

**Die durch exogenes ATP gesteuerte Modulation
von exzitatorischen synaptischen Signalen in
striatalen Neuronen der Ratte**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

An der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Hans-Michael Tautenhahn

geboren:

am 19.07.1980 in Querfurt

angefertigt am:

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Nörenberg

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

15.10.2013

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	
BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Basalganglien.....	1
1.2 ATP	6
1.3 Rezeptoren	7
1.3.1 P1- oder Adenosin-Rezeptoren	7
1.3.2 P2- oder Purin-Rezeptoren.....	10
1.3.2.1 P2X-Rezeptoren	11
1.3.2.2 P2Y-Rezeptoren	13
2 ZIELSETZUNG UND BEGRÜNDUNG DER METHODENWAHL	15
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Materialien.....	18
3.2 Patch clamp	19
3.2.1 Mögliche Fehlerquellen.....	23
3.3 Messplatzaufbau	24
3.4 Präparation und allgemeine Versuchs-durchführung....	26
3.5 Identifizierung der striatalen GABAergen Projektionsneurone („medium spiny neurons“)	32
3.6 Elektrische Stimulation, Substanzapplikation und Auswertung	33
3.7 Statistische Auswertung.....	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Vorversuche I: Der Beitrag von NMDA (GluN)-, AMPA (GluA)- und GABA_A-Rezeptoren zu exzitatorischen postsynaptischen Strömen in striatalen „medium spiny“ Neuronen der Ratte	37

4.2	Vorversuche II: Die Wirkungen von Adenosin und ATP sowie von unterschiedlichen Stimulationsparametern auf exzitatorische postsynaptische Ströme in striatalen „medium spiny“ Neuronen	39
4.3	Wechselwirkungen zwischen Adenosin- und Purinozeptor-Antagonisten	43
4.4	Wechselwirkungen zwischen ATP- und Purinozeptor-Antagonisten	46
4.5	Wechselwirkungen zwischen ATP und ionotropen Glutamat-Rezeptor-Antagonisten vor und nach zusätzlicher Adenosin-A₁-Rezeptorblockade	48
4.6	Charakterisierung der Wirkungen von ATP und Adenosin auf ionotrope NMDA (GluN)- und AMPA (GluA)-Rezeptoren striataler „medium spiny“ Neuronen.....	50
5	DISKUSSION	55
5.1	Die Rolle von Adenosin A₁-Rezeptoren, ATP metabolisierenden Ecto-Enzymen, Adenosin-Transportern und potentiellen P1- / P2-Rezeptor-Heterodimeren in der ATP vermittelten Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone.....	57
5.2	Die Rolle von P2X- und P2Y-Rezeptoren in der ATP vermittelten Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone	62
5.3	Mögliche Funktionen postsynaptischer Adenosin A₁-Rezeptoren an striatalen „medium spiny“ Neuronen	66
5.4	Ausblick I: Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Adenosin A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an striatalen „medium spiny“ Neuronen unter physiologischen Bedingungen.....	72

5.5	Ausblick II: Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Adenosin A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an striatalen „<i>medium spiny</i>“ Neuronen bei Störungen der Basalganglienfunktion	75
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	85
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
	ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	
	CURRICULUM VITAE	
	PUBLIKATIONEN.....	
	DANKSAGUNG	

BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Hans-Michael Tautenhahn

Titel der Arbeit:

Die durch exogenes ATP gesteuerte Modulation von exzitatorischen synaptischen Signalen in striatalen Neuronen der Ratte

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Dissertation

Die Arbeit umfasst 114 Seiten, 268 Literaturverweise, 18 Abbildungen sowie 2 Tabellen.

Referat:

Untersucht wurde die mögliche Rolle von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) als extrazelluläres Signalmolekül im Neostriatum der Ratte. Zum Einsatz kam die *patch-clamp* Methode, adaptiert für Ableitungen aus akuten Hirnschnitten. Bereits bekannt war, dass ATP exzitatorische postsynaptische Ströme an GABAergen, striatalen Projektionsneuronen („*medium spiny*“ Neurone) hemmen konnte. Nun sollten die verantwortlichen Mechanismen hinter diesem Effekt aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass exogen zugeführtes ATP zunächst zu Adenosin metabolisiert werden musste, um seine Wirkung ausüben zu können. Ein Teil dieses Effektes war, vermittelt über präsynaptische Adenosin A₁-Rezeptoren, einer Hemmung der striatalen Glutamat-Freisetzung geschuldet. Neu war, dass auch die „*medium spiny*“ Neurone selbst funktionelle A₁-Rezeptoren exprimierten. Aktiviert durch lokal gebildetes Adenosin vermittelten diese eine Hemmung der Leitfähigkeit von Glutamat-Rezeptoren des *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Subtyps. Unter physiologischen Bedingungen mag dieser Mechanismus der Begrenzung der Informationsweiterleitung über die GABAergen Projektionsneurone dienen. Striataler Glutamat-Exzess mit Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren ist ein Charakteristikum der Huntington'schen Erkrankung. Eine Adressierung der A₁-Rezeptoren als therapeutische Option im Rahmen dieser Basalglienerkrankung scheint daher prinzipiell möglich.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
Ado	Adenosin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
EPSC	<i>excitatory postsynaptic current</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
IPSC	<i>inhibitory postsynaptic current</i>
lat.	lateinisch für
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
MSN	„ <i>medium spiny</i> “ Neurone
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSS	nicht statistisch signifikant
o.g.	oben genannt
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne

1 EINLEITUNG

1.1 Die Basalganglien

Das Striatum ist eine große Kernmasse eingebettet in der Tiefe zwischen den Hemisphären des Telencephalons. Anatomisch zu den Basalganglien gehörend, wird das Striatum in ein Neo- (zum Telencephalon gehörend) und ein Paläostriatum (zum Diencephalon gehörend) unterteilt. Phylogenetisch stellt das Paläostriatum den wesentlich älteren Anteil dar. Wird die anatomische Aufteilung im Primatenhirn betrachtet, so zählen hier sowohl der Nucleus caudatus und das Putamen, als Teil des neostriatalen Corpus striatum, als auch das externe Segment des Globus pallidus zum Neostriatum (Bähr, Frotscher *et al.* 2003).

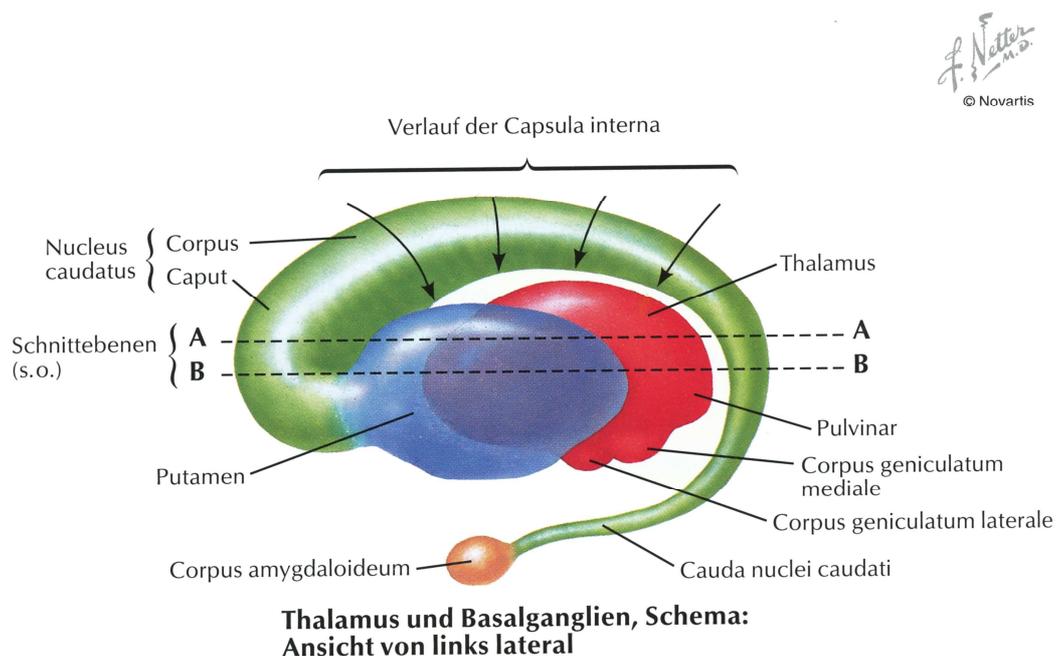


Abb. 1: Thalamus und Basalganglien, Schema Ansicht von links lateral, aus (Netter 1999) Tafel 104

Den Namen „Streifenkörper“ (lat. striatum) trägt die Struktur aufgrund von streifenförmigen Zellbrücken, welche sich zwischen dem Putamen und dem Nucleus caudatus befinden. Das Striatum kann in Caput, Corpus und Cauda unterteilt werden (Abbildung 1).

In der Ratte entspricht der Nucleus entopeduncularis dem internen Segment des Globus pallidum des Menschen. Exakte Trennungsstrukturen wie im Primaten herrschen bei der Ratte nicht, sodass zur Vereinfachung, die Bestandteile des Corpus striatum zum Caudato-Putamen zusammengefasst werden (Paxinos 1995).

Funktionell werden von einigen Autoren auch der Nucleus subthalamicus und die Substantia nigra den Basalganglien zugeschrieben, da sie gemeinsam mit dem Striatum eine übergeordnete Funktionseinheit zum extrapyramidal-motorischen System bilden (Paxinos 1995; Bähr, Frotscher *et al.* 2003).

Im Menschen sind die Basalganglien insbesondere für die Planung und Ausführung der Willkürmotorik essentiell, ebenso sind sie aber auch in das assoziative Lernen, das Arbeitsgedächtnis und die Affektivität involviert (Obeso, Rodriguez-Oroz *et al.* 2008).

Kommt es zu funktionellen Störungen der Basalganglien (im Rahmen von Verletzungen, Hirninfarkten, Raumforderungen oder Ähnlichem) können hierdurch komplexe Bewegungsstörungen, aber auch kognitive Beeinträchtigungen hervorgerufen werden. Das Ausmaß der Schädigung im Bereich der Basalganglien wird deutlich, bei Betrachtung der beiden wohl am besten untersuchten Krankheiten auf diesem Gebiet: dem Morbus Parkinson als hypokinetisches-hypertones-Syndrom (Ehringer und Hornykiewicz 1960) und die Huntington Krankheit als choreatische Hyperkinesie (Alzheimer 1911).

Bei den o.g. Krankheiten sind die motorischen Störungen fast immer begleitet von psychischen Auffälligkeiten und kognitiven Störungen bis hin zur Demenz, was nochmals vermuten lässt, dass die Basalganglien außer in motorischen auch in kognitiven und emotionalen Prozessen eine wesentliche Rolle spielen. Grundlage hierfür scheinen die zahlreichen Verbindungen der Basalganglien mit Strukturen des limbischen Systems zu sein (Weddell 1994; Breitenstein, Van Lancker *et al.* 2001; Bähr, Frotscher *et al.* 2003; Dara, Monetta *et al.* 2008)

Innerhalb des Striatums von Nagetieren machen GABAerge „*medium spiny* Projektions-Neurone“ mehr als 95% der neuronalen Zellpopulation aus. Die verbleibenden 5% verteilen sich auf cholinerge und GABAerge Interneurone, wobei letztere nach dem Vorhandensein spezifischer neurochemischer

Marker (z.B. Neuropeptid Y, Parvalbumin oder Calretinin) sowie bestimmter Feuermuster (z.B. „*fast-spiking* (FS) *neurons*“, „*persistent und low-threshold spike* (PLTS) *neurons*“) weiter unterteilt werden können (Tepper und Bolam 2004).

Weiterführende Untersuchungen der striatalen MSN's haben, wie in Abbildung 2 illustriert, zwei verschiedene Untergruppen dieser Zelllinie aufgezeigt (Kawaguchi, Wilson *et al.* 1995). Die Zellkörper der MSN's liegen für beide Untergruppen in der Eingangsstruktur der Basalganglienschleife dem Striatum (Nucleus caudatus und Putamen). Die Projektion zur Ausgangsstation der Basalganglienschleife (Substantia nigra pars reticularis = SNr und interner Teil des Globus pallidus = GPI; zusammen auch als Pallidum bezeichnet) findet über einen direkten und einen indirekten Projektionsweg statt. Der direkte Projektionsweg der MSN's führt vom Striatum zur SNr und zum GPI. Dies sind diejenigen Neurone, welche Dopamin D1-Rezeptoren exprimieren und neben GABA (γ -Aminobuttersäure) das Neuropeptid Dynorphin als Botenstoffe benutzen. Der indirekte Projektionsweg geht vom Striatum über den externen Teil des Globus pallidus und den subthalamischen Nucleus zum Pallidum. Die MSN's des indirekten Projektionswegs exprimieren D2- und A2_A-Rezeptoren. Sie benutzen GABA und Enkephalin als Botenstoffe. Der direkte und der indirekte Weg haben dann entgegengesetzte funktionelle Auswirkungen auf den „*output*“ der Basalganglienschleife. MSN's des direkten Weges hemmen die Ausgabekerne, während GPI und SNr über die indirekte Projektion erregt werden (GABAerge Hemmung des Globus pallidus pars externa mit nachfolgender Enthemmung des subthalamischen Nucleus, der seinerseits dann glutamaterg die Ausgabekerne aktiviert). GPI und SNr senden dann ihrerseits GABAerge Projektionen zum ventrolateralen Thalamus. Von dort geht der Informationsfluss dann über glutamaterge Bahnen zurück zum motorischen Cortex. Es wird allgemein angenommen, dass eine verminderte neuronale Aktivität in SNr und GPI (Enthemmung des Thalamus mit vermehrtem Informationsfluss zum Cortex) mit einer Erleichterung der Willkürmotorik assoziiert ist, während bei hypokinetischen Zuständen wie z.B. bei Morbus Parkinson eine erhöhte Feuerrate von SNr, GPI und subthalamischem Nucleus beobachtet wird. Erklärt wird dies durch den

Dopamin Mangel, der im Rahmen dieser Erkrankung auftritt. Folge ist eine verminderte Aktivierung der D1-Rezeptor tragenden MSN's des direkten Projektionsweges bei gleichzeitig verminderter Hemmung der D2-Rezeptor tragenden MSN's des indirekten Projektionsweges (siehe Übersicht in [Obeso, Rodriguez-Oroz *et al.* 2008]). Bei Chorea Huntington wiederum degenerieren primär die MSN's des indirekten Projektionspfades. Über den Verlust der GABAergen Innervation des externen Teils des Globus pallidus wird der subthalamische Nucleus gehemmt. Folge ist eine Enthemmung des Thalamus. Die überschießende glutamaterge Stimulation des Cortex bedingt dann die hyperkinetischen Bewegungsstörungen (Raymond, Andre *et al.* 2011). Bei dieser Darstellung handelt es sich um eine stark vereinfachte Modellvorstellung. Unterscheiden lassen sich die beiden Zelluntergruppen zum einen anhand ihrer chemischen Botenstoffe und zum anderen anhand ihrer Projektionswege. Eine MSN Untergruppe kommt vor allem in den inneren Anteilen des Globus pallidus und in der Substantia nigra vor und bildet einen direkten Signalweg zum Thalamus und zum Cortex. Diese Untergruppe nutzt Prodynorphin und GABA als chemische Botenstoffe (Parent und Hazrati 1993). Durch einen indirekten Signalweg über äußere Anteile des Globus pallidus zeichnet sich die zweite Untergruppe der MSN's aus. Zudem nutzt diese, anstelle von Prodynorphin, Enkephalin und GABA als chemische Botenstoffe (Latini, Pazzagli *et al.* 1996).

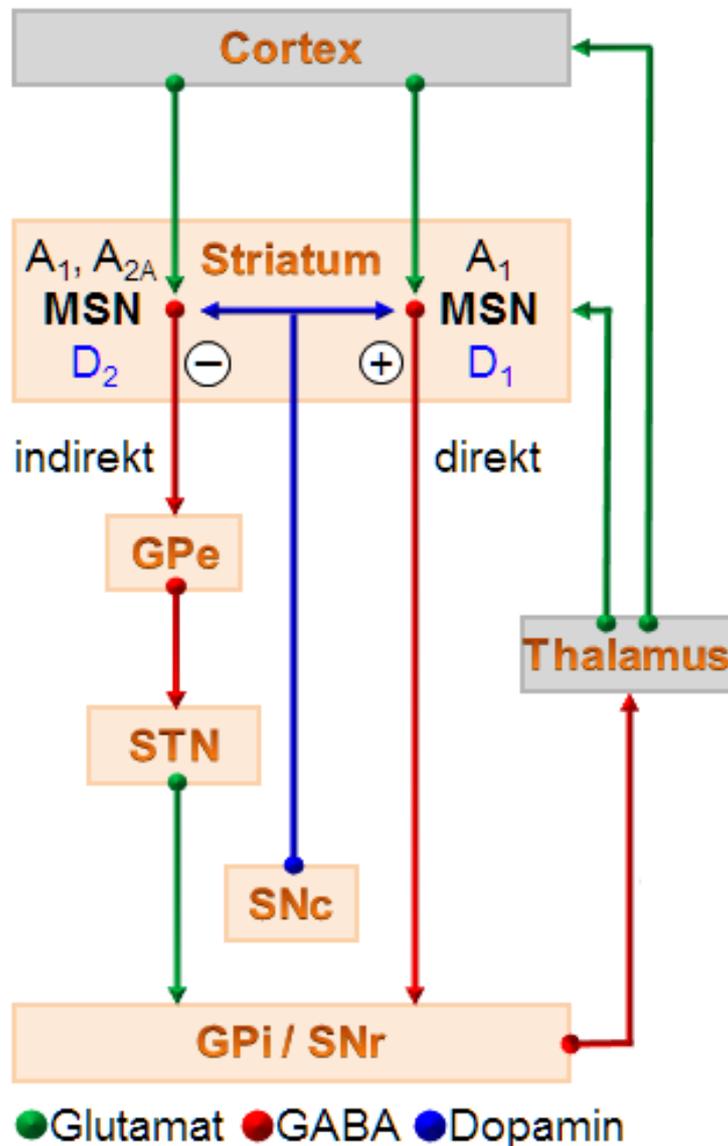


Abb. 2: Stark vereinfachte Darstellung der Vernetzung zwischen den Kernen im Basalgangliensystem des menschlichen Gehirns: GABAerge MSN's stehen am Beginn zweier, funktionell antagonistischer Projektionsbahnen, deren balancierte Aktivität für eine geordnete Willkürmotorik essentiell ist. Ein direkter Weg, beteiligt an der Bahnung von Bewegungen, besteht aus zwei aufeinanderfolgenden GABAergen Verbindungen, gebildet aus Adenosin A₁-Rezeptor tragenden striatonigralen MSN's vom Striatum zu den Ausgangskernen der Basalganglien, dem internen Segment des Globus (GPI) und der Substantia nigra pars reticularis (SNr), sowie von dort weiterführenden Neuronen zum Thalamus. Glutamaterge, corticale Erregung der MSN's dieser direkten Projektion enthemmt die thalamischen Neurone (Minderung des inhibitorischen GABAergen Inputs aus GPI und SNr) und fördert den Informationsrückfluss zum Cortex (und Striatum). Der indirekte Projektionsweg, beteiligt an der Unterdrückung von überschießenden Bewegungen, geht über striatopallidale MSN's, welche zusätzlich zu A₁- auch Adenosin A_{2A}-Rezeptoren exprimieren, zum externen Segment des Globus pallidus (GPE) und von dort weiter GABAerg zum subthalamischen Nucleus (STN), welcher seinerseits GPI und SNr glutamaterg innerviert. Aktivität in der indirekten Projektion führt zur Enthemmung des STN, Erregung von GPI / SNr und schließlich Hemmung des Thalamus. Dopaminerge Afferenzen aus der Substantia nigra pars compacta (SNc) modulieren die Aktivität der direkten und indirekten Projektionsbahnen gegensinnig über exzitatorische Dopamin-Rezeptoren der D1- und inhibitorische Dopamin-Rezeptoren der D2-Klasse, welche präferentiell auf striatonigralen beziehungsweise striatopallidalen MSN's exprimiert werden.

Modifiziert nach (Graybiel 2000) und (Andre, Cepeda *et al.* 2010)

1.2 ATP

Vor fast einem Jahrhundert wurde erstmals die Wirkung der Purinnukleotide und -nukleoside, ATP und Adenosin, am Herzen und an Blutgefäßen beschrieben (Drury und Szent-Gyorgyi 1929). Lange Zeit herrschte relative Ruhe um dieses Thema, bis eine Auftragsarbeit zur Klärung der Rolle des ATP in der Heilung von Kriegswunden des 2. Weltkriegs aus dem Jahre 1950 (Stoner und Green 1950) den Stein dann erneut ins Rollen brachte. Es folgten zahlreiche Arbeiten über ATP und seine Rolle in verschiedensten Geweben und Zellprozessen (Buchthal, Deutsch *et al.* 1948; Emmelin und Feldberg 1948; Mihich, Clarke *et al.* 1954).

Die erste Arbeit über ATP als Transmittersubstanz lieferte Pamela Holton. Sie zeigte die ATP Freisetzung aus Neuronen des sensorischen Nervensystems nach einer antidromen Stimulation (Holton 1959).

Urvater des ATPs als Neurotransmitter kann jedoch zweifelsohne Geoffrey Burnstock genannt werden. Als eine seiner bahnbrechenden Arbeiten sei hier nur eine im Jahre 1970 veröffentlichte Studie genannt, in welcher belegt werden konnte, dass ATP der Transmitter inhibitorischer Neurone des Darmnervensystems ist (Burnstock, Campbell *et al.* 1970).

Lange Zeit galt es als umstritten, welche Rolle ATP als Transmitter zwischen Neuronen spielt. Eine wesentliche Antwort auf diese Frage ergab sich aus einer Arbeit von Edwards *et al.* (1992). Diese zeigte, dass durch elektrische Feldreizung im Hirnschnitt evozierte exzitatorische postsynaptische Ströme, gemessen an Neuronen der medialen Habenula, neben Glutamat auch durch ATP vermittelt wurden (Edwards, Gibb *et al.* 1992). Es gibt im Gehirn allerdings noch zusätzliche Quellen für extrazelluläres ATP, so z.B. Astrozyten, die das Nukleotid möglicherweise mittels vesikulärer Exozytose freisetzen können (Bowser und Khakh 2007). Nicht zuletzt sei erwähnt, dass nach Gewebeschädigung, z.B. im Rahmen einer Ischämie, extrazelluläre ATP-Spiegel massiv ansteigen können (Illes und Alexandre Ribeiro 2004; Burnstock 2007). Der Nachweis von Ecto-Nukleosidasen (Ecto-Nukleosid Triphosphat Diphosphohydrolasen, Umwandlung von ATP zu AMP; Ecto-Nukleotid Pyrophosphatasen / Phosphodiesterasen, Umwandlung von ATP zu ADP und dann zu AMP) und Ecto-5'-Nukleotidasen (Umwandlung von AMP

zu Adenosin) im Gehirn (siehe Übersicht in [Yegutkin 2008]) macht schließlich deutlich, dass auch potentielle Inaktivierungsmechanismen für Transmitter-ATP vorhanden sind. Das entstehende Adenosin kann über spezielle Transporter aus dem extrazellulären Raum entfernt werden, die Adenosin-Deaminase (Umwandlung zu Inosin) dient zusätzlich zur Inaktivierung (Yegutkin 2008).

1.3 Rezeptoren

Purin (P)-Rezeptoren werden in zwei große Familien unterteilt, die P1-Rezeptoren, aktivierbar durch das Adenin-Nukleosid Adenosin, sowie P2-Rezeptoren die durch Adenin (ATP)- aber auch Pyrimidin-Nukleotide wie z.B. Uracil-5´triphosphat (UTP) Uracil-5´-diphosphat (UDP) erregt werden können. P1- und P2Y-Rezeptoren sind typische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die von ihnen ausgelösten Signale dauern in der Regel einige 100 Millisekunden bis Sekunden (Fredholm und Dunwiddie 1988; Khakh 2001; Abbraccio, Burnstock *et al.* 2006). P2X-Rezeptoren sind hingegen ATP gesteuerte Ionenkanäle, die nach Aktivierung binnen Millisekunden depolarisierende Kationenströme leiten. Ihre Aufgabe ist die Vermittlung schneller ATP getragener Signale, z.B. als Antwort auf synaptisch freigesetztes ATP (Neurotransmission) (Khakh 2001). Die Signaleigenschaften der P1- und P2Y-Rezeptoren prädestinieren sie wiederum für neuromodulatorische Funktionen (Modulation der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und der postsynaptischen Exzitabilität) (Fredholm und Dunwiddie 1988; Khakh 2001; Abbraccio, Burnstock *et al.* 2006).

1.3.1 P1- oder Adenosin-Rezeptoren

Bis heute konnten mittels genetischer Untersuchungen 4 Subtypen des P1-Rezeptors kloniert werden: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ (Fredholm, Abbraccio *et al.* 1994; Fredholm, AP *et al.* 2011). Alle Subtypen des P1-Rezeptors sind morphologisch und funktionell typische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Ralevic und Burnstock 1998). Wie unter Punkt 1.3 bereits erwähnt handelt es sich bei dieser Rezeptorgruppe um *rhodospin-like* G-Protein gekoppelte

Rezeptoren mit sieben transmembranen α -Helices. Die extrazelluläre N-terminale Domäne dieser Rezeptoren ist im Gegensatz zum kurzen, intrazellulären C-Terminus häufig sehr groß, da sich hier die Bindungsstelle des Agonisten befindet. Neuere Untersuchungen am menschlichen Genom haben gezeigt, dass sich die Transmembrandomänen (TM I bis TM VII) der Adenosin-Rezeptoren untereinander sehr ähneln. Hier kommt es zu einer Basensequenzhomologie zwischen 40 und 60%, wohingegen die Sequenzen zwischen P1- und P2-Rezeptoren nur zu circa 15% homolog sind (Fredholm, Arslan *et al.* 2000). Generell wird durch P1-Rezeptoren die Aktivität der intrazellulären Adenylatcyclase, welche die cAMP-Konzentration in der Zelle moduliert, beeinflusst. Handelt es sich um einen A_1 - oder A_3 -Rezeptor wird durch Agonistenbindung ein inhibitorisches G-Protein ($G_{i/o}$) aktiviert, was zur Inhibierung der Adenylatcyclase und somit zur Senkung des intrazellulären cAMP-Levels führt. Handelt es sich aber um einen A_2 -Rezeptor, bedingt die Agonistenbindung die Aktivierung eines stimulatorischen G-Proteins (G_s), wodurch die Adenylatcyclase aktiviert wird und die cAMP-Konzentration in der Zelle steigt (Reshkin, Guerra *et al.* 2000).

Es ist weiterhin wohl bekannt, dass rekombinante Adenosin-Rezeptoren mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren Heteromere bilden können. Die in dieser Hinsicht am besten untersuchte Kombination stellt die Paarung A_{2A} - und D_2 -Rezeptor dar (siehe unten). Es ist zur Zeit aber nicht endgültig geklärt, ob und falls ja, welche funktionelle Rolle solche heteromeren Rezeptoren in intakten Geweben spielen (Fredholm, AP *et al.* 2011). Eine Übersicht der Subtyp-spezifischen Agonisten und ihrer Gegenspieler an P1-Rezeptoren ist in Tabelle 1 zu sehen. Abschließend sei noch bemerkt, dass Speziesunterschiede in der Pharmakologie der Adenosin-Rezeptoren bestehen. So zeigt der A_1 -Antagonist DPCPX an humanen Rezeptoren eine nur geringe Subtypen-Spezifität, der A_{2B} -Antagonist MRS 1754 wirkt potent und selektiv beim Menschen nicht aber bei der Ratte und A_3 -Rezeptoren sind speziell dafür berüchtigt, dass alle bekannten Antagonisten am humanen Ortholog weitaus potenter wirken als an den entsprechenden Rezeptoren von Nagetieren (siehe Übersicht [Fredholm, AP *et al.* 2011]).

Tab. 1: Charakterisierung der P1 (Adenosin)-Rezeptoren (modifiziert nach Übersichtsarbeiten von Burnstock (2007) und Fredholm (2011)).

Rezeptor	Untergruppe	Hauptverteilung	Agonisten	Antagonisten	Transduktions Mechanismus
P1 (Adenosin)	A ₁	Gehirn, Rückenmark, Hoden, Herz, autonome Nerven	R-PIA, CHA, CCPA, CPA, S-ENBA, CVT-510, TCPA, Tecadenoson	DPCPX 3,0 (h) / 0,5 (r) > CFPFX 1,26 (h) / 0,63 (r) > Rolofyllin, PSB-36, FK-453, (Caffein und Theophyllin - nicht selektiv)	G _{i/o} ↓ cAMP
	A _{2A}	Gehirn, Herz, Lunge, Milz	CGS 21680, Apadenoson, UK-432097, HE-NECA, CV-3146	CSC , MSX-2, KF17837, SCH- 58261, ZM-241385, KW6002, (Caffein und Theophyllin - nicht selektiv)	G _s ↑ cAMP
	A _{2B}	Dickdarm, Blase	A2B Agonist, BAY 60- 6583, (NECA - nicht selektiv)	MRE2029-F20, MRS1754, PSB- 603, PSB-1115, (Caffein und Theophyllin - nicht selektiv)	G _s ↑ cAMP
	A ₃	Lunge, Leber, Gehirn, Hoden, Herz	IB-MECA, 2- CI-IB-MECA, CF 102, MRS3558, DBXRM, VT160	KF26777, MRS1191, MRS1523, VUF- 5574, (Caffein und Theophyllin - nicht selektiv)	G _{i/o} G _{q/11} ↓ cAMP ↑ IP ₃

Wie unter Punkt 1.1 bereits erwähnt, teilen sich die in dieser Arbeit untersuchten MSN's in zwei Untergruppen. Untersuchungen zur Genexpression in den Untergruppen der MSN-Zellen haben gezeigt, dass in einer der Untergruppen überwiegend A_{2A}-Rezeptor-mRNA gefunden werden konnte, wohingegen die andere Untergruppe überwiegend A₁-Rezeptor-Gene exprimiert (Rivkees, Price *et al.* 1995; Burnstock, Krugel *et al.* 2011). Wird nun die Lokalisation der Rezeptortranskripte in den Zellen genauer betrachtet, so zeigt sich eine Ko-Lokalisation von A_{2A}-und D2 (Dopamin)-Rezeptor-mRNA in den striatopallidalen Projektionsneuronen, welche zudem Enkephalin ausschütten. *Vice versa* hierzu sind A₁-Rezeptor- und D1-Rezeptor-mRNA an ähnlichen Stellen lokalisiert (Schiffmann, Jacobs *et al.* 1991; Ongini und Fredholm 1996). Diese Erkenntnis hat zu mehreren klinischen Studien auf dem Gebiet der dopaminergen Erkrankungen geführt und insbesondere in den letzten Jahren auch zu Erfolg versprechenden Fortschritten beigetragen. So zeigte eine *proof-of-concept*-Studie die Verbesserung der motorischen Funktion bei an Morbus Parkinson erkrankten Patienten unter der Medikation mit einem A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten. Als weiteres Ergebnis dieser Studie wurden schützende Eigenschaften des A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten auf die dopaminergen Neurone bei Patienten mit Morbus Parkinson gezeigt (Schwarzschild, Agnati *et al.* 2006; Jenner, Mori *et al.* 2009).

Da cholinerge striatale Interneurone funktionell sowohl A_{2A} - als auch D2-Rezeptoren in Ihre Zellmembran einbauen, können diese wiederum über eine Acetylcholinfreisetzung MSN's und deren Funktion steuern (Tozzi, de Iure *et al.* 2011). Abgesehen von postsynaptischen Rezeptoren an den MSN's und den cholinergen Interneuronen, spielen auch die präsynaptischen Rezeptoren eine entscheidende Rolle im Informationsfluss der MSN's. Auch hier wurden A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren funktionell nachgewiesen. Diese scheinen hier vor allem dopaminerge, glutamaterge, GABAerge und cholinerge Signale an die striatalen Neurone weiterzugeben (Fredholm und Dunwiddie 1988; Latini, Pazzagli *et al.* 1996; Flagmeyer, Haas *et al.* 1997; Pang, Deng *et al.* 2002; Wirkner, Gerevich *et al.* 2004; Ciruela, Casado *et al.* 2006).

1.3.2 P2- oder Purin-Rezeptoren

P2-Rezeptoren werden nach dem Mechanismus ihrer Signaltransduktion in zwei große Gruppen eingeteilt. Bei P2X-Rezeptoren handelt es sich um Liganden gesteuerte Ionenkanäle, permeabel für mono- und divalente Kationen wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} , während P2Y-Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine koppeln. Mittels Genanalyse sind inzwischen sieben P2X ($P2X_1$ – $P2X_7$)-Proteinuntereinheiten und acht P2Y ($P2Y_1$ - $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$ - $P2Y_{14}$)-Rezeptoren im menschlichen Genom sequenziert worden (Khakh, Burnstock *et al.* 2001; Abbracchio, Burnstock *et al.* 2006). Spezifische Untersuchungen im Striatum der Ratte haben auch hier Genexpression mehrerer verschiedener P2X- und P2Y-Rezeptoren gezeigt (Norenberg und Illes 2000; Amadio, Montilli *et al.* 2007). Bereits 1988 beschrieben Zahng und Kornecki die Freisetzung von ATP durch Depolarisation von in Kultur befindlichen striatalen Neuronen (1988). Ebenfalls in den 80ern gelang es erstmals Synaptosomen von cholinergen Interneuronen des Striatums zu isolieren (Richardson, Brown *et al.* 1987). Nachdem später gezeigt werden konnte, dass ATP genau aus diesen Synaptosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden kann, begann das Interesse für ATP als Neurotransmitter im Gehirn zu wachsen (James und Richardson 1993). Trotz vieler Hinweise und insbesondere der Detektion von Rezeptor-mRNA in den GABAergen MSN's und den cholinergen Neuronen des Striatums, fehlt bisher

ein funktioneller Nachweis der Rezeptoren *in vivo* (Scheibler, Pesic *et al.* 2004).

1.3.2.1 P2X-Rezeptoren

Es handelt sich um Homo- oder Heterotrimere, gebildet aus den Untereinheiten P2X₁ - P2X₇. Die Untereinheiten, mit intrazellulär gelegenen N- und C-Termini und zwei Transmembrandomänen (TMD1, TMD2), sind aus Aminosäureketten von 379 (P2X₆) bis 579 Residuen (P2X₇) aufgebaut. Die beiden TMD's sind dabei über eine lange (ca. 300 Aminosäuren), extrazelluläre Schleife miteinander verbunden. Die Pore des Rezeptorkanalkomplexes, sein Selektivitätsfilter und sein Schließmechanismus („gate“) wird wohl durch die TMD2 der Proteinuntereinheiten gebildet, während sich die vermutlich 3'-ATP Bindungsstellen an den Grenzflächen zwischen benachbarten Extrazellulärschleifen ausbilden (Jarvis und Khakh 2009; Kawate, Michel *et al.* 2009; Coddou, Yan *et al.* 2011). Nicht alle P2X-Untereinheiten bilden jedoch leicht und in jedem zellulären Hintergrund funktionelle Rezeptorkomplexe aus. P2X₆ wird entweder auf Grund eines Glykosylierungsdefektes (Jones, Vial *et al.* 2004) oder wegen einer Unfähigkeit zur Homotrimerbildung (Ormond, Barrera *et al.* 2006) nicht in die Zellmembran transportiert. P2X₅, der beim Menschen primär als nicht-funktionale Deletionsmutante (Teile der C-terminalen extrazellulären Schleife und der TMD2 fehlen) vorkommt (Duckwitz, Hausmann *et al.* 2006), besitzt ein Retentions-Motiv, was zusätzlich seine nur schlechte funktionelle Möglichkeit zur Expression erklären mag (Bo, Jiang *et al.* 2003).

In Tabelle 2 ist die hauptsächliche Gewebeverteilung, sowie die Pharmakologie (subtyp-spezifische Agonisten und Antagonisten) der bekannten homo- und heterotrimeren P2X-Rezeptoren zusammengestellt.

Tab. 2:

Charakterisierung der P2 (Purin)-Rezeptoren (modifiziert nach Übersichtsarbeiten von [Burnstock 2007] und [Freedholm 2011]).

Rezeptor	Untergruppe	Hauptverteilung	Agonisten	Antagonisten	Transduktions-Mechanismus
P2X	P2X ₁	Glatte Muskulatur, Blutblättchen, Kleinhirn, Spinalnerven	α, β -meATP, ATP , 2-MeSATP, L- β, γ -meATP	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449	intrinsischer Kationen Kanal (Ca^{2+} und Na^+)
	P2X ₂	Glatte Muskulatur, ZNS, Retina	ATP , ATP- γ -S, 2-MeSATP, α, β -meATP	Suramin , iso PPADS , RB2 , NF770, NF279	intrinsisches Ion (teilweise Ca^{2+})
	P2X ₃	sensorische Neuronen, NTS, sympathische Neurone	2-MeSATP, ATP , α, β -meATP, Ap ₄ A	TNP-ATP, PPADS , A317491, NF110, Ip ₃ I, Phenolrot	intrinsischer Kationen Kanal
	P2X ₄	ZNS, Hoden, Dickdarm	ATP, α, β -meATP, CTP, Ivermectin Potenzierung	TNP-ATP (schwach), BBG (schwach), Phenolphthalein	intrinsisches Ion (besonders Ca^{2+})
	P2X ₅	proliferierende Zellen der Haut, Darm, Blase, Thymus, Rückenmark	ATP , α, β -meATP, ATP- γ -S	Suramin , PPADS , BBG	intrinsisches Ion
	P2X ₆	ZNS, Motor Neurone des Rückenmarks	nur als Heteromer z.B. mit P2X ₄ wirksam	nur als Heteromer z.B. mit P2X ₄ wirksam	intrinsisches Ion
	P2X ₇	apoptotische Zellen, Zellen des Immunsystems, Pankreas, Haut	BzATP, ATP, 2-MeSATP, α, β -meATP	KN62, KN04, MRS2427, O-ATP Coomassie brilliant blue G	intrinsischer Kationen-Kanal und eine große Pore
P2Y	P2Y ₁	epitheliale und endotheliale Zellen, Blutblättchen, Immun Zellen, Osteoklasten	2-MeSADP, ADP- β -S, ADP, MRS2365	A3P5P, MRS2179, MRS2500, MRS2279	G _q /G ₁₁ ; PLC- β Aktivierung
	P2Y ₂	Immunzellen, epitheliale und endotheliale Zellen, Niere, Osteoblasten	UTP, ATP , UTP- γ -S, NS 365, INS37217, MRS2698	Suramin , RB2 , AR-C126313, MRS2576	G _q /G ₁₁ und möglicherweise G _i ; PLC- β
	P2Y ₄	endotheliale Zellen	UTP, 2'-azido-dUTP	PPADS , RB2 , Suramin , ATP	G _q /G ₁₁ und möglicherweise G _i ; PLC- β
	P2Y ₆	einige epitheliale Zellen, Plazenta, T- Zellen, Thymus	UDP, UTP, ATP , UDP- β -S, INS48823	MRS2578	G _q /G ₁₁ ; PLC- β Aktivierung
	P2Y ₁₁	Milz, Darm, Granulozyten	AR-C67085, ATP- γ -S, ATP	Suramin > RB2 , NF157, 5'-AMP- α -S	G _q /G ₁₁ und G _s ;P Aktivierung
	P2Y ₁₂	Blutblättchen, Gliazellen	2-MeSADP, ADP	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP, ATP , Clopidogrel	G _{i/o} ; Inhibierung der Adenylatcyclase
	P2Y ₁₃	Milz, Hirn, Lymphknoten, Knochenmark	ADP, 2-MeSADP, ATP, 2-MeSATP	MRS2211, AR-C67085, AR-C69931MX	G _{i/o}
	P2Y ₁₄	Plazenta, Fettgewebe, Magen, Darm	UDP-Glucose, UDP-Galactose, MRS2690	UDP	G _q /G ₁₁

1.3.2.2 P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren werden durch Adenin- und / oder Pyrimidin (Uracil)-Nukleotide aktiviert. Eine Ausnahme hiervon bildet der Subtyp P2Y₁₄, der durch UDP-Glucose, einem Baustein der Glykogensynthese, aktiviert wird (siehe Tabelle 2). Aufgrund der Art des gekoppelten G-Proteins kann diese Rezeptorklasse in zwei Unterfamilien eingeteilt werden. Die P2Y₁-Unterfamilie beinhaltet außerdem P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁. Alle aktivieren das heterotrimere G-Protein G_q und können daher über den Phospholipase C-Inositol-Triphosphat-Signalweg Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzen. Über die G-Proteinuntereinheit G_{αq} kann es zudem zur Aktivierung kleiner G-Proteine (GTPasen) der Rho Familie kommen. Die P2Y₁₂-Unterfamilie (P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄) koppelt hingegen an G_i, Hemmung der Adenylatcyclase und cAMP-Bildung ist die Konsequenz. Über das freiwerdende G_{βγ}-Dimer können zudem zahlreiche weitere Effektoren wie z.B. einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle (GIRK) aktiviert oder wie z.B. einige Typen spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (z.B. N-Typ) auch inhibiert werden (Abbraccio, Burnstock *et al.* 2006; von Kugelgen und Harden 2011). Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die lückenhafte Nummerierung der Subtypen der Tatsache geschuldet ist, dass zunächst Rezeptoren irrtümlich in die P2Y-Familie aufgenommen wurden, von denen sich später herausstellte, dass sie entweder nicht durch Nukleotide aktiviert werden, oder dass es sich um Spezieshomologe bereits benannter P2Y-Rezeptoren handelte (Abbraccio, Burnstock *et al.* 2006).

Die generelle Membrantopografie von P2Y-Rezeptoren ist in Abb. 3 dargestellt. Sie zeigt die typischen Eigenschaften G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit sieben hydrophoben TMD's die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Das N-terminale Ende des Proteins befindet sich im Extrazellulärraum, der C-Terminus ist intrazellulär gelegen. Wie es für Rhodopsin-artige G-Protein gekoppelte Rezeptoren typisch ist, wird vermutet, dass mehrere polare Aminosäuren am extrazellulären Anteil der TMD 3, 5, 6 und 7 an der Agonistenbindung beteiligt sind. Zusätzlich tragen wohl Aminosäuren an den extrazellulären Schleifen 2 und 3 zur Liganden-Erkennung bei (von Kugelgen und Harden 2011). Wenig Genaues ist zurzeit noch darüber bekannt, welche Anteile des P2Y-

Rezeptoren an der G-Protein Aktivierung beteiligt sind. Im Falle des humanen P2Y₁-Rezeptors zeigten allerdings Mutagenese-Studien, dass zwei Arginine (Position 333 und 334) im C-terminalen Anteil des Rezeptors entscheidend für die Bindung an G_q waren (Ding, Tuluc *et al.* 2005).

Wie andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, können auch P2Y-Rezeptoren Dimere bilden. Bekannt sind z.B. Heterodimere rekombinanter P2Y₁-und Adenosin A₁-Rezeptoren in HEK293 Zellen mit gemischten pharmakologischen Eigenschaften (Antagonisierbarkeit des P2Y₁-Rezeptor-Agonisten ADPβS durch den A₁-Antagonisten DPCPX; [Yoshioka, Saitoh *et al.* 2001]). Ko-Immunopräzipitationsstudien im Rattencortex, Cerebellum und Hippocampus deuten zudem auf eine enge physikalische Interaktion der beiden Rezeptoren in diesen Hirngebieten hin (Yoshioka, Hosoda *et al.* 2002), ohne jedoch endgültig beweisend für die Existenz nativer Rezeptordimere sein zu können.

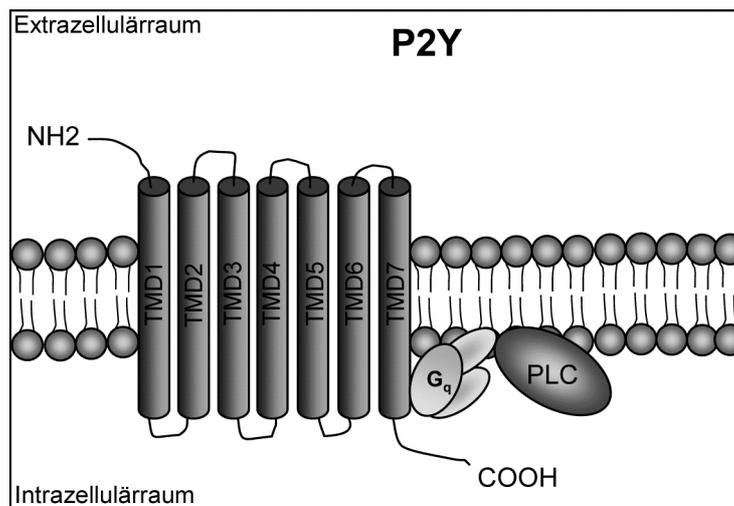


Abb. 3: Schematische Darstellung der Membrantopografie eines P2Y-Rezeptors (NH₂, COOH, N- und C-terminales Ende der Aminosäurekette; TMD 1 - 7 = Transmembrandomäne 1 bis 7; G_q = heterotrimeres G-Protein der G_q-Familie).

2 ZIELSETZUNG UND BEGRÜNDUNG DER METHODENWAHL

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits einiges über das mögliche Vorkommen von Purin-Rezeptoren im Striatum bekannt. So wurde im Streifenkern der Ratte die mRNA und / oder die Immunfluoreszenz für alle sieben P2X-Untereinheiten und alle P2Y-Rezeptoren mit Ausnahme von P2Y₁₁, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ nachgewiesen (Übersicht in [Norenberg und Illes 2000; Amadio, Montilli *et al.* 2007]). In funktionellen Studien konnte weiterhin eine Depolarisations induzierte Freisetzung von ATP aus kultivierten striatalen Neuronen (Zhang, Kornecki *et al.* 1988), oder aus Synaptosomen cholinergischer striataler Interneurone (Richardson, Brown *et al.* 1987) gezeigt werden. Da sich in der Synaptosomenpräparation zudem Ecto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase- und 5'-Nukleotidase-Aktivität demonstrieren ließ, schienen die wesentlichen Minimalvoraussetzungen für eine mögliche Transmitter- / Ko-Transmitterrolle für ATP im Striatum gegeben zu sein. Eine vorangehende Untersuchung aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte allerdings bereits nachweisen, dass MSN's in akuten Hirnschnitten der Ratte keine funktionellen P2X-Rezeptoren exprimieren, eine Rolle von ATP als Transmitter / Ko-Transmitter in der schnellen Kommunikation zwischen z.B. striatalen cholinergen Interneuronen und MSN's erschien daher als unwahrscheinlich (Scheibler, Pesic *et al.* 2004). In Erweiterung dieser früheren Studie sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob ATP möglicherweise die glutamaterge Innervation der MSN's moduliert. Hintergrund hierfür war die zusätzliche Beobachtung, dass ATP-konzentrationsabhängig die Amplituden glutamaterger exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSC's), gemessen in MSN's in Antwort auf eine elektrische Feldreizung des striatalen Hirnschnittes, hemmte (Pesic 2006; Tautenhahn, Leichsenring *et al.* 2012).

Allerdings waren auch für das ATP-Abbauprodukt Adenosin bereits P1-Rezeptor vermittelte Interferenzen mit glutamatergen Mechanismen im Neostriatum der Ratte beschrieben. Der Neuromodulator reduzierte hierbei, über präsynaptische A₁-Rezeptoren, die Glutamatfreisetzung auf allen MSN's (Calabresi, Centonze *et al.* 1997; Calabresi, Centonze *et al.* 2000). Nur in den

Neuronen des indirekten Projektionsweges (näheres unter Punkt 5.5, Abb. 17) wurden zudem postsynaptische Adenosin A_{2A}-Rezeptoren identifiziert, deren Aktivierung den, über ionotrope N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA- oder GluN-Rezeptoren; zur Nomenklatur siehe [Collingridge, Olsen *et al.* 2009]) vermittelten, Anteil der exzitatorischen postsynaptischen Ströme hemmen konnte (Wirkner, Gerevich *et al.* 2004).

Im Einzelnen sollte nun geklärt werden:

- (1) ob die oben beschriebenen Hemmwirkungen von ATP auf die glutamatergen postsynaptischen Ströme durch das Nukleotid selbst oder aber durch sein Abbauprodukt Adenosin verursacht worden waren,
- (2) ob der Effekt präsynaptisch (Hemmung der Glutamatfreisetzung) oder postsynaptisch (z.B. Hemmung von Glutamat-Rezeptoren) vermittelt war und,
- (3) schließlich, welche Subtypen von P2Y- und / oder P1-Rezeptoren involviert waren?

Insgesamt sollte die Untersuchung neue Einsichten hinsichtlich des möglichen Einflusses purinerger Mechanismen in die Regulation der Basalganglienfunktion erbringen. Obwohl es nicht das primäre Ziel eines solchen Grundlagen-orientierten Vorgehens ist, können sich aus so gewonnenen Ergebnissen dennoch Hinweise für die Identifizierung beziehungsweise Falsifizierung zukünftiger Angriffspunkte neuer Therapien ergeben. Die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Pharmaka zur symptomatischen Behandlung von Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Huntington sind jedenfalls in ihrer Wirksamkeit limitiert (Katsuno, Tanaka *et al.* 2012).

Zum Einsatz kam die *patch clamp* Technik in ihrer Variante der Ganzzell (*whole-cell*)-Ableitung, adaptiert für die Anwendung in akuten Hirnschnitten. Die Methode erlaubt es, mit hoher Empfindlichkeit und in exzellenter zeitlicher Auflösung, glutamaterge EPSC's aus MSN's abzuleiten und die Effekte von P1- / P2-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf diese Signale zu untersuchen. Ebenso können mögliche Wirkungen auf postsynaptische ionotrope Glutamat-Rezeptoren wie NMDA (GluN)- oder α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA- oder GluA-Rezeptoren;

[Collingridge, Olsen *et al.* 2009]) untersucht werden. Kenngröße ist in diesem Fall die Veränderung der mittleren, durch entsprechende exogene Agonisten (NMDA, AMPA) hervorgerufene, Stromamplitude.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

Zur Durchführung der Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden folgende Wirkstoffe verwendet:

Adenosine 5'-triphosphate Dinatriumsalz (ATP); Adenosine 5'-diphosphate Natriumsalz (ADP); Adenosine 5'-monophosphate Dinatriumsalz (AMP); 9- β -D-Ribofuranosyl-9H-purin-6-amin (Adenosin); [R-(R*,S*)]-6-(5,6,7,8-Tetrahydro-6-methyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl)furo[3,4-e]-1,3-benzodioxol-8(6H)-eins (Bicucullin); Mg²⁺ (Magnesium); DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic Säure (DL-AP5); 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamid (NBQX); 4-[[4-Formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonooxy)methyl]-2-pyridinyl]azo]-1,3-benzenedisulfonic Säure Tetranatriumsalz (PPADS); 8,8'-[Carbonylbis[imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-methyl-3,1-phenylene)carbonylimino]]bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic Säure Hexanatriumsalz (Suramin); 1-Amino-4-[[4-[[4-chloro-6-[[3 (or 4)-sulfophenyl]amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfophenyl]amino]-9,10-dihydro-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic Säure (*reactive blue 2*); 1,3,7-Trimethyl-8-(3-chlorostyryl)xanthine (CSC); 8-(p-Sulfophenyl)theophylline (8-SPT); 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX); α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Säure hydrobromid (AMPA); N-Methyl-D-aspart Säure (NMDA); α -(4-Hydroxyphenyl)- β -methyl-4-benzyl-1-piperidineethanol (+)-tartrate Salz (Ifenprodil); 4-[2-[[6-Amino-9-(N-ethyl- β -D-ribofuranuronamidoyl)-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic Säure hydrochloride (CGS 21680); Kaliumhydroxid (KOH).

Die meisten Wirksubstanzen wurden von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Ausnahmen waren 8-SPT, CCPA, DPCPX, DL-AP-5, Ifenprodil, MRS 1220 und TTX, welche von Tocris erworben wurden (Tocris Bioscience, Bristol, UK).

Stammlösungen (10-100 mM) wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Im Falle von DPCPX wurde anstatt des destillierten Wassers Dimethyl-Sulfoxid benutzt. Am Versuchstag wurden die benötigten

Mengen aus den eingefrorenen Aliquoten sorgfältig aufgetaut und in ACFS pipettiert um die entsprechende Substanzkonzentration zu erhalten.

Der pH-Wert aller ATP enthaltenden Lösungen wurde überprüft und bei Bedarf auf einen Wert von 7,4 eingestellt.

3.2 Patch clamp

Die *patch clamp* Technik ermöglicht es, Ionenströme die über die Zellmembranen fließen, zu messen. Sie beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme (*voltage clamp*), entwickelt in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts von Cole und Curtis (Cole 1979). In der am häufigsten verwendeten Form des Verfahrens wurden zwei spitze Mikroelektroden in die untersuchte Zelle eingestochen. Mit der Ersten wird das Membranpotential der Zelle (in Relation zu einer Badelektrode) gemessen. Die andere Mikroelektrode dient zusätzlich zur Strominjektion und erlaubt es, das Transmembranpotential auf einen vom Experimentator voreingestellten Wert (Haltepotential) zu verschieben und dort zu fixieren (zu klemmen). Beide Elektroden sind über einen Rückkopplungsverstärker verbunden. Wird nun unmittelbar die Membranleitfähigkeit erhöht, z.B. durch die Aktivierung Liganden gesteuerter Kanäle mittels eines entsprechenden Agonisten, würde es theoretisch über den zusätzlichen Ionenstrom zu einer Differenz zwischen Haltepotential und aktuellem Membranpotential kommen. Dies wird allerdings durch den Verstärker verhindert, der solange einen zusätzlichen Kompensationsstrom in die Zelle injiziert, bis die Kanäle wieder schließen. Der dazu erforderliche Zusatzstrom ist dabei proportional zum Ionenflux über die Zellmembran und stellt die eigentliche Messgröße dar.

Für die Entwicklung der eigentlichen Membranfleck-Klemme (*patch clamp*), erstmals beschrieben 1976 (Neher und Sakmann 1976), wurden Bert Sakmann und Erwin Neher im Jahre 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Ein wesentlicher Fortschritt zur herkömmlichen Spannungsklemme besteht darin, dass nun nur eine einzige, stumpfe, extrazelluläre, mit Elektrolytlösung gefüllte Glasmikroelektrode (*Patch Pipette*) zum Anlegen des Halte- (Klemm-) Potentials und zur zeitsynchronen Messung der Ionenströme nötig ist. Stark vereinfacht gesagt, wird dabei ein Operationsverstärker in Parallelschaltung

mit einem Rückkopplungswiderstand als Strom-Spannungswandler eingesetzt. An den beiden Eingängen des Verstärkers wird kontinuierlich diese vorgegebene Soll- (Klemm-) Spannung mit der an der *Patch* Pipette anliegenden Spannung verglichen. Entstehen durch das Öffnen von Ionenkanälen Abweichungen zwischen diesen beiden Potentialen, generiert der Ausgangspol des Operationsverstärkers eine proportionale, aber extrem verstärkte Spannung, die als Strom über den Rückkopplungswiderstand in die Pipette zurückfließt und die Spannungsdifferenz beseitigt. Wieder dient der Kompensationsstrom als eigentliche Messgröße des Ionenstromes über die Zellmembran.

Ein zweiter wesentlicher Fortschritt kommt dadurch zustande, dass die *Patch* Pipette nicht mehr eingestochen wird, sie wird zunächst der intakten Zellmembran nur vorsichtig aufgesetzt. Das Anlegen eines leichten Unterdruckes an das Pipetteninnere steigert dann den Abdichtwiderstand zwischen Pipettenglas und Lipidschicht der Zellmembran in den Gigaohm-Bereich. Dadurch wird das Hintergrundrauschen der Messungen massiv reduziert (Hamill, Marty *et al.* 1981). Die Ausbildung dieses sogenannten Gigaseals (von *seal*: Dichtung) erlaubt nicht nur die Auflösung von Einzelkanalstromamplituden im Picoampere-Bereich, sie ist auch mechanisch stabil und gewährt die Möglichkeit, durch entsprechende Manipulationen vier verschiedene Ableitungskonfigurationen herzustellen (Abbildung 3 [Hamill, Marty *et al.* 1981]). Deren wichtigste Eigenschaften seien im Folgenden kurz charakterisiert.

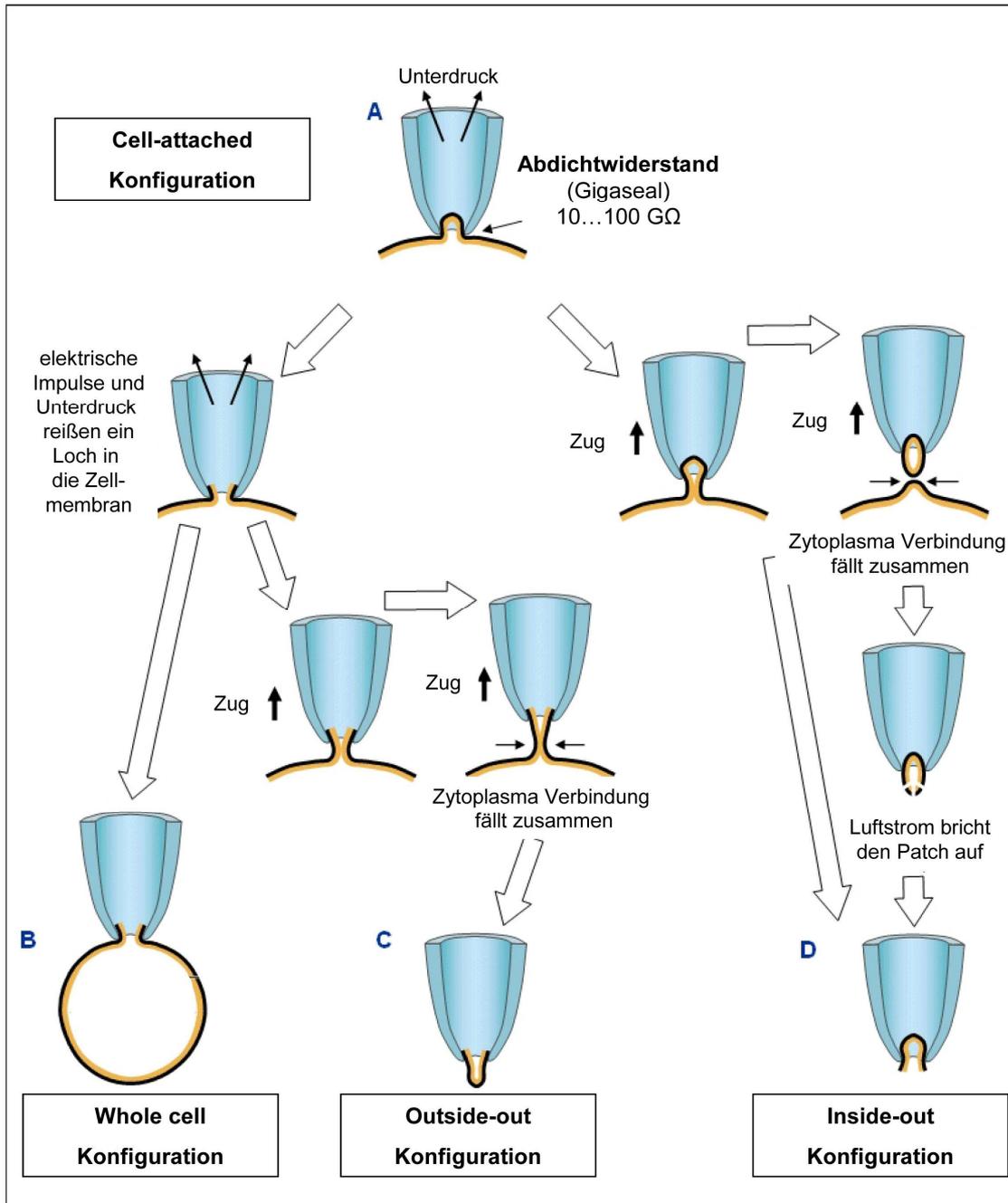


Abb. 4: Schematische Darstellung der vier verschiedenen, grundlegenden patch clamp Konfigurationen und der zu ihrer Erzielung nötigen Manipulationen (Für die Details siehe nebenstehenden Text). Abbildung modifiziert nach (Hamill, Marty *et al.* 1981; Malmivuo und Plonsey 1995).

A) *Cell-attached*: Diese Konfiguration ist der Ausgangspunkt für alle weiteren Varianten und ist mit der oben erwähnten Ausbildung eines Gigaseals bereits erreicht. Einzelkanalmessungen sind möglich. Ein Vorteil besteht darin, dass in dieser Konfiguration intrazelluläre Signalkaskaden nicht gestört sind. Ein möglicher Nachteil ist allerdings, dass die untersuchten Ionenkanäle vom Badmilieu isoliert sind; ein

Vergleich der Kanalaktivität vor und nach Zugabe eines Modulators an der gleichen Zelle ist unter Standardbedingungen nicht möglich. Ein weiterer Nachteil kommt daher, dass nur das Pipettenpotential nicht aber das Membranpotential der Zelle bekannt ist. Daher können z.B. Einzelkanalleitfähigkeiten in dieser Konfiguration nicht exakt bestimmt werden. Deren Berechnung erfordert unter anderem die Kenntnis des wahren Transmembranpotentials, welches sich wiederum aus dem voreingestellten Pipettenpotential und dem unbekanntem Zell (Membran)-Potential zusammensetzt.

- B) *Whole cell*: Diese Konfiguration wird erreicht, wenn man den Membranflecken innerhalb der *Patch* Pipettenöffnung, nach Ausbildung des Gigaseals, durch einen stärkeren Unterdruck, hochfrequente, hochamplitudige Wechsellspannung oder eine Kombination aus beidem aufreißt. In dieser Ganzzell-Konfiguration werden keine Einzelkanäle gemessen, sondern der Ensemblestrom durch alle gleichzeitig aktiven Kanäle der Zellmembran. Günstig ist, dass die Ionenkanäle nicht von der Badlösung isoliert sind und somit die Wirkung extrazellulärer Liganden einfach untersucht werden kann. Ein Nachteil mag zunächst sein, dass das intrazelluläre Milieu mit der Pipettenlösung ausgetauscht wird. Dafür ist allerdings dessen Ionenzusammensetzung bekannt und Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion, wie ATP und Guanosin-5'-Triphosphat (GTP), können ebenfalls über die *Patch* Pipette in das Zellinnere dialysiert werden.
- C) *Outside-out*: Wird nach Erreichen der *whole cell* Ableitung die *Patch* Pipette langsam von der Zelle abgezogen, löst sich ein Membranfleck (*excised patch*). Durch die Oberflächenspannung schließen sich die Außenränder. Es bildet sich ein geschlossenes Membranvesikel dessen extrazelluläre Seite zur Badlösung weist. In Abhängigkeit von der Expressionsdichte der untersuchten Kanäle sind in dieser Konfiguration prinzipiell Einzelkanalmessungen möglich.
- D) *Inside-out*: In diese Konfiguration gelangt man, indem nach der Ausbildung des Gigaseals die *Patch* Pipette relativ schnell von der Zelle abgezogen wird. Im besten Fall wird dabei ein Membranfleck aus der Zelle ausgeschnitten (*excised patch*), ohne dass sich die

Abdichtung zwischen Pipettenglas und Membran (Sealwiderstand) nennenswert verschlechtert. Oft bildet sich allerdings zunächst ein Membranvesikel. Geschieht dies kann die Patch Pipette für kurze Zeit aus der Badlösung gehoben werden. Dadurch bricht das Vesikel auf, es entsteht ein *inside-out patch*, die zytoplasmatische Seite der Membran ist der Badlösung zugewendet, Einzelkanalmessungen sind möglich. Diese Konfiguration bietet folglich Vorteile für die Untersuchung möglicher Einflüsse von intrazellulären Liganden wie „*second messenger*“ Molekülen auf die Kanalaktivität. Für extrazelluläre Modulatoren gelten die gleichen Einschränkungen wie für den *cell-attached* Modus.

3.2.1 Mögliche Fehlerquellen

Für diese Arbeit wurde ausschließlich die *whole cell* Konfiguration benutzt. Zwei wesentliche Fehlerquellen, der Serienwiderstand (R_s) und „*space clamp*“ Probleme, sind bei dieser Untersuchungsanordnung zu beachten.

Die *whole-cell* Technik geht eigentlich davon aus, dass an der *Patch* Pipette und der zu untersuchenden Zelle ein identisches Potential anliegt, bestimmt durch den Betrag des jeweils injizierten Stromes. Allerdings sind dabei die elektrischen Widerstände von Pipette und Membran in Serie geschaltet, der injizierte Strom muss über beide zur Bad-Erde abfließen um den Stromkreis zu schließen. Es liegt also ein Spannungsteiler vor (Sontheimer H und Olsen ML, *whole cell patch-clamp recordings*, in [Walz 2007]). Gesetzt den hypothetischen Fall, der Experimentator verschiebt, durch Strominjektion, das Potential der untersuchten Zelle um 100 mV vom Ruhemembranpotential und Pipetten- und Membranwiderstand seien gleich, dann würde der R_s induzierte Fehler im Haltepotential tatsächlich 50 mV betragen. Allerdings sind die Verhältnisse unter experimentellen Bedingungen günstiger, der Widerstand der Zellemembran liegt um einiges über dem der *Patch* Pipette, wodurch der Fehler verkleinert wird. Unter Kenntnis des Serienwiderstandes (abgelesen von den Kompensationseinstellungen des *patch clamp* Verstärkers; siehe auch 3.4 Präparation und allgemeine Versuchsdurchführung) und dem Betrag

des gemessenen Stromes lässt sich mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes (Spannung = Strom x Widerstand) eine Fehlerschätzung durchführen. In der vorliegenden Arbeit war R_s $15.8 \pm 0,1 \text{ M}\Omega$ ($n = 491$). Die maximale Amplitude z.B. der glutamatergen EPSC's betrug etwa 500 pA. Die Obergrenze des R_s bedingten Fehlers im Zellpotential lag in diesem Fall also bei etwa 8.5 mV. Es ist zusätzlich zu beachten, dass sich R_s über die Zeit erhöhen kann, der R_s induzierte Fehler im Membranpotential steigt damit an. Eine häufige Ursache hierfür ist der partielle Wiederverschluss der Zellmembran in der Öffnung der Patch Pipette (*Membrane healing* [Walz 2007]). Daher wurden alle MSN's, bei denen sich der Serienwiderstand über die Dauer des Experimentes um mehr als 15% veränderte, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Die Patch Pipette ist eine punktuelle Stromquelle. Der in die Zelle injizierte Strom breitet sich radial von der Injektionsstelle aus und fällt über die Distanz ab. Dies stellt vor allem dann ein Problem dar, wenn wie im vorliegenden Versuchsaufbau von geometrisch komplexen Neuronen mit einem verästelten Dendritenbaum abgeleitet wird. Im schlimmsten Falle unterliegen dadurch distale Membrananteile keinerlei Spannungskontrolle (Walz 2007). Das Auftreten von Aktionspotentialen (erkennbar an repetitiven, spiegelbildlichen Aktionsströmen) nach elektrischer Feldreizung oder Applikation von ionotropen Glutamat-Rezeptor-Agonisten wurde in der vorliegenden Arbeit als Hinweis für schwerwiegende „*space clamp*“ Probleme gewertet. Auch die Ableitungen von MSN's, bei denen solche Aktionsströme beobachtet wurden, waren von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

3.3 Messplatzaufbau

Die Komponenten des *patch clamp* Messplatzes und der Präparier-Arbeitsplatz sind in Abb. 5 dargestellt. Im Zentrum des Patch Messtandes befindet sich ein aufrechtes Mikroskop [1] (Axioskop; Zeiss, Jena, Deutschland), ausgerüstet mit Normarski Differentialkontrast Optik, auf einem schwingungsgedämpften Tisch [2] (TMC, Peabidy, USA). [3] zeigt ein gepatchtes MSN, fotografiert durch das 40-fach Wasserimmersionsobjektiv des Axioskops. Die Badkammer ist auf dem Bild nicht zu erkennen. Das Mikroskop wird flankiert von zwei motorisierten Mikromanipulatoren (LN-SM1;

Lugis & Neumann, Ratingen, Deutschland). Der rechte Mikromanipulator [4] trägt den *Patch* Pipettenhalter der mit einem Vorverstärker verbunden ist. Am linken Mikromanipulator [5] ist wahlweise eine Reizelektrode zur elektrischen Feldstimulation, wie im gezeigten Fall, oder die Auslasskanüle eines lokalen Substanzsuperfusionssystems befestigt. Zur elektrischen Abschirmung ist der Messplatz mit einem Faraday-Käfig abgeschirmt [6].

Weitere Komponenten befinden sich in einem separaten Geräteturm. Dazu gehören die Steuereinheit für die Mikromanipulatoren [7] (Lugis & Neumann), ein digitaler Stimulator [8] (S-98 Multimode; Medical Systems Corp., Greenvale, New York, USA) der die Impulse zur Feldstimulation liefert, sowie der *patch clamp* Endverstärker [9] (EPC 7; List Medical, Darmstadt, Deutschland). Das ebenfalls gezeigte Oszilloskop [10] (Hameg GmbH; Frankfurt, Deutschland) diente zur kontinuierlichen Überwachung des Verstärkersignals während der Versuche. Gleichzeitig wurde dieses nach Filterung bei 1 kHz [11] (Model 902, Frequency Devices Inc., Ottawa, Kanada) mit Hilfe eines Analog-Digitalwandlers [nicht gezeigt] (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, GB) bei einer Sammelfrequenz von 3 kHz digitalisiert und auf einem üblichen Laborcomputer gespeichert. Zur späteren Auswertung diente die *patch* und *voltage clamp* Software der Firma Cambridge Electronic Design. [12] zeigt die Ventilbank des Substanzapplikationssystems das zur Messung von NMDA- und AMPA-evozierten Strömen verwendet wurde. Die Ansteuerung der Ventile erfolgte über einen separaten Computer [nicht gezeigt]. Zeitpunkt und Dauer der Ventilöffnungen, sowie der applizierte Ejektionsdruck waren separat programmierbar.

Zur Präparation der striatalen Hirnschnitte diente ein Vibratom der Firma TPI [13] (Technical Products International Inc., St. Louis, USA). Vor Verwendung wurden diese in einer beheizbaren (M3 Lauda Thermostat, Lauda Dr. R. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) Inkubationskammer aufbewahrt [14].

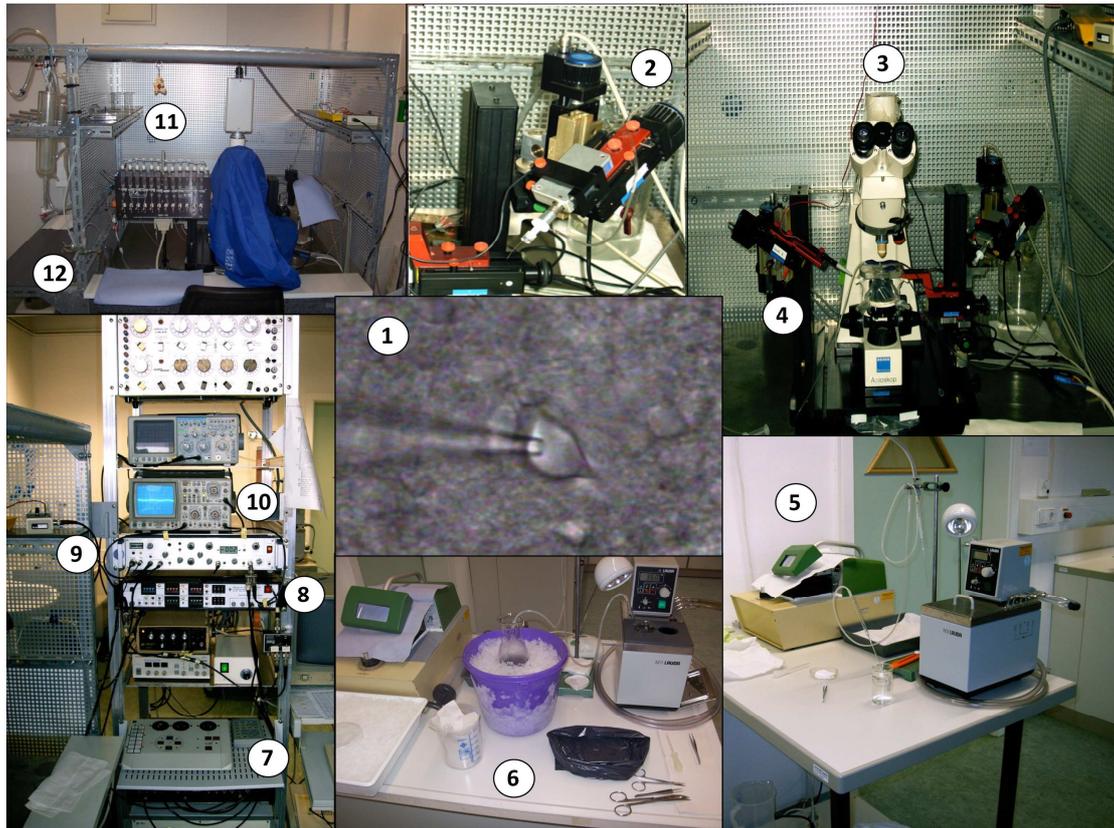


Abb. 5: Messplatzaufbau:

[1] aufrechtes Mikroskop; [2] schwingungsgedämpfter Tisch; [3] MSN gepatcht; [4] Mikromanipulator mit *Patch* Pipettenhalterung; [5] Mikromanipulator mit Reizelektrode; [6] Faraday-Käfig; [7] Steuereinheit für Mikromanipulatoren; [8] digitaler Stimulator; [9] *patch clamp* Endverstärker; [10] Oszilloskop; [11] Frequenzfilter; [12] Ventilbank des Substanzapplikationssystem; [13] Vibratom; [14] Inkubationskammer.

3.4 Präparation und allgemeine Versuchsdurchführung

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Versuche wurden unter strenger Einhaltung der Tierversuchsrichtlinien der Universität Leipzig, des Landes Sachsens und der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Von 12-16 Tage alten Wistar-Ratten wurde zu Versuchsbeginn, nach Dekapitation, das Gehirn entnommen und für fünf Minuten mittels kalter artifizierender zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) heruntergekühlt (Nörenberg *et al.* 1997). Nach der Kühlungsphase wurde das Gehirn mit seiner dorsalen Oberfläche auf einem eisgekühlten, mit Filterpapier bedeckten und mit ACSF-befeuchteten Petrischalendeckel platziert. Durch zwei transversale Schnitte mit einer Rasierklinge, einer posterior des Bulbus olfactorius, der zweite auf Höhe des Chiasma opticum, wurde ein Gewebekblock des Vorderhirns angefertigt und anschließend auf seine anteriore Schnittfläche gedreht. Mit

zwei weiteren horizontalen Schnitten wurde dieser begradigt und durch einen Vertikalschnitt in zwei Hälften geteilt (Abb. 6). Mit Hilfe eines Vibratoms wurden dann aus dem verbleibenden Gewebeblock 200 µm dicke Schnitte der Zielregion angefertigt.

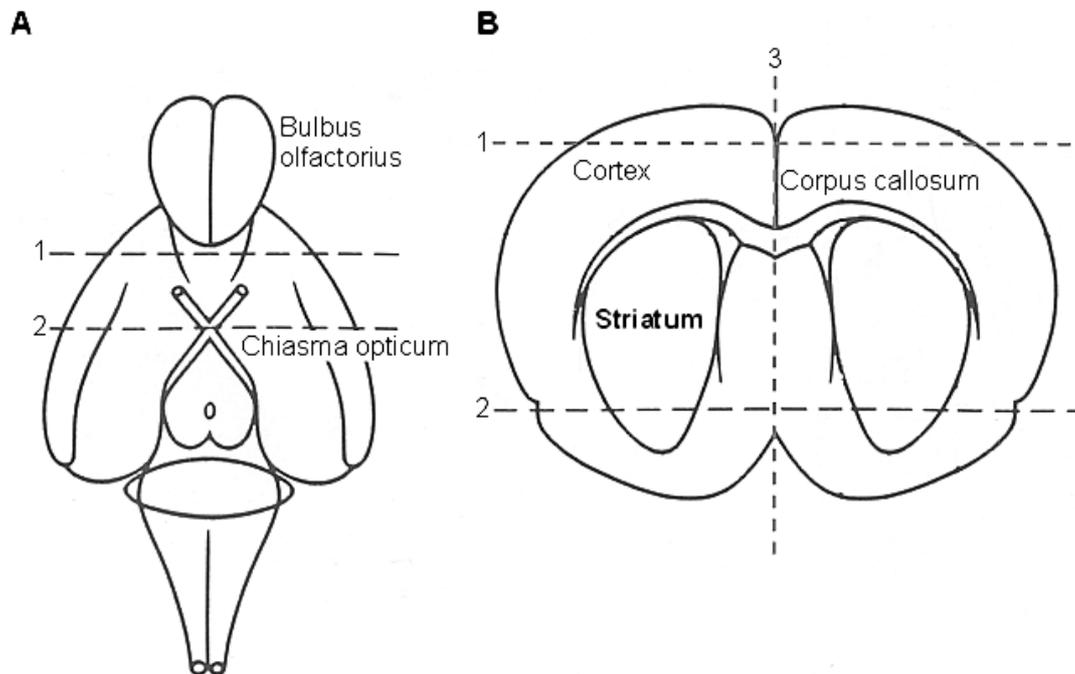


Abb. 6: Schnittführung zur Isolation des Corpus striatum aus dem Rattenhirn. **A:** Aufsicht auf die ventrale Fläche des Rattenhirns. Gezeigt sind die zwei Schnittebenen (1, 2) die zur initialen Isolierung des Vorderhirns mitsamt des Striatums benutzt wurden. **B:** Zeigt die in **A** hergestellte Gewebescheibe. Die Positionen horizontaler (1, 2) und vertikaler (3) Schnitte zur Herstellung des Gewebeblocks, aus dem dann mittels eines Vibratoms die striatalen Hirnschnitte angefertigt wurden, sind eingezeichnet (modifiziert nach Robertson T, Zimmer J, Gähwiler BH, Dissection procedures for preparation of slice cultures pp 1-15 in [Shahar 1993]).

In einer Aufbewahrungskammer (siehe Abb. 7) wurden sämtliche Schnitte (4 - 6 pro Präparation) für eine Stunde in Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster ACSF (126 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 2,4 mM CaCl₂; 1,3 mM MgCl₂; 26 mM NaHCO₃; 11 mM Glukose) bei 37°C inkubiert, danach wurde die Heizung abgestellt. Bei Raumtemperatur blieben die Präparate hier über den ganzen Versuchstag vital. Für das eigentliche Experiment wurden die Hirnschnitte mit einer Pasteurpipette behutsam entnommen und in eine Ableitungskammer überführt. Zur mechanischen Fixierung des Schnittes diente dabei ein U-förmig gebogener Platindraht über den in ca. 200 µm Abständen Nylonfäden gespannt waren. Die Ableitkammer (300 – 400 µl Volumen) wurde dann auf den Mikroskoptisch transferiert und bei einer

Flussrate von zirka 3 ml pro Minute kontinuierlich mit lauwarmer ACSF-Lösung superfundiert.

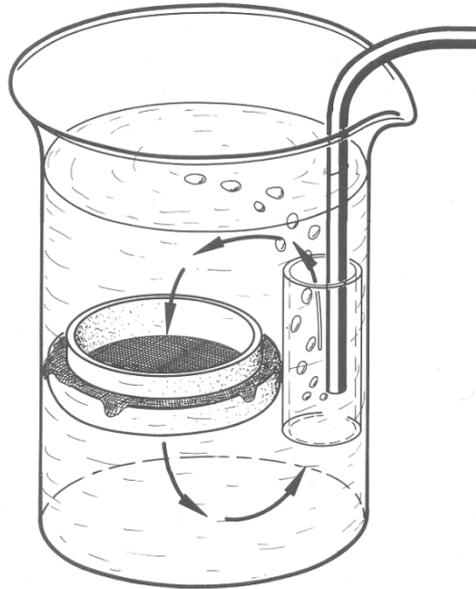


Abb. 7: Inkubationskammer zur Aufbewahrung von Hirnschnitten. Die eigentliche Haltekammer, in welche die Hirnschnitte eingebracht werden, besteht aus einem Kunststoffring bespannt mit einem Nylonnetz. Mit Hilfe eines starren Plastikschlauches wird die Haltekammer auf etwa halber Höhe eines herkömmlichen, mit ACSF gefüllten 100 ml Becherglas fixiert. In den Plastikschlauch wird dann ein Glasröhrchen zur Begasung mit Carbogen eingeführt. Durch die Blasenbildung entsteht ein Kreislauf frisch oxygenierter Lösung über die Schnitte, die unter diesen Bedingungen über mehr als 8 Stunden für die Experimente verwendbar blieben (entnommen aus: [Edwards und Konnerth 1992]).

Mit Hilfe eines Drei-Wege-Hahn-Systems und mehrerer Superfusionsbehälter konnten verschiedene Substanzen über den Schnitt appliziert werden.

Nach Ziehen einer *Patch* Pipette aus Borosilikatglas-Kapillaren (Außendurchmesser 2 mm; Wandstärke 0,3 mm; Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) auf einem Pipettenziehgerät (L/N-3-PA, List Medical), wurde diese mit einer kleinen Kanüle, luftleer, mit der Pipettenlösung befüllt. Diese Pipettenlösung enthielt in mM: Kalium-Glukonat 140, NaCl 10, $MgCl_2$ 1, HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2-Ethansulphonsäure]) 10, EGTA (Ethylenglykol-bis-[2-Aminoethylether]-N,N,N',N'-Tetraacetat-Säure) 11,

MgATP (Magnesium-Adenosin-5'-Triphosphat) 1,5 und GTP (Guanosin-5'-Triphosphat) 0,3. Der pH wurde mit Kaliumhydroxid auf 7,3 eingestellt. Die nun befüllte Pipette wurde in einen Pipettenhalter, der den eigentlichen Signalaufnehmer, einen chlorierten Silberdraht enthielt, eingespannt und dann mittels Mikromanipulator und unter Zuhilfenahme eines 40-fach-Immersionsobjektives an die Zelle herangeführt.

Vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde ein leicht positiver Druck an selbige angelegt, um ein Verstopfen der Pipettenspitze während der Passage durch das Bad und das Hirnschnittgewebe zu vermeiden. Nach dem Eintauchen wurde zunächst der Pipettenstrom durch die Abgleich-Kompensation des Verstärkers auf „0“ gestellt. Gleichzeitig wurde ein kleiner, repetitiver Rechteckspannungspuls (5 mV Amplitude, 10 ms Dauer, 100 Hz Frequenz) an die Pipette angelegt, um kontinuierlich deren Widerstand am Oszilloskop überwachen zu können. Der Kontakt mit der Zellmembran eines MSN zeigte sich dann durch eine diskrete, unter Differentialkontrast sichtbare, Eindellung, sowie durch eine etwa 10 - 20%ige Erhöhung des Pipettenwiderstandes. Nach Ablassen des positiven Drucks erhöhte sich letzterer weiter und in einigen Zellen kam es dabei spontan zur Ausbildung eines Gigaseals. War dies nicht der Fall wurde durch vorsichtiges Ansaugen der Zellmembran die Sealbildung unterstützt. Die Stromkurve auf dem Oszilloskop verlief, jetzt mit Ausnahme zweier kapazitiver Artefakte, flach. Letztere reflektierten im Wesentlichen die Lade- und Entladeströme des aus Pipettenglas und den extra- und intrazellulären Elektrolytlösungen gebildeten Kondensators.

Nach elektronischer Abgleichung dieser schnellen kapazitiven Ströme mittels der *C-fast* Einstellung am *Patch* Verstärker wurde das Haltepotential eingestellt, dieses betrug in allen Versuchen -61 mV. Bedingt durch die stark unterschiedlichen Mobilitätskoeffizienten, vor allem der in der Bad (Chlorid; $u = 1,04$)- und Pipettenlösung (Gluconat; $u = 0,33$) enthaltenen Anionen, war dabei ein Diffusionspotential (*liquid junction potential*) zu beachten.

Dieses betrug, berechnet nach (Barry 1994), 14 mV. Nach der Beziehung:

$$V_m = V_p - V_L$$

(V_m , Membranpotential der Zelle; V_p , eingestelltes Pipetten (Halte)- potential;
 V_L , *Liquid junction potential*; [Barry 1994]),

wurde am Verstärker folglich ein Klemmpotential von -47 mV eingestellt. Im Anschluss wurde der *cell-attached patch* in die *whole-cell* Konfiguration überführt. Erkennlich war dies auf dem Oszilloskop durch das erneute Auftreten relativ großer und breiter kapazitiver Ströme, diese waren bedingt durch die Ladevorgänge des Zellmembrankondensators (siehe Abb. 8). Auch diese wurden mit Hilfe der elektronischen Schaltung des *Patch* Verstärkers manuell soweit abgeglichen (*C-slow* und Serienwiderstand [R_s] Einstellung des Verstärkers), bis auf dem Oszilloskop wieder eine weitgehend flache Stromkurve zu beobachten war (Abb. 8). Dieser Abgleich lieferte zudem nützliche Informationen. Die Membrankapazität ist proportional zur geklemmten Membranoberfläche des untersuchten Neurons, 1 pF Kapazität entspricht dabei etwa $100 \mu\text{m}^2$ Membranareal. Die ermittelten Werte für R_s dienten, wie unter 3.2.1 erläutert, zur Messfehlerabschätzung und als Parameter der Stabilität der Ableitqualität über die Zeit.

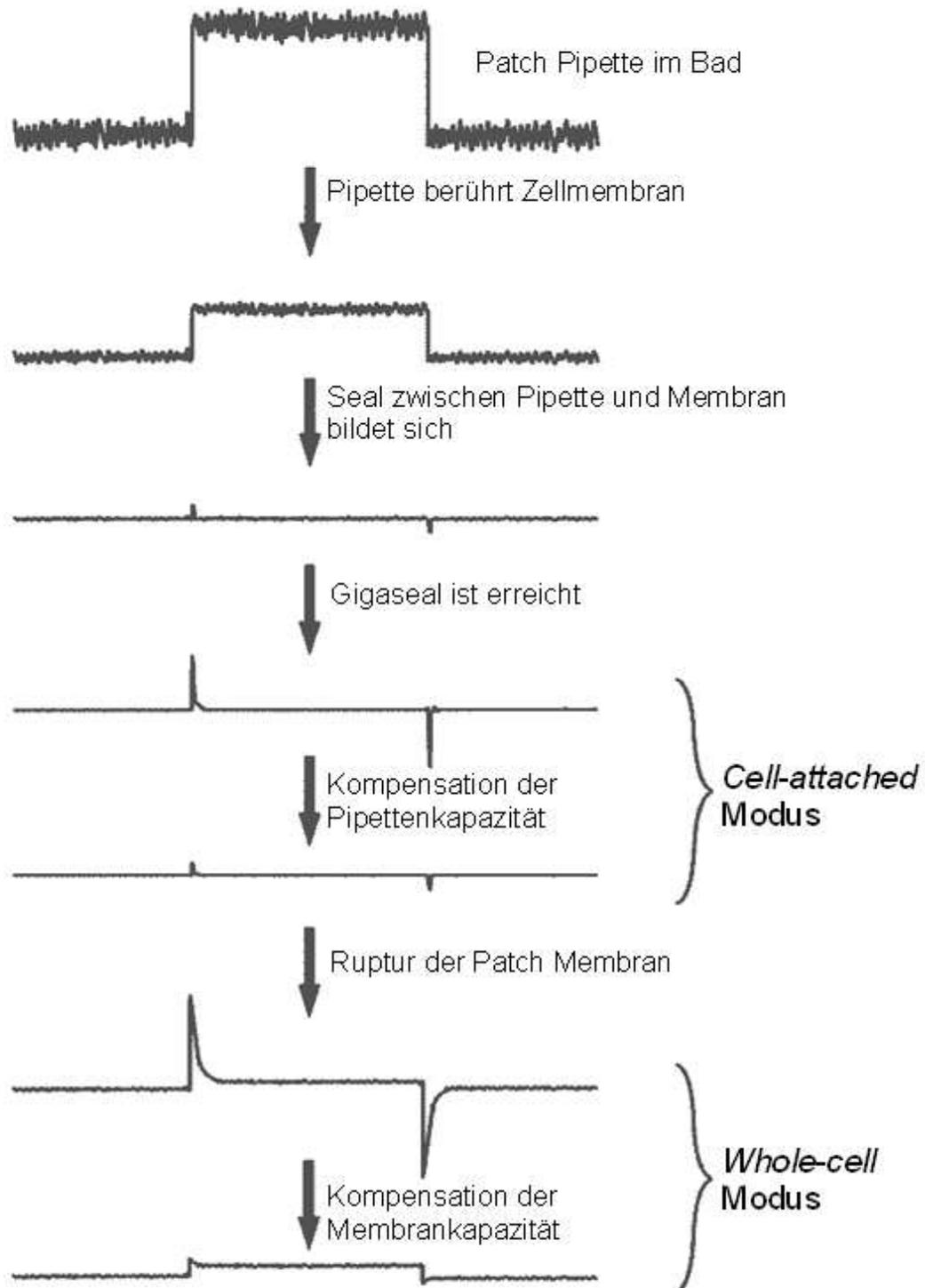


Abb. 8: Typische Stromantworten, induziert durch Rechteck-Spannungssprünge, wie sie auf dem Oszilloskop-Monitor während der Herstellung der *whole-cell patch clamp* Ableitungskonfiguration beobachtet werden können (für Details siehe den obenstehenden Text; modifiziert nach Akita T, Ohara M *et al.* Patch-clamp techniques: general remarks, in [Okada]).

3.5 Identifizierung der striatalen GABAergen Projektionsneurone („*medium spiny neurons*“)

Wie in der Einleitung unter Punkt 1.1. bereits ausgeführt, findet sich im Striatum eine heterogene neuronale Zellpopulation, die sich aus GABAergen Projektionsneuronen („*medium spiny neurons*“, MSN's) und cholinergen sowie GABAergen Interneuronen zusammensetzt. Der „richtige“ neuronale Zelltyp wurde mit Hilfe kombinierter morphologischer und elektrophysiologischer Kriterien ausgewählt. Dazu wurde vor Beginn der eigentlichen Experimente der längere somatische Durchmesser der Zellen unter der Differentialkontrastoptik des Mikroskops bestimmt. Zusätzlich wurde das Membranpotential der Zellen unmittelbar nach Herstellung des *whole-cell* Zuganges gemessen. Dazu wurde der Verstärker kurzzeitig vom „*voltage clamp*“ in den „*current clamp*“ Betrieb umgeschaltet. Bei letzterem wird im Gegensatz zur Spannungsklemme, der Strom über die Membran fest voreingestellt während das Membranpotential freigegeben wird. Wird der Strom auf „0“ fixiert und die Messung direkt nach Ruptur der Zellmembran durchgeführt, d.h. bevor es zu einem vollständigen Austausch der Ladungsträger zwischen Zytoplasma und Pipettenlösung gekommen ist, lässt sich so ein zuverlässiger Schätzwert für das Ruhemembranpotential des untersuchten Neurons gewinnen (Yawo 2012).

Die in die weitere Auswertung aufgenommenen Neurone besaßen einen relativ kleinen Zellkörper (Durchmesser von $14,9 \pm 0,03 \mu\text{m}$) und ein stark hyperpolarisiertes Ruhemembranpotential von $(-78,3 \pm 0,6 \text{ mV}; n = 504)$. Diese Werte ähnelten in ihrer Kombination stark den Daten, die aus der Literatur für die MSN's bereits bekannt waren (Durchmesser 12 - 25 μm , Membranpotential ca. -80 mV), unterschieden sich aber deutlich von den entsprechenden Parametern cholinerg (20 - 61 μm , ca. -60 mV) und GABAerger Interneurone mit PLTS (*persistent and low threshold spiking*) Aktionspotential-Feuerungsmuster (12 - 35 μm , ca. -56 mV; [Kawaguchi 1993; Kawaguchi, Wilson *et al.* 1995; Scheibler, Pesic *et al.* 2004; Tepper und Bolam 2004]). Schnell feuernde („*fast spiking*“, FS) und Parvalbumin positive GABA-Interneurone besitzen allerdings ebenfalls ein relativ kleines Soma (16 - 18 μm) und ein stark negatives Membranpotential (ca. -80 mV; [Kawaguchi

1993; Kawaguchi, Wilson *et al.* 1995; Tepper und Bolam 2004]). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass in den Versuchen weitgehend nur EPSC's von „*medium spiny*“ Neuronen abgeleitet wurden. Gerechtfertigt wird diese Annahme durch die relativen Anteile der beiden Neuronentypen an der striatalen neuronalen Gesamtpopulation (MSN > 95%, FS Neurone ca. 0,7%; [Tepper und Bolam 2004]).

3.6 Elektrische Stimulation, Substanzapplikation und Auswertung

Ein Vorteil der striatalen Hirnschnittpräparation ist es, dass die Integration der untersuchten Neurone in den Zellverband weitgehend erhalten bleibt. MSN's erhalten den überwiegenden Teil ihrer glutamatergen Innervation durch corticostriatale Afferenzen, welche mit den Dornen („*spines*“) auf den Dendriten dieser Zellen Synapsen bilden (Graybiel 1990). Fokale elektrische Feldstimulation depolarisiert im Hirnschnitt die betroffenen Axonendigungen und löst so eine Transmitterfreisetzung aus. Tatsächlich führt sowohl die elektrische Reizung des Cortex, als auch die des Striatums, vermittelt über glutamaterge Synapsen, zur Auslösung exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSC's) in den MSN's (Calabresi, Centonze *et al.* 2000).

Die EPSC's können nach einer intrastriatalen Reizung allerdings mit einer GABAergen Komponente kontaminiert sein (Jiang und North 1991; Wirkner, Gerevich *et al.* 2004). Neostriatale Quellen für den Transmitter γ -Aminobuttersäure sind die GABAergen Interneurone (Kawaguchi, Wilson *et al.* 1995), Afferenzen aus anderen Anteilen der Basalganglien wie Globus pallidus pars externa (GPE) und Substantia nigra pars reticularis (SNr) (Kita 1993) und schließlich ein extensives Netzwerk von Axonkollateralen der MSN's selbst (Park, Lighthall *et al.* 1980; Kita 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden synaptische Ströme durch rechteckige elektrische Impulse (0,1 ms Dauer; 0,1 Hz Frequenz) mittels einer bipolaren Wolfram-Elektrode, die zirka 200 - 400 μm entfernt vom untersuchten Neuron innerhalb des Striatums in den Hirnschnitt eingestochen wurde, ausgelöst. Um einer Erschöpfung („*rundown*“) der Transmitterfreisetzung

entgegenzuwirken, war die Stimulationsstärke (20 - 100 mV) so gewählt, dass lediglich EPSC's von halbmaximaler Amplitude hervorgerufen wurden.

Das Haltepotential wurde dabei so eingestellt, dass es dem Chlorid-Gleichgewichtspotential (E_{Cl}) entsprach. Letzteres wurde mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet:

$$E_{Cl} = (R \times T \div F) \times \ln [Cl]_i \div [Cl]_e,$$

wobei R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur in Kelvin, F die Faraday-Konstante und $[Cl]_i$ sowie $[Cl]_e$ die Chloridkonzentrationen in der Pipettenlösung (12 mM) bzw. in der Badlösung (133,3 mM) bezeichneten. Der numerische Wert für $(R \times T \div F)$ bei 23°C war 25,52 mV; $\ln [Cl]_i \div [Cl]_e$ war -2,4. Es ergab sich also ein Wert für E_{Cl} von -61 mV. An diesem Haltepotential sollte kein Nettostrom von Chlorid durch Chlorid-permeable Kanäle nachweisbar sein. Mit anderen Worten, die mögliche Verfälschung der glutamatergen EPSC's durch Wirkung von gleichzeitig freigesetztem GABA an Liganden gesteuerten Chloridkanälen vom $GABA_A$ -Rezeptor-Typ (Jiang und North 1991) sollte, wenn überhaupt vorhanden, vernachlässigbar klein sein.

Substanzen, deren Wirkungen auf die synaptischen Ströme hin untersucht werden sollten, wurden mit Hilfe von Drei-Wege-Hähnen aus unterschiedlichen Carbogen begasten Vorratsgefäßen über die Hirnschnitte superfundiert. Bei der Flussrate von 3 ml pro Minute dauerte es ungefähr 30 Sekunden bis die Testsubstanzen die Ableitkammer erreichten.

Die Wirkungen von Tetrodotoxin (TTX), von Antagonisten an ionotropen Glutamat- und $GABA_A$ -Rezeptoren, wie auch die von Magnesium und einer nominellen Calcium-freien Badlösung wurden ausgewertet, indem die mittlere Amplitude einer Folge von 6 EPSC's, ausgelöst mit einer Frequenz von 0,1 Hz unmittelbar vor Beginn der Applikation, mit der mittleren Amplitude einer weiteren Folge von 6 EPSC's, ausgelöst 10 Minuten nach dem Beginn der Testsubstanz-Superfusion, verglichen wurde.

Die Effekte von ATP und Adenosin auf die synaptischen Ströme wurden hingegen bestimmt, indem die mittleren Amplituden der ersten sechs

Reizantworten in Abwesenheit der Purinozeptor-Agonisten mit den sechs Reizantworten nach 5 Minuten Exposition gegen diese Substanzen verglichen wurden.

In Interaktionsexperimenten mit Purinozeptor- oder Glutamat-Rezeptor-Antagonisten, wurden diese 35 min vor dem eigentlichen Beginn der Experimente eingewaschen, dann wurde eine Folge von 6 EPSC's ausgelöst, bevor Purinozeptor-Agonisten wie ATP oder Adenosin für zusätzlich 4 Minuten in fortgesetzter Anwesenheit der Antagonisten der Superfusionslösung zugesetzt wurden. Wieder wurde die mittlere Amplitude der 6 EPSC's vor und nach Agonisten-Applikation miteinander verglichen.

Die Wirkungen von ATP und Adenosin auf die EPSC-Amplitude der striatalen MSN's wurde zusätzlich auch während kontinuierlicher elektrischer Feldstimulation bei 0,1 Hz über 12 min untersucht.

Eine zweite Ausnahme vom Standardprotokoll bildet die Untersuchung von möglichen Eigeneffekten der verwendeten P1- und P2-Rezeptor-Antagonisten. Hier wurden Folgen von 6 EPSC's bei 0,1 Hz aller 5 Minuten über einen Zeitraum von 45 Minuten ausgelöst. Die Antagonisten wurden nach der ersten Pulsfolge superfundiert und waren für insgesamt 30 Minuten im Bad anwesend. Danach erfolgte eine 15 minütige Auswaschperiode mit Wirksubstanz-freier ACSF. Die Daten aus diesen Experimenten wurden auf die mittlere EPSC-Amplitude der ersten Reizfolge in Abwesenheit der Antagonisten normalisiert.

In abschließenden Experimenten wurden die ionotropen Glutamat-Rezeptor-Agonisten NMDA oder AMPA, gelöst in ACSF, mit Hilfe eines Druckapplikationssystems (DAD-12) fokal für 1 - 2 Sekunden auf das untersuchte MSN appliziert (80 - 90 mmHg Druck). Die Intervalle (200 s) zwischen den repetitiven Stimulationen während eines Experimentes waren so gewählt, dass reproduzierbare Stromamplituden ausgelöst werden konnten. Insgesamt wurden NMDA oder AMPA induzierte Ströme 8 bis 12 Mal an einem einzelnen MSN ausgelöst. ($T_1 - T_8$ oder T_{12}). Die erste Stromantwort einer Serie (T_1) war in der Regel unverhältnismäßig groß und wurde daher verworfen. Die Wirkungen von z.B. Purinozeptor-Agonisten auf die NMDA oder AMPA induzierten Ströme wurden evaluiert, indem diese, nachdem die ersten drei Antworten auf NMDA oder AMPA ausgelöst worden

waren, dem Superfusionsmedium zugesetzt wurden (für 600 s T_4 und T_6). Die Stromamplituden wurden dann mit Bezug auf die gemittelten Antworten an T_2 und T_3 aufgezeichnet, vor Applikation der Purinozeptor-Agonisten normalisiert und die Substanzeffekte als prozentuale Veränderung des Mittelwertes der Stromamplituden an T_4 und T_5 angegeben.

3.7 Statistische Auswertung

Alle im Folgenden angeführten Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes aus n Experimenten angegeben, wobei n die Anzahl der in einer experimentellen Gruppe jeweils untersuchten MSN's bezeichnet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Software Packet SigmaPlot (Version 11.0; Jandel Scientific, San Jose, CA, USA). Nach Testung auf Normalverteilung der Daten (Kolmogorov-Smirnov-Test) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse nach signifikanten Unterschieden in den Mittelwerten der jeweiligen Versuchsgruppenpopulation gesucht. Ein anschließender Holm-Sidak-Test diente dann zur Identifizierung derjenigen Versuchsgruppen zwischen denen die Unterschiede bestanden. Ein Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ wurde dabei als Hinweis auf einen statistisch signifikanten Unterschied gewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorversuche I: Der Beitrag von NMDA (GluN)-, AMPA (GluA)- und GABA_A-Rezeptoren zu exzitatorischen postsynaptischen Strömen in striatalen „*medium spiny*“ Neuronen der Ratte

Mit dieser ersten Versuchsserie wurden zunächst die Eigenschaften der postsynaptischen Ströme in den MSN's unter den, für die vorliegende Arbeit gewählten, experimentellen Bedingungen untersucht. In einer Mg²⁺-freien Badlösung löste die intrastriatale fokale Elektrostimulation (Pulse von 0,1 ms Dauer und halbmaximaler Reizstärke) am Haltepotential von -61 mV EPSC's mit einer einwärtsgerichteten mittleren Amplitude von $-472,9 \pm 15,3$ pA aus ($n = 350$). Diese wurden in Anwesenheit von dl-2-Amino-5-Phosphopentanoensäure (DL-AP-5; 50 μ M), einem kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten (Watkins und Evans 1981), oder in Anwesenheit von 1,2,3,4-Tetrahydro-5-Nitro-2,3-Dioxo-Benzol[f]Quinoxalin-7-Sulfonamid (NBQX; 10 μ M), einem kompetitiven AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonisten (Lees und Leong 1993), annähernd halbiert (Hemmung um $46,9 \pm 4,1\%$ und $40,9 \pm 6,6\%$; $n = 7$ für beide Gruppen). Eine Kombination aus DL-AP-5 (50 μ M) und NBQX (10 μ M) hemmte die EPSC's dann fast vollständig (Hemmung um $94,8 \pm 1,9\%$, $n = 7$; Abb. 9, A a – A d, B). Extrazelluläres Mg²⁺ (1,3 mM), welches (an negativen Membranpotentialen) die Pore der NMDA-Rezeptoren blockiert (Monyer, Burnashev *et al.* 1994), reduzierte die EPSC-Amplitude ebenfalls um etwa die Hälfte (Hemmung um $43,4 \pm 5,9\%$; $n = 8$; Abb. 9, B), während Tetrodotoxin (TTX; 0,3 μ M), ein Hemmstoff spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle (Kao 1986) zu deren fast vollständiger Aufhebung führte ($98,6 \pm 1,4\%$ Hemmung; $n = 5$; Abb. 9, B). Superfusion mit einer nominell Ca²⁺-freien ACSF, eine Bedingung unter der die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration im Hirnschnitt und damit die Bereitstellung des divalenten Kations als Trigger der exozytotischen Transmitterfreisetzung (Wojcik und Brose 2007) stark absinken sollte, hemmte die mittlere EPSC-Amplitude um $77,6 \pm 5,3\%$ ($n = 5$; Abb. 9, B). Interessant war zudem, dass der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin (Curtis, Duggan *et al.* 1970; Sieghart 1989) keine signifikante

Wirkung auf die EPSC-Amplitude ausübte ($-0,8 \pm 6,6\%$ Hemmung; $n = 7$; Abb. 9, B).

In ihrer Gesamtheit zeigten diese ersten, exploratorischen Versuche eindeutig, dass die, in Antwort auf eine intrastriatale elektrische Feldstimulation, in MSN's gemessenen Ströme tatsächlich durch eine Aktionspotential ausgelöste (TTX) Exozytose (Ca^{2+} -Entzug) des Neurotransmitters Glutamat (DL-AP-5, NBQX) verursacht wurden. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Mg^{2+} -freie Badlösung, Haltepotential von -61 mV) wurden die EPSC's durch eine Kombination von NMDA (GluN)- (Wirkungen von extrazellulärem Mg^{2+} , DL-AP-5) und, da ionotrope Glutamat-Rezeptoren vom Kainat-Typ (GluK); (Collingridge, Olsen *et al.* 2009) in MSN's funktionell bisher nicht eindeutig nachweisbar waren (Stefani, Chen *et al.* 1998), hoch wahrscheinlich AMPA (GluA)-Rezeptoren (NBQX) vermittelt. Ein Beitrag GABA_A -Rezeptor vermittelter Cl^- -Ströme (siehe [Jiang und North 1991; Wirkner, Gerevich *et al.* 2004]) konnte hingegen ausgeschlossen werden (fehlende Wirkung von Bicucullin). Daraus ließ sich zusätzlich ableiten, dass die Qualität der Spannungsklemme in den MSN's gut genug war, um das Zellpotential dem Cl^- -Gleichgewichtspotential ausreichend anzunähern (für mögliche Fehlerquellen siehe 3.2.1). Alle nachfolgenden Versuche wurden daher an einem Haltepotential von -61 mV und in Mg^{2+} -freier Badlösung durchgeführt.

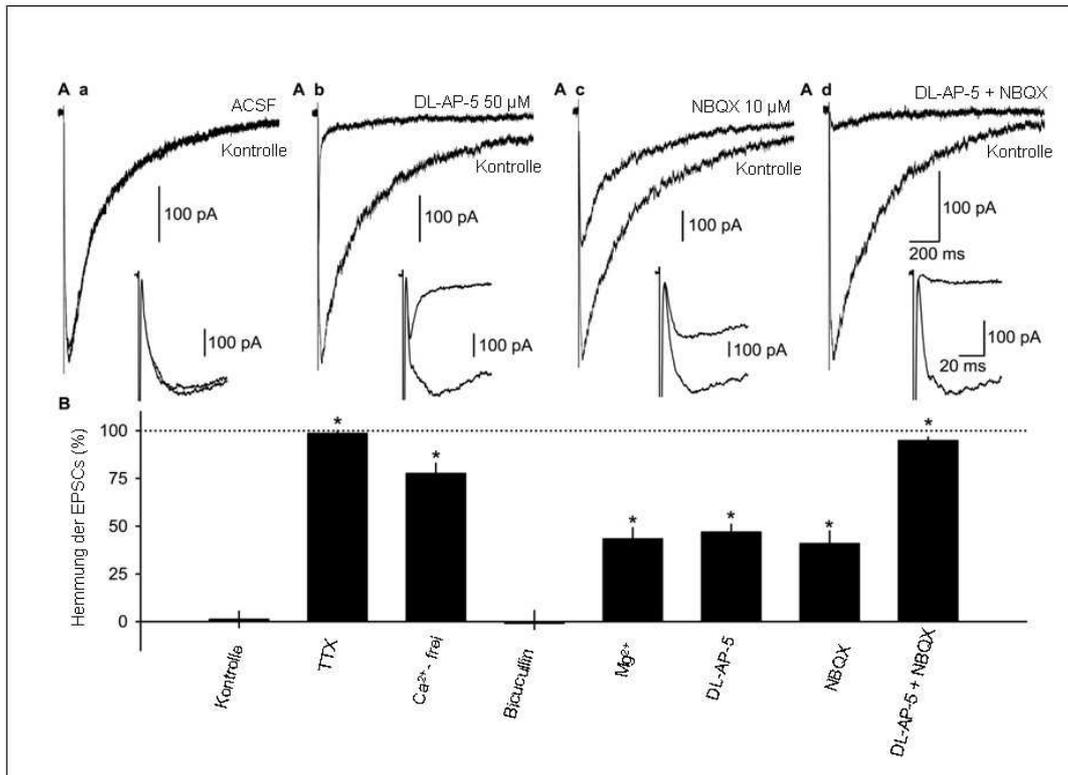


Abb. 9: Charakterisierung exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSC's) in „medium spiny“ Neuronen der Ratte. EPSC's wurden durch intrastriale, fokale Stimulation in einer Mg²⁺-freien Badlösung ausgelöst. Das Haltepotential der striatalen Projektionsneurone wurde dabei auf das theoretische Cl⁻-Gleichgewichtspotential geklemmt (-61 mV). **A:** Gezeigt sind zwei überlagerte EPSC-Amplituden, welche im Abstand von 10 Minuten vom gleichen Neuron abgeleitet wurden. Nach Auslösung des ersten synaptischen Stromes (Kontrolle) wurden die Zellen mit Badlösung weiter superfundiert. Diese enthielt zusätzlich: (**Aa**) keine weitere Wirksubstanz (ACSF), (**Ab**) den NMDA-Rezeptor-Antagonisten DL-AP-5 (50 μM), (**Ac**) den AMPA-Rezeptor-Antagonisten NBQX (10 μM) oder (**Ad**) einer Kombination aus DL-AP-5 (50 μM) und NBQX (10 μM). Die Einschübe unter den jeweiligen Registraten bilden zusätzlich die Anstiegsphase der EPSC-Paare auf einer 10-fach gespreizten Zeitskala ab. **B:** Statistische Auswertung aller Versuchsgruppen, die nach dem in A gezeigten Applikationsschema durchgeführt wurden. Zusätzlich zu DL-AP-5 und NBQX wurden auch die Effekte von Tetrodotoxin (TTX; 0,3 μM), einer nominell Ca²⁺-freien Badlösung (Ca²⁺-frei), von Bicucullin und von Mg²⁺ (1,3 mM) getestet. Die Säulen repräsentieren die mittlere prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden unter der jeweiligen Versuchsbedingung, die Balken indizieren den dazugehörigen Standardfehler des Mittelwertes. *(p < 0,05) statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe (ACSF ohne zugesetzte Wirksubstanz [n = 5 – 8]).

4.2 Vorversuche II: Die Wirkungen von Adenosin und ATP sowie von unterschiedlichen Stimulationsparametern auf exzitatorische postsynaptische Ströme in striatalen „medium spiny“ Neuronen

Als nächstes wurden die Wirkungen von Adenosin (30 μM) und ATP (300 μM) untersucht. Vorausgegangene Studien deuteten bereits darauf hin, dass die beiden Purinozeptor-Agonisten, in diesen Konzentrationen, etwa gleichstarke, inhibitorische Wirkungen auf die EPSC-Amplituden ausübten (Pesic 2006;

Tautenhahn, Leichsenring *et al.* 2012). Die vorläufigen Beobachtungen sollten nun zunächst bestätigt werden. Ein darüber hinausgehendes Ziel der Versuchsserie war es, zusätzlich die Parameter der elektrischen Feldstimulation für die nachfolgenden Versuche zu optimieren.

Zwei Reizbedingungen wurden getestet. In einer ersten Serie wurden die Stimuli mit einer festen Frequenz von 0,1 kHz kontinuierlich über eine 12 Minuten Ableitperiode verabreicht. Adenosin oder ATP wurden der Superfusionslösung 100 Sekunden nach Start des Experimentes zugegeben und verblieben dort für weitere 270 Sekunden (4,5 Minuten). Im zweiten Protokoll wurde diskontinuierlich stimuliert. Hier wurden EPSC's mit Reizfolgen von 6 elektrischen Feldpulsen bei 0,1 kHz zu Beginn (Minute 0), etwa um die Hälfte (beginnend mit Minute 5) und am Ende des Experimentes ausgelöst (Minute 12). Adenosin oder ATP wurden in diesem Fall vom Ende der ersten bis zum Ende der zweiten Stimulationsepoche für 5 Minuten über die striatalen Hirnschnitte superfundiert.

Unter kontinuierlich repetitiver Feldstimulation zeigte sich in den MSN's eine progressive Abnahme der EPSC-Amplitude über die Zeit, bereits in Kontrollversuchen ohne Einsatz von Adenosin oder ATP (Abb. 10, A; $n = 7$). Möglicherweise führten diese Bedingungen zu einer fortschreitenden Entleerung präsynaptischer Glutamatspeicher, obwohl mit nur halbmaximaler Reizstärke stimuliert wurde (siehe 3.6). Sowohl der P1-Purinozeptor-Agonist Adenosin (30 μM ; $n = 7$), als auch der P2-Purinozeptor-Agonist ATP (300 μM ; $n = 7$) induzierten eine deutliche und in etwa gleich starke Inhibition der EPSC-Amplituden. Nach Beendigung der Exposition waren diese Hemmeffekte, soweit in Hinsicht auf den zeitabhängigen „*rundown*“ der Kontrollsignale beurteilbar, zumindest teilweise reversibel (Abb. 10, A).

Bei diskontinuierlicher Feldstimulation waren die Amplituden der postsynaptischen Ströme in den striatalen Neuronen über die Versuchsdauer hingegen stabil ($n = 7$). Adenosin (30 μM ; $n = 6$) und ATP (300 μM ; $n = 7$) hemmten die EPSC's reversibel und um $71,3 \pm 4,1\%$ bzw. um $57,5 \pm 5,8\%$ (Abb. 10, B).

Insgesamt konnten also zunächst die früheren Befunde bestätigt werden, wonach sowohl P1- als auch P2-Rezeptor-Agonisten die Neurotransmission von vermutlich corticalen, glutamatergen Afferenzen auf „*medium spiny*“

Projektionsneurone im Neostriatum der Ratte hemmen. Das Ausmaß der Hemmwirkung war an den gewählten Konzentrationen, wie erwartet, ähnlich. Diese (Adenosin 30 μ M, ATP 300 μ M) wurden in allen weiteren Versuchen als Standardkonzentration verwendet. Ebenso wurde die diskontinuierliche elektrische Feldstimulation als Standardverfahren zur Auslösung von EPSC's gewählt, da die Messamplituden unter diesen Bedingungen stabil blieben.

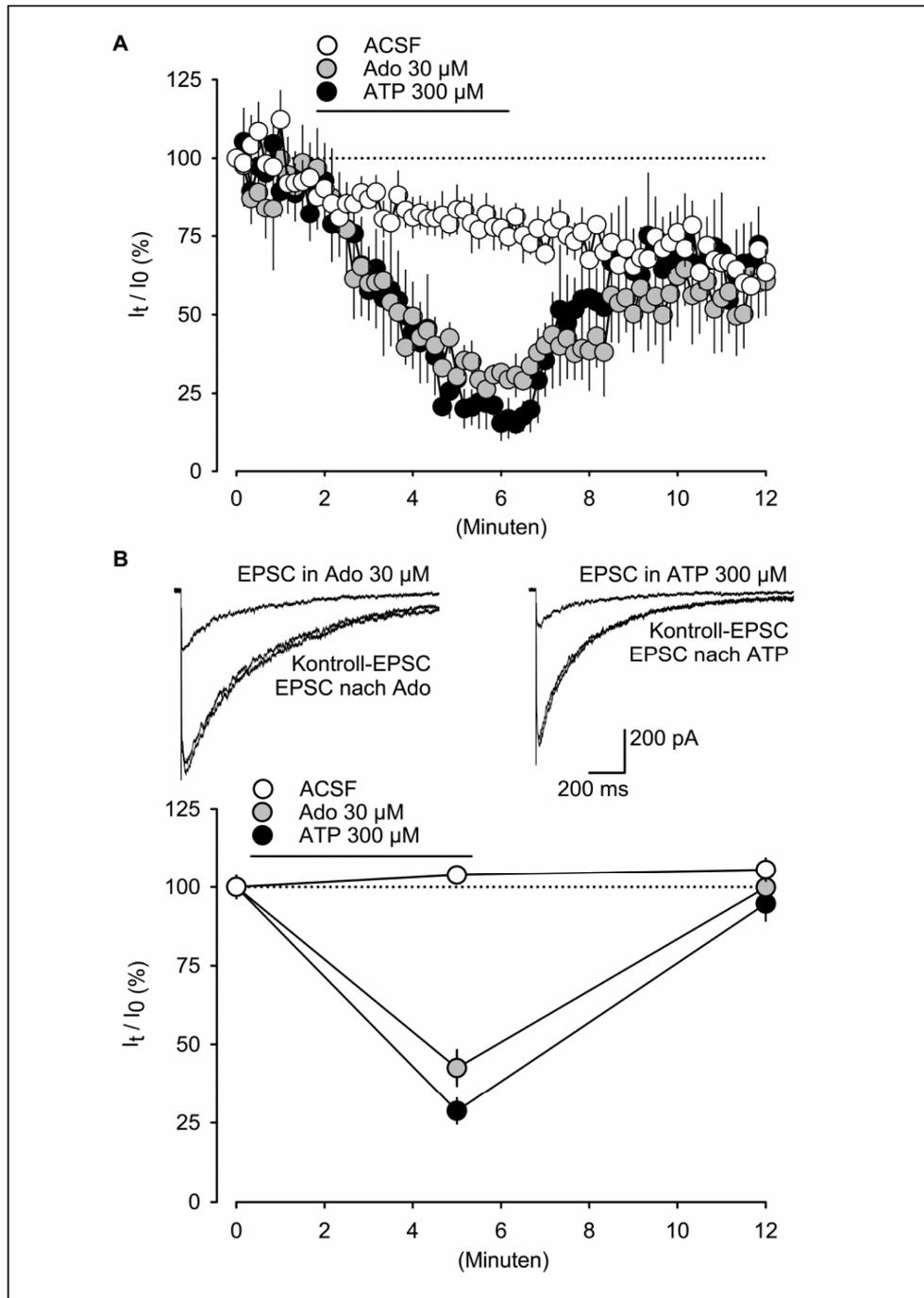


Abb. 10: Adenosin und ATP hemmen die EPSC-Amplitude in „medium spiny“ Neuronen der Ratte.

EPSC's wurden durch fokale intrastriatale Stimulation mit Reizimpulsen von halbmaximaler Stimulationsintensität und 0,1 ms Dauer bei einer Frequenz von 0,1 Hz in Mg^{2+} -freier Badlösung ausgelöst. Das Haltepotential der „medium spiny“ Neurone betrug -61 mV. Zwei unterschiedliche Reizmuster wurden benutzt. **A:** Effekte von Adenosin (Ado; 30 μM ; $n = 7$) und ATP (300 μM ; $n = 7$) während kontinuierlicher, repetitiver Feldreizung über 12 Minuten. Beachte die progressive Abnahme der EPSC-Amplituden über den Zeitverlauf der Experimente bereits unter Kontrollbedingungen (ACSF; $n = 7$). **B:** Hemmeffekte von Adenosin (30 μM ; $n = 6$) und ATP (300 μM ; $n = 7$) während diskontinuierlicher Feldreizung (Reizfolgen von 6 Stimuli bei 0,1 Hz in Intervallen von 5 – 7 Minuten). Unter diesen Bedingungen blieben die Kontrollantworten stabil ($n = 7$). Die Einschübe zeigen repräsentative EPSC-Amplituden, aufgezeichnet vor, während und nach Superfusion mit Adenosin (links) oder ATP (rechts). **A** und **B:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte normalisierter EPSC's (I_t) einer Reizfolge am Zeitpunkt t als Prozentsatz der ersten Reizfolge zu Beginn der Experimente (I_0).

4.3 Wechselwirkungen zwischen Adenosin- und Purinozeptor-Antagonisten

In den nachfolgenden Gruppen von Interaktionsexperimenten sollte zunächst mit Hilfe von P1 (Adenosin)- und P2 (ATP)-Rezeptor-Antagonisten eruiert werden, über welche Art von Rezeptoren Adenosin bzw. ATP die synaptischen Ströme in den „*medium spiny*“ Neuronen hemmen.

Zuerst wurden allerdings mögliche Eigenwirkungen der Antagonisten untersucht. Zum Einsatz kamen: 8-(p-Sulphophenyl)-Theophyllin (8-SPT; 100 μM), ein unspezifischer und nicht-membranpermeabler Adenosin-Rezeptor-Antagonist (Collis, Palmer *et al.* 1985); 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX; 0,3 μM), ein selektiver Adenosin-A₁-Rezeptor-Antagonist (von der Leyen, Schmitz *et al.* 1989); 8-(3-Chlorostyryl)Koffein (CSC; 3 μM), ein selektiver Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Antagonist (Jacobson, Nikodijevic *et al.* 1993); Suramin (100 μM) und Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2'-4'-Disulfonsäure (PPADS; 100 μM), zwei nicht-selektive P2-Rezeptor-Antagonisten (Lambrecht, Braun *et al.* 2002); sowie Reaktiv Blau-2 (RB-2; 100 μM), ein präferentieller aber nicht Subtyp-spezifischer P2Y-Rezeptor-Antagonist (von Kugelgen 2006).

In diesen Versuchen wurden 10 EPSC-Serien mittels diskontinuierlicher Feldstimulation in Intervallen von 5 Minuten über eine Gesamtversuchsdauer von 45 Minuten ausgelöst. Die Antagonisten wurden nach der ersten Reizfolge für einen Zeitraum von 30 Minuten über die Hirnschnitte superfundiert. Danach folgte eine 15 Minuten andauernde Auswaschphase mit Wirksubstanz freier ACSF.

Über diese relativ lange Versuchsdauer zeigten die EPSC-Amplituden bereits unter Kontrollbedingungen eine Tendenz zur Abnahme über die Zeit ($n = 10$), welche durch 8-SPT, DPCPX und CSC ($n = 6 - 8$), nicht oder nur wenig ausgeprägt weiter beschleunigt wurde. Die P2Y-Rezeptor-Antagonisten Suramin, PPADS und RB-2 verursachten dagegen eine zusätzliche Blockade der EPSC's, die nach etwa 30 Minuten Kontaktzeit eine Plateauphase erreichte und nach Auswaschen der Testsubstanzen weitgehend fort dauerte ($n = 7$ für alle). Den stärksten Hemmeffekt wies dabei RB-2 auf (Abb. 11, C).

In der vorliegenden Untersuchung wurde den Mechanismen hinter den Eigeneffekten der Purinozeptor-Antagonisten nicht weiter nachgegangen. Von Suramin, PPADS und RB-2 ist allerdings bekannt, dass sie in der hier verwendeten relativ hohen Konzentration von 100 μM unspezifisch NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme hemmen können, so z.B. in Neuronen des Locus coeruleus der Ratte, oder des Hippocampus der Maus (Frohlich, Boehm *et al.* 1996; Peoples und Li 1998). Erwähnt sei auch, dass RB-2 kompetitiv die Aufnahme von Glutamat in synaptische Speichervesikel hemmt (Roseth, Fykse *et al.* 1998). Zumindest für diese Substanz ist also eine zusätzliche Interferenz mit der Verfügbarkeit von exozytotisch freisetzbarem Glutamat vorstellbar.

Die zeitliche Entwicklung des RB-2 Eigeneffektes über etwa eine halbe Stunde gab allerdings auch den Rahmen für die nachfolgenden Interaktionsexperimente vor. Um unter vergleichbar stationären Bedingungen arbeiten zu können, wurden alle Antagonisten für mindestens 35 Minuten vor Versuchsbeginn vorgelegt und verblieben bis zum Versuchsende in der Superfusionslösung. Die Wirkungen von Adenosin (bzw. ATP) unter Purinozeptor-Blockade wurden dann nach dem bereits bekannten Stimulationsschema untersucht (diskontinuierliche Feldstimulation mit 3 Reizfolgen, erstens in Abwesenheit, zweitens in Gegenwart [5 Minuten] und drittens nach Auswaschen [7 Minuten] der Purinozeptor-Agonisten).

Wie erwartet hemmte Adenosin (30 μM) die EPSC-Amplituden in Abwesenheit der Antagonisten wieder und zwar um $60,8 \pm 8,5\%$ ($n = 6$; Abb. 11, A a, A b, B). In Gegenwart von 8-SPT (100 μM ; $n = 7$) und DPCPX (0,3 μM ; $n = 5$) wurde dieser inhibitorische Effekt vollständig aufgehoben. Der dritte verwendete Adenosin-Rezeptor-Antagonist CSC (3 μM ; $n = 8$) war dagegen unwirksam ($47,8 \pm 4,7\%$ verbleibende Hemmung durch Adenosin; Abb. 11, A c, B). Das Gleiche galt für die gemischten P2X- / P2Y (ATP)-Rezeptor-Antagonisten Suramin (30 oder 100 μM ; $n = 8$ und 7; Hemmung um $73,1 \pm 2,4\%$ und $70,4 \pm 1,7\%$) und PPADS (30 oder 100 μM ; $n = 9$ und 7; Hemmung um $64,0 \pm 3,9\%$ und $74,6 \pm 1,7\%$). Der P2Y-Rezeptor-Antagonist RB-2 verminderte bei 100 μM ($n = 7$; $36,4 \pm 4,3\%$ residuale Hemmung durch Adenosin), nicht aber bei 30 μM ($n = 7$; Hemmung um $50,2 \pm 4,6\%$), den Adenosin-Effekt signifikant (Abb. 11, A d, B). Allerdings, es sei noch einmal

ausdrücklich darauf hingewiesen, unterdrückte die Substanz alleine die EPSC's in der höheren Konzentration schon auf $12,0 \pm 0,5\%$ des Ausgangswertes ($n = 7$; Abb. 11, C).

Die Subtyp-Selektivitäten von 8-SPT ($A_1 = A_{2A} = A_{2B}$, unwirksam an A_3), DPCPX ($A_1 \gg A_{2B} > A_{2A}, \gg A_3$) und CSC ($A_{2A} \gg A_{2B} \gg A_1, \geq A_3$) (Fredholm, Abbracchio *et al.* 1994; Fredholm, AP *et al.* 2011) legten es nahe, dass die Adenosin induzierte Hemmung der EPSC's in den „*medium spiny*“ Neuronen über P1-Rezeptoren des A_1 -, nicht aber des A_{2A} -, A_{2B} - oder A_3 -Subtyps vermittelt wurde. A_1 -Rezeptoren werden auf allen Arten von Afferenzen zu den MSN's massiv exprimiert (Fredholm und Dunwiddie 1988; Flagmeyer, Haas *et al.* 1997). Daher war zu vermuten, dass die Wirkung von Adenosin über einen präsynaptischen Angriffsort mit nachfolgender Hemmung der Glutamatfreisetzung auf die MSN's vermittelt wurde, ein Mechanismus der so auch bereits in anderen Hirnabschnitten beschrieben worden ist (Calabresi, Mercuri *et al.* 1987; Calabresi, Centonze *et al.* 2000). Eine Aktivierung von P2Y-Rezeptoren durch Adenosin war dagegen primär nicht zu erwarten, was dann auch durch die fehlende Wirksamkeit von Suramin (bei der Ratte aktiv an P2Y_{1, 2, 6, 12, 13}) und PPADS (P2Y_{1, 6, 13}) bestätigt wurde. Die beobachtete Abschwächung des Adenosin-Effektes durch die hohe Konzentration von RB-2 (100 μ M; P2Y_{1, 2, 4, 6, 12, 13} [von Kugelgen 2006; von Kugelgen und Harden 2011]), war daher als eher unspezifisch einzuschätzen.

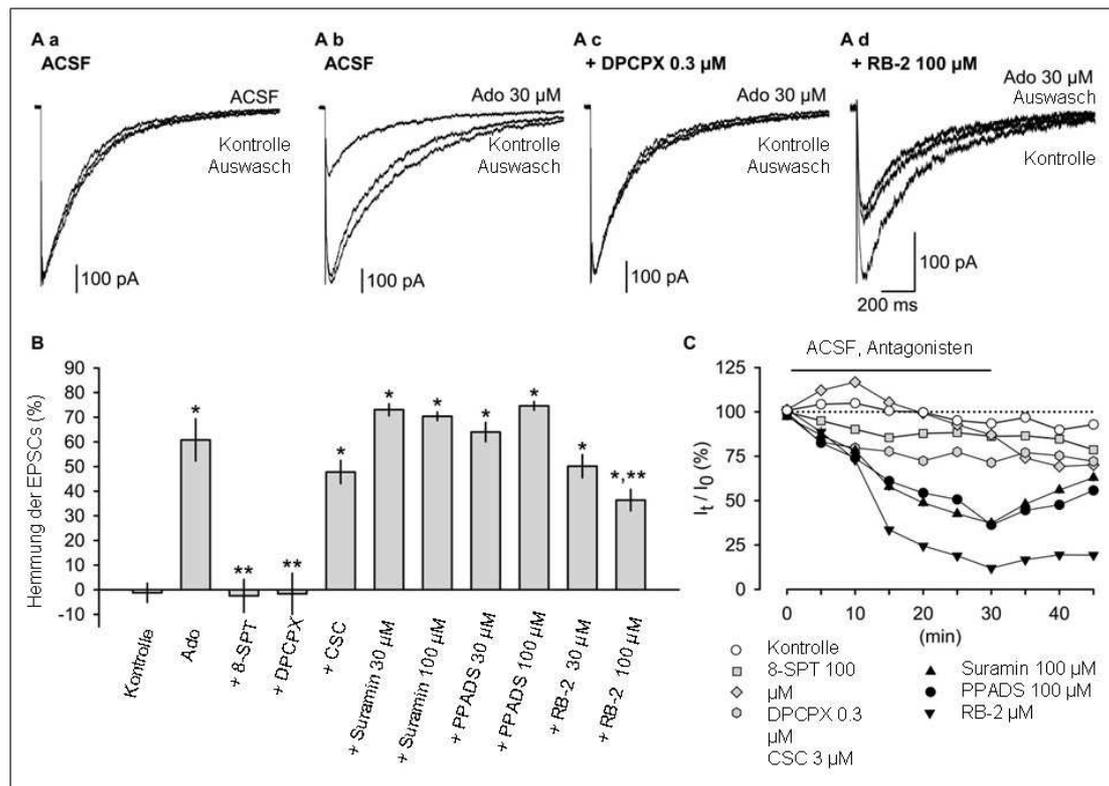


Abb. 11: Wirkungen von Purinozeptor-Antagonisten auf die Adenosin induzierte Hemmung der EPSC's in striatalen „medium spiny“ Neuronen.

A: Originalregistrare von 3 übereinandergelegten EPSC's, ausgelöst vor, während oder nach der Applikation von Adenosin (30 µM), in Abwesenheit (**A b**) oder Gegenwart von DPCPX (0,3 µM; **A c**) oder RB-2 (100 µM; **A d**). **A a** zeigt ein vergleichbares Kontrolllexperiment ohne Adenosin in Abwesenheit von Purinozeptor-Antagonisten. Diese wurden 35 Minuten vor Versuchsbeginn vorgelegt und verblieben bis zum Versuchsende in der Superfusionslösung. **B:** Prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden durch ACSF (Kontrolle) und Adenosin (Ado; 30 µM), oder durch Adenosin (30 µM) in Gegenwart von 8-SPT (+8-SPT; 100 µM), DPCPX (+DPCPX; 0,3 µM), CSC (+CSC; 3 µM), Suramin (+Suramin; 30, 100 µM), PPADS (+PPADS; 30, 100 µM) oder RB-2 (+RB-2; 30, 100 µM). * $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe; ** $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Wirkung von Adenosin alleine ($n = 6 - 9$). **C:** Zeitabhängige Hemmung der EPSC-Amplituden während 30-minütiger Superfusion mit ACSF oder ACSF plus Purinozeptor-Antagonisten wie indiziert ($n = 6 - 10$; Fehlerbalken werden durch die Symbole überdeckt).

4.4 Wechselwirkungen zwischen ATP- und Purinozeptor-Antagonisten

Als nächstes wurde die Palette der Antagonisten gegen ATP (300 µM) eingesetzt. Das Nukleotid selbst hemmte in dieser Versuchsserie die EPSC's um $59,5 \pm 4,7\%$ ($n = 7$). Interessanterweise schwächten sowohl 8-SPT (100 µM; $33,5 \pm 5,1\%$ residuale Hemmung; $n = 6$) als auch DPCPX (0,3 µM; $18,2 \pm 3,2\%$ residuale Hemmung; $n = 6$) den Effekt von ATP zwar signifikant ab, hoben ihn aber nicht völlig auf (Abb. 12, A a - A c, B a), wie es mit der vergleichbar starken Hemmung der EPSC-Amplituden durch Adenosin geschehen war (Abb. 12, A c, B). Der A_{2A}-Rezeptor-Antagonist CSC (3 µM;

ATP induzierte Hemmung $71,6 \pm 2,3\%$; $n = 8$) war hingegen unwirksam, ebenso wie die P2Y-Rezeptor-Antagonisten Suramin (30, 100 μM ; $n = 8$ und 7), PPADS (30, 100 μM ; $n = 6$ und 7) und RB-2 (30, 100 μM ; $n = 8$ und 7). Die ATP (300 μM) induzierte Hemmung der EPSC-Amplituden bewegte sich in diesen Versuchen im Bereich von $59,3 \pm 3,5\%$ (in Gegenwart von 100 μM RB-2) bis zu $80,0 \pm 3,9\%$ (PPADS 100 μM ; Abb. 12, A d, B).

Es stellte sich nun die zusätzliche Frage, ob die in Anwesenheit von 8-SPT und DPCPX verbleibende Inhibition der EPSC-Amplituden durch ATP möglicherweise nicht doch über P2Y-Rezeptoren vermittelt war. Zur Klärung wurde daher, in einer weiteren Versuchsreihe, der A_1 -Rezeptor-Blocker mit P2Y-Rezeptor-Antagonisten kombiniert. Bemerkenswerterweise wurde der ATP-Effekt (300 μM ; Hemmung der EPSC-Amplituden um $52,3 \pm 3,9\%$; $n = 7$) in Gegenwart von DPCPX (0,3 μM ; $27,3 \pm 3,8\%$; $n = 8$) durch die zusätzlich applizierten P2Y-Rezeptor-Antagonisten Suramin (30 μM ; $23,4 \pm 3,5\%$; $n = 8$) oder RB-2 (30 μM ; $24,0 \pm 5,8\%$; $n = 4$; Abb. 12, B b) nicht weiter reduziert.

Diese Daten wiesen in ihrer Summe darauf hin, dass das superfundierte ATP während der Passage durch den Hirnschnitt zunächst zum Teil zu Adenosin abgebaut wurde, welches dann in Folge über präsynaptische Rezeptoren vom A_1 - (Wirksamkeit von DPCPX), nicht aber vom A_{2A} -Subtyp (Unwirksamkeit von CSC) die Glutamatfreisetzung auf „*medium spiny*“ Neurone hemmte. Sie ergaben allerdings keinen Hinweis für die Existenz modulatorischer ATP sensibler P2Y-Rezeptoren, weder an den Endigungen glutamaterger Afferenzen, noch an den MSN's selbst.

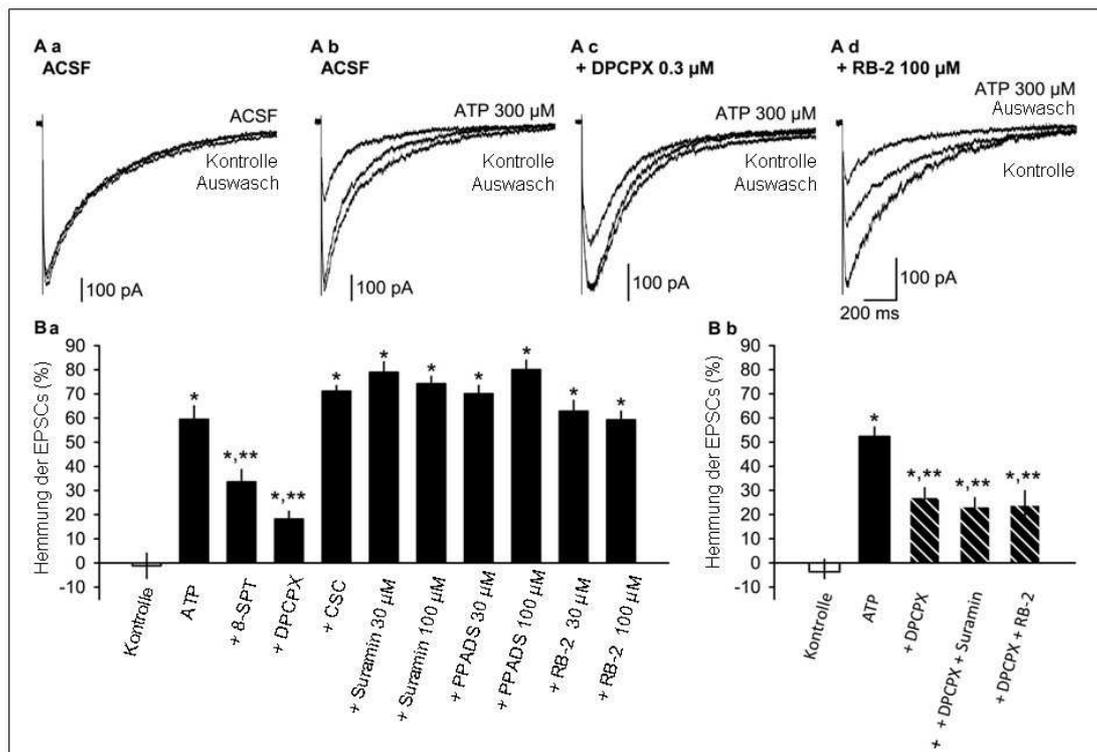


Abb. 12: Wirkungen von Purinozeptor-Antagonisten auf die ATP induzierte Hemmung der EPSC's in striatalen „medium spiny“ Neuronen.

A: Originalregistrate von 3 übereinandergelegten EPSC's, ausgelöst vor, während oder nach der Applikation von ATP (300 µM), in Abwesenheit (A b) oder Gegenwart von DPCPX (0,3 µM; A c) oder RB-2 (100 µM; A d). **A a:** zeigt ein vergleichbares Kontrollexperiment ohne ATP in Abwesenheit von Purinozeptor-Antagonisten. Diese wurden 35 Minuten vor Versuchsbeginn vorgelegt und verblieben bis zum Versuchsende in der Superfusionslösung. **B a:** Prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden durch ACSF (Kontrolle) und ATP (300 µM), oder durch ATP (300 µM) in Gegenwart von 8-SPT (+8-SPT; 100 µM), DPCPX (+DPCPX; 0,3 µM), CSC (+CSC; 3 µM), Suramin (+Suramin; 30, 100 µM), PPADS (+PPADS; 30, 100 µM) oder RB-2 (+RB-2; 30, 100 µM). *p < 0,05, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe; **p < 0,05, statistisch signifikante Unterschiede von der Wirkung von ATP alleine (n = 6 - 8). **B b:** Prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden durch ACSF (Kontrolle) und ATP (300 µM), oder durch ATP (300 µM) in Anwesenheit von DPCPX (+DPCPX; 0,3 µM), einer Kombination aus DPCPX und Suramin (30 µM; +DPCPX+Suramin), oder einer Kombination aus DPCPX und RB-2 (30 µM; +DPCPX+RB-2). Beachte, dass die DPCPX induzierte Reduzierung des inhibitorischen ATP-Effektes durch die Koapplikation mit Suramin oder RB-2 nicht verändert wird. *p < 0,05, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe; **p < 0,05, statistisch signifikante Unterschiede von der Wirkung von Adenosin alleine (n = 4 - 9).

4.5 Wechselwirkungen zwischen ATP und ionotropen Glutamat-Rezeptor-Antagonisten vor und nach zusätzlicher Adenosin-A₁-Rezeptorblockade

ATP, wirksam nach Abbau zu Adenosin, so die bisher referierten Daten, hemmte exzitatorische postsynaptische Ströme striataler „medium spiny“ Neurone über einen präsynaptischen Angriffspunkt. Unter den gewählten Standardbedingungen (Mg²⁺-freie Badlösung, -61 mV Haltepotential)

bestanden diese EPSC's ausschließlich aus einem NMDA (GluN)- und einem AMPA (GluA)-Rezeptor vermittelten Anteil (siehe Abb. 15). Die aus der Adenosin A_1 -Rezeptor-Aktivierung resultierende Hemmung der Glutamatfreisetzung sollte nun beide Komponenten des postsynaptischen Signales gleichermaßen negativ beeinflussen. Im Falle einer differentiellen Modulation wäre dies allerdings ein Hinweis auf einen zusätzlichen postsynaptischen Angriffspunkt. Daher wurde nun die Wirkung von ATP auf die EPSC-Amplituden in Gegenwart entweder des NMDA-Rezeptor-Antagonisten DL-AP-5, oder aber des AMPA-Rezeptor-Antagonisten NBQX evaluiert. Um mögliche ATP-Effekte von Adenosin vermittelten Wirkungen unterscheiden zu können, wurden die Experimente anschließend in Anwesenheit des Adenosin A_1 -Rezeptor-Antagonisten DPCPX wiederholt.

In Abwesenheit von DPCPX wurde die ATP (300 μ M) induzierte Hemmung der postsynaptischen Ströme ($54,2 \pm 4,1\%$; $n = 6$) weder durch die Vorbehandlung (35 Minuten) mit DL-AP-5 (50 μ M; $50,8 \pm 4,4\%$; $n = 7$), noch durch die mit NBQX (10 μ M; $51,8 \pm 4,1\%$; $n = 9$) verändert (Abb. 13, A a, A b, C a). Eine differentielle Modulation der NMDA- oder AMPA-Rezeptor vermittelten Komponente der EPSC's ließ sich unter diesen Bedingungen nicht zeigen.

Nach pharmakologischer Blockade von A_1 -Rezeptoren mit DPCPX, wurde dann allerdings doch noch eine unterschiedliche Beeinflussung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren demaskiert. In Anwesenheit von DPCPX (0,3 μ M) alleine verursachte ATP (300 μ M) wie erwartet, eine schwächere Hemmung der EPSC-Amplituden ($30,7 \pm 2,8\%$; $n = 7$; $p < 0,001$; vergleiche Abb. 13, C a und C b). Die Kombination von DPCPX mit NBQX (10 μ M) schwächte diesen Effekt nicht weiter ab ($25,2 \pm 4,7\%$; $n = 7$; $p = 0,335$; Abb. 13, B b, C b). Die gleichzeitige Blockade von A_1 - und NMDA-Rezeptoren (DL-AP-5, 50 μ M) hingegen hob die ATP induzierte Hemmung der postsynaptischen Ströme völlig auf ($-4,1 \pm 6,5\%$; $n = 7$; $p < 0,001$; Abb. 13, B a, C b).

Insgesamt deuteten diese Daten nun tatsächlich auf einen zusätzlichen Angriffspunkt hin. Das aus der Muttersubstanz ATP entstehende Adenosin wirkt dabei, dem Anschein nach, an der postsynaptischen Membran der striatalen „*medium spiny*“ Neurone und interagiert über A_1 -Rezeptoren mit ionotropen Glutamat-Rezeptoren des NMDA-Subtyps.

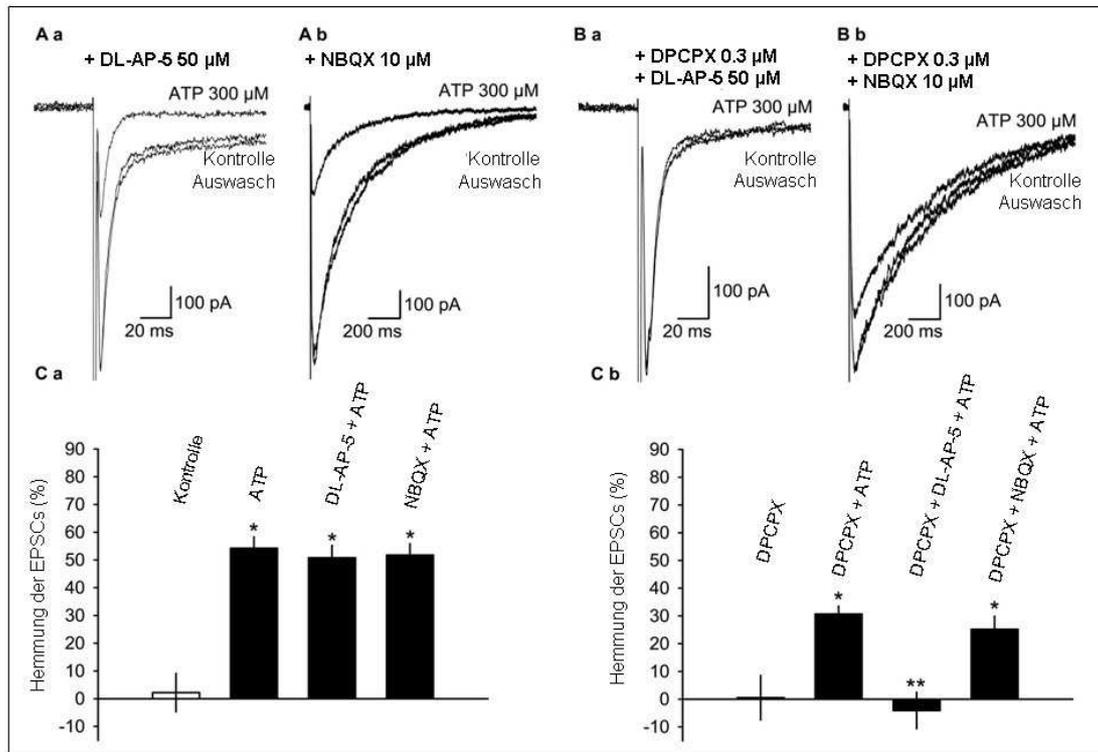


Abb. 13: Auswirkungen der Blockade von NMDA- oder AMPA-Rezeptoren auf die ATP induzierte Hemmung der EPSC-Amplituden in striatalen „medium spiny“ Neuronen.

A: Originalregistrare von 3 übereinandergelegten EPSC's, ausgelöst vor, während oder nach der Applikation von ATP (300 μ M), in Anwesenheit von DL-AP-5 (50 μ M; A a) oder NBQX (10 μ M; A b). **B:** 3 überlagerte EPSC's, ausgelöst in DPCPX (0,3 μ M) vor, während oder nach der Applikation von ATP (300 μ M), in Gegenwart von DL-AP-5 (50 μ M; B a) oder NBQX (10 μ M; B b). Antagonisten wurden 35 Minuten vor Versuchsbeginn vorgelegt und verblieben bis zum Versuchsende in der Superfusionslösung. **C a:** Prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden durch ACSF (Kontrolle) und ATP (300 μ M), oder durch ATP (300 μ M) in Gegenwart von DL-AP-5 (+DL-AP-5; 50 μ M) oder NBQX (+NBQX; 10 μ M). Weder DL-AP-5 noch NBQX beeinflussten die ATP induzierte Hemmung der EPSC-Amplituden. * $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe ($n = 7 - 9$). **C b:** Prozentuale Hemmung der EPSC-Amplituden durch DPCPX (0,3 μ M) oder eine Kombination aus DPCPX (0,3 μ M) plus ATP (300 μ M); DPCPX + ATP). DPCPX schwächte die Wirkung von ATP ab. Die zusätzliche Gabe von DL-AP-5 (50; DPCPX + DL-AP-5 + ATP) hob den ATP-Hemmeffekt völlig auf, während er durch die zusätzliche Gabe von NBQX (10 μ M; DPCPX + NBQX + ATP) unbeeinflusst blieb. * $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe (DPCPX alleine); ** $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Wirkung von DPCPX in Gegenwart von ATP ($n = 7$ für alle).

4.6 Charakterisierung der Wirkungen von ATP und Adenosin auf ionotrope NMDA (GluN)- und AMPA (GluA)-Rezeptoren striataler „medium spiny“ Neuronen

In den abschließenden Experimenten wurde der Vermutung einer zusätzlichen, postsynaptischen Wechselwirkung zwischen ATP und / oder Adenosin einerseits und NMDA- und / oder AMPA-Rezeptoren andererseits weiter nachgegangen. Dazu wurde NMDA (100 μ M) oder AMPA (100 μ M)

mittels Druckapplikation fokal auf die untersuchten MSN's appliziert und die resultierenden Transmembranströme durch die ionotropen Glutamat-Rezeptorkanäle am Soma dieser Zellen gemessen. Die Einzelapplikationen der beiden Glutamat-Rezeptor-Agonisten von 1 - 2 s Dauer erfolgte dabei in festen Intervallen von 200 Sekunden. Die erste Stromantwort war in der Regel bedeutend größer als alle weiteren und wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Die folgenden Stromamplituden waren hingegen über die Zeit stabil. So löste die zweite und achte NMDA Applikation einwärtsgerichtete Ströme von $-763,9 \pm 128,8$ pA und $-717,1 \pm 136,9$ pA aus ($n = 9$; $p = 0,805$). Die entsprechenden Werte für AMPA lagen bei $-533,5 \pm 73,3$ pA und $-563,3 \pm 82,5$ pA ($n = 9$; $p = 0,790$; Abb. 14, A a, B a).

Allerdings sei erwähnt, dass diese Versuche unter pseudostationären Bedingungen stattfanden, da die Anstiegsphase der Glutamat-Rezeptor vermittelten Ströme in keinem der Experimente während der Substanzapplikation abgeschlossen war. Ursache hierfür waren Diffusionsbarrieren im Hirnschnittpräparat, da auch Depolarisationen, ausgelöst durch fokale Applikation hoher K^+ -Konzentration (25 statt 2,5 mM in ACSF), selbst nach 30 Sekunden Applikationsdauer keinen „*steady-state*“ erreichten.

Daher wurde zunächst versucht die Verlässlichkeit der fokalen Substanzapplikation zu überprüfen. In einer früheren Arbeit wurden in einer Subpopulation von „*medium spiny*“ Neuronen (78% der untersuchten Zellen) funktionelle A_{2A} -Rezeptoren gefunden, deren Aktivierung, durch den selektiven Agonisten 4-[2-[[6-Amino-9-(N-Ethyl- β -D-Ribofuranuronamidoyl)-9H-Purin-2-yl]Amino]Ethyl]Benzen Propionsäure (CGS 21680; 0,1 μ M; [Phillis 1990]), eine etwa 45%ige Inhibition NMDA-Rezeptor vermittelter Ströme bewirkte (Norenberg, Wirkner *et al.* 1997). Die damaligen Daten wurden unter Gleichgewichtsbedingungen und mittels Badperfusion gewonnen. Bei fokaler Druckapplikation hemmte CGS 21680 (0,1 μ M) nun die NMDA (100 μ M)-Antworten in sechs der untersuchten Zellen (67%) um $41,9 \pm 4,1\%$, war aber in den restlichen dreien unwirksam ($-28,7 \pm 20,6\%$; Abb. 14, A d). Die Reproduzierbarkeit der älteren Daten war damit ein deutliches Argument für die Reliabilität der in dieser Arbeit verwendeten Methode.

ATP (300 μ M) hemmte dann NMDA (100 μ M) evozierte Ströme im Vergleich zu Kontrollexperimenten signifikant um $27,9 \pm 3,5\%$ ($n = 14$) während seine möglichen Abbauprodukte ADP ($-9,9 \pm 5,9\%$; $n = 8$) und AMP ($7,5 \pm 11,8\%$; $n = 8$) in dieser Hinsicht völlig unwirksam waren (Abb. 14, A b, A c, A d). Interessanterweise reagierten dabei alle MSN's ähnlich stark auf ATP (siehe Streuung in Abbildung 14 A c). Eine differentielle Sensitivität der beiden bekannten MSN-Populationen (Dynorphin-positive und Enkephalin-positive Neurone des direkten und indirekten Projektionsweges; Abb. 2) gegenüber dem Nukleotid schien daher ausgeschlossen. AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten wurden dagegen weder durch ATP (300 μ M; $-12,2 \pm 14,2\%$; $n = 7$; Abb. 14, B b), noch durch ADP ($-1,2 \pm 13,8\%$; $n = 8$) oder AMP ($7,5 \pm 11,8\%$; $n = 8$) gehemmt.

Die bisherigen Daten bestätigten, dass AMPA-Rezeptoren nicht in die postsynaptischen Effekte von ATP involviert waren. Die abschließenden Untersuchungen konzentrierten sich dann auf die Frage, ob die Wechselwirkung mit NMDA-Rezeptoren durch einen direkten Angriff an diesen ionotropen Glutamat-Rezeptorkanälen verursacht wurde, oder aber, ob Purinozeptoren an der Vermittlung des Effektes beteiligt waren.

Der erste Punkt bedarf wohl etwas weiterer Erläuterung. NMDA-Rezeptoren sind Heteromere, gebildet aus einer essentiellen Glycin bindenden NR1 (GluN1)-, einer variablen Glutamat bindenden NR2 (NR2A - NR2D oder GluN2A - GluN2D)- und möglicherweise einer NR3 (NR3A, NR3B oder GluN3A, GluN3B)-Untereinheit (Cull-Candy, Brickley *et al.* 2001; Collingridge, Olsen *et al.* 2009). Es war bereits gezeigt, dass Ströme durch rekombinante und native NMDA-Rezeptoren in *Xenopus*-Oozyten und hippocampalen Neuronen der Ratte, welche die NR2B (GluN2B)-Untereinheit enthielten, durch ATP gehemmt wurden. Da NR2B ein Adenin-Nukleotid-Bindungsmotiv als mögliche molekulare Zielstruktur enthält, wurde vermutet, dass ATP die Agonisten Glutamat oder NMDA kompetitiv von ihrer Bindungstasche verdrängen kann (Ortinou, Laube *et al.* 2003). Zur Überprüfung eines ähnlichen Mechanismus in den „*medium spiny*“ Neuronen wurde nun Iifenprodil eingesetzt, bei Konzentrationen $\leq 10 \mu$ M ein selektiver Antagonist an NR2B (Williams 1993). Alleine gegeben (10 μ M) hemmte diese Substanz die NMDA (100 μ M) evozierten Ströme um $31,4 \pm 4,0\%$ ($n = 7$), NR2B war in den

striatalen Neuronen wohl funktionell vorhanden. Entscheidend war aber, dass der Hemmeffekt von ATP (300 μ M; $27,8 \pm 3,8\%$; $n = 7$; $p = 0,848$ vs. Kontrolle; Abb. 14, A c) durch Ifenprodil nicht vermindert wurde.

Da ein kompetitiver Antagonismus mit NMDA-NR2B-Rezeptoren als möglicher Mechanismus des ATP-Effektes somit ausgeschlossen schien, wurde nun nach beteiligten Purinozeptoren gesucht. Als Antagonisten wurden wieder die bereits bekannten Substanzen PPADS, Suramin und DPCPX eingesetzt. Es sei zusätzlich erwähnt, dass PPADS ($37,3 \pm 8,2\%$ Hemmung; $n = 8$) sowie Suramin ($27,2 \pm 3,8\%$; $n = 7$), nicht aber DPCPX ($-12,0 \pm 11,5\%$; $n = 8$), die NMDA induzierten Transmembranströme auch nach alleiniger Gabe in Abwesenheit von ATP hemmen konnten (Abb. 14, A c), ein wie bereits angeschnitten (siehe 4.3) bekannter Nebeneffekt dieser Substanzen.

ATP (300 μ M) interagierte dann nicht mit PPADS sensitiven P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1, 6, 13}), da der Antagonist in einer Konzentration von 100 μ M nicht in der Lage war die Nukleotid induzierte Hemmung der NMDA-Antworten abzuschwächen ($26,7 \pm 7,2\%$ Hemmung; $n = 8$). Vergleichbar dazu versagte auch Suramin (100 μ M), in der Ratte wirksam an P2Y_{1, 2, 6, 12, 13} als Gegenspieler von ATP ($19,3 \pm 3,7\%$ Hemmung; $n = 7$; Abb. 14, A c). Im Gegensatz dazu blockierte der Adenosin A₁-Rezeptor-Antagonist DPCPX (0,3 μ M), alleine ($-3,3 \pm 11,6\%$; $n = 8$) oder in Kombination mit PPADS (100 μ M; $-7,2 \pm 9,9\%$; $n = 8$), die Nukleotidwirkung völlig (Abb. 14, A c). Im scheinbaren Widerspruch hierzu stellte sich dann heraus, dass Adenosin (300 μ M) die NMDA-Ströme der MSN's nicht modulierte ($-0,4 \pm 4,5\%$ Hemmung; $n = 8$; Abb. 14, A d). Dies stimmte allerdings mit einer früheren Beobachtung überein, welcher zufolge der Neuromodulator die NMDA-Antworten in diesen Zellen nur hemmte, wenn zuvor Nukleosidtransporter blockiert worden waren (Norenberg, Wirkner *et al.* 1997).

Endogenes, lokal aus ATP entstehendes, nicht aber exogenes Adenosin, hemmte NMDA-Rezeptorkanäle, so lautete die wahrscheinliche Essenz der obigen Daten. Die involvierten Adenosin-Rezeptoren gehörten dem A₁-Subtyp an. Neben der ebenfalls indirekten und A₁-Rezeptor vermittelten Inhibition der Glutamatfreisetzung durch ATP, könnte dieser Mechanismus eine zusätzliche postsynaptische Komponente der Modulation glutamaterger

Informationsübertragung auf striatale „*medium spiny*“ Projektionsneurone darstellen.

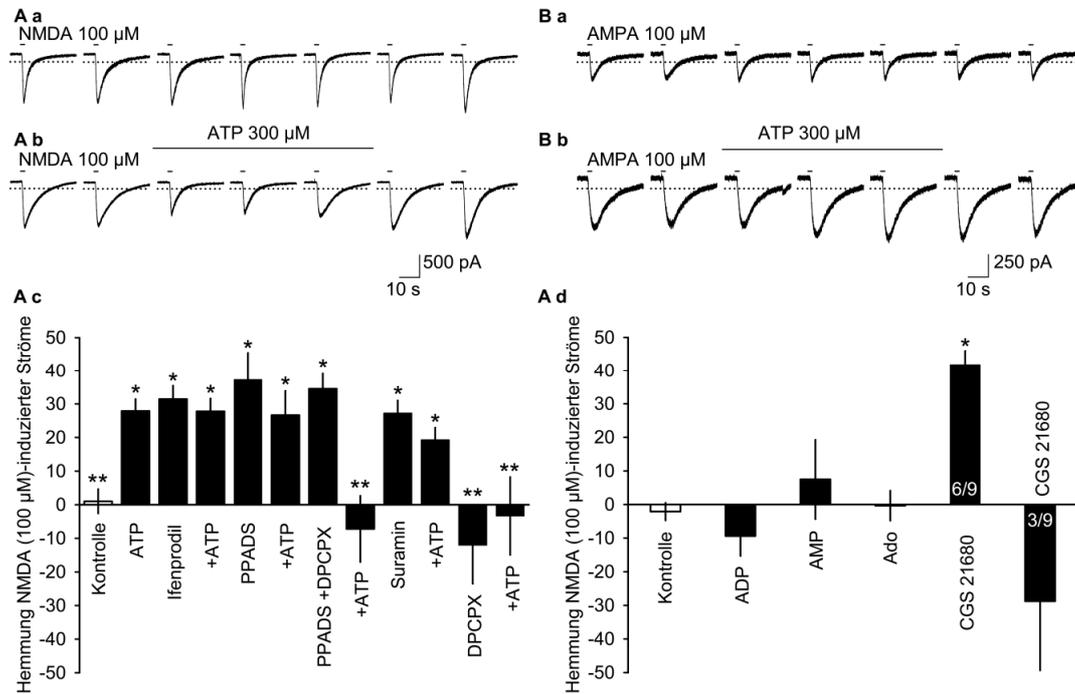


Abb. 14: Charakterisierung der Wirkungen von ATP auf NMDA (GluN)- und AMPA (GluA)-Rezeptoren in striatalen „*medium spiny*“ Neuronen der Ratte.

NMDA (100 μ M) oder AMPA (100 μ M) wurde mittels schneller, fokaler Superfusion alle 200 s für 1 - 2 s druckappliziert. **A:** Originalstromkurven NMDA (100 μ M) induzierter Ströme registriert entweder vor, während oder nach der Applikation von ATP (300 μ M; A b), oder in der Abwesenheit von ATP (A a). ATP (und alle weiteren Testsubstanzen) wurden nach der Auslösung von 2 Kontrollstromamplituden für 10 Minuten ko-appliziert. Der waagerechte Balken über den Registraten symbolisiert die Zeitdauer der ATP-Applikation, die gepunkteten Linien zeigen das Nullstrom-Niveau an. **A c:** Prozentuale Hemmung der NMDA-Ströme durch ACSF (Kontrolle) und ATP (300 μ M). Ifenprodil (10 μ M), PPADS (100 μ M) oder Suramin (100 μ M) selbst hemmten die NMDA evozierten Ströme, interferierten aber nicht mit dem ATP-Effekt. DPCPX (0,3 μ M) und DPCPX (0,3 μ M) plus PPADS (100 μ M) hoben die ATP induzierte Hemmwirkung auf die NMDA-Rezeptorströme auf. Die Pluszeichen vor ATP zeigen an, dass das Nukleotid in Gegenwart der jeweiligen Antagonisten verabreicht wurde, die unter den unmittelbar vorangehenden Säulen angezeigt sind. **A d:** ADP (300 μ M), AMP (300 μ M) und Adenosin (300 μ M) zeigten keine Effekte, während CGS 21680 (0,1 μ M) in einer Subpopulation der Zellen die NMDA-Rezeptor vermittelten Transmembranströme in den MSN's hemmte. * $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe; ** $p < 0,05$, statistisch signifikante Unterschiede von der Wirkung von ATP alleine (n = 6 - 14) **B:** Repräsentative Originalstromkurven AMPA (100 μ M) induzierter Ströme registriert entweder vor, während oder nach der Applikation von ATP (300 μ M; B b), oder in der Abwesenheit von ATP (B a).

5 DISKUSSION

Die Kernaussage der vorliegenden Arbeit ist, dass exogenes ATP die glutamaterge Neurotransmission auf „*medium spiny*“ Neurone in Hirnschnitten aus dem Corpus striatum der Ratte sowohl über einen prä-, als auch über einen postsynaptischen Mechanismus negativ moduliert, während exogenes Adenosin nur an der Präsynapse angreift. Die Hemmwirkung beider Botenstoffe wird dabei ausschließlich über Adenosin A₁-Rezeptoren vermittelt. Erweitert impliziert diese Hypothese erstens, dass exogenes ATP im Hirnschnittpräparat zu Adenosin hydrolysiert wird, zweitens, dass diese Hydrolyse auch lokalisiert in enger Nachbarschaft zu postsynaptischen A₁-Rezeptoren stattfindet und drittens, dass ebenfalls in enger Nachbarschaft zu den postsynaptischen, nicht aber den präsynaptischen A₁-Rezeptoren Inaktivierungsmechanismen wie Nukleosid-Transporter vorhanden sind, die dort die Wirkungen exogenen Adenosins verhindern. Hinweise auf die Einbindung von P2Y-Rezeptoren in die Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf „*medium spiny*“ Neurone ergaben sich hingegen nicht. Abb. 15 zeigt eine Übersicht.

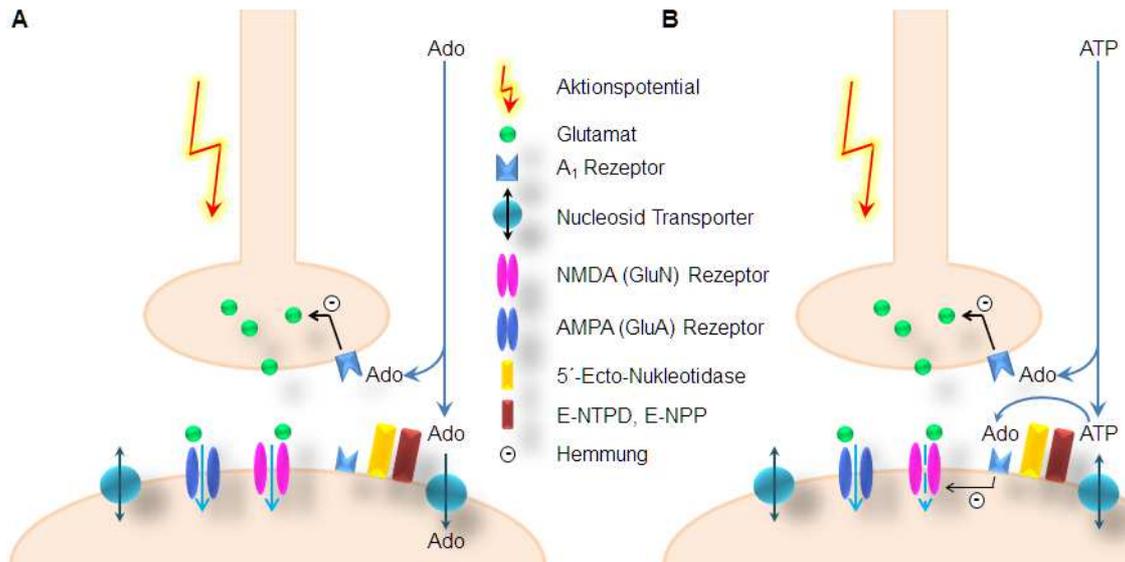


Abb. 15: Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone durch exogenes ATP oder Adenosin.

Die Synapsen Modelle in **A** und **B** zeigen schematisch glutamaterge Axonendigungen (oben) im engen Kontakt mit angeschnittenen Dornen („spines“) auf den Dendriten der MSN's (unten). Fortgeleitete Aktionspotentiale depolarisieren die Präsynapse und lösen die Freisetzung von Glutamat aus. Die exzitatorische Aminosäure überquert dann den synaptischen Spalt, AMPA- und NMDA-Rezeptoren werden aktiviert, die postsynaptischen striatalen Projektionsneurone werden erregt. Der dem Vorgang zugrunde liegende Kationeneinstrom durch die ionotropen Glutamat-Rezeptoren war die eigentliche Messgröße in vorliegender Arbeit. Ausgelöst wurde er entweder indirekt mittels elektrischer Feldstimulation zur Induktion von Aktionspotentialen in den glutamatergen Afferenzen, oder durch direkte fokale Druckapplikation der Agonisten NMDA und AMPA. **A:** Superfundiertes Adenosin gelangt an präsynaptische A_1 -Rezeptoren und vermindert, vermutlich über die Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und / oder die Aktivierung von K^+ -Kanälen, die Freisetzung von Glutamat. Erkennlich war dies an der Adenosin induzierten Hemmung der EPSC's. Postsynaptische A_1 -Rezeptoren wurden hingegen nicht aktiviert. NMDA (und AMPA) induzierte Transmembranströme wurden nicht beeinflusst. Vermutliche Ursache hierfür sind Beseitigungsmechanismen wie z.B. „equilibrative“ Nucleosid Transporter (ENT1, ENT2), die bei hohen extrazellulären Konzentrationen die Aufnahme von Adenosin in das Zellinnere bewerkstelligen. **B:** Superfundiertes ATP wird bereits bei der Passage durch das Hirnschnittgewebe zum Teil metabolisiert. Das entstehende Adenosin aktiviert präsynaptische A_1 -Rezeptoren, die Konsequenzen sind die gleichen wie in A. Membranständige Enzyme wie Ecto-Nucleosid Triphosphat Diphosphohydrolasen (E-NTPD), Ecto-Nucleotid Pyrophosphatasen / Phosphodiesterasen (E-NPP) und Ecto-5'-Nucleotidasen in unmittelbarer Nachbarschaft der postsynaptischen A_1 -Rezeptoren wandeln zusätzlich verbliebenes ATP zu Adenosin um, welches dadurch der zellulären Aufnahme entkommt und diese Rezeptoren aktivieren kann. Über einen unbekanntem Mechanismus wird dann die Aktivität von NMDA-, nicht aber AMPA-Rezeptoren reduziert. Erkennlich war dies unter anderem an den verminderten Stromantworten auf fokale appliziertes NMDA.

Im Anschluss wird der Frage nachgegangen, inwieweit die für das hier vorgeschlagene Modell nötigen Voraussetzungen (Rezeptoren, Ecto-Enzyme, Transporter) im Striatum überhaupt gegeben sind (5.1). Gefolgt wird dies von einer Erörterung der Diskrepanz zwischen morphologischen Anhaltspunkten für die Existenz von P2-Rezeptoren in diesem Hirngbiet und ihrem in vorliegender Arbeit nicht gelungenem funktionellem Nachweis (5.2). Mögliche striatale Quellen für extrazelluläres Adenosin werden dann aufgezeigt (5.3). Abschließend erfolgt ein Ausblick auf die physiologische Bedeutung der hier

neu charakterisierten Wechselwirkung zwischen postsynaptischen A₁- und NMDA (GluN)-Rezeptoren (5.4), sowie eine Betrachtung ihrer Eignung als potentieller Angriffspunkt für die Therapie von Erkrankungen des Basalgangliensystems (5.5).

5.1 Die Rolle von Adenosin A₁-Rezeptoren, ATP metabolisierenden Ecto-Enzymen, Adenosin-Transportern und potentiellen P1- / P2-Rezeptor-Heterodimeren in der ATP vermittelten Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone

Bereits frühe autoradiographische Untersuchungen deuteten auf das Vorhandensein prä- und postsynaptischer Adenosin A₁-Rezeptoren im Neostriatum der Ratte hin. Sowohl die Zerstörung striataler Neurone durch lokale Injektion des Neurotoxins Kainsäure, als auch die Durchtrennung corticostriataler Afferenzen führte so beispielsweise zur verminderten Bindung A₁-Rezeptor selektiver Radioliganden (Alexander und Reddington 1989). Mittels in situ Hybridisierung und mit Hilfe Rezeptor spezifischer Antikörper wurde in der Folge dann auch die entsprechende Boten-RNA (z.B. [Dixon, Gubitza *et al.* 1996]) und das Rezeptorprotein im Rattenstriatum nachgewiesen (Rivkees, Price *et al.* 1995).

Neben diesen eher allgemeinen Rezeptorbelegen war bereits auch bekannt, dass präsynaptische Adenosin A₁-Rezeptoren, nach Aktivierung durch exogenes (Flagmeyer, Haas *et al.* 1997) oder endogenes Adenosin, letzteres freigesetzt im Rahmen einer in vitro Ischämie (Glucose Entzug; [Calabresi, Centonze *et al.* 1997]), glutamaterge exzitatorische Potentiale in MSN's hemmten. Ein Effekt der zudem in Mäusen nach Ausschaltung des A₁-Gens nicht mehr nachweisbar war (Schotanus, Fredholm *et al.* 2006) und der zumindest zum Teil über eine Inhibierung präsynaptischer spannungsaktivierter Ca²⁺-Kanäle zustande kam (Ambrosio, Malva *et al.* 1996). Die hier berichtete, durch den A₁-Subtyp selektiven Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dimethylxanthin (DPCPX; [von der Leyen, Schmitz *et al.* 1989]) aufhebbare, Hemmung der EPSC's durch Adenosin (4.3 und Abb. 11)

bestätigte nun gänzlich die Rolle präsynaptischer Adenosin A₁-Rezeptoren in der Modulation der glutamatergen striatalen Neurotransmission.

Zunächst unerwartet war hingegen, dass diese präsynaptischen A₁-Rezeptoren ein offensichtliches, wenn auch indirektes Ziel für exogenes ATP darstellten, wie die z.B. durch DPCPX, nicht aber durch P2-Rezeptor-Antagonisten, abgeschwächte Hemmung der postsynaptischen Ströme durch das Nukleotid zeigte (4.4 und Abb. 12). Die zusätzliche Beobachtung, dass dieser ATP-Effekt durch Adenosin-Deaminase, welche das Nukleosid zum unwirksamen Inosin abbaut (z.B. [Yegutkin 2008]), signifikant abgeschwächt werden konnte (Pesic 2006; Tautenhahn, Leichsenring *et al.* 2012), stützte diese Hypothese zusätzlich. Ähnliches fand sich auch in Hirnschnitten aus dem Hippocampus der Ratte. Superfusion mit ATP verminderte dort, vermittelt über Adenosin-Rezeptoren, die Amplituden exzitatorischer postsynaptischer Potentiale in Pyramidenzellen der CA1-Region. Die Halbwertszeit der dazu nötigen Umwandlung von ATP zu Adenosin wurde auf etwa 200 Millisekunden geschätzt (Dunwiddie, Diao *et al.* 1997). Da Ecto-Enzyme zur Hydrolyse von ATP ubiquitär im Gehirn vorkommen und dort z.B. auf Neuronen, und Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) lokalisiert sind (Übersicht in [Zimmermann 1996]), könnte der striatale Hirnschnitt, ähnlich der Situation im Hippocampus, als Bioreaktor zur Konversion von ATP zu Adenosin gedient haben. In der Tat wurde auch bereits in striatalen synaptischen Membranpräparationen beispielsweise Ecto-Nukleosid 5'-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (zur Nomenklatur siehe: [Zimmermann 2000] und [Yegutkin 2008]), welche ATP zu AMP hydrolysieren, sowie Ecto-5'-Nukleotidasen, verantwortlich für die Umwandlung von AMP zu Adenosin, gefunden (Richardson, Brown *et al.* 1987; Nedeljkovic, Banjac *et al.* 2003).

Über postsynaptische striatale Adenosin A₁-Rezeptoren war allerdings zu Beginn der vorliegenden Untersuchung wenig bekannt. Neben dem indirekten Hinweis auf ihre mögliche Existenz aus der oben bereits genannten Läsionsstudie (Alexander und Reddington 1989) war nach bestem Wissen bisher nur gezeigt, dass sich in circa 40% der Zellkörper intrinsischer Neurone des Corpus striatum der Ratte, nach Markierung mit spezifischen Antikörpern, eine, wenn auch schwache, A₁-Rezeptor spezifische Immunfluoreszenz

detektieren ließ (Rivkees, Price *et al.* 1995). Der hier berichtete Antagonismus von DPCPX gegen die ATP induzierte Hemmung nur der NMDA-Rezeptor vermittelten Komponente der EPSC's (4.5 und Abb. 13), wie auch nur der Stromantworten auf fokal appliziertes NMDA (4.6 und Abb. 14), deuteten nun auf eine mögliche Rolle, auch dieser bisher schlecht charakterisierten postsynaptischen Rezeptoren in der glutamatergen Informationsübertragung auf die „*medium spiny*“ Neurone hin. Aktiviert wurden sie offensichtlich wieder durch Adenosin, nach enzymatischer Konversion von ATP, was die im gleichen Zusammenhang beobachtete Unwirksamkeit der P2Y-Rezeptor-Antagonisten Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2'-4'-Disulfonsäure (PPADS) und Suramin nahelegte. Es sei zusätzlich erwähnt, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit alle 29 MSN's, die in Abwesenheit von Antagonisten oder in Gegenwart der unwirksamen Antagonisten PPADS und Suramin untersucht wurden, auf ATP mit einer Hemmung der NMDA induzierten Ströme reagierten. Im Gegensatz zur Expression von Adenosin A_{2A}-Rezeptoren, die auf die Subpopulation der indirekt projizierenden MSN's beschränkt ist (Schiffmann, Jacobs *et al.* 1991; Ongini und Fredholm 1996), schienen die A₁-Rezeptoren daher wohl auf allen „*medium spiny*“ Neuronen vorhanden zu sein. Ein Befund in Diskrepanz zum Nachweis der A₁-Rezeptor-Immunfluoreszenz in nur einem Teil der striatalen Neurone (Rivkees, Price *et al.* 1995). Eine Rezeptordichte, ausreichend für die funktionelle Detektion aber unterhalb der Sensitivitätsschwelle des bildgebenden Verfahrens, wäre eine mögliche Erklärung hierfür.

Paradoxe Weise hemmte offensichtlich nur endogenes Adenosin, gebildet aus superfundiertem ATP, nicht aber exogen zugeführtes Adenosin, die NMDA-Rezeptoren der „*medium spiny*“ Neurone (4.6 und Abb. 14). Erklärbar war dies prinzipiell durch eine Generierung des Nucleosids in unmittelbarer Nachbarschaft der postsynaptischen A₁-Rezeptoren. Da das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der extrazellulären Adenosin-Bildung, die 5'-Ecto-Nucleotidase (z.B. [Zimmermann 1996]), im Striatum von Ratte und Mensch nicht nur außergewöhnlich hoch exprimiert ist, sondern auch eine enge Ko-Lokalisation mit A₁-Rezeptoren aufweist (Fastbom, Pazos *et al.* 1987), schien eine solchermaßen eng umgrenzte Nucleosidentstehung möglich. Gleichzeitig war allerdings auch ein effektiver Schutz der Rezeptoren

vor superfundiertem Adenosin zu fordern. Passend hierzu werden z.B. beide Isoformen der „equilibrativen“ Nukleosidtransporter (ENT1 und ENT2), die Adenosin und andere Nukleoside entlang ihres Konzentrationsgradienten über die Zellmembran transportieren, im Neostriatum auf sehr hohem Niveau exprimiert (Anderson, Baldwin *et al.* 1999; Anderson, Xiong *et al.* 1999) und ENT1 scheint zumindest im humanen Striatum auch mit A₁-Rezeptoren kolo­kalisiert zu sein (Glass, Faull *et al.* 1996).

Es ist also zunächst festzuhalten, dass alle zu fordernden Einzelkomponenten der in Abb. 16 vorgeschlagenen Mechanismen der purinergen Modulation der Erregungsübertragung zwischen, vermutlich überwiegend corticalen glutamatergen Afferenzen und „*medium spiny*“ Projektionsneuronen, innerhalb des Striatums vorhanden sind. Dennoch bedarf ein Punkt zusätzlicher Klärung. Grundsätzlich kamen als prä- und / oder postsynaptische Bindungspartner für ATP auch P1- / P2-Rezeptor-Heteromere in Frage. Nach Expression in HEK293 Zellen bildeten z.B. A₁- und P2Y₁-Rezeptoren dimere Konstrukte, über die der P2Y-Agonist ADP-β-S (Adenosin 5'-O- [2-Thiodiphosphat]), in DPCPX antagonisierbarer Weise, die Produktion von cAMP, zuvor induziert durch den Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin, hemmen konnte (Yoshioka, Saitoh *et al.* 2001). Mutmaßliche Rezeptoren mit sehr ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften waren zudem auch schon an den Endigungen postganglionärer sympathischer Neuronen und an glutamatergen Fasern des Hippocampus beschrieben worden (Shinozuka, Bjur *et al.* 1988; Smith, Cheek *et al.* 1997; Mendoza-Fernandez, Andrew *et al.* 2000). Darüber hinaus wurde dann auch noch gezeigt, dass sich mit Hilfe von A₁-Rezeptor-Antikörpern zusätzlich auch P2Y₁-Proteine aus Gewebelysaten von Cortex, Hippocampus und Cerebellum der Ratte extrahieren ließen, ein weiterer Hinweis für die mögliche Existenz solcher Rezeptor-Heterodimere auch im Gehirn (Yoshioka, Hosoda *et al.* 2002). Beweisend sind diese Daten allerdings nicht. Die Dimerbildung in den HEK293 Zellen konnte auch einer Überexpression der beteiligten Rezeptoren geschuldet sein. Für die beschriebene Oligomerisierung in den Hirnlysaten wiederum war nicht auszuschließen, dass sie erst in Lösung, nach der Behandlung mit Detergentien, über hydrophobe Protein-Protein-Wechselwirkungen zustande gekommen war, daher ein sekundäres

Phänomen darstellte, und somit nicht die tatsächlichen Verhältnisse der Rezeptororganisation in der Zellmembran widerspiegelte (für eine weitergehende Diskussion siehe [Fredholm, AP *et al.* 2011]). Zumindest für die Region des Hippocampus stellte sich dann noch heraus, dass die Existenz nativer A₁- / P2Y₁-Dimere hoch unwahrscheinlich war, da sich die dortige ATP vermittelte Hemmung der Glutamatfreisetzung in Hirnschnitten transgener Mäuse mit deletiertem A₁-Rezeptor-Gen nicht länger nachweisen ließ (Masino, Diao *et al.* 2002). Damit war auch die frühere Hypothese bestätigt, dass der Hemmeffekt von ATP auf die hippocampale synaptische Übertragung seinen lokalen Abbau durch Ecto-Nukleotidasen erforderte und, dass das so entstehende Adenosin als eigentliches und ausschließliches Wirkprinzip nachfolgend dann A₁-Rezeptoren aktivierte (Cunha, Sebastiao *et al.* 1998), eine Grundannahme die nun wohl mit einiger Sicherheit auch für das Striatum akzeptiert werden kann.

Ungelöst blieb in dieser Arbeit dagegen die Frage nach Art und Weise der Wechselwirkung zwischen A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Zellmembran. Eine vergleichbare Hemmung NMDA induzierter Ströme durch Adenosin oder Adenosin-Analoga in Pyramidenzellen der CA₁-Region des Hippocampus und bipolaren Neuronen der Retina wurde dort auf die klassische Signaltransduktion dieser Rezeptorenhemmung der Adenylatcyclase mit nachfolgendem Absinken der cAMP-Spiegel und verminderter Aktivität der Proteinkinase A zurückgeführt (de Mendonca, Sebastiao *et al.* 1995; Costenla, De Mendonca *et al.* 1999). In der Tat wurde gezeigt, dass die Kinase über das Ankerprotein Yotiao an NMDA-Rezeptoren koppelt (Westphal, Tavalin *et al.* 1999) und diese auch phosphoryliert (Leonard und Hell 1997). Eine Hemmung des Enzyms wiederum senkte die Leitfähigkeit der ionotropen Glutamat-Rezeptoren (Skeberdis, Chevaleyre *et al.* 2006). Von daher scheint die Adenylatcyclase-cAMP-Signalkaskade ein vielversprechender Ausgangspunkt für zukünftige Untersuchungen des molekularen Mechanismus hinter der Adenosin A₁-Rezeptor vermittelten Hemmung von NMDA-Rezeptoren in striatalen „*medium spiny*“ Projektionsneuronen.

5.2 Die Rolle von P2X- und P2Y-Rezeptoren in der ATP vermittelten Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone

Aus der Unterfamilie der P2X-Rezeptoren ließen sich mit Hilfe immunzytochemischer Methoden Anfärbungen v.a. für P2X₂-, P2X₃- und P2X₄-Proteine an „medium spiny“ Projektionsneuronen und / oder an GABAergen Interneuronen nachweisen (Amadio, Montilli *et al.* 2007). Dies deckte sich zunächst gut mit früheren Befunden der eigenen Arbeitsgruppe, nach denen sich im Striatum eine Ko-Lokalisation von P2X₂ und P2X₄ mit dem neuronalen Marker MAP-2 (Mikrotubulus assoziiertes Protein 2) fand. Während sich P2X₂, nicht aber P2X₄, auch in etwa der Hälfte der zuvor elektrophysiologisch charakterisierten MSN's darstellte, löste hingegen die fokale Applikation von ATP und einiger seiner abbaustabileren Strukturanaloga unter experimentellen Bedingungen, bei denen NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte Antworten in der vorliegenden Arbeit regelmäßig nachweisbar waren (siehe Abb. 12), keine entsprechenden P2X-Rezeptorkanal vermittelten Transmembranströme in diesen Zellen aus. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand war, dass die P2X-Immunfluoreszenz Proteinuntereinheiten repräsentierte, die entweder nicht zur Zellmembran transportiert wurden, oder dort nicht in die erforderliche trimere Struktur aggregierten (Scheibler, Pesic *et al.* 2004). Was auch immer die exakte Ursache für die Diskrepanz zwischen Proteinnachweis und fehlender Funktion gewesen sein mag, eine Rolle von postsynaptischen P2X-Rezeptoren in der schnellen synaptischen Informationsübertragung auf „medium spiny“ Neurone war damit als recht unwahrscheinlich anzusehen.

Indes ergaben sich auch zunehmend Hinweise für eine präsynaptische Lokalisation neuronaler P2X-Rezeptoren, so für P2X₁ und P2X₇, die sich im Striatum auf myelinisierten Fasern der weißen Substanz (P2X₁; [Amadio, Montilli *et al.* 2007]) oder in enger Nachbarschaft zu vesikulären Glutamattransportern (VGLUT₁) nachweisen ließen (P2X₇; [Atkinson, Batten *et al.* 2004]). Die exakte Rolle präsynaptischer P2X-Rezeptoren an exzitatorischen Nervenendigungen ist jedoch noch nicht geklärt. Aufgrund

ihrer relativ hohen Permeabilität für Ca^{2+} (z.B. [Khakh 2001]) war eigentlich eine Bahnung der Transmitterfreisetzung zu erwarten, denn ein solcher Effekt konnte bereits sowohl für P2X_1 an glutamatergen Synaptosomen aus dem Hippocampus (Rodrigues, Almeida *et al.* 2005), als auch für P2X_7 an präganglionären sympathischen Neuronen in Schnittpräparaten des Rückenmarks demonstriert werden (Deuchars, Atkinson *et al.* 2001). Andererseits wurden auch inhibitorische Konsequenzen bekannt. An Moosfasersynapsen des Hippocampus, an denen die Aktivierung präsynaptischer P2X_7 -Rezeptoren EPSC-Amplituden, abgeleitet von Stratum lucidum Neuronen der CA_3 -Region, reduzierte. Dieser Effekt wurde vermutlich über die p38-MAP-Kinase (p38 Mitogen aktivierte Protein Kinase) mit nachfolgender Hemmung präsynaptischer Ca^{2+} -Kanäle vermittelt (Armstrong, Brust *et al.* 2002).

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich ATP induzierte Hemmeffekte auf die glutamatergen EPSC's in den striatalen MSN's beobachtet wurden, war eine Interferenz mit bahnenden, präsynaptischen P2X_1 -Rezeptoren sehr unwahrscheinlich, ohne jedoch gleichzeitig deren Vorhandensein tatsächlich auszuschließen. Ähnliches galt auch für mögliche inhibitorische P2X_7 -Rezeptoren. Halbmaximal effektive ATP-Konzentrationen am P2X_7 -Subtyp der Ratte liegen bei etwa 3 mM (Yan, Khadra *et al.* 2010) und damit 10-fach über derjenigen (300 μM), die in dieser Arbeit durchgängig verwendet wurde. Durchaus vorstellbar war daher, dass die Menge an nicht konvertiertem ATP, die noch an den glutamatergen Projektionen auf den MSN's ankam, nicht ausreichte um messbare Effekte an den vermuteten präsynaptischen P2X_7 -Rezeptoren auslösen zu können. Der fehlende Antagonismus der ATP induzierten EPSC-Hemmung in den „*medium spiny*“ Neuronen durch PPADS und Suramin (Abb. 12, B a), sprach dann auch endgültig gegen eine Involvierung inhibitorischer, präsynaptischer P2X_7 -Rezeptoren unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit, da das Ratten-Ortholog eine exquisite Sensitivität gegen diese beiden Blocker aufweist (halbmaximale inhibitorische Konzentrationen von etwa 2 und 20 μM [Hibell, Thompson *et al.* 2001]).

Aus der Gruppe der G-Protein gekoppelten P2-Rezeptoren fand sich für P2Y_4 eine stark ausgeprägte Immunfluoreszenz auf GABAergen Projektionsneuronen und Interneuronen des Neostriatums (Amadio, Montilli *et*

al. 2007) und in etwa 50% elektrophysiologisch charakterisierter MSN's ließ sich zusätzlich auch das P2Y₁-Protein nachweisen (Scheibler, Pesic *et al.* 2004). Beide Rezeptoren waren aber wohl nicht in die hier beobachtete, postsynaptische, ATP induzierte, negative Modulation der NMDA-Rezeptoraktivität involviert, da Xanthin-Derivate wie DPCPX, welches die Nukleotidwirkung aufhob (Abb. 12, B a), eher keine antagonistischen Wirkungen an P2-Rezeptoren aufwies (Burnstock 1978). Im Falle von P2Y₁ unterstützte zudem der fehlende Antagonismus durch Suramin und PPADS, welche diesen Rezeptorsubtyp bereits im niedrig mikromolaren Bereich blockieren, (siehe Abb. 12, B a [von Kugelgen 2006; von Kugelgen und Harden 2011]) diese Ansicht.

Während sich für P2Y₂-Proteine eine axonale Lokalisation innerhalb des Neostriatums bereits demonstrieren ließ (Amadio, Montilli *et al.* 2007), ist über die dortige Funktion putativer inhibitorischer präsynaptischer P2Y-Rezeptoren als Ziel für extrazelluläres ATP nicht viel bekannt. Hinweise für ihre Existenz gab es nach bestem Wissen bisher nur für Afferenzen aus der Substantia nigra, da die elektrisch evozierte Dopaminfreisetzung aus striatalen Hirnschnitten durch ATP vermindert wurde. Ein Effekt der zudem durch P2Y-Rezeptor-Antagonisten wie Reaktiv Blau-2 zu hemmen war (Trendelenburg und Bultmann 2000). Eine Inhibition der Glutamatfreisetzung fand sich dann allerdings außerhalb des Striatums, z.B. im Modell gereinigter glutamaterger Synaptosomen aus dem Hippocampus, wo P2Y₁-, P2Y₂- und / oder P2Y₄-Rezeptoren an der Vermittlung des Effektes beteiligt waren (Rodrigues, Almeida *et al.* 2005). Wie dem auch sei, solche Rezeptoren waren nicht für die ATP induzierte Hemmung der EPSC's in striatalen MSN's verantwortlich, wie durch den fehlenden Antagonismus durch Suramin (P2Y_{1, 2}), PPADS (P2Y₁) und Reaktiv Blau-2 (P2Y_{1, 2, 4} [von Kugelgen 2006; von Kugelgen und Harden 2011]) belegbar war (siehe Abb. 12, B a).

Wie bei der P2X-Unterfamilie, sei ebenso hier noch einmal darauf hingewiesen, dass der in dieser Arbeit getroffene Ausschluss direkt P2-Rezeptor vermittelter ATP-Wirkungen die Existenz von P2Y-Rezeptoren auf glutamatergen Afferenzen und „*medium spiny*“ Neuronen weder generell in Frage stellen konnte noch sollte. Auch in diesem Fall war ja eine unter den Versuchsbedingungen mangelnde lokale Verfügbarkeit von genuinem ATP

als mögliche Ursache in Betracht zu ziehen. So wurde vor kurzem gezeigt, dass postsynaptische P2Y₁-Rezeptoren, nach Aktivierung mit dem spezifischen und möglicherweise auch abbaustabileren Agonisten 2-Methylthio ATP, in etwa 70% der untersuchten striatalen „*medium spiny*“ Neurone, das Öffnen Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle vermittelten, und dementsprechend über eine Reduzierung der Aktionspotential-Frequenz die Aktivität dieser Zellen regulieren konnten (Coppi, Pedata *et al.* 2012). Hinweise auf die Existenz ATP induzierter Ströme in den MSN's wurden in dieser Arbeit allerdings nicht gesehen, möglicherweise auch weil die hier verwendete hohe Konzentration an EGTA (11 mM) in der Pipettenlösung ein Ansteigen des freien intrazellulären Ca²⁺ und so die Aktivierung der K⁺-Kanäle effektiv unterdrückte.

So offen wie ihre eigentliche Existenz, blieb in der vorliegenden Arbeit allerdings auch die Frage ob, und wenn ja unter welchen Bedingungen, präsynaptische P2Y-Rezeptoren die striatale Glutamatfreisetzung bedeutsam modulieren könnten. Die Mehrzahl der Studien zu diesem Thema, durchgeführt an hippocampalen Hirnschnitten, an denen diese Problematik bisher wohl am intensivsten untersucht wurde, kamen jedenfalls zu dem Schluss, dass, anders als an den gereinigten Synaptosomen (s.o.), die Effekte von exogenem ATP auf die dortige Glutamatfreisetzung ausschließlich durch Wirkungen des Metaboliten Adenosin an P1-Rezeptoren erklärbar waren (Dunwiddie, Diao *et al.* 1997; Cunha, Sebastiao *et al.* 1998; Masino, Diao *et al.* 2002; Rodrigues, Almeida *et al.* 2005). Im Striatum modulieren cholinerge Interneurone, deren möglicher Acetylcholin-Ko-Transmitter ATP ist (Richardson, Brown *et al.* 1987), die Glutamatfreisetzung auf MSN's über Muscarin (M2 und M3)-Rezeptoren an den exzitatorischen Nervenendigungen (Pakhotin und Bracci 2007; Higley, Soler-Llavina *et al.* 2009). Gezeigt wurde dies unter anderem mit Hilfe gepaarter *patch clamp* Ableitungen, bei denen die Auslösung von Aktionspotentialen in den Interneuronen die Amplituden gleichzeitig abgeleiteter EPSC's in den „*medium spiny*“ Neuronen reduzierte (Pakhotin und Bracci 2007). Eine mögliche Abschwächung dieses Hemmeffektes durch P2-Antagonisten könnte daher in zukünftigen Experimenten die Frage klären, ob P2Y-Rezeptoren an striatalen glutamatergen Afferenzen ein Ziel für endogenes ATP sind.

5.3 Mögliche Funktionen postsynaptischer Adenosin A₁-Rezeptoren an striatalen „medium spiny“ Neuronen

Die Frage nach einer möglichen Bedeutung der hier zum ersten Mal in „medium spiny“ Neuronen beschriebenen inhibitorischen Wechselwirkung zwischen postsynaptischen A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren impliziert das Vorhandensein von regulierbaren endogenen Quellen für extrazelluläres Adenosin. Letzteres kann dabei prinzipiell aus dem Katabolismus von freigesetzten Purinnukleotiden entstehen oder aber per se, z.B. über equilibrative Nukleosidtransporter, in den Extrazellulärraum gelangen. Das für den zuletzt genannten Mechanismus nötige zytoplasmatische Adenosin im ZNS mag dabei im Wesentlichen aus dem durch intrazelluläre 5'-Nukleotidasen bewerkstelligten Abbau von AMP, anfallend aus dem Energiestoffwechsel der Zellen, stammen. Eine zweite potentielle intrazelluläre Quelle, die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein, ein Intermediärprodukt bei der Synthese der Aminosäure Cystein, scheint im Gehirn aber nur wenig zur intrazellulären Produktion des Nukleosids beizutragen, da die Hemmung der zuständigen S-Adenosyl-l-Homocystein Hydrolase mit dem selektiven Inhibitor Adenosin-Dialdehyd z.B. im Hippocampus keine wesentliche Einschränkung seiner Freisetzung zeigte (Pak, Haas *et al.* 1994; Latini, Corsi *et al.* 1995). Normalerweise sind die intrazellulären Adenosinkonzentrationen, kontrolliert durch Enzyme wie die Adenosin-Deaminase (Umwandlung zu Inosin) und die Adenosin-Kinase (Umwandlung zu AMP), allerdings nur gering (Abb. 16 [1]; z.B. [Latini und Pedata 2001]). Da im Hirngewebe die Blockade der generell bidirektionalen Transporter zudem eher zum Ansteigen der extrazellulären Nukleosidspiegel führte (Thorn und Jarvis 1996), herrscht weitgehender Konsens darüber, dass unter physiologischen Bedingungen der überwiegende Anteil des extrazellulären Neuromodulators Adenosin aus dem Abbau von Nukleotiden wie ATP stammt (Latini und Pedata 2001; Ferre, Borycz *et al.* 2005; Wall und Dale 2008).

Die Bereitstellung der extrazellulären Purinnukleotide obliegt dabei wahrscheinlich sowohl neuronalen, als auch glialen Quellen. Im ersten Falle könnte z.B. der Ko-Transmitter ATP, freigesetzt aus cholinergen (Richardson, Brown *et al.* 1987), oder, wie im Hippocampus gezeigt, aus glutamatergen Axonen (Abb. 16 [2] [Mori, Heuss *et al.* 2001]) als Ausgangspunkt für die Generierung von Adenosin dienen. Neurone sind darüber hinaus aber offenbar auch in der Lage Adenosin per se freizusetzen (Abb. 16 [3]). So führte die Stimulation von Parallelfasern in Kleinhirn-Schnittpräparaten, Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) defizienter Mäuse, deren Fähigkeit zur Konversion von ATP oder AMP weitgehend aufgehoben war, zum deutlichen Ansteigen der extrazellulären Adenosinkonzentration in der Molekularschicht des zerebellären Cortex (Klyuch, Dale *et al.* 2012). Da dieser Effekt resistent gegen die Blockade equilibrativer Nucleosidtransporter war, zudem eine Ca^{2+} - und Aktionspotential-Abhängigkeit aufwies (Wall und Dale 2008) und durch Bafilomycin, ein Hemmstoff vakuolärer H^+ -ATPasen, zuständig für die Schaffung eines Protonengradienten zur Wiederauffüllung synaptischer Speichervesikel, stark abgeschwächt wurde, handelte es sich möglicherweise um eine direkte exozytotische Adenosinfreisetzung aus den glutamatergen Körnerzellaxonen (Klyuch, Dale *et al.* 2012). Es sei angemerkt, dass, bei Bestätigung und Erweiterung dieser Befunde, das Nucleosid, über seinen akzeptierten Neuromodulatorstatus hinaus, damit eigentlich auch alle Voraussetzungen (neuronale Synthese, vesikuläre Speicherung, Aktionspotential abhängige Freisetzung, Vorhandensein von Inaktivierungsmechanismen) erfüllen würde, die gemeinhin für eine Einstufung als Neurotransmitter herangezogen werden.

Neben präsynaptischen Mechanismen der Nucleotidbereitstellung sind in Hirnschnitten aus dem Cortex der Ratte auch postsynaptische Alternativen beschrieben. Dort wurde gezeigt, dass eine NMDA-Rezeptor induzierte, Ca^{2+} abhängige Freisetzung von Adenosin auf der extrazellulären Dephosphorylierung von AMP beruht, welches seinerseits aus der Konversion von intrazellulärem cAMP zu stammen schien (Abb. 16 [4]; [Craig und White 1993; Craig, Temple *et al.* 1994]). Allerdings kann gegenwärtig auch ein Beitrag der ebenfalls Ca^{2+} abhängigen Hemmung der Adenosin-Kinase (Lu,

Chung *et al.* 2003) zu dieser NMDA-Rezeptor vermittelten Akkumulation von extrazellulärem Adenosin nicht ausgeschlossen werden.

Auch Astrozyten können ATP als potentiellen Gliatransmitter freisetzen. Beschriebene Mechanismen hierfür umfassen die Möglichkeit einer vesikulären (Pascual, Casper *et al.* 2005) und / oder lysosomalen Exozytose (Abb. 16 [5]; [Zhang, Chen *et al.* 2007]), sowie den Efflux über Pannexin-1 (Iglesias, Dahl *et al.* 2009), „large-conductance“-Anionen (Liu, Sabirov *et al.* 2008) und P2X₇-Rezeptorkanäle (Abb. 16 [6]; [Suadicani, Brosnan *et al.* 2006]). Letztere waren nicht in die hier beschriebene A₁-Rezeptor vermittelte Hemmung der NMDA-Rezeptorleitfähigkeit an den striatalen MSN's involviert, da die durchgängig verwendete ATP-Konzentration von 300 µM in vergleichbaren Schnittpräparaten (präfrontaler Cortex) nicht ausreichte, um nennenswerte, P2X₇ vermittelte Stromantworten an den dortigen Astrozyten auszulösen (Oliveira, Riedel *et al.* 2011). Wie dem auch sei, da die Gliazellen über ihre Endfüße Kontakt mit multiplen Synapsen aufnehmen, ist gut vorstellbar, dass astrozytär freigesetztes ATP, nach seinem Abbau zu Adenosin, prinzipiell eine regulatorische Funktion auf neuronale Netzwerke ausübt (Abb. 16; [Boison, Chen *et al.* 2010]).

Eine weitere Möglichkeit der glialen Nucleosidbereitstellung könnte in der spezifischen Freisetzung von zyklischem Adenosin-5'-Monophosphat bestehen (Abb. 16 [7]). Extrazelluläres cAMP würde demnach dann durch Ecto-Phosphodiesterasen, funktionell bereits nachgewiesen z.B. in corticalen und neostriatalen Neuronen (Minneman, Quik *et al.* 1978; Henderson und Strauss 1991), weiter zu AMP und über 5'-Ecto-Nucleotidasen zu Adenosin umgewandelt. Ob es sich bei den Esterasen um Mitglieder der Ecto-Nucleotid-Pyrophosphatase-Phosphodiesterase (E-NPP) Familie handelt (Zimmermann 1999), ist zwar nicht geklärt, bis zum Beweis des Gegenteils aber naheliegend. Der cAMP-Efflux, vermittelt über eine unidirektionale, Energie abhängige und Probenecid sensitive Anionenpumpe, wurde zwar direkt nur an C6-Gliomzellen demonstriert (Henderson und Strauss 1991), könnte aber dennoch einen generellen Mechanismus darstellen über den Astrozyten, nach Aktivierung von G_s gekoppelten Rezeptoren wie z.B. β-Adrenozeptoren zusätzlich zur Regulation extrazellulärer Nucleosidspiegel beitragen (Rosenberg und Dichter 1989; Rosenberg und Li 1995).

Zweifelhaft ist hingegen, ob Astrozyten unter physiologischen Bedingungen Adenosin per se freisetzen (Parkinson und Xiong 2004; Boison, Chen *et al.* 2010). Ein Mangel an verfügbarem Nucleosid wäre eine mögliche Erklärung hierfür, da die Adenosin-Kinase in diesen Zellen eine besonders hohe Expressionsdichte aufweist (Studer, Fedele *et al.* 2006).

Nicht zuletzt sei erwähnt, dass es im Gehirn, unter Bedingungen eines (pathologisch) gesteigerten Energiebedarfs, regelhaft zur Erhöhung der extrazellulären Adenosin-Spiegel kommt, wie z.B. im Rahmen von Ischämie oder epileptischer Aktivität belegt (siehe Übersichten in [Latini und Pedata 2001; Dale und Frenguelli 2009; Boison, Chen *et al.* 2010]). Bedingt durch den gesteigerten ATP-Umsatz kann es über die Vermittlung zytoplasmatischer 5'-Nucleotidasen (Sala-Newby, Skladanowski *et al.* 1999) bei metabolischem Stress rasch zum Anstieg der intrazellulären Nucleosidkonzentration kommen und, so wird gemeinhin angenommen, zur Umkehr der Transportrichtung von ENT1 und ENT2 (Latini und Pedata 2001), welche sowohl in Neuronen (Anderson, Baldwin *et al.* 1999; Anderson, Xiong *et al.* 1999), als auch in Astrozyten vorhanden sind (Abb. 16 [8]; [Peng, Huang *et al.* 2005]). Allerdings sind weder die Mechanismen noch die Quellen der erhöhten extrazellulären Adenosin-Spiegel unter metabolischer Belastung wirklich unstrittig. So führte die Blockade der equilibrativen Transporter im Hippocampus der Ratte eher zur Potenzierung der Ischämie bedingten Adenosinfreisetzung, obwohl unter diesen Voraussetzungen eigentlich eher der umgekehrte Effekt zu erwarten gewesen wäre (Pearson, Nuritova *et al.* 2001; Frenguelli, Wigmore *et al.* 2007; Martin, Fernandez *et al.* 2007), während eine primäre Rolle von Astrozyten in der Regulation extrazellulärer Adenosin-Spiegel unter epileptischer Aktivität nicht nachweisbar war (Lovatt, Xu *et al.* 2012).

unter pathophysiologischen Bedingungen darzustellen (Latini und Pedata 2001; Dale und Frenguelli 2009; Boison, Chen *et al.* 2010).

In Anbetracht der genannten potentiellen Quellen scheint es zudem hoch wahrscheinlich, dass die striatalen A₁-Rezeptoren an striatalen „*medium spiny*“ Neuronen (und an glutamatergen Nervenendigungen) Ziele für endogenes Adenosin darstellen. Auch im Striatum stammt der größere Anteil an extrazellulärem Adenosin, sowohl unter basalen Bedingungen (83%), als auch nach Stimulation mit NMDA, (74%; [Delaney und Geiger 1998]), wohl nicht aus einer per se Freisetzung, sondern aus dem Ecto-Enzym katalysierten Umsatz von Purinnukleotiden. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, ließ sich in vorliegender Untersuchung eine A₁-Rezeptor vermittelte Hemmung der NMDA induzierten Transmembranströme an den MSN's ja auch nur nach Superfusion mit ATP, nicht aber mit Adenosin demonstrieren (4.6 und Abb. 14 [A c und A d]). Die basalen extrazellulären Adenosin-Konzentrationen liegen dabei im Gehirn mit geschätzten 20 - 300 nM (Dunwiddie und Diao 1994; Delaney und Geiger 1996) in einem ausreichend hohen Bereich um A₁-Rezeptoren bereits tonisch zu aktivieren (Fredholm, AP *et al.* 2011). Ein solcher Effekt ließ sich in dieser Untersuchung allerdings nicht sicher demonstrieren. Der spezifische Antagonist DPCPX steigert z.B. die Amplituden der NMDA evozierten Ströme nur tendenziell, nicht aber signifikant (4.6 und Abb. 14 [A c]). Die Ursache hierfür blieb unklar. Es war aber nicht auszuschließen, dass durch die kontinuierliche Badsuperfusion ursprünglich vorhandenes Adenosin aus den Hirnschnitten ausgewaschen worden war.

Wie im Kleinhirn (Klyuch, Dale *et al.* 2012) wurde auch für das Striatum der Ratte bereits eine Ca²⁺ und Aktionspotential abhängige und so möglicherweise exozytotische Adenosin-Freisetzung gezeigt (Pedata, Pazzagli *et al.* 1990). In scheinbarem Widerspruch hierzu konnte in der vorliegenden Arbeit aber keine Pulszahl bezogene Hemmung der EPSC-Amplituden beobachtet werden. Allerdings war das weitgehend verwendete (diskontinuierliche) Stimulationsprotokoll, optimiert für die Stabilität der EPSC-Amplituden über den Zeitverlauf (siehe 4.2 und Abb. 10 [B]), auch nicht gezielt zum Nachweis einer möglichen purinergen Modulation der Glutamatfreisetzung gedacht. Der andererseits bei kontinuierlicher Reizung in

einigen Versuchen beobachtete „*rundown*“ der postsynaptischen Ströme (4.2 und Abb. 10 [A]) könnte daher, neben der erwähnten Verarmung präsynaptischer Glutamat-Speicher, durchaus auch einem solchen Mechanismus geschuldet gewesen sein. Variationen der Stimulationsparameter in Verbindung mit dem Vergleich des Amplitudenverlaufes der EPSC's in An- und Abwesenheit von DPCPX wären Maßnahmen um zukünftig diese offene Frage zu klären.

5.4 Ausblick I: Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Adenosin A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an striatalen „*medium spiny*“ Neuronen unter physiologischen Bedingungen

Die Ergebnisse dieser Untersuchung, zusammen mit entsprechenden Daten der vorhandenen Literatur, deuten auf eine zumindest zweifach purinerge Kontrolle der glutamatergen Informationsübertragung auf „*medium spiny*“ Neuronen im Neostriatum der Ratte hin (Abb. 17). Postsynaptische NMDA (GluN)-Rezeptoren nehmen dabei eine zentrale Stellung ein. Einerseits erkennen diese, als sogenannte Ko-Inzidenz Detektoren, die zeitliche und / oder räumliche Summierung glutamaterger Signale, wie sie bei hochfrequenter Aktivität einzelner und / oder kooperativer Aktivität multipler, auf ein Neuron konvergierender Axonendigungen auftritt (z.B. [Dumas 2005]). Dies ist so, weil erst bei relativ starker Depolarisation (um ca. 30 - 40 mV), bewerkstelligt z.B. über die vorangehende Öffnung von AMPA (GluA)-Rezeptoren, die unter physiologischen Bedingungen gegebene, spannungsabhängige Blockade ihrer Transmembranporen durch extrazelluläres Mg²⁺ aufgehoben wird (Mayer, Westbrook *et al.* 1984). Andererseits steigt in Antwort auf die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (Delaney und Geiger 1998), nicht aber der von AMPA-Rezeptoren (Delaney, Shepel *et al.* 1998), im Striatum extrazelluläres Adenosin an. Als Konsequenz sinkt, vermittelt über prä- und postsynaptische A₁-Rezeptoren, die Glutamatfreisetzung aus den Axonendigungen (Calabresi, Centonze *et al.* 1997; Flagmeyer, Haas *et al.* 1997), wie auch die NMDA-Rezeptor

Leitfähigkeit im nachgeschalteten MSN (vorliegende Arbeit). Insgesamt stellen NMDA- und A_1 -Rezeptoren so hoch wahrscheinlich die Stellglieder eines Rückkopplungsmechanismus dar, der beim Eintreffen andauernder, massiver Erregung, z.B. aus dem motorischen Cortex, die Informationsweiterleitung über die GABAergen Projektionsneurone begrenzt (Abb. 17).

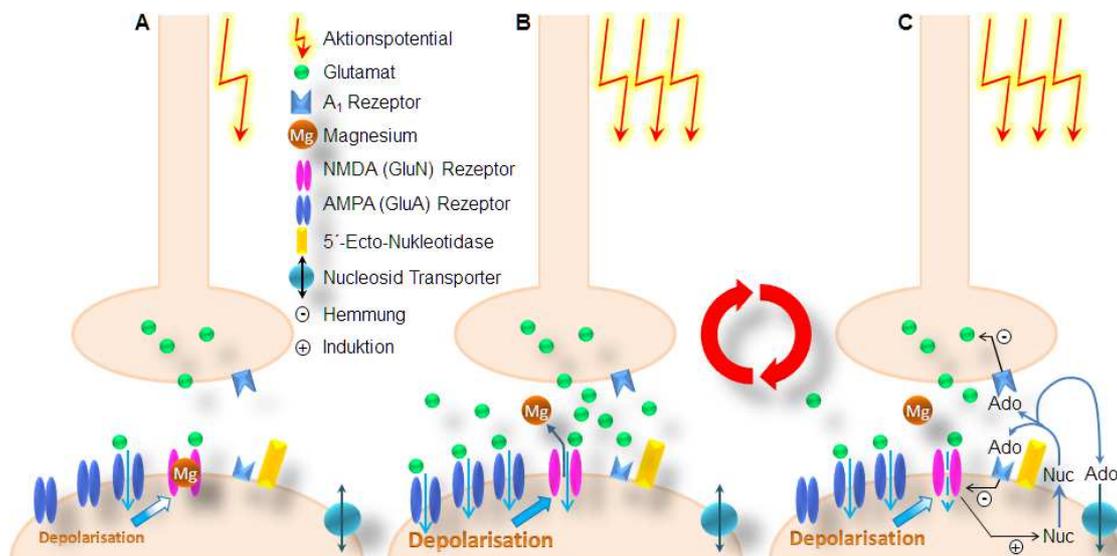


Abb. 17: Bimodale purinerge Modulation der glutamatergen Neurotransmission auf striatale „medium spiny“ Neurone. [A]: Niederfrequente Aktionspotentiale depolarisieren die glutamaterge Axonendigung (oben) und lösen die Transmitterfreisetzung aus. Die AMPA-Rezeptoren im dendritischen Dorn eines postsynaptischen MSN (unten) werden durch das freigesetzte Glutamat nur zum Teil aktiviert. Die resultierende Depolarisation reicht nicht aus, um den physiologischen Magnesium (Mg)-Block der ko-lokalisierten NMDA-Rezeptoren aufzuheben. **[B]:** Länger andauernde, hochfrequente elektrische Aktivität in der Präsynapse (oder, hier nicht gezeigt, die simultane Aktivität multipler, konvergierender Axonendigungen) setzt mehr Glutamat frei, eine größere Anzahl an AMPA-Rezeptoren öffnet. Die stärkere Depolarisation treibt Magnesium aus den Poren der NMDA-Rezeptoren. In einen voll leitfähigen Zustand versetzt, tragen sie nun über einen zusätzlichen Na^+ - und Ca^{2+} - Einstrom zur weiteren Erregung der MSN's bei. **[C]:** Infolge der NMDA-Rezeptoraktivierung steigt extrazelluläres Adenosin an. Dessen Interaktion mit prä- und postsynaptischen A_1 -Rezeptoren führt zur Hemmung der Glutamatfreisetzung, die NMDA-Rezeptorleitfähigkeit wird zusätzlich reduziert. In Antwort darauf sinkt der synaptische Adenosin-Spiegel, vermittelt wohl über Nucleosid-Transporter, wieder ab. Parallel vermindern sich auch beide Hemmeffekte (nicht gezeigt). Insgesamt ergibt sich ein Regelkreis, der, bei andauernd hoher Aktivität der glutamatergen Afferenzen, geeignet ist, das Erregungsniveau der „medium spiny“ Projektionsneurone zu limitieren. Die synaptische Aktivität oszilliert dabei zwischen den Zuständen in [B] und [C]. Das nötige Adenosin stammt wohl überwiegend aus einer 5'-Ecto-Nucleotidase abhängigen Hydrolyse von Purinnucleotiden (Nuc; siehe auch 5.3). Wie dargestellt könnten letztere aus den Neuronen stammen. Ein Beitrag benachbarter Gliazellen ist allerdings keineswegs ausgeschlossen.

Dieser, auf der Basis von *ex vivo* Befunden postulierte, „synaptische Drehzahlbegrenzer“ könnte allerdings auch *in vivo* operativ sein. Indirekte Hinweise für diese Behauptung kommen von Untersuchungen, bei denen die Mikrodialyse-Technik mit Verhaltensbeobachtungen an freilaufenden Ratten kombiniert wurde. Systemisch appliziertes NMDA hemmte hier das normale Explorationsverhalten der Tiere in ungewohnter Umgebung und führte

gleichzeitig zu einem Anstieg der Adenosin-Konzentration im simultan aus dem Striatum gewonnenen Dialysat. Zwei Effekte, die durch einen spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten (MK-801) aufgehoben werden konnten (Melani, Corsi *et al.* 1999).

Während die zuletzt berichteten Befunde zwar nun die vorstellbare physiologische Relevanz des Regelmechanismus unterstreichen mögen, fällt allerdings auch seine redundante Konstruktion auf. Für eine Höchstwertbegrenzung des Informationsflusses vom Cortex über die Basalganglienschleife wäre einer der beiden Zügel, nämlich die bereits vor dieser Arbeit bekannte Hemmung der Glutamatfreisetzung (Calabresi, Centonze *et al.* 1997; Flagmeyer, Haas *et al.* 1997), wahrscheinlich ausreichend. Dieses teleologische Problem muss letztendlich unbeantwortet bleiben. Ein möglicher Erklärungsansatz mag aber in der Janusköpfigkeit NMDA-Rezeptor vermittelter Effekte liegen. Die von diesen Rezeptoren vermittelten Ca^{2+} -Signale initiieren einerseits zwar z.B. verschiedene Formen der synaptischen Plastizität wie Langzeit-Potenzierung und Langzeit-Hemmung (Malenka und Bear 2004), von denen angenommen wird, dass sie Lernvorgängen zugrunde liegen (Übersicht in [Zorumski und Izumi 2012]), andererseits führt ihre überschießende Aktivierung aber auch zu einer zellulären Überladung mit dem divalenten Kation, welches schließlich, wohl vermittelt u.a. über eine Ca^{2+} abhängige Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthetase (nNOS), den sogenannten exzitotoxischen Zelltod der betroffenen Neurone auslösen kann (Wang, Shimoji *et al.* 2003; Szydłowska und Tymianski 2010), was die Notwendigkeit einer besonders engmaschigen, doppelten Kontrolle der NMDA-Rezeptoren plausibler erscheinen lässt.

Besonders eng und sogar dreifach konstruiert ist diese übrigens möglicherweise bei den striatopallidalen MSN's des indirekten Projektionsweges. Diese besitzen zusätzlich zu A_1 -Rezeptoren auch A_{2A} -Rezeptoren, die über einen Phospholipase C und Calmodulin Kinase II vermittelten Signalweg, ebenfalls die NMDA-Rezeptorleitfähigkeit herabsetzen können (Wirkner, Assmann *et al.* 2000). Eine möglicherweise massivere Innervation mit glutamatergen corticostriatalen Afferenzen (Reiner, Jiao *et al.* 2003; Raymond, Andre *et al.* 2011), im Vergleich zu den MSN's des direkten

striatonigralen Projektionsweges, wäre eine passende Begründung hierfür. Interessanterweise fand sich an den Endigungen von Schaffer-Kollateralen im Hippocampus, eine ähnliche Ko-Existenz von A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, welche dort allerdings konträre Effekte vermittelten. Erstere, aktiviert überwiegend durch endogenes Adenosin, welches aus einem Nukleosidtransporter vermittelten Efflux zu stammen schien, steigerten, letztere, aktiviert überwiegend durch Adenosin aus der 5'-Ecto-Nukleotidase vermittelten Hydrolyse von Purinnukleotiden, hemmten dagegen die Freisetzung von Glutamat (Cunha, Correia-de-Sa *et al.* 1996). Bei niederfrequenter Stimulation der Kollateralen kam es zudem zur tonischen Aktivierung der A₁-Rezeptoren. Bei hochfrequenter Reizung wurde dann die A_{2A}-Rezeptor vermittelte Förderung der Transmitter Freisetzung apparent (Cunha, Vizi *et al.* 1996; Ferre, Borycz *et al.* 2005). Übertragen auf die Situation in den striatopallidalen MSN's, wäre es daher wohl durchaus interessant dort zukünftig nach einer so möglich erscheinenden, sequentiellen Hemmung der glutamatergen Neurotransmission, zuerst durch postsynaptische A₁-Rezeptoren und, bei höherer Aktivität, dann zusätzlich durch A_{2A}-Rezeptoren, zu suchen.

5.5 Ausblick II: Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Adenosin A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an striatalen „medium spiny“ Neuronen bei Störungen der Basalganglienfunktion

Abschließend sei noch die mögliche Bedeutung der striatalen A₁-Rezeptoren an den MSN's (und den corticostriatalen Afferenzen) als Angriffspunkte potentieller Therapeutika bei Störungen der Basalganglien evaluiert. Vorausgeschickt sei zudem, dass sich das Folgende auf die Huntington'sche Erkrankung beschränken wird, bei der eine Hyperaktivität von NMDA-Rezeptoren als zentral für die zugrunde liegenden neurodegenerativen Prozesse angesehen wird (z.B. [Blum, Hourez *et al.* 2003]).

Beim Morbus Huntington, mit einer Prävalenz von 4 - 10 Fällen auf 100.000 Einwohner in Westeuropa, handelt es sich um eine dominant vererbte Erkrankung, welche durch die instabile Expansion eines CAG-Basentriplets

in der kodierenden Region des IT15 (HD1)-Gens, lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 4, verursacht wird. Folge ist die Produktion einer mutierten Form des Proteins Huntingtin, das dann am N-Terminus ein verlängertes (>36) Polyglutamin-Segment trägt (Group 1993). Histologisch findet sich ein gravierender Verlust von GABAergen MSN's im Striatum (Reiner, Albin *et al.* 1988), sowie von glutamatergen Pyramidenzellen v.a. der Schichten III, V und VI der Großhirnrinde (Hedreen, Peyser *et al.* 1991; Heinsen, Strik *et al.* 1994).

Glutamat-Exzess und NMDA-Rezeptoren nehmen im Krankheitsgeschehen vermutlich eine zentrale Rolle ein. Gegenwärtig geht man davon aus, dass vor allem extrasynaptisch lokalisierte Rezeptoren, mit der in reifen striatalen Neuronen in hoher Dichte exprimierten NR2B-Untereinheit (GluN2B; [Landwehrmeyer, Standaert *et al.* 1995]) in den exzitotoxischen Zelluntergang involviert sind (Liu, Wong *et al.* 2007). Dies wird nicht zuletzt deswegen vermutet, weil synaptische und extrasynaptische NMDA-Rezeptoren differentiell mit dem Transkriptionsfaktor CREB (cAMP Response Element Binding Protein) interagieren. Angeschaltet durch synaptische Rezeptoren (Hardingham, Arnold *et al.* 2001) folgt die Expression von antiapoptotischen, antioxidativen und das Überleben fördernden Proteinen, einschließlich BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor [Jiang, Tian *et al.* 2005; Papadia, Soriano *et al.* 2008]). Extrasynaptische NMDA-Rezeptoren schalten hingegen CREB nicht nur ab (Hardingham, Fukunaga *et al.* 2002), sondern aktivieren im Gegenzug auch Zelltod-Gene (Soriano, Martel *et al.* 2008; Wahl, Buchthal *et al.* 2009) und tragen zu einer mitochondrialen Ca²⁺-Überladung bei (Leveille, El Gaamouch *et al.* 2008). Ähnliches wurde in einem transgenen Tiermodell der Huntington'schen Erkrankung (YAC128 Maus) bestätigt, wo eine erhöhte Expression und Signalaktivität extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren, über die Hemmung von CREB, zur erhöhten neuronalen Toxizität von mutiertem Huntingtin führte (Okamoto, Pouladi *et al.* 2009). Zu weiteren, vermutlich durch mutiertes Huntingtin bedingten, Veränderungen gehört eine erhöhte synaptische Freisetzung von Glutamat (Joshi, Wu *et al.* 2009), sowie dessen defizienter Inaktivierung infolge verminderter Expression des astroglialen Transporters GLT-1 (Lievens, Woodman *et al.* 2001), was zusammen zu erhöhten Glutamat-Spiegeln führen mag. Darüber hinaus kommt es, wohl

über eine Aktivierung der Mikroglia (Tai, Pavese *et al.* 2007), auch zur vermehrten Sekretion des endogenen NMDA-Rezeptor-Agonisten Quinolinsäure (Guidetti, Luthi-Carter *et al.* 2004). Allerdings bleiben die Glutamat-Spiegel nicht über den gesamten Krankheitsverlauf erhöht, so gezeigt z.B. an YAC128 Mäusen, bei denen im Prodromalstadium eine vermehrte, nach voller Ausprägung der Symptomatik, aber eine verminderte, Freisetzung des Transmitters zu beobachten war (Joshi, Wu *et al.* 2009). Gleichzeitig werden die MSN's, bedingt durch fortschreitende Degeneration, vom Großteil ihrer synaptischen Verbindungen, einschließlich der corticostriatalen glutamatergen Afferenzen getrennt (Cepeda, Hurst *et al.* 2003).

In Erweiterung der Glutamat-Hypothese wird heute davon ausgegangen, dass wohl auch eine Hyperaktivität dopaminergere Systeme zur Symptomatik und zum neuronalen Zelluntergang bei Morbus Huntington beitragen kann. Der Transmitter übt seine Wirkungen über metabotrope Rezeptoren aus von denen 5 Subtypen, D1 - D5, bekannt sind, welche wiederum wegen ähnlicher pharmakologischer Eigenschaften auch in eine D1 (D1, D5)- und eine D2 (D2, D3, D4)-Unterfamilie zusammengefasst werden (Sokoloff und Schwartz 1995). Eine Schädigung striataler und corticaler Neurone kann dabei potentiell wohl über beide Untergruppen vermittelt werden. NMDA-Rezeptoren sind aber auch hier teilweise involviert. Die D1-Unterfamilie, präferentiell exprimiert in striatonigralen MSN's (Haber und Nauta 1983), steigert nämlich, ein bei Überstimulation potentiell toxischer Effekt, die NMDA-Rezeptoraktivität z.B. mittels cAMP abhängiger Phosphorylierung (Blank, Nijholt *et al.* 1997), wie auch durch die Förderung eines vermehrten Einbaus dieser Liganden gesteuerten Ionenkanäle in die postsynaptische Membran (Dunah und Standaert 2001). Rezeptoren der D2-Unterfamilie, dominierend in striatopallidalen MSN's (Haber und Nauta 1983), hemmen dagegen unter physiologischen Bedingungen zwar die NMDA-Rezeptorleitfähigkeit (Cepeda, Buchwald *et al.* 1993), können aber auch die Bildung von Aggregaten aus mutiertem Huntingtin induzieren (Charvin, Vanhoutte *et al.* 2005) und so die Expression antiapoptotischer Gene hemmen (Nucifora, Sasaki *et al.* 2001). Der im Verlauf des Morbus Huntington transient erhöhte Dopamin-Spiegel wird möglicherweise durch den Untergang der MSN's mitbedingt (Raymond,

Andre *et al.* 2011). Letztere innervieren auch die Substantia nigra pars compacta (Bolam und Smith 1990) und ein Wegfall dortiger GABAerger Hemmung an Zellkörpern nigrostriataler Projektionsneurone kann prinzipiell die Dopaminfreisetzung im Striatum steigern (Paladini und Tepper 1999). In Analogie zum Glutamat sinkt das Dopamin im Tiermodell mit dem Fortschreiten der Erkrankung allerdings ebenfalls stark ab (Johnson, Rajan *et al.* 2006). Mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie konnte bei Menschen darüber hinaus gezeigt werden, dass es mit zunehmender Dauer der Erkrankung zu einem progredienten Verlust von Dopamin D1- und D2-Rezeptoren im Striatum kommt (Andrews, Weeks *et al.* 1999; van Oostrom, Dekker *et al.* 2009), ein Befund vereinbar mit, aber nicht beweisend für eine späte Degeneration auch des nigrostriatalen Dopamin-Systems.

Interessanterweise scheint die Gruppe der striatopallidalen MSN's bei Morbus Huntington besonders vulnerabel zu sein. Ein Verlust entsprechender spezifischer „Marker“, z.B. von Met-Enkephalin, fand sich in post mortem Untersuchungen der Gehirne von IT15-Mutationsträgern bereits vor Ausbruch der Symptomatik (Albin, Reiner *et al.* 1992). Striatonigrale, das Neuropeptid Substanz P exprimierende, MSN's sind dagegen in geringerem Ausmaß und erst später im Verlauf betroffen (Reiner, Albin *et al.* 1988). Die unter 5.4 erwähnte massivere Innervation mit glutamatergen corticostriatalen Afferenzen (Reiner, Jiao *et al.* 2003; Raymond, Andre *et al.* 2011) mag ursächlich für die höhere Empfindlichkeit der striatopallidalen Neurone sein, für deren glutamaterge Synapsen inzwischen auch eine, im Vergleich zu den striatonigralen MSN's, höhere Freisetzung-Wahrscheinlichkeit, bei gleichzeitig größerer Amplitude der NMDA-Rezeptor vermittelten EPSC's, nachgewiesen werden konnte (Kreitzer und Malenka 2007). Wie dem auch sei, die differentielle Vulnerabilität der striatalen Projektionsneurone führte zu einer Hypothese, nach der, die bei Morbus Huntington zunächst auftretenden hyperkinetisch, choreatischen Bewegungsstörungen, einer präferentiellen Dysfunktion und schließlich dem Untergang von striatopallidalen MSN's geschuldet sind. Während die im Spätstadium der Erkrankung auftretende Hypokinese / Akinese und möglicherweise auch Dystonie auf der zusätzlichen Fehlfunktion und dem Verlust von striatonigralen MSN's beruht (Abbildung 18; [Albin, Reiner *et al.* 1990]).

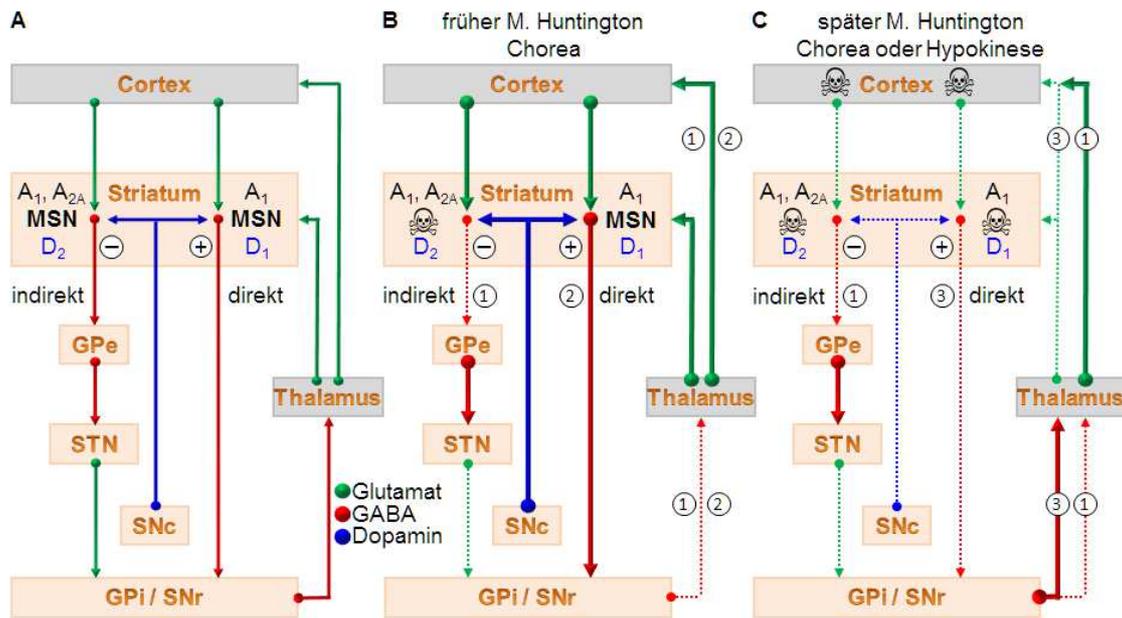


Abb. 18: Hypothesen zur Funktion der motorischen Basalganglienschleife im intakten Gehirn und bei Morbus Huntington. [A]: Vereinfachtes Schema der Basalganglienschaltung. Exzitatorische glutamaterge, inhibitorische GABAerge und modulierende dopaminerge Projektionen sind grün, rot und blau dargestellt. GABAerge MSN's stehen am Beginn zweier, funktionell antagonistischer Projektionsbahnen, deren balancierte Aktivität für eine geordnete Willkürmotorik essentiell ist. Ein direkter Weg, beteiligt an der Bahnung von Bewegungen, besteht aus zwei aufeinanderfolgenden GABAergen Verbindungen, gebildet aus Adenosin A₁-Rezeptor tragenden striatonigralen MSN's vom Striatum zu den Ausgangskernen der Basalganglien, dem internen Segment des Globus pallidus (GPI) und der Substantia nigra pars reticularis (SNr), sowie von dort weiterführenden Neuronen zum Thalamus. Glutamaterge, corticale Erregung der MSN's dieser direkten Projektion enthemmt die thalamischen Neuronen (Minderung des inhibitorischen GABAergen Inputs aus GPI und SNr) und fördert den Informationsrückfluss zum Cortex (und Striatum). Der indirekte Projektionsweg, beteiligt an der Unterdrückung von überschießenden Bewegungen, geht über striatopallidale MSN's, welche zusätzlich zu A₁- auch Adenosin A_{2A}-Rezeptoren exprimieren, zum externen Segment des Globus pallidus (GPe) und von dort weiter GABAerg zum subthalamischen Nucleus (STN), welcher seinerseits GPI und SNr glutamaterg innerviert. Aktivität in der indirekten Projektion führt zur Enthemmung des STN, Erregung von GPI / SNr und schließlich Hemmung des Thalamus. Dopaminerge Afferenzen aus der Substantia nigra pars compacta (SNc) modulieren die Aktivität der direkten und indirekten Projektionsbahnen gegensinnig über exzitatorische Dopamin-Rezeptoren der D₁- und inhibitorische Dopamin-Rezeptoren der D₂-Klasse, welche präferentiell auf striatonigralen beziehungsweise striatopallidalen MSN's exprimiert werden. [B]: Im frühen Stadium des Mb. Huntington führen initiale corticale Störungen zur exzessiven Glutamatfreisetzung im Striatum. Erhöhte striatale Glutamat- und auch Dopamin-Spiegel lösen eine selektive Degeneration striatopallidaler MSN's aus (1), wie auch eine abnorme Stimulation striatonigraler MSN's (2). Es kommt zur Inhibition von GPI und SNr mit konsekutiver Enthemmung des Thalamus, welche für die hyperkinetischen Bewegungsstörungen (Chorea) verantwortlich gemacht wird. [C]: Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung degenerieren zunehmend auch glutamaterge corticostriatale Afferenzen, ebenso wie die striatonigralen MSN's (3). Die striatale Glutamat- und Dopaminfreisetzung sinkt, die Dichte von Dopamin-Rezeptoren nimmt ab. Überwiegt die Dysfunktion im indirekten Projektionsweg besteht die Chorea fort (1). Bei dominierendem Defekt im direkten Projektionsweg stehen hypokinetische Bewegungsstörungen im Vordergrund (3).

Modifiziert nach (Graybiel 2000), (Blum, Hourez *et al.* 2003), (Andre, Cepeda *et al.* 2010) und (Raymond, Andre *et al.* 2011).

Die bisher geschilderten pathophysiologischen Veränderungen legen auch nahe, dass dopaminerge, glutamaterge und purinerge Mechanismen als prinzipielle Angriffspunkte therapeutischer Strategien angesehen werden

können. Tatsächlich wird Tetrabenzazin, welches synaptische Dopamin-Speicher durch Hemmung des vesikulären Monoamin-Transporters VMAT₂ depletiert (Howell, Shirvan *et al.* 1994), zur Behandlung hyperkinetischer Störungen bei Morbus Huntington ebenso eingesetzt wie D2-Rezeptor antagonistische Neuroleptika (Übersicht in [Adam und Jankovic 2008]). Abb. 18 [B] sagt unter diesen Umständen ja auch eine verbesserte Kontrolle des disinhibierten Thalamus voraus. Eine mögliche Linderung der Chorea-Symptomatik wird allerdings mit Nebenwirkungen wie z.B. Depression (Tetrabenzazin) oder Sedierung, tardive Dyskinesie und Verschlechterung kognitiver und affektiver Symptome erkauft (Neuroleptika), die den Einsatz limitieren können (Adam und Jankovic 2008; Andre, Cepeda *et al.* 2010).

Klinische Studien mit NMDA-Rezeptor antagonistischen Substanzen wie Amantadin, Ketamin und Remacemid zeigen bisher allerdings entweder keinen (Amantadin [O'Suilleabhain und Dewey 2003]), einen nur moderaten (Amantadin [Lucetti, Del Dotto *et al.* 2003]; Remacemid [Kieburtz, Feigin *et al.* 1996]), oder sogar einen verschlechternden Einfluss auf die hyperkinetische Symptomatik (Ketamin [Mestre, Ferreira *et al.* 2009]), bei möglichen Nebenwirkungen wie z.B. Halluzinationen, Schlaflosigkeit, Agitiertheit, Konfusion und gastrointestinale Störungen (Kieburtz, Feigin *et al.* 1996; O'Suilleabhain und Dewey 2003).

Auch zur möglichen Adressierung von Adenosin-Rezeptoren im Rahmen des Morbus Huntington liegen Daten vor. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass Veränderungen der Aktivität des A_{2A}-Subtyps in der Pathophysiologie dieser Erkrankung eine prominente Rolle spielen. So wird bei Patienten, wie auch im Tiermodell, schon vor dem Auftreten motorischer Störungen eine Abnahme von dessen Expression beobachtet (Glass, Faull *et al.* 1996; Cha, Frey *et al.* 1999; Tarditi, Camurri *et al.* 2006) und ein Polymorphismus des entsprechenden Gens (ADOR2A) korreliert mit einem, auf das Lebensalter bezogenen, früheren Ausbruch der Symptomatik (Dhaenens, Burnouf *et al.* 2009), was zunächst einen Einsatz von Rezeptor-Agonisten nahelegen mag. Allerdings ist die Ergebnislage, gewonnen aus Untersuchungen an transgenen Mausmodellen, widersprüchlich. Berichtet wurde sowohl eine Besserung (Chou, Lee *et al.* 2005), als auch eine Verschlechterung der motorischen Koordination (Domenici, Scattoni *et al.*

2007). Letzteres freilich kam aus theoretischen Erwägungen nicht ganz unerwartet. A_{2A} -Rezeptoren hemmen selektiv an striatopallidalen MSN's die Leitfähigkeit von NMDA-Rezeptoren (Norenberg, Wirkner *et al.* 1997), ein Effekt welcher in den symptomatischen Stadien der Erkrankung, gemäß des gängigen pathophysiologischen Erklärungsmodells, die Disinhibition thalamischer Neurone und so die Hyperkinesie / Chorea verstärken würde (vergleiche Abb. 18, B, C). Eine weitere Folge der Aktivierung von A_{2A} -Rezeptoren ist die Freisetzung von Glutamat aus corticostriatalen Afferenzen (Popoli, Betto *et al.* 1995), ein Grund dafür, dass hohe Konzentrationen von Adenosin mit Überaktivierung dieser Rezeptoren neurotoxische Wirkungen zeigten (Jacobson, Hoffmann *et al.* 1999; Popoli, Blum *et al.* 2008). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise darauf, dass sie an den MSN's in Gegenwart von mutiertem Huntingtin ein aberrant verstärktes Koppeln an die Adenylatcyclase aufweisen (Varani, Rigamonti *et al.* 2001) und zusätzlich auch zur Mikroglia-Aktivierung beitragen (Kust, Biber *et al.* 1999). Vorgänge welche die striatale Neurodegeneration weiter begünstigen könnten (Varani, Rigamonti *et al.* 2001; Blum, Hourez *et al.* 2003). Von daher wäre nun eigentlich zu erwarten, dass A_{2A} -Rezeptor-Antagonisten protektive Effekte bei Morbus Huntington aufweisen. In vitro Untersuchungen deuteten allerdings früh darauf hin, dass dies nur für die Blockade von präsynaptischen Rezeptoren mit der Konsequenz einer reduzierten Glutamatfreisetzung zutrifft, während die gleichzeitig unvermeidbare Hemmung der postsynaptischen A_{2A} -Rezeptoren neurotoxische Effekte von exogen appliziertem NMDA eher verstärkte (Tebano, Pintor *et al.* 2004). Die Entthemung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren an striatopallidalen MSN's (Norenberg, Wirkner *et al.* 1997) wäre eine mögliche, wenn auch spekulative, Erklärung hierfür. Da zudem die Ausschaltung des ADOR2A-Gens sowohl die Überlebensdauer, als auch die motorischen Defizite in Huntington-Mäusen verschlechterte (Mievis, Blum *et al.* 2011) und, darüber hinaus, in den Basalganglien von menschlichen Huntington-Gehirnen, abhängig vom Erkrankungsstadium, ein Totalverlust der Bindung von A_{2A} -Radioliganden beobachtbar war (Glass, Dragunow *et al.* 2000), scheinen A_{2A} -Rezeptoren daher gegenwärtig als eher ungeeignetes Ziel für therapeutische Interventionen bei Morbus Huntington.

Für eine mögliche Rolle von Adenosin A₁-Rezeptoren in der symptomatischen Therapie der Huntington'schen Erkrankung sind bisher nur vergleichsweise wenig Daten verfügbar. Einiges kann aber zunächst von Untersuchungen zu ischämisch / hypoxischen Hirnschädigungen abgeleitet werden, die ebenfalls mit einer massiven, Glutamat vermittelten Exzitotoxizität einhergehen (z.B. [de Mendonca, Sebastiao *et al.* 2000]). Adenosin, sowie Subtyp selektive Agonisten verminderten dabei *in vitro* neuronale Schäden, während A₁-Antagonisten dies verhinderten (Daval und Nicolas 1994; Lynch, Alexander *et al.* 1998). Auch *in vivo* reduzierten spezifische A₁-Rezeptor-Agonisten, wenn sie im Rahmen einer experimentell induzierten Vorderhirnischämie akut verabreicht wurden, den neuronalen Zellverlust und verbesserten gleichzeitig den neurologischen Status und die Überlebenschancen der Versuchstiere (von Lubitz, Dambrosia *et al.* 1988; von Lubitz und Marangos 1990). Bei chronischer Anwendung zeigte sich jedoch, wohl aufgrund der Desensibilisierung der Rezeptoren, ein vermehrter Zellverlust nach Gabe von A₁-Agonisten und, möglicherweise verursacht durch eine Hochregulierung der Rezeptorexpression, ein durch A₁-Antagonisten deutlich reduzierter Neuronenuntergang sowie ein verbessertes Überleben (Übersicht in [Jacobson, von Lubitz *et al.* 1996]). Zu den bisher bekannten Mechanismen der neuroprotektiven Effekte der A₁-Rezeptor-Agonisten im Rahmen einer Ischämie gehören eine Hemmung der Glutamatfreisetzung (z.B. [Goda, Ooboshi *et al.* 1998]), wie auch eine Hyperpolarisation der neuronalen Zellmembran (Schubert, Rudolphi *et al.* 1994). Anders als dies beim A_{2A}-Subtyp der Fall ist, sind daher, ein offensichtlicher Vorteil, prä- und postsynaptische A₁-Rezeptoren gleichermaßen in die Generierung antiexzitotoxischer Antworten involviert (Blum, Hourez *et al.* 2003). Mit Bezug auf den Morbus Huntington ergibt sich zusätzlich, dass auch die hier beschriebene hemmende Wechselwirkung zwischen A₁-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren an den MSN's, als potentiell therapeutisch ansprechbarer Bremsmechanismus der Neurodegeneration angesehen werden kann.

Dem Einsatz von A₁ Adenosin-Rezeptor-Agonisten bei der Huntington'schen Erkrankung standen bisher, neben Befürchtungen zur möglichen Induktion der Desensibilisierung (Jacobson, von Lubitz *et al.* 1996) und einer mangelnden Hirngängigkeit mancher der infrage kommenden Substanzen

(Brodie, Lee *et al.* 1987), vor allem auch Bedenken wegen der zu erwartenden, systemischen Nebenwirkungen, wie negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Effekte am Herzen (Wilbur und Marchlinski 1997), erniedrigte Plasma-Glucose-Spiegel (Merkel, Hawkins *et al.* 1995), Hypothermie (Anderson, Sheehan *et al.* 1994) und Sedierung (Guttinger, Padrun *et al.* 2005), um nur einige zu nennen, entgegen. Allerdings wurde inzwischen eine Reihe von A_1 spezifischen Substanzen mit guter Penetrationsfähigkeit über die Blut-Hirnschranke entwickelt, die gleichzeitig verminderte kardiale Effekte, wie z.B. die hypotensive Wirkung, aufweisen (Bischofberger, Jacobson *et al.* 1997; Knutsen, Lau *et al.* 1999). Eine davon, dem Adenosin ähnlich oder artverwandt (*congeneric*), das „Adenosin-Amin-Congener“ (ADAC) mit einer langen Seitenkette am Phenyl-Substituenten des N_6 -Phenyladenosins (Bischofberger, Jacobson *et al.* 1997), welches zudem neuroprotektive Wirkungen bei zerebraler Ischämie, nach akuter und auch chronischer Gabe, aufwies (Von Lubitz, Lin *et al.* 1996), wurde bereits auf eine mögliche Wirksamkeit im 3-Nitropropionsäure (3-NP) Modell des Morbus Huntington untersucht (Blum, Gall *et al.* 2002). Letztere ist ein irreversibler Hemmstoff der Succinat-Dehydrogenase, blockiert langdauernd die mitochondriale, oxidative Phosphorylierung und repliziert z.B. in Ratten einige der histologischen und motorischen Kennzeichen der humanen Erkrankung, wie z.B. eine progressive striatale Neurodegeneration einhergehend mit choreiformen und dystonen Bewegungsstörungen (Brouillet, Conde *et al.* 1999). Nach akuter Gabe an 3-NP vorbehandelten Tieren (Tag 3 bis 5 nach 3-NP), verhinderte ADAC nicht nur die schwere Dystonie der Hinterbeine, der in diesem Modell auffälligste motorische Defekt, sondern hemmte ebenso das Fortschreiten der striatalen Neurodegeneration. Wirkungen die am wahrscheinlichsten über eine Unterdrückung der glutamatergen, corticostriatalen Neurotransmission vermittelt worden waren (Blum, Gall *et al.* 2002). Wurden die Ratten allerdings bereits für 8 Tage vor der 3-NP Injektion mit ADAC vorbehandelt, ließen sich keine protektiven Effekte mehr nachweisen, wohl weil es unter diesen Bedingungen zu einer ausgeprägten Herunterregulation der striatalen A_1 -Rezeptoren kam (Blum, Gall *et al.* 2002). Dennoch zeigt das Beispiel ADAC die Richtigkeit des Prinzips. Da die bisher vorhandenen symptomatischen Behandlungsmöglichkeiten ungenügend sind

(siehe oben) und eher kausal orientierte Therapieansätze, wie eine Hemmung der Huntingtin-Aggregation oder die Zellersatztherapie mittels fetaler Stammzell-Implantation, sich noch in frühen Entwicklungsstadien befinden (Adam und Jankovic 2008; Katsuno, Tanaka *et al.* 2012), sollte die Entwicklung von Adenosin A_1 -Rezeptor modulierenden Substanzen als potentielle Therapieoption der Huntington'schen Erkrankung wohl dennoch weiter vorangetrieben werden. Dabei bieten sich Substanzen aus der Gruppe der allosterischen A_1 -Modulatoren an, wie z.B. T62 (2-Amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[β]thiophen-3-yl 4-chlorophenylmethanon; [Bruns, Fergus *et al.* 1990]), welches, so gezeigt in einem Rattenmodell der mechanischen Hypersensibilität (Allodynie), nach systemischer Gabe ausreichend in das ZNS eindringt (Pan, Xu *et al.* 2001). Diese Modulatoren aktivieren die Rezeptoren zwar nicht selbst, stabilisieren aber über eine Konformationsänderung den ternären Agonist-Rezeptor-G-Protein-Komplex. Die Folge ist eine verlängerte und verstärkte Wirkung von z.B. Adenosin (Szentmiklosi, Cseppento *et al.* ; Goblyos und Ijzerman 2009). Durch eine so möglich erscheinende Dosisreduktion, so wäre zu hoffen, ließe sich dann auch das Problem der A_1 -Rezeptordesensibilisierung reduzieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Die durch exogenes ATP gesteuerte Modulation von exzitatorischen synaptischen Signalen in striatalen Neuronen der Ratte

eingereicht von Hans-Michael Tautenhahn

angefertigt am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

betreut von Prof. Dr. med. Nörenberg

eingereicht im Mai 2013

Adenosin 5-Triphosphat (ATP) ist ein Transmitter / Ko-Transmitter des peripheren und zentralen Nervensystems. Für das Neostriatum der Ratte war bereits bekannt, dass das Nukleotid die Amplituden glutamaterger, exzitatorischer postsynaptischer Ströme („*excitatory postsynaptic currents*“, EPSC´s), abgeleitet von GABAergen Projektionsneuronen („*medium spiny*“ Neurone, MSN´s), reduzieren konnte (1). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nun die Mechanismen hinter diesem Hemmeffekt aufzuklären. Verwendet wurde dazu die *patch clamp* Methode. Untersuchungsobjekt waren elektrophysiologisch charakterisierte MSN´s in akuten Schnittpräparaten, hergestellt aus dem Striatum von Wistar-Ratten.

Folgende Schlüsselbefunde wurden erhoben:

1. Isolierte glutamaterge EPSC´s in Antwort auf intrastriatale Feldreizung, an den MSN´s unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Mg^{2+} -freie Badlösung, Haltepotential = Cl^- -Gleichgewichtspotential = -61 mV) exklusiv vermittelt über ionotrope Glutamat-Rezeptoren vom *N*-methyl-D-Aspartat (NMDA oder GluN)- und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA oder GluA)-Typ, wurden sowohl durch superfundiertes ATP, wie auch durch Adenosin supprimiert.
2. Die Effekte etwa gleich stark wirksamer Konzentrationen von ATP (300 μ M) und Adenosin (30 μ M), die beide eine etwa 60%ige Hemmung der EPSC-Amplituden auslösten, wurden durch den nicht selektiven Adenosin (P1)-Rezeptor-Antagonisten 8-(*p*-Sulfophenyl)Theophyllin

- (100 μM) stark abgeschwächt (ATP), beziehungsweise aufgehoben (Adenosin). Gleiches fand sich für 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX, 0.3 μM), ein selektiver Hemmstoff am A_1 -Subtyp der Adenosin-Rezeptoren. Chlorostyryl-Coffein (3 μM), ein A_{2A} -Rezeptor spezifischer Hemmstoff, war hingegen unwirksam.
3. Die ATP (P2)-Rezeptor-Antagonisten Suramin, Pyridoxalphosphat-azophenyl-disulfonsäure (PPADS) und Reaktiv Blau-2 (in jeweils 30 und 100 $\mu\text{molarer}$ Konzentration) beeinflussten die Hemmwirkung von ATP (und Adenosin) auf die EPSC-Amplituden nicht.
 4. Die residuale Hemmung der EPSC's durch ATP in Gegenwart von DPCPX (in etwa 30%ige Reduktion) wurde durch gleichzeitige Blockade von NMDA-Rezeptoren (mittels 2-Amino-5-phosphono-valerat, 50 μM), nicht aber durch die von AMPA-Rezeptoren (mittels 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzol[f]quinoxalin, 10 μM) komplett aufgehoben.
 5. ATP hemmte nur die Membranströme, welche an den MSN's durch fokale Applikation von NMDA (100 μM) ausgelöst wurden. Durch AMPA (100 μM) hervorgerufene Stromantworten blieben hingegen unbeeinflusst. Adenosin hingegen zeigte keine vergleichbaren Effekte, die NMDA- und AMPA-Rezeptorleitfähigkeit blieb unbeeinflusst.
 6. Die ATP induzierte Inhibition der MSN-Stromantworten auf exogenes NMDA wurde durch DPCPX, nicht aber P2-Rezeptor-Antagonisten (Suramin, PPADS) verhindert.

Exogenes ATP wirkt auf die glutamaterge Neurotransmission zu den MSN's offensichtlich ausschließlich in Form seines Metaboliten Adenosin, so die wahrscheinlichste Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen. Seine indirekten Wirkungen werden dabei hoch wahrscheinlich über Adenosin-Rezeptoren vom A_1 -Subtyp vermittelt. Diese sitzen zum einen an glutamatergen Axonendigungen und werden auch durch exogenes Adenosin aktiviert. Die Folge ist dann eine verminderte Freisetzung von Glutamat. Neu ist der funktionelle Nachweis von postsynaptischen A_1 -Rezeptoren an den GABAergen Projektionsneuronen selbst. Ihre Aktivierung erfordert augenscheinlich eine lokale Dephosphorylierung von ATP. Superfundiertes

Adenosin erreicht diese Rezeptoren wohl aufgrund der bekannt hohen Dichte striataler Nukleosid-Transporter nicht (2, 3). Die hier beschriebene negative Interaktion zwischen A₁- und NMDA-Rezeptoren mag unter physiologischen Bedingungen zur Modulation des Informationsflusses über die „*medium spiny*“ Neurone zu den nachgeschalteten Kernen der Basalganglienschleife dienen. Die A₁-Rezeptoren selbst stellen aber ebenfalls ein potentiell attraktives Ziel zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei Basalganglienerkrankungen dar. Zu denken ist hier vor allem an den Morbus Huntington, in dessen Verlauf es zum striatalen Glutamat-Exzess mit NMDA-Rezeptor vermitteltem, exzitotoxischem Untergang der MSN's kommt (z.B. 4).

- (1) Mihael Pesic, Elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle des Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) als extrazellulärer Botenstoff im Striatum der Ratte, Dissertation, Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig 2006.
- (2) Anderson, C. M., S. A. Baldwin, et al. (1999). "Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **70**(2): 293-7.
- (3) Anderson, C. M., W. Xiong, et al. (1999). "Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain." *J Neurochem* **73**(2): 867-73.
- (4) Blum, D., R. Horez, et al. (2003). "Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics." *Lancet Neurol* **2**(6): 366-74.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, et al. (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**(3): 281-341.
- Adam, O. R. and J. Jankovic (2008). "Symptomatic treatment of Huntington disease." Neurotherapeutics **5**(2): 181-97.
- Albin, R. L., A. Reiner, et al. (1992). "Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease." Ann Neurol **31**(4): 425-30.
- Albin, R. L., A. Reiner, et al. (1990). "Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia." Ann Neurol **27**(4): 357-65.
- Alexander, S. P. and M. Reddington (1989). "The cellular localization of adenosine receptors in rat neostriatum." Neuroscience **28**(3): 645-51.
- Alzheimer, A. (1911). Über die anatomische Grundlage der Huntingtonschen Chorea und der choreatischen Bewegungen überhaupt, Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie.
- Amadio, S., C. Montilli, et al. (2007). "Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study." Purinergic Signal **3**(4): 389-98.
- Ambrosio, A. F., J. O. Malva, et al. (1996). "Modulation of Ca²⁺ channels by activation of adenosine A1 receptors in rat striatal glutamatergic nerve terminals." Neurosci Lett **220**(3): 163-6.
- Anderson, C. M., S. A. Baldwin, et al. (1999). "Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain." Brain Res Mol Brain Res **70**(2): 293-7.
- Anderson, C. M., W. Xiong, et al. (1999). "Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain." J Neurochem **73**(2): 867-73.
- Anderson, R., M. J. Sheehan, et al. (1994). "Characterization of the adenosine receptors mediating hypothermia in the conscious mouse." Br J Pharmacol **113**(4): 1386-90.
- Andre, V. M., C. Cepeda, et al. (2010). "Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act." CNS Neurosci Ther **16**(3): 163-78.
- Andrews, T. C., R. A. Weeks, et al. (1999). "Huntington's disease progression. PET and clinical observations." Brain **122 (Pt 12)**: 2353-63.
- Armstrong, J. N., T. B. Brust, et al. (2002). "Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase." J Neurosci **22**(14): 5938-45.
- Atkinson, L., T. F. Batten, et al. (2004). "Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS." Neuroscience **123**(3): 761-8.
- Bähr, M., M. Frotscher, et al. (2003). Duus' neurologisch-topische Diagnostik : Anatomie, Funktion, Klinik. [Stuttgart], Thieme.

- Barry, P. H. (1994). "JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements." J Neurosci Methods **51**(1): 107-16.
- Bischofberger, N., K. A. Jacobson, et al. (1997). "Adenosine A1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders." Ann N Y Acad Sci **825**: 23-9.
- Blank, T., I. Nijholt, et al. (1997). "The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14859-64.
- Blum, D., D. Gall, et al. (2002). "The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity." J Neurosci **22**(20): 9122-33.
- Blum, D., R. Horez, et al. (2003). "Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics." Lancet Neurol **2**(6): 366-74.
- Bo, X., L. H. Jiang, et al. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." Mol Pharmacol **63**(6): 1407-16.
- Boison, D., J. F. Chen, et al. (2010). "Adenosine signaling and function in glial cells." Cell Death Differ **17**(7): 1071-82.
- Bolam, J. P. and Y. Smith (1990). "The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat." Brain Res **529**(1-2): 57-78.
- Bowser, D. N. and B. S. Khakh (2007). "Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 4212-7.
- Breitenstein, C., D. Van Lancker, et al. (2001). "Impaired perception of vocal emotions in Parkinson's disease: influence of speech time processing and executive functioning." Brain Cogn **45**(2): 277-314.
- Brodie, M. S., K. Lee, et al. (1987). "Central versus peripheral mediation of responses to adenosine receptor agonists: evidence against a central mode of action." Brain Res **415**(2): 323-30.
- Brouillet, E., F. Conde, et al. (1999). "Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals." Prog Neurobiol **59**(5): 427-68.
- Bruns, R. F., J. H. Fergus, et al. (1990). "Structure-activity relationships for enhancement of adenosine A1 receptor binding by 2-amino-3-benzoylthiophenes." Mol Pharmacol **38**(6): 950-8.
- Buchthal, F., A. Deutsch, et al. (1948). "Phosphorylation of myosin by adenosine triphosphate." Nature **162**(4129): 965.
- Burnstock, G. (1978). A basic for distinguishing two types of purinergic receptors. New York, Raven Press.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." Physiol Rev **87**(2): 659-797.
- Burnstock, G., G. Campbell, et al. (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**(4): 668-88.

- Burnstock, G., U. Krugel, et al. (2011). "Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function." Prog Neurobiol **95**(2): 229-74.
- Calabresi, P., D. Centonze, et al. (2000). "Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration." Prog Neurobiol **61**(3): 231-65.
- Calabresi, P., D. Centonze, et al. (1997). "Endogenous adenosine mediates the presynaptic inhibition induced by aglycemia at corticostriatal synapses." J Neurosci **17**(12): 4509-16.
- Calabresi, P., N. Mercuri, et al. (1987). "Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D1 receptor involvement." Neuroscience **20**(3): 757-71.
- Cepeda, C., N. A. Buchwald, et al. (1993). "Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9576-80.
- Cepeda, C., R. S. Hurst, et al. (2003). "Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease." J Neurosci **23**(3): 961-9.
- Cha, J. H., A. S. Frey, et al. (1999). "Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1386): 981-9.
- Charvin, D., P. Vanhoutte, et al. (2005). "Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12218-23.
- Chou, S. Y., Y. C. Lee, et al. (2005). "CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model." J Neurochem **93**(2): 310-20.
- Ciruela, F., V. Casado, et al. (2006). "Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers." J Neurosci **26**(7): 2080-7.
- Coddou, C., Z. Yan, et al. (2011). "Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels." Pharmacol Rev **63**(3): 641-83.
- Cole, K. S. (1979). "Mostly membranes (Kenneth S. Cole)." Annu Rev Physiol **41**: 1-24.
- Collingridge, G. L., R. W. Olsen, et al. (2009). "A nomenclature for ligand-gated ion channels." Neuropharmacology **56**(1): 2-5.
- Collis, M. G., D. B. Palmer, et al. (1985). "Comparison of the potency of 8-phenyltheophylline as an antagonist at A1 and A2 adenosine receptors in atria and aorta from the guinea-pig." J Pharm Pharmacol **37**(4): 278-80.
- Coppi, E., F. Pedata, et al. (2012). "P2Y1 receptor modulation of Ca²⁺-activated K⁺ currents in medium-sized neurons from neonatal rat striatal slices." J Neurophysiol **107**(3): 1009-21.
- Costenla, A. R., A. De Mendonca, et al. (1999). "An adenosine analogue inhibits NMDA receptor-mediated responses in bipolar cells of the rat retina." Exp Eye Res **68**(3): 367-70.
- Craig, C. G., S. D. Temple, et al. (1994). "Is cyclic AMP involved in excitatory amino acid-evoked adenosine release from rat cortical slices?" Eur J Pharmacol **269**(1): 79-85.

- Craig, C. G. and T. D. White (1993). "N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release." J Neurochem **60**(3): 1073-80.
- Cull-Candy, S., S. Brickley, et al. (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 327-35.
- Cunha, R. A., P. Correia-de-Sa, et al. (1996). "Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides." Br J Pharmacol **119**(2): 253-60.
- Cunha, R. A., A. M. Sebastiao, et al. (1998). "Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors." J Neurosci **18**(6): 1987-95.
- Cunha, R. A., E. S. Vizi, et al. (1996). "Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices." J Neurochem **67**(5): 2180-7.
- Curtis, D. R., A. W. Duggan, et al. (1970). "Bicuculline and central GABA receptors." Nature **228**(5272): 676-7.
- Dale, N. and B. G. Frenguelli (2009). "Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy." Curr Neuropharmacol **7**(3): 160-79.
- Dara, C., L. Monetta, et al. (2008). "Vocal emotion processing in Parkinson's disease: reduced sensitivity to negative emotions." Brain Res **1188**: 100-11.
- Daval, J. L. and F. Nicolas (1994). "Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons." Neurosci Lett **175**(1-2): 114-6.
- de Mendonca, A., A. M. Sebastiao, et al. (1995). "Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation." Neuroreport **6**(8): 1097-100.
- de Mendonca, A., A. M. Sebastiao, et al. (2000). "Adenosine: does it have a neuroprotective role after all?" Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 258-74.
- Delaney, S. M. and J. D. Geiger (1996). "Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation." J Neurosci Methods **64**(2): 151-6.
- Delaney, S. M. and J. D. Geiger (1998). "Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism." J Pharmacol Exp Ther **285**(2): 568-72.
- Delaney, S. M., P. N. Shepel, et al. (1998). "Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals." J Pharmacol Exp Ther **285**(2): 561-7.
- Deuchars, S. A., L. Atkinson, et al. (2001). "Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems." J Neurosci **21**(18): 7143-52.
- Dhaenens, C. M., S. Burnouf, et al. (2009). "A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease." Neurobiol Dis **35**(3): 474-6.

- Ding, Z., F. Tuluc, et al. (2005). "Arg333 and Arg334 in the COOH terminus of the human P2Y1 receptor are crucial for Gq coupling." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C559-67.
- Dixon, A. K., A. K. Gubitz, et al. (1996). "Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat." Br J Pharmacol **118**(6): 1461-8.
- Domenici, M. R., M. L. Scattoni, et al. (2007). "Behavioral and electrophysiological effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 in R6/2 Huntington's disease mice." Neurobiol Dis **28**(2): 197-205.
- 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**(3): 213-37.
- Duckwitz, W., R. Hausmann, et al. (2006). "P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate." J Biol Chem **281**(51): 39561-72.
- Dumas, T. C. (2005). "Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning." Prog Neurobiol **76**(3): 189-211.
- Dunah, A. W. and D. G. Standaert (2001). "Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane." J Neurosci **21**(15): 5546-58.
- Dunwiddie, T. V. and L. Diao (1994). "Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses." J Pharmacol Exp Ther **268**(2): 537-45.
- Dunwiddie, T. V., L. Diao, et al. (1997). "Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus." J Neurosci **17**(20): 7673-82.
- Edwards, F. A., A. J. Gibb, et al. (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system." Nature **359**(6391): 144-7.
- Edwards, F. A. and A. Konnerth (1992). Methods in Enzymology. San Diego, Academic Press.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]." Klin Wochenschr **38**: 1236-9.
- Emmelin, N. and W. Feldberg (1948). "Systemic effects of adenosine triphosphate." Br J Pharmacol Chemother **3**(4): 273-84.
- Fastbom, J., A. Pazos, et al. (1987). "The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals." Neuroscience **22**(3): 813-26.
- Fastbom, J., A. Pazos, et al. (1987). "Adenosine A1 receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study." Neuroscience **22**(3): 827-39.
- Ferre, S., J. Borycz, et al. (2005). "Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses." J Integr Neurosci **4**(4): 445-64.

- Flagmeyer, I., H. L. Haas, et al. (1997). "Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro." Brain Res **778**(1): 178-85.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, et al. (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev **46**(2): 143-56.
- Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2011). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update." Pharmacol Rev **63**(1): 1-34.
- Fredholm, B. B., G. Arslan, et al. (2000). "Structure and function of adenosine receptors and their genes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 364-74.
- Fredholm, B. B. and T. V. Dunwiddie (1988). "How does adenosine inhibit transmitter release?" Trends Pharmacol Sci **9**(4): 130-4.
- Frenguelli, B. G., G. Wigmore, et al. (2007). "Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus." J Neurochem **101**(5): 1400-13.
- Frohlich, R., S. Boehm, et al. (1996). "Pharmacological characterization of P2 purinoceptor types in rat locus coeruleus neurons." Eur J Pharmacol **315**(3): 255-61.
- Glass, M., M. Dragunow, et al. (2000). "The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease." Neuroscience **97**(3): 505-19.
- Glass, M., R. L. Faull, et al. (1996). "Localisation of the adenosine uptake site in the human brain: a comparison with the distribution of adenosine A1 receptors." Brain Res **710**(1-2): 79-91.
- Goblyos, A. and A. P. Ijzerman (2009). "Allosteric modulation of adenosine receptors." Purinergic Signal **5**(1): 51-61.
- Goda, H., H. Ooboshi, et al. (1998). "Modulation of ischemia-evoked release of excitatory and inhibitory amino acids by adenosine A1 receptor agonist." Eur J Pharmacol **357**(2-3): 149-55.
- Graybiel, A. M. (1990). "Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia." Trends Neurosci **13**(7): 244-54.
- Graybiel, A. M. (2000). "The basal ganglia." Curr Biol **10**(14): R509-11.
- Group, T. H. s. D. C. R. (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group." Cell **72**(6): 971-83.
- Guidetti, P., R. E. Luthi-Carter, et al. (2004). "Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease." Neurobiol Dis **17**(3): 455-61.
- Guttinger, M., V. Padrun, et al. (2005). "Seizure suppression and lack of adenosine A1 receptor desensitization after focal long-term delivery of adenosine by encapsulated myoblasts." Exp Neurol **193**(1): 53-64.
- Haber, S. N. and W. J. Nauta (1983). "Ramifications of the globus pallidus in the rat as indicated by patterns of immunohistochemistry." Neuroscience **9**(2): 245-60.

- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hardingham, G. E., F. J. Arnold, et al. (2001). "A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication." Nat Neurosci **4**(6): 565-6.
- Hardingham, G. E., Y. Fukunaga, et al. (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**(5): 405-14.
- Hedreen, J. C., C. E. Peyser, et al. (1991). "Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease." Neurosci Lett **133**(2): 257-61.
- Heinsen, H., M. Strik, et al. (1994). "Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease." Acta Neuropathol **88**(4): 320-33.
- Henderson, G. B. and B. P. Strauss (1991). "Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump." J Biol Chem **266**(3): 1641-5.
- Hibell, A. D., K. M. Thompson, et al. (2001). "Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs." J Pharmacol Exp Ther **296**(3): 947-57.
- Higley, M. J., G. J. Soler-Llavina, et al. (2009). "Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration." Nat Neurosci **12**(9): 1121-8.
- Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." J Physiol **145**(3): 494-504.
- Howell, M., A. Shirvan, et al. (1994). "Cloning and functional expression of a tetrabenazine sensitive vesicular monoamine transporter from bovine chromaffin granules." FEBS Lett **338**(1): 16-22.
- Iglesias, R., G. Dahl, et al. (2009). "Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels"." J Neurosci **29**(21): 7092-7.
- Illes, P. and J. Alexandre Ribeiro (2004). "Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system." Eur J Pharmacol **483**(1): 5-17.
- Jacobson, K. A., C. Hoffmann, et al. (1999). "Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling." Apoptosis **4**(3): 197-211.
- Jacobson, K. A., O. Nikodijevic, et al. (1993). "8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A2-adenosine antagonist in vitro and in vivo." FEBS Lett **323**(1-2): 141-4.
- Jacobson, K. A., D. K. von Lubitz, et al. (1996). "Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment." Trends Pharmacol Sci **17**(3): 108-13.
- James, S. and P. J. Richardson (1993). "Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse." J Neurochem **60**(1): 219-27.
- Jarvis, M. F. and B. S. Khakh (2009). "ATP-gated P2X cation-channels." Neuropharmacology **56**(1): 208-15.
- Jenner, P., A. Mori, et al. (2009). "Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **15**(6): 406-13.

- Jiang, X., F. Tian, et al. (2005). "The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons." J Neurochem **94**(3): 713-22.
- Jiang, Z. G. and R. A. North (1991). "Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro." J Physiol **443**: 533-53.
- Johnson, M. A., V. Rajan, et al. (2006). "Dopamine release is severely compromised in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." J Neurochem **97**(3): 737-46.
- Jones, C. A., I. P. Chessell, et al. (2000). "Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues." Br J Pharmacol **129**(2): 388-94.
- Jones, C. A., C. Vial, et al. (2004). "Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype." Mol Pharmacol **65**(4): 979-85.
- Joshi, P. R., N. P. Wu, et al. (2009). "Age-dependent alterations of corticostriatal activity in the YAC128 mouse model of Huntington disease." J Neurosci **29**(8): 2414-27.
- Kao, C. Y. (1986). "Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues." Ann N Y Acad Sci **479**: 52-67.
- Katsuno, M., F. Tanaka, et al. (2012). "Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(3): 329-35.
- Kawaguchi, Y. (1993). "Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum." J Neurosci **13**(11): 4908-23.
- Kawaguchi, Y., C. J. Wilson, et al. (1995). "Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization." Trends Neurosci **18**(12): 527-35.
- Kawate, T., J. C. Michel, et al. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-8.
- Khakh, B. S. (2001). "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses." Nat Rev Neurosci **2**(3): 165-74.
- Khakh, B. S., G. Burnstock, et al. (2001). "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." Pharmacol Rev **53**(1): 107-18.
- Khakh, B. S. and R. A. North (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." Nature **442**(7102): 527-32.
- Kieburz, K., A. Feigin, et al. (1996). "A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease." Mov Disord **11**(3): 273-7.
- Kita, H. (1993). "GABAergic circuits of the striatum." Prog Brain Res **99**: 51-72.
- Klyuch, B. P., N. Dale, et al. (2012). "Deletion of ecto-5'-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release." J Neurosci **32**(11): 3842-7.
- Knutsen, L. J., J. Lau, et al. (1999). "N-substituted adenosines as novel neuroprotective A(1) agonists with diminished hypotensive effects." J Med Chem **42**(18): 3463-77.
- Kreitzer, A. C. and R. C. Malenka (2007). "Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models." Nature **445**(7128): 643-7.

- Kust, B. M., K. Biber, et al. (1999). "Regulation of K⁺ channel mRNA expression by stimulation of adenosine A_{2a}-receptors in cultured rat microglia." *Glia* **25**(2): 120-30.
- Lambrecht, G., K. Braun, et al. (2002). "Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P₂ receptor antagonists." *Curr Pharm Des* **8**(26): 2371-99.
- Landwehrmeyer, G. B., D. G. Standaert, et al. (1995). "NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum." *J Neurosci* **15**(7 Pt 2): 5297-307.
- Latini, S., C. Corsi, et al. (1995). "The source of brain adenosine outflow during ischemia and electrical stimulation." *Neurochem Int* **27**(3): 239-44.
- Latini, S., M. Pazzagli, et al. (1996). "A₂ adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system." *Gen Pharmacol* **27**(6): 925-33.
- Latini, S. and F. Pedata (2001). "Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations." *J Neurochem* **79**(3): 463-84.
- Lees, G. J. and W. Leong (1993). "Differential effects of NBQX on the distal and local toxicity of glutamate agonists administered intra-hippocampally." *Brain Res* **628**(1-2): 1-7.
- Leonard, A. S. and J. W. Hell (1997). "Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites." *J Biol Chem* **272**(18): 12107-15.
- Leveille, F., F. El Gaamouch, et al. (2008). "Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors." *Faseb J* **22**(12): 4258-71.
- Lievens, J. C., B. Woodman, et al. (2001). "Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice." *Neurobiol Dis* **8**(5): 807-21.
- Liu, H. T., R. Z. Sabirov, et al. (2008). "Oxygen-glucose deprivation induces ATP release via maxi-anion channels in astrocytes." *Purinergic Signal* **4**(2): 147-54.
- Liu, Y., T. P. Wong, et al. (2007). "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo." *J Neurosci* **27**(11): 2846-57.
- Lovatt, D., Q. Xu, et al. (2012). "Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(16): 6265-70.
- Lu, Y., H. J. Chung, et al. (2003). "NMDA receptor-mediated extracellular adenosine accumulation in rat forebrain neurons in culture is associated with inhibition of adenosine kinase." *Eur J Neurosci* **17**(6): 1213-22.
- Lucetti, C., P. Del Dotto, et al. (2003). "IV amantadine improves chorea in Huntington's disease: an acute randomized, controlled study." *Neurology* **60**(12): 1995-7.
- Lynch, J. J., 3rd, K. M. Alexander, et al. (1998). "Inhibition of adenosine kinase during oxygen-glucose deprivation in rat cortical neuronal cultures." *Neurosci Lett* **252**(3): 207-10.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron* **44**(1): 5-21.

- Malmivuo, J. and R. Plonsey (1995). Bioelectromagnetism. New York, Oxford University Press, Inc.
- Martin, E. D., M. Fernandez, et al. (2007). "Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission." Glia **55**(1): 36-45.
- Masino, S. A., L. Diao, et al. (2002). "Modulation of hippocampal glutamatergic transmission by ATP is dependent on adenosine a(1) receptors." J Pharmacol Exp Ther **303**(1): 356-63.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook, et al. (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-3.
- Melani, A., C. Corsi, et al. (1999). "Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat." Eur J Pharmacol **385**(1): 15-9.
- Mendoza-Fernandez, V., R. D. Andrew, et al. (2000). "ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices." J Pharmacol Exp Ther **293**(1): 172-9.
- Merkel, L. A., E. D. Hawkins, et al. (1995). "Cardiovascular and antilipolytic effects of the adenosine agonist GR79236." Pharmacology **51**(4): 224-36.
- Mestre, T., J. Ferreira, et al. (2009). "Therapeutic interventions for symptomatic treatment in Huntington's disease." Cochrane Database Syst Rev(3): CD006456.
- Mievis, S., D. Blum, et al. (2011). "A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease." Neurobiol Dis **41**(2): 570-6.
- Mihich, E., D. A. Clarke, et al. (1954). "Effect of adenosine analogs on isolated intestine and uterus." J Pharmacol Exp Ther **111**(3): 335-42.
- Minneman, K. P., M. Quik, et al. (1978). "Receptor-linked cyclic AMP systems in rat neostriatum: differential localization revealed by kainic acid injection." Brain Res **151**(3): 507-21.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-40.
- Mori, M., C. Heuss, et al. (2001). "Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures." J Physiol **535**(Pt 1): 115-23.
- Nedeljkovic, N., A. Banjac, et al. (2003). "Ecto-ATPase and ecto-ATP-diphosphohydrolase are co-localized in rat hippocampal and caudate nucleus synaptic plasma membranes." Physiol Res **52**(6): 797-804.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Netter, F. (1999). Atlas der Anatomie des Menschen. East Hanover, USA, Thieme.
- Norenberg, W. and P. Illes (2000). "Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 324-39.
- Norenberg, W., K. Wirkner, et al. (1997). "Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones." Br J Pharmacol **122**(1): 71-80.

- Nucifora, F. C., Jr., M. Sasaki, et al. (2001). "Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity." Science **291**(5512): 2423-8.
- O'Suilleabhain, P. and R. B. Dewey, Jr. (2003). "A randomized trial of amantadine in Huntington disease." Arch Neurol **60**(7): 996-8.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, et al. (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." Mov Disord **23 Suppl 3**: S548-59.
- Okada, Y. (2012). Patch clamp techniques : from beginning to advanced protocols. Tokyo [u.a.], Springer.
- Okamoto, S., M. A. Pouladi, et al. (2009). "Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin." Nat Med **15**(12): 1407-13.
- Oliveira, J. F., T. Riedel, et al. (2011). "Rodent cortical astroglia express in situ functional P2X7 receptors sensing pathologically high ATP concentrations." Cereb Cortex **21**(4): 806-20.
- Ongini, E. and B. B. Fredholm (1996). "Pharmacology of adenosine A2A receptors." Trends Pharmacol Sci **17**(10): 364-72.
- Ormond, S. J., N. P. Barrera, et al. (2006). "An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum." Mol Pharmacol **69**(5): 1692-700.
- Ortinou, S., B. Laube, et al. (2003). "ATP inhibits NMDA receptors after heterologous expression and in cultured hippocampal neurons and attenuates NMDA-mediated neurotoxicity." J Neurosci **23**(12): 4996-5003.
- Pak, M. A., H. L. Haas, et al. (1994). "Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices." Neuropharmacology **33**(9): 1049-53.
- Pakhotin, P. and E. Bracci (2007). "Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum." J Neurosci **27**(2): 391-400.
- Paladini, C. A. and J. M. Tepper (1999). "GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo." Synapse **32**(3): 165-76.
- Pan, H. L., Z. Xu, et al. (2001). "Allosteric adenosine modulation to reduce allodynia." Anesthesiology **95**(2): 416-20.
- Pang, Z. P., P. Deng, et al. (2002). "Depression of fast excitatory synaptic transmission in large aspiny neurons of the neostriatum after transient forebrain ischemia." J Neurosci **22**(24): 10948-57.
- Papadia, S., F. X. Soriano, et al. (2008). "Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses." Nat Neurosci **11**(4): 476-87.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (1993). "Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia." Trends Neurosci **16**(3): 111-6.
- Park, M. R., J. W. Lighthall, et al. (1980). "Recurrent inhibition in the rat neostriatum." Brain Res **194**(2): 359-69.

- Parkinson, F. E. and W. Xiong (2004). "Stimulus- and cell-type-specific release of purines in cultured rat forebrain astrocytes and neurons." J Neurochem **88**(5): 1305-12.
- Pascual, O., K. B. Casper, et al. (2005). "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." Science **310**(5745): 113-6.
- Paxinos, G. (1995). The rat nervous system. San Diego, Calif. [u.a.], Academic Press.
- Pearson, T., F. Nuritova, et al. (2001). "A depletable pool of adenosine in area CA1 of the rat hippocampus." J Neurosci **21**(7): 2298-307.
- Pedata, F., M. Pazzagli, et al. (1990). "Regional differences in the electrically stimulated release of endogenous and radioactive adenosine and purine derivatives from rat brain slices." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **342**(4): 447-53.
- Peng, L., R. Huang, et al. (2005). "Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes." Glia **52**(1): 25-35.
- Peoples, R. W. and C. Li (1998). "Inhibition of NMDA-gated ion channels by the P2 purinoceptor antagonists suramin and reactive blue 2 in mouse hippocampal neurones." Br J Pharmacol **124**(2): 400-8.
- Pesic, M. (2006). Elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle des Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) als extrazellulärer Botenstoff im Striatum der Ratte. Leipzig, Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. **Dr. med.**
- Phillis, J. W. (1990). "The selective adenosine A2 receptor agonist, CGS 21680, is a potent depressant of cerebral cortical neuronal activity." Brain Res **509**(2): 328-30.
- Popoli, P., P. Betto, et al. (1995). "Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats." Eur J Pharmacol **287**(2): 215-7.
- Popoli, P., D. Blum, et al. (2008). "A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease." Curr Pharm Des **14**(15): 1500-11.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-92.
- Raymond, L. A., V. M. Andre, et al. (2011). "Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function." Neuroscience **198**: 252-73.
- Reiner, A., R. L. Albin, et al. (1988). "Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5733-7.
- Reiner, A., Y. Jiao, et al. (2003). "Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats." J Comp Neurol **457**(4): 420-40.
- Reshkin, S. J., L. Guerra, et al. (2000). "Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells." J Membr Biol **178**(2): 103-13.
- Richardson, P. J., S. J. Brown, et al. (1987). "Ectoenzymes control adenosine modulation of immunisolated cholinergic synapses." Nature **327**(6119): 232-4.
- Rivkees, S. A., S. L. Price, et al. (1995). "Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia." Brain Res **677**(2): 193-203.

- Rodrigues, R. J., T. Almeida, et al. (2005). "Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus." J Neurosci **25**(27): 6286-95.
- Rosenberg, P. A. and M. A. Dichter (1989). "Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture." J Neurosci **9**(8): 2654-63.
- Rosenberg, P. A. and Y. Li (1995). "Vasoactive intestinal peptide regulates extracellular adenosine levels in rat cortical cultures." Neurosci Lett **200**(2): 93-6.
- Roseth, S., E. M. Fykse, et al. (1998). "Uptake of L-glutamate into synaptic vesicles: competitive inhibition by dyes with biphenyl and amino- and sulphonic acid-substituted naphthyl groups." Biochem Pharmacol **56**(9): 1243-9.
- Sala-Newby, G. B., A. C. Skladanowski, et al. (1999). "The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I." J Biol Chem **274**(25): 17789-93.
- Scheibler, P., M. Pesic, et al. (2004). "P2X2 and P2Y1 immunofluorescence in rat neostriatal medium-spiny projection neurones and cholinergic interneurons is not linked to respective purinergic receptor function." Br J Pharmacol **143**(1): 119-31.
- Schiffmann, S. N., O. Jacobs, et al. (1991). "Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study." J Neurochem **57**(3): 1062-7.
- Schotanus, S. M., B. B. Fredholm, et al. (2006). "NMDA depresses glutamatergic synaptic transmission in the striatum through the activation of adenosine A1 receptors: evidence from knockout mice." Neuropharmacology **51**(2): 272-82.
- Schubert, P., K. A. Rudolphi, et al. (1994). "Modulation of nerve and glial function by adenosine--role in the development of ischemic damage." Int J Biochem **26**(10-11): 1227-36.
- Schwarzschild, M. A., L. Agnati, et al. (2006). "Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease." Trends Neurosci **29**(11): 647-54.
- Shahar, A. (1993). A dissection and tissue culture manual of the nervous system. New York [u.a.], Wiley-Liss.
- Shinozuka, K., R. A. Bjur, et al. (1988). "Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **338**(3): 221-7.
- Sieghart, W. (1989). "Multiplicity of GABAA--benzodiazepine receptors." Trends Pharmacol Sci **10**(10): 407-11.
- Skeberdis, V. A., V. Chevalere, et al. (2006). "Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors." Nat Neurosci **9**(4): 501-10.
- Smith, A. D., D. J. Cheek, et al. (1997). "Competition of adenine nucleotides for a 1,3-[3H]-dipropyl-8-cyclopentylxanthine binding site in rat vas deferens." Clin Exp Pharmacol Physiol **24**(7): 492-7.
- Sokoloff, P. and J. C. Schwartz (1995). "Novel dopamine receptors half a decade later." Trends Pharmacol Sci **16**(8): 270-5.

- Soriano, F. X., M. A. Martel, et al. (2008). "Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand." J Neurosci **28**(42): 10696-710.
- Stefani, A., Q. Chen, et al. (1998). "Physiological and molecular properties of AMPA/Kainate receptors expressed by striatal medium spiny neurons." Dev Neurosci **20**(2-3): 242-52.
- Stoner, H. B. and H. N. Green (1950). "Studies on the role of the adrenal cortex in adenosine triphosphate shock." Br J Exp Pathol **31**(5): 603-14.
- Studer, F. E., D. E. Fedele, et al. (2006). "Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme." Neuroscience **142**(1): 125-37.
- Suadicani, S. O., C. F. Brosnan, et al. (2006). "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling." J Neurosci **26**(5): 1378-85.
- Szentmiklosi, A. J., A. Cseppento, et al. "Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs." Curr Med Chem **18**(8): 1164-87.
- Szydlowska, K. and M. Tymianski (2010). "Calcium, ischemia and excitotoxicity." Cell Calcium **47**(2): 122-9.
- Tai, Y. F., N. Pavese, et al. (2007). "Imaging microglial activation in Huntington's disease." Brain Res Bull **72**(2-3): 148-51.
- Tarditi, A., A. Camurri, et al. (2006). "Early and transient alteration of adenosine A2A receptor signaling in a mouse model of Huntington disease." Neurobiol Dis **23**(1): 44-53.
- Tautenhahn, M., A. Leichsenring, et al. (2012). "Purinergic modulation of the excitatory synaptic input onto rat striatal neurons." Neuropharmacology **62**(4): 1756-66.
- Tebano, M. T., A. Pintor, et al. (2004). "Adenosine A2A receptor blockade differentially influences excitotoxic mechanisms at pre- and postsynaptic sites in the rat striatum." J Neurosci Res **77**(1): 100-7.
- Tepper, J. M. and J. P. Bolam (2004). "Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons." Curr Opin Neurobiol **14**(6): 685-92.
- Thorn, J. A. and S. M. Jarvis (1996). "Adenosine transporters." Gen Pharmacol **27**(4): 613-20.
- Tozzi, A., A. de Lure, et al. (2011). "The distinct role of medium spiny neurons and cholinergic interneurons in the D/AA receptor interaction in the striatum: implications for Parkinson's disease." J Neurosci **31**(5): 1850-62.
- Trendelenburg, A. U. and R. Bultmann (2000). "P2 receptor-mediated inhibition of dopamine release in rat neostriatum." Neuroscience **96**(2): 249-52.
- van Oostrom, J. C., M. Dekker, et al. (2009). "Changes in striatal dopamine D2 receptor binding in pre-clinical Huntington's disease." Eur J Neurol **16**(2): 226-31.
- Varani, K., D. Rigamonti, et al. (2001). "Aberrant amplification of A(2A) receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin." Faseb J **15**(7): 1245-7.
- von der Leyen, H., W. Schmitz, et al. (1989). "Effects of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), a highly selective adenosine receptor antagonist, on force of contraction in

- guinea-pig atrial and ventricular cardiac preparations." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **340**(2): 204-9.
- von Kugelgen, I. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." Pharmacol Ther **110**(3): 415-32.
- von Kugelgen, I. and T. K. Harden (2011). "Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors." Adv Pharmacol **61**: 373-415.
- von Lubitz, D. K., J. M. Dambrosia, et al. (1988). "Cyclohexyl adenosine protects against neuronal death following ischemia in the CA1 region of gerbil hippocampus." Stroke **19**(9): 1133-9.
- Von Lubitz, D. K., R. C. Lin, et al. (1996). "Posts ischemic administration of adenosine amine congener (ADAC): analysis of recovery in gerbils." Eur J Pharmacol **316**(2-3): 171-9.
- von Lubitz, D. K. and P. J. Marangos (1990). "Cerebral ischemia in gerbils: posts ischemic administration of cyclohexyl adenosine and 8-sulfophenyl-theophylline." J Mol Neurosci **2**(1): 53-9.
- Wahl, A. S., B. Buchthal, et al. (2009). "Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene Clca1 via activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors." Neuroscience **158**(1): 344-52.
- Wall, M. and N. Dale (2008). "Activity-dependent release of adenosine: a critical re-evaluation of mechanism." Curr Neuropharmacol **6**(4): 329-37.
- Walz, W. (2007). Patch-clamp analysis : advanced techniques. Totowa, NJ, Humana-Press.
- Wang, H., M. Shimoji, et al. (2003). "Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 132-9.
- Watkins, J. C. and R. H. Evans (1981). "Excitatory amino acid transmitters." Annu Rev Pharmacol Toxicol **21**: 165-204.
- Weddell, R. A. (1994). "Effects of subcortical lesion site on human emotional behavior." Brain Cogn **25**(2): 161-93.
- Westphal, R. S., S. J. Tavalin, et al. (1999). "Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex." Science **285**(5424): 93-6.
- Wilbur, S. L. and F. E. Marchlinski (1997). "Adenosine as an antiarrhythmic agent." Am J Cardiol **79**(12A): 30-7.
- Williams, K. (1993). "Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors." Mol Pharmacol **44**(4): 851-9.
- Wirkner, K., H. Assmann, et al. (2000). "Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons." Br J Pharmacol **130**(2): 259-69.
- Wirkner, K., Z. Gerevich, et al. (2004). "Adenosine A2A receptor-induced inhibition of NMDA and GABAA receptor-mediated synaptic currents in a subpopulation of rat striatal neurons." Neuropharmacology **46**(7): 994-1007.
- Wojcik, S. M. and N. Brose (2007). "Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter." Neuron **55**(1): 11-24.

- Yan, Z., A. Khadra, et al. (2010). "Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating." J Neurosci **30**(42): 14213-24.
- Yawo, H. (2012). Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols. Tokyo, Springer.
- Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-94.
- Yoshioka, K., R. Hosoda, et al. (2002). "Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains." FEBS Lett **531**(2): 299-303.
- Yoshioka, K., O. Saitoh, et al. (2001). "Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7617-22.
- Zhang, J., E. Kordecki, et al. (1988). "ATP secretion and extracellular protein phosphorylation by CNS neurons in primary culture." Brain Res Bull **21**(3): 459-64.
- Zhang, Z., G. Chen, et al. (2007). "Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis." Nat Cell Biol **9**(8): 945-53.
- Zimmermann, H. (1996). "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system." Prog Neurobiol **49**(6): 589-618.
- Zimmermann, H. (1999). "Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function." Trends Pharmacol Sci **20**(6): 231-6.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.
- Zorumski, C. F. and Y. Izumi (2012). "NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders." Neurosci Biobehav Rev **36**(3): 989-1000.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Ausland in gleicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

CURRICULUM VITAE

HANS-MICHAEL TAUTENHAHN



PERSÖNLICHE DATEN

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 19.07.1980

Geburtsort: Querfurt

Eltern: Dr. med. Gabriele Tautenhahn - Allgemeinärztin
Dr. med. Hans-Christian Tautenhahn - Chirurg und Urologe

BERUF

Assistenzarzt für Chirurgie in der Klinik für Visceral-,
Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie seit Oktober 2007

AUSBILDUNG

1987 - 1991	Grundschule	Obhausen / Sachsen Anhalt
1991 - 1999	Gymnasium	Querfurt / Sachsen Anhalt (Hochschulreife - NC: 1,9)
1999 - 2000	Zivildienst DRK	Querfurt / Sachsen Anhalt
2000 - 2007	Medizinstudium an der alma mater lipsiensis	
27.Juni 2007	Approbation als Arzt	

KLINISCHE AUSBILDUNG

Famulaturen

- 2003 Innere Medizin/ITS am Carl-von-Basedow Klinikum Merseburg/Querfurt (Dr. med. Mandok)
- 2004 Praxis für Radiologie (Drs. med. Glatzel/Hempel)
- 2004 Chirurgie und Anästhesie am Carl-von-Basedow Klinikum (Chefarzt Dr. med. Meißner)
- 2005 Chirurgie am Diakonie Krankenhaus Halle/Saale (Chefarzt Dr. med. Rose)
- 2005 Neurochirurgie am Kathmandu Model Hospital in Kathmandu/Nepal (Chefarzt Dr. med. Dital)

Praktisches Jahr (2006/2007)

1. Tertial Abteilung für Gynäkologie am St. Elisabeth Krankenhaus Leipzig (Chefärztin Dr. med. Henne)
2. Tertial Klinik und Poliklinik für Visceral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig AöR (Prof. Dr. med. Hauss)
3. Tertial A Klinik und Poliklinik für Innere Medizin am Universitätsklinikum Leipzig AöR – Notfallaufnahme (Prof. Dr. med. Mössner)
3. Tertial B Abteilung für Innere Medizin am Spital Saanen (Lehrkrankenhaus der Universität Bern)

SPRACHKENNTNISSE

- | | |
|-------------|-------------------------|
| Deutsch | Muttersprache |
| Englisch | Englisch in der Medizin |
| Französisch | Schulfranzösisch |

HOBBIES & INTERESSEN

- Radfahren
Klettern
Klassische Musik
Literatur
Computer
Forschung

Publikationen

Purinergeric modulation of the excitatory synaptic input onto rat striatal neurons.
Tautenhahn, M., A. Leichsenring, et al. (2012). Neuropharmacology 62(4): 1756-66.

Horseshoe kidney for transplantation: technical considerations.
Hau HM, Morgul HM, Uhlmann D, Thelen A, Fellmer P, Benckert C, **Tautenhahn HM**, Bartels M, Jonas S. Scand J Urol. 2013 Feb;47(1):76-9.

Liver resection for hepatocellular carcinoma in patients without cirrhosis.
Thelen A, Benckert C, **Tautenhahn HM**, Hau HM, Bartels M, Linnemann J, Bertolini J, Moche M, Wittekind C, Jonas S. Br J Surg. 2013 Jan;100(1):130-7.

[Early Results after Peripheral Vascular Replacement with Biosynthetic Collagen Prosthesis in Cases of Graft Infection.]
Fellmer PT, Wiltberger G, **Tautenhahn HM**, Matia I, Krenzien F, Jonas S. Zentralbl Chir. 2013 Jan 22.

Renal autotransplantation a possibility in the treatment of complex renal vascular diseases and ureteric injuries.
Hau HM, Bartels M, **Tautenhahn HM**, Morgul MH, Fellmer P, Ho-Thi P, Benckert C, Uhlmann D, Moche M, Thelen A, Schmelzle M, Jonas S. Ann Transplant. 2012 Dec 31;17(4):21-7.

Kidney transplant from the same donor without maintenance immunosuppression after previous hematopoietic stem cell transplant.
Fangmann J, Kathrin Al-Ali H, Sack U, Kamprad M, **Tautenhahn HM**, Faber S, Hauss J, Niederwieser D, Lindner T, Bachmann A. Am J Transplant. 2011 Jan;11(1):156-62.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich an erster Stelle bei meinen Eltern und meinen Großeltern die mir den Weg bis hierher ermöglicht haben und ohne deren Unterstützung ich es nicht bis hierher geschafft hätte.

Mein Dank gilt zudem meinem hochverehrten Doktorvater, Herrn Prof. Nörenberg für die Überlassung des Themas und die ausdauernde Betreuung insbesondere in den „zähen“ Phasen dieser Arbeit.

Ein Weiterer dem mein besonderer Dank gilt, ist mein höchst geschätzter Oberarzt PD Dr. med. Michael Bartels, der mich durch ständigen Antrieb zur Fertigstellung der Arbeit beflügelt hat.

Dank und Hochachtung der Universität Leipzig, „Forschen-Lehren-Heilen“ ist mehr als eine Losung, es ist eine Lebenseinstellung.

Nicht vergessen möchte ich all diejenigen an meiner Seite, die mich über all die Jahre unterstützt und ertragen haben.

Bilder sagen mehr als tausend Worte. Danke!

