into median preoptic nucleus in conscious rats. *Life Sci* 75: 685-697.
- Saad, W. A., I. F. Guarda, L. A. de Arruda Camargo, and T. A. dos Santos. 2006.** L-type calcium channels mediate water intake induced by angiotensin injection into median preoptic nucleus. *Pharmacol Biochem Behav* 83: 598-602.
- Sachs, L. 2004.** *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sajjadi, F. G., K. Takabayashi, A. C. Foster, R. C. Domingo, and G. S. Firestein. 1996.** Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 156: 3435-3442.
- Sakurai, T. 1999.** Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* 85: 25-30.
- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, and M. Yanagisawa. 1998.** Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585.
- Sam, S., and L. A. Frohman. 2008.** Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37: 1-22, vii.
- Samways, D. S., and T. M. Egan. 2007.** Acidic amino acids impart enhanced Ca²⁺ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. *J Gen Physiol* 129: 245-256.
- Sanz, J. M., and F. Di Virgilio. 2000.** Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* 164: 4893-4898.
- Saper, C. B. 1985.** Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. *J Comp Neurol* 237: 21-46.
- Saper, C. B., and D. Levisohn. 1983.** Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res* 288: 21-31.
- Saper, C. B., T. C. Chou, and T. E. Scammell. 2001.** The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24: 726-731.
- Saper, C. B., T. E. Scammell, and J. Lu. 2005.** Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437: 1257-1263.
- Saper, C. B., A. D. Loewy, L. W. Swanson, and W. M. Cowan. 1976.** Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 117: 305-312.
- Sasaki, Y., M. Hoshi, C. Akazawa, Y. Nakamura, H. Tsuzuki, K. Inoue, and S. Kohsaka. 2003.** Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44: 242-250.
- Satoh, S., H. Matsumura, F. Suzuki, and O. Hayaishi. 1996.** Promotion of sleep mediated by the A_{2a}-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D₂ in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5980-5984.
- Sawada, M., A. Suzumura, and T. Marunouchi. 1992.** TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res* 583: 296-299.
- Sawchenko, P. E., and L. W. Swanson. 1981.** A method for tracing biochemically defined pathways in the central nervous system using combined fluorescence retrograde transport and immunohistochemical techniques. *Brain Res* 210: 31-51.

- Scammell, T. E., D. Y. Gerashchenko, T. Mochizuki, M. T. McCarthy, I. V. Estabrooke, C. A. Sears, C. B. Saper, Y. Urade, and O. Hayaishi. 2001.** An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience* 107: 653-663.
- Schafers, M., D. H. Lee, D. Brors, T. L. Yaksh, and L. S. Sorkin. 2003.** Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23: 3028-3038.
- Schaffhauser, A. O., A. Stricker-Krongrad, L. Brunner, F. Cumin, C. Gerald, S. Whitebread, L. Criscione, and K. G. Hofbauer. 1997.** Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46: 1792-1798.
- Scherbel, U., R. Raghupathi, M. Nakamura, K. E. Saatman, J. Q. Trojanowski, E. Neugebauer, M. W. Marino, and T. K. McIntosh. 1999.** Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8721-8726.
- Schlitz, J. C., and P. E. Sawchenko. 2003.** Signaling in the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci* 8: 1321-1329.
- Schuster, V. L. 1998.** Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60: 221-242.
- Schwab, J. M., L. Guo, and H. J. Schluesener. 2005.** Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol* 163: 185-189.
- Schwartz, G. J., C. F. Salorio, C. Skoglund, and T. H. Moran. 1999.** Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am J Physiol* 276: R1623-R1629.
- Schwartz, M. W. 2006.** Central nervous system regulation of food intake. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1: 1S-8S.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, and D. G. Baskin. 2000.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
- Schwiebert, E. M. 1999.** ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am J Physiol* 276: C1-C8.
- Schwierin, B., A. A. Borbely, and I. Tobler. 1996.** Effects of N6-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *Eur J Pharmacol* 300: 163-171.
- Sclafani, A., K. Ackroff, and G. J. Schwartz. 2003.** Selective effects of vagal deafferentation and celiac-superior mesenteric ganglionectomy on the reinforcing and satiating action of intestinal nutrients. *Physiol Behav* 78: 285-294.
- Sebastiao, A. M., and J. A. Ribeiro. 1996.** Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* 48: 167-189.
- Sehic, E., and C. M. Blatteis. 1996.** Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* 726: 160-166.
- Seidel, B., M. Bigl, H. Franke, H. Kittner, W. Kiess, P. Illes, and U. Krugel. 2006.** Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. *Brain Res* 1089: 143-152.
- Semenoff, D., and H. K. Kimelberg. 1985.** Autoradiography of high affinity uptake of catecholamines by primary astrocyte cultures. *Brain Res* 348: 125-136.
- Sergeeva, O. A., B. P. Klyuch, W. Fleischer, K. S. Eriksson, T. M. Korotkova, M. Siebler, and H. L. Haas. 2006.** P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur J Neurosci* 24: 1413-1426.
- Shepel, P. N., D. Ramonet, P. Stevens, and J. D. Geiger. 2005.** Purine level regulation during energy depletion associated with graded excitatory stimulation in brain. *Neurol Res* 27: 139-148.
- Sherin, J. E., P. J. Shiromani, R. W. McCarley, and C. B. Saper. 1996.** Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271: 216-219.

- Shibata, M., and C. M. Blatteis. 1991.** Differential effects of cytokines on thermosensitive neurons in guinea pig preoptic area slices. *Am J Physiol* 261: R1096-R1103.
- Shibuya, I., K. Tanaka, Y. Hattori, Y. Uezono, N. Harayama, J. Noguchi, Y. Ueta, F. Izumi, and H. Yamashita. 1999.** Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J Physiol* 514: 351-367.
- Shioda, S., F. Takenoya, M. Yagi, I. Wang, Y. Hori, and H. Kageyana. 2008.** Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation. *Nutrition* 24: 848-853.
- Shigemoto-Mogami, Y., S. Koizumi, M. Tsuda, K. Ohsawa, S. Kohsaka, and K. Inoue. 2001.** Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J Neurochem* 78: 1339-1349.
- Shimizu, I., T. Iida, Y. Guan, C. Zhao, S. N. Raja, M. F. Jarvis, D. A. Cockayne, and M. J. Caterina. 2005.** Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X3. *Pain* 116: 96-108.
- Shukla, V., H. Zimmermann, L. Wang, H. Kettenmann, S. Raab, K. Hammer, J. Seigny, S. C. Robson, and N. Braun. 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.
- Simon, E. 1997.** Wärmehaushalt und Temperaturregulation. *In* R. F. Schmidt and G. Thews [eds.], *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin. pp. 649-669.
- Simon, E. 2000.** The enigma of deep-body thermosensory specificity. *Int J Biometeorol* 44: 105-120.
- Simon, E., F. K. Pierau, and D. C. Taylor. 1986.** Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. *Physiol Rev* 66: 235-300.
- Simon, J., E. J. Kidd, F. M. Smith, I. P. Chessell, R. Murrell-Lagnado, P. P. Humphrey, and E. A. Barnard. 1997.** Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* 52: 237-248.
- Sindelar, D. K., P. J. Havel, R. J. Seeley, C. W. Wilkinson, S. C. Woods, and M. W. Schwartz. 1999.** Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 48: 1275-1280.
- Sly, D. J., L. Colvill, M. J. McKinley, and B. J. Oldfield. 1999.** Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *J Auton Nerv Syst* 77: 73-82.
- Smith, T. M., and T. L. Kirley. 1998.** Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases1. *Biochim Biophys Acta* 1386: 65-78.
- Solle, M., J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths, and C. A. Gabel. 2001.** Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276: 125-132.
- Song, Z., S. Vijayaraghavan, and C. D. Sladek. 2006.** Simultaneous exposure to ATP and phenylephrine induces a sustained elevation in the intracellular calcium concentration in supraoptic neurons. *Am J Physiol* 291: R37-R45.
- Song, Z., S. Vijayaraghavan, and C. D. Sladek. 2007.** ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol* 292: R423-R431.
- Sorimachi, M., H. Ishibashi, T. Moritoyo, and N. Akaike. 2001.** Excitatory effect of ATP on acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 105: 393-401.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, J. M. Gomez-Hernandez, M. Hollmann, C. Karschin, and W. Stuhmer. 1996.** P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3684-3688.
- Soulet, D., and S. Rivest. 2008.** Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* 8: 508-518.

- Souslova, V., P. Cesare, Y. Ding, A. N. Akopian, L. Stanfa, R. Suzuki, K. Carpenter, A. Dickenson, S. Boyce, R. Hill, D. Nebenuis-Oosthuizen, A. J. Smith, E. J. Kidd, and J. N. Wood. 2000. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 407: 1015-1017.
- Spanswick, D., M. A. Smith, V. E. Groppi, S. D. Logan, and M. L. Ashford. 1997. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390: 521-525.
- Sperlagh, B., and E. S. Vizi. 1991. Effect of presynaptic P2 receptor stimulation on transmitter release. *J Neurochem* 56: 1466-1470.
- Sperlagh, B., H. Sershen, A. Lajtha, and E. S. Vizi. 1998a. Co-release of endogenous ATP and [3H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience* 82: 511-520.
- Sperlagh, B., G. Hasko, Z. Nemeth, and E. S. Vizi. 1998b. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. *Neurochem Int* 33: 209-215.
- Sperlagh, B., F. Erdelyi, G. Szabo, and E. S. Vizi. 2000. Local regulation of [(3)H]-noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P(2X)-receptors located on axon terminals. *Br J Pharmacol* 131: 1775-1783.
- Stanley, B. G., and S. F. Leibowitz. 1984. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35: 2635-2642.
- Stanley, S. A., C. J. Small, K. G. Murphy, E. Rayes, C. R. Abbott, L. J. Seal, D. G. Morgan, D. Sunter, C. L. Dakin, M. S. Kim, R. Hunter, M. Kuhar, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res* 893: 186-194.
- Starzl, T. E., C. W. Taylor, and H. W. Magoun. 1951. Ascending conduction in reticular activating system, with special reference to the diencephalon. *J Neurophysiol* 14: 461-477.
- Steiner, A. A., V. F. Turek, M. C. Almeida, J. J. Burmeister, D. L. Oliveira, J. L. Roberts, A. W. Bannon, M. H. Norman, J. C. Louis, J. J. Treanor, N. R. Gavva, and A. A. Romanovsky. 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* 27: 7459-7468.
- Steininger, T. L., M. N. Alam, H. Gong, R. Szymusiak, and D. McGinty. 1999. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res* 840: 138-147.
- Stenberg, D., E. Litonius, L. Halldner, B. Johansson, B. B. Fredholm, and T. Porkka-Heiskanen. 2003. Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J Sleep Res* 12: 283-290.
- Stenoien, D. L., and S. T. Brady. 1999. Axonal transport. In M. D. Uhler [ed.], *Basic Neuro-chemistry*. Lippincott-Raven, Philadelphia. pp. 348-389.
- Stetson, M. H., and M. Watson-Whitmyre. 1976. Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? *Science* 191: 197-199.
- Stevens, B., S. Porta, L. L. Haak, V. Gallo, and R. D. Fields. 2002. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36: 855-868.
- Stjarne, L. 2001. Novel dual 'small' vesicle model of ATP- and noradrenaline-mediated sympathetic neuromuscular transmission. *Auton Neurosci* 87: 16-36.
- Stocker, S. D., and G. M. Toney. 2007. Vagal afferent input alters the discharge of osmotic and ANGII -responsive median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1131: 118-128.
- Stone, B. M., C. Turner, S. L. Mills, and A. N. Nicholson. 2000. Hypnotic activity of melatonin. *Sleep* 23: 663-669.
- Stoop, R., A. Surprenant, and R. A. North. 1997. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* 78: 1837-1840.

- Stout, C. E., J. L. Costantin, C. C. Naus, and A. C. Charles. 2002.** Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277: 10482-10488.
- Strecker, R. E., T. Porkka-Heiskanen, M. M. Thakkar, L. J. Dauphin, D. Stenberg, and R. W. McCarley. 1999.** Recent evidence that the sleep-promoting effects of adenosine are site-specific. *Sleep* 22: S32-S38.
- Strecker, R. E., S. Morairty, M. M. Thakkar, T. Porkka-Heiskanen, R. Basheer, L. J. Dauphin, D. G. RAINNIE, C. M. Portas, R. W. Greene, and R. W. McCarley. 2000.** Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* 115: 183-204.
- Streit, W. J. 2002.** Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139.
- Stricker, E. M., and M. L. Hoffmann. 2007.** Presystemic signals in the control of thirst, salt appetite, and vasopressin secretion. *Physiol & Behav* 91: 404-412.
- Suadicani, S. O., C. F. Brosnan, and E. Scemes. 2006.** P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 26: 1378-1385.
- Sullivan, G. W. 2003.** Adenosine A2A receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 1313-1319.
- Suntsova, N., R. Szymusiak, M. N. Alam, R. Guzman-Marin, and D. McGinty. 2002.** Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol* 543: 665-677.
- Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell. 1996.** The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-738.
- Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata. 2004.** Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24: 1-7.
- Szymusiak, R., and D. McGinty. 1989.** Sleep-waking discharge of basal forebrain projection neurons in cats. *Brain Res Bull* 22: 423-430.
- Szymusiak, R., I. Gvilia, and D. McGinty. 2007.** Hypothalamic control of sleep. *Sleep Med* 8: 291-301.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2000.** Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4908-4911.
- Takeda, M., D. J. Nelson, and B. Soliven. 1995.** Calcium signaling in cultured rat oligodendrocytes. *Glia* 14: 225-236.
- Tanious, F. A., J. M. Veal, H. Buczak, L. S. Ratmeyer, and W. D. Wilson. 1992.** DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103-3112.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe, and R. I. Tepper. 1995.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Teitelbaum, P., and E. Stellar. 1954.** Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science* 120: 894-895.
- Ter Horst, G. J., P. de Boer, P. G. Luiten, and J. D. van Willigen. 1989.** Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31: 785-797.
- Thakkar, M. M., R. A. Delgiacco, R. E. Strecker, and R. W. McCarley. 2003.** Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a

- simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats. *Neuroscience* 122: 1107-1113.
- Thomas, A. R., and F. Delaville. 1991.** The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. *In* P. H. Cobbold [ed.], *Cellular Calcium, a Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. pp. 1-54.
- Thomas, S., C. Virginio, R. A. North, and A. Surprenant. 1998.** The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. *J Physiol* 509: 411-417.
- Thompson, R., L. W. Swanson, and N. Canteras. 1997.** Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376: 143-173.
- Thrasher, T. N., L. C. Keil, and D. J. Ramsay. 1982.** Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-induced drinking and vasopressin secretion in the dog. *Endocrinology* 110: 1837-1839.
- Ticho, S. R., and M. Radulovacki. 1991.** Role of adenosine in sleep and temperature regulation in the preoptic area of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 33-40.
- Tobias, P. S., K. Soldau, and R. J. Ulevitch. 1986.** Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 164: 777-793.
- Tominaga, M., M. Wada, and M. Masu. 2001.** Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6951-6956.
- Troade, J. D., S. Thirion, G. Nicaise, J. R. Lemos, and G. Dayanithi. 1998.** ATP-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X₂ purinoceptor. *J Physiol* 511 (Pt 1): 89-103.
- Trotter, J. 1993.** The development of myelin-forming glia: studies with primary cell cultures and immortalized cell lines. *Perspect Dev Neurobiol* 1: 149-154.
- Trujillo, C. A., A. A. Nery, A. H. Martins, P. Majumder, F. A. Gonzalez, and H. Ulrich. 2006.** Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X₂ receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry* 45: 224-233.
- 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., and M. Poenie. 1986.** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *TIBS* 11: 450-455.
- Tsien, R. Y., T. J. Rink, and M. Poenie. 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., Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M. W. Salter, and K. Inoue. 2003.** P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778-783.
- Urade, Y., N. Eguchi, W. M. Qu, M. Sakata, Z. L. Huang, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, J. S. Fink, and O. Hayaishi. 2003.** Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice. *Neurology* 61: S94-S96.
- Uschakov, A., B. J. Oldfield, and M. J. McKinley.** The efferent neural connections of the median preoptic nucleus of the rat. (unpublished manuscript).
- Uschakov, A., H. Gong, D. McGinty, and R. Szymusiak. 2007.** Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience* 150: 104-120.
- Ushikubi, F., E. Segi, Y. Sugimoto, T. Murata, T. Matsuoka, T. Kobayashi, H. Hizaki, K. Tuboi, M. Katsuyama, A. Ichikawa, T. Tanaka, N. Yoshida, and S. Narumiya. 1998.** Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Nature* 395: 281-284.

- Valassi, E., M. Scacchi, and F. Cavagnini. 2008.** Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 158-168.
- Valera, S., N. Hussey, R. J. Evans, N. Adami, R. A. North, A. Surprenant, and G. Buell. 1994.** A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.
- Valera, S., F. Talabot, R. J. Evans, A. Gos, S. E. Antonarakis, M. A. Morris, and G. N. Buell. 1995.** Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3: 283-289.
- van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht. 1978.** Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276: 839-841.
- van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht. 1979.** Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005.
- van der Weyden, L., D. J. Adams, B. M. Luttrell, A. D. Conigrave, and M. B. Morris. 2000.** Pharmacological characterisation of the P2Y11 receptor in stably transfected haematological cell lines. *Mol Cell Biochem* 213: 75-81.
- Verbalis, J. G., R. E. Blackburn, G. E. Hoffman, and E. M. Stricker. 1995.** Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Adv Exp Med Biol* 395: 209-225.
- Verkhasky, A., O. A. Krishtal, and G. Burnstock. 2009.** Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* (Epub ahead of print).
- Verney, E. B. 1947.** The antidiuretic hormone and factors which determine its release. *Proc Roy Soc B* 135: 25-106.
- Vicentic, A., A. Lakatos, and D. Jones. 2006.** The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 27: 1934-1937.
- Virginio, C., D. Church, R. A. North, and A. Surprenant. 1997.** Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36: 1285-1294.
- Virginio, C., G. Robertson, A. Surprenant, and R. A. North. 1998.** Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol Pharmacol* 53: 969-973.
- von Economo, C. 1923.** Encephalitis lethargica. *Wien Med Wochenschr* 77: 777-782.
- von Economo, C. 1930.** Sleep as a problem of localization. *Nerv Ment Dis* 71: 248-259.
- von Kugelgen, I., E. Schoffel, and K. Starke. 1989.** Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P2-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: 522-532.
- von Kugelgen, I., K. Kurz, and K. Starke. 1993.** Axon terminal P2-purinoceptors in feedback control of sympathetic transmitter release. *Neuroscience* 56: 263-267.
- Vorhoff, T., H. Zimmermann, J. Pelletier, J. Sevigny, and N. Braun. 2005.** Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1: 259-270.
- Vorobjev, V. S., I. N. Sharonova, H. L. Haas, and O. A. Sergeeva. 2003a.** Expression and function of P2X purinoceptors in rat histaminergic neurons. *Br J Pharmacol* 138: 1013-1019.
- Vorobjev, V. S., I. N. Sharonova, O. A. Sergeeva, and H. L. Haas. 2003b.** Modulation of ATP-induced currents by zinc in acutely isolated hypothalamic neurons of the rat. *Br J Pharmacol* 139: 919-926.
- Vulchanova, L., M. S. Riedl, S. J. Shuster, G. Buell, A. Surprenant, R. A. North, and R. Elde. 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., U. Arvidsson, M. Riedl, J. Wang, G. Buell, A. Surprenant, R. A. North, and R. Elde. 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., M. S. Riedl, S. J. Shuster, L. S. Stone, K. M. Hargreaves, G. Buell, A. Surprenant, R. A. North, and R. Elde. 1998.** P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci* 10: 3470-3478.
- Wakamori, M., and M. Sorimachi. 2004.** Properties of native P2X receptors in large multipolar neurons dissociated from rat hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Res* 1005: 51-59.
- Wang, C. Z., N. Namba, T. Gono, N. Inagaki, and S. Seino. 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, J., L. Drake, F. Sajjadi, G. S. Firestein, K. M. Mullane, and D. A. Bullough. 1997.** Dual activation of adenosine A1 and A3 receptors mediates preconditioning of isolated cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 320: 241-248.
- Wang, L.-Y., W.-Q. Cai, P.-H. Chen, Q.-Y. Deng, and C.-M. Zhao. 2009.** Down-regulation of P2X7 receptor expression in rat oligodendrocyte precursor cells after hypoxia ischemia. *Glia* 57: 307-319.
- Watts, A. G., L. W. Swanson, and G. Sanchez-Watts. 1987.** Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 258: 204-229.
- Webb, T. E., J. Simon, B. J. Krishek, A. N. Bateson, T. G. Smart, B. F. King, G. Burnstock, and E. A. Barnard. 1993.** Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324: 219-225.
- Weekley, L. B. 1992.** Renal renin secretion rate and norepinephrine secretion rate in response to centrally administered angiotensin-II: role of the medial basal forebrain. *Clin Exp Hypertens A* 14: 923-945.
- Widdowson, P. S. 1997.** Regionally-selective down-regulation of NPY receptor subtypes in the obese Zucker rat. Relationship to the Y5 'feeding' receptor. *Brain Res* 758: 17-25.
- Wieland, H. A., W. Engel, W. Eberlein, K. Rudolf, and H. N. Doods. 1998.** Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents. *Br J Pharmacol* 125: 549-555.
- Wildman, S. S., B. F. King, and G. Burnstock. 1998.** Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol* 123: 1214-1220.
- Wildman, S. S., B. F. King, and G. Burnstock. 1999.** Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. *Br J Pharmacol* 128: 486-492.
- Wildman, S. S., S. G. Brown, M. Rahman, C. A. Noel, L. Churchill, G. Burnstock, R. J. Unwin, and B. F. King. 2002.** Sensitization by extracellular Ca²⁺ of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol Pharmacol* 62: 957-966.
- Wilkin, L. D., L. D. Mitchell, D. Ganten, and A. K. Johnson. 1989.** The supraoptic nucleus: afferents from areas involved in control of body fluid homeostasis. *Neuroscience* 28: 573-584.
- Williams, M., and M. F. Jarvis. 2000.** Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* 59: 1173-1185.
- Wilson, C. N., and V. K. Batra. 2002.** Lipopolysaccharide binds to and activates A(1) adenosine receptors on human pulmonary artery endothelial cells. *J Endotoxin Res* 8: 263-271.
- Wilson, T. E., C. L. Sauder, M. L. Kearney, N. T. Kuipers, U. A. Leuenberger, K. D. Monahan, and C. A. Ray. 2007.** Skin-surface cooling elicits peripheral and visceral vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol* 103: 1257-1262.

- Windscheif, U., O. Pfaff, A. U. Ziganshin, C. H. Hoyle, H. G. Baumert, E. Mutschler, G. Burnstock, and G. Lambrecht. 1995.** Inhibitory action of PPADS on relaxant responses to adenine nucleotides or electrical field stimulation in guinea-pig taenia coli and rat duodenum. *Br J Pharmacol* 115: 1509-1517.
- Winn, H. R., R. Rubio, and R. M. Berne. 1981.** Brain adenosine concentration during hypoxia in rats. *Am J Physiol* 241: H235-H242.
- Wollmann, G., C. Acuna-Goycolea, and A. N. van den Pol. 2005.** Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *J Neurophysiol* 94: 2195-2206.
- Wright, S. D. 1999.** Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med* 189: 605-609.
- Wuchert, F., D. Ott, S. Rafalzik, J. Roth, and R. Gerstberger. 2009.** Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J Neuroimmunol* 206: 44-51.
- Wuchert, F., D. Ott, J. Murgott, S. Rafalzik, N. Hitzel, J. Roth, and R. Gerstberger. 2008.** Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 204: 66-74.
- Wynn, G., W. Rong, Z. Xiang, and G. Burnstock. 2003.** Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* 125: 1398-1409.
- Xiang, Z., and G. Burnstock. 2005a.** Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia* 52: 119-126.
- Xiang, Z., and G. Burnstock. 2005b.** Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 156: 147-157.
- Xiang, Z., X. Bo, and G. Burnstock. 1998a.** Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* 256: 105-108.
- Xiang, Z., C. He, and G. Burnstock. 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., X. Bo, I. Oglesby, A. Ford, and G. Burnstock. 1998b.** Localization of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Brain Res* 813: 390-397.
- Xiang, Z., Y. Xiong, N. Yan, X. Li, Y. Mao, X. Ni, C. He, R. H. LaMotte, G. Burnstock, and J. Sun. 2008.** Functional up-regulation of P2X3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain* 140: 23-34.
- Xin, L., and C. M. Blatteis. 1992.** Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. *Brain Res Bull* 29: 27-35.
- Xiong, K., R. W. Peoples, J. P. Montgomery, Y. Chiang, R. R. Stewart, F. F. Weight, and C. Li. 1999.** Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *J Neurophysiol* 81: 2088-2094.
- Yaar, R., M. R. Jones, J. F. Chen, and K. Ravid. 2005.** Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol* 202: 9-20.
- Yagi, R., S. Tanaka, and T. Koike. 1999.** Thapsigargin induces microglial transformation from amoeboid to ramified type in vitro. *Glia* 28: 49-52.
- Yamaguchi, N., M. Suzuki-Kusaba, H. Hisa, Y. Hayashi, M. Yoshida, and S. Satoh. 2000.** Interaction between norepinephrine release and intrarenal angiotensin II formation during renal nerve stimulation in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 831-837.
- Yamanaka, A., T. Sakurai, T. Katsumoto, M. Yanagisawa, and K. Goto. 1999.** Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849: 248-252.

- Yamanaka, A., K. Kunii, T. Nambu, N. Tsujino, A. Sakai, I. Matsuzaki, Y. Miwa, K. Goto, and T. Sakurai. 2000.** Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859: 404-409.
- Yamanaka, A., C. T. Beuckmann, J. T. Willie, J. Hara, N. Tsujino, M. Mieda, M. Tominaga, K. Yagami, F. Sugiyama, K. Goto, M. Yanagisawa, and T. Sakurai. 2003.** Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38: 701-713.
- Yang, L., K. Lindholm, Y. Konishi, R. Li, and Y. Shen. 2002.** Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci* 22: 3025-3032.
- Yao, S. T., A. V. Gourine, K. M. Spyer, J. A. Barden, and A. J. Lawrence. 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.
- Yoshida, K., S. McCormack, R. A. Espana, A. Crocker, and T. E. Scammell. 2006.** Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494: 845-861.
- Yoshioka, K., O. Saitoh, and H. Nakata. 2001.** Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7617-7622.
- Yoshioka, K., R. Hosoda, Y. Kuroda, and H. Nakata. 2002.** Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Lett* 531: 299-303.
- Zalc, B. 1995.** Phylogeny of myelin and myelin forming cells. *C R Seances Soc Biol Fil* 189: 239-244.
- Zetterstrom, T., L. Vernet, U. Ungerstedt, U. Tossman, B. Jonzon, and B. B. Fredholm. 1982.** Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci Lett* 29: 111-115.
- Zemkova, H., A. Balik, M. Jindrichova, and V. Vara. 2008.** Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary. *Physiol Res* 57 Suppl 3: S23-S38.
- Zhang, J. M., H. K. Wang, C. Q. Ye, W. Ge, Y. Chen, Z. L. Jiang, C. P. Wu, M. M. Poo, and S. Duan. 2003.** ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40: 971-982.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zhang, Y. H., J. X. Lin, and J. Vilcek. 1990.** Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* 10: 3818-3823.
- Zhang, Y. H., M. Yanase-Fujiwara, T. Hosono, and K. Kanosue. 1995.** Warm and cold signals from the preoptic area: which contribute more to the control of shivering in rats? *J Physiol* 485: 195-202.
- Zhang, Z., K. Trautmann, and H. J. Schluesener. 2005.** Microglia activation in rat spinal cord by systemic injection of TLR3 and TLR7/8 agonists. *J Neuroimmunol* 164: 154-160.
- Zhong, Y., P. M. Dunn, and G. Burnstock. 2000.** Pharmacological comparison of P2X receptors on rat coeliac, mouse coeliac and mouse pelvic ganglion neurons. *Neuropharmacology* 39: 172-180.
- Zhu, Y., and H. K. Kimelberg. 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. *Brain Res Dev Brain Res* 148: 77-87.
- Zimmermann, H. 1996.** Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases 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.

8. Anhang

8.1 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Sein Engagement sowie seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth danke ich für die vielen guten Ratschläge während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an das Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ der JLU Gießen für die finanzielle Unterstützung über ein Stipendium der DFG, sowie an Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger und Frau Jana Heber für die vorbildliche Organisation.

Frau Daniela Ott danke ich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden. Es lebe der Keller!

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Jolanta Murgott für Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays bedanken.

Herrn Michael Haas und Frau Alexia Alimoh danke ich für die sorgfältige Pflege der Versuchstiere. Liebe Lexi, danke für die kleinen Pausen zwischendurch.

Weberchen, danke für die lustige Zeit, die wir miteinander hatten und das immer gewährte Asyl in der Rhön. Ich werde dich vermissen.

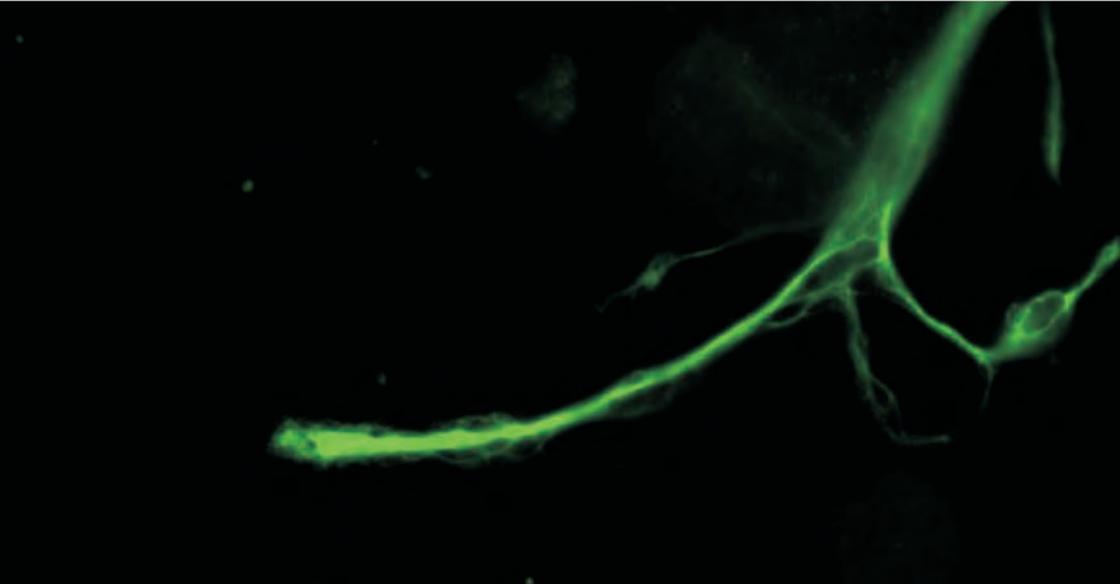
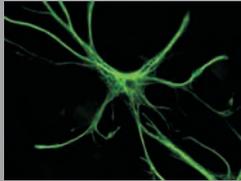
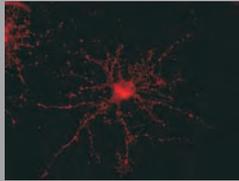
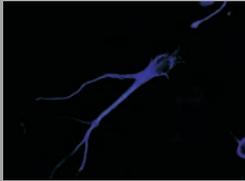
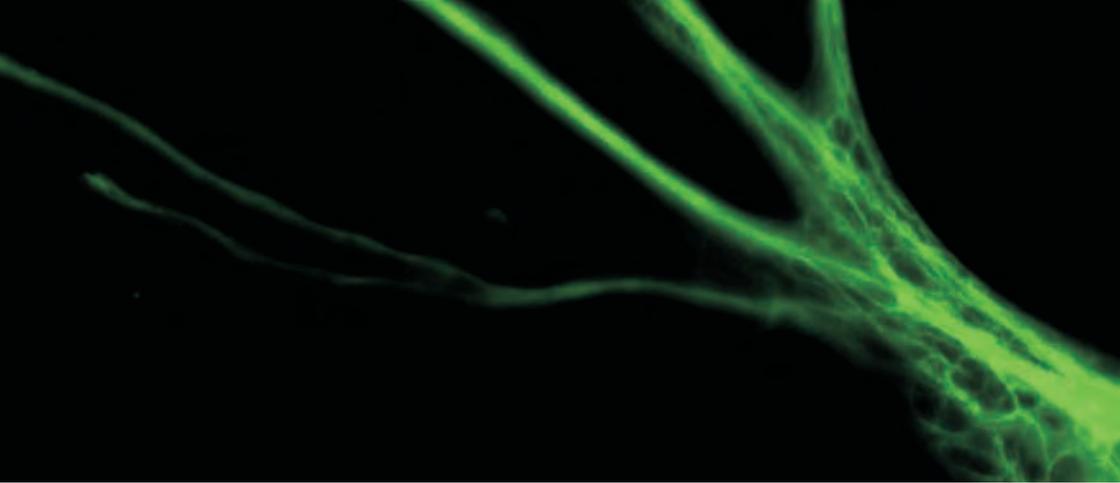
Allen anderen DoktorandInnen und Mitarbeitern der AG Gerstberger und AG Diener danke ich für die abwechslungsreichen Mittagspausen und den Spaß den wir miteinander hatten.

Außerdem danke ich meinem Freund Kai für seine Ruhe und Geduld, gerade in der letzten Phase dieser Arbeit, in der der Computer zu oft versagte.

Mit der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

8.2 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht 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.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5470-9

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 195470 0