

Der lange Weg zum ATP als extrazellulärem Signalstoff

Herbert Zimmermann

Zusammenfassung

ATP ist eines der vielseitigsten zellulären Moleküle überhaupt. Seine Rolle als extrazellulärer Signalstoff wurde erst in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts konsolidiert, mit der Klonierung der Rezeptoren (P2-Rezeptoren) und von Enzymen (Ekto-Nukleotidasen), die extrazelluläres ATP hydrolysieren können. P2-Rezeptoren können je nach Subtyp durch ATP oder durch ADP, UTP, UDP und verschiedene Diadenosinpolyphosphate aktiviert werden. ATP und andere Nucleotide werden in Subtypen synaptischer Vesikel gespeichert und können exozytotisch freigesetzt werden. Außerhalb der Zelle werden Nucleotide bis zum jeweiligen Nucleosid hydrolysiert. Extrazellulär gebildetes Adenosin aktiviert seinerseits P1-Rezeptoren und wird anschließend wieder in die Nervenendigung oder in benachbarte Zellen aufgenommen. Bis jetzt wurden mehrere Ekto-Nucleotidasen kloniert und funktionell charakterisiert. Gegenwärtig analysieren wir ihre unterschiedliche zelluläre Lokalisierung im zentralen und peripheren Nervensystem. Die selektive Expression einer der Ekto-Nucleotidasen durch Stammzellen des adulten Nagerhirns weist den Nucleotiden eine Rolle auch bei der Regulation der adulten Neurogenese zu.

Abstract

ATP represents one of the most versatile cellular compounds. The notion that it functions also as an extracellular signaling molecule was corroborated in the 90ies of the last century by the cloning of its receptors (P2 receptors) and of the enzymes (ecto-nucleotidases) that catalyze the hydrolysis of extracellular nucleotides. Depending on subtype, P2 receptors can be activated by ATP or by ADP, UTP, UDP and several diadenosine polyphosphates. ATP and other nucleotides are stored in subtypes of synaptic vesicles and they can be released by exocytosis. After release, nucleotides are hydrolyzed to the respective nucleoside. Extracellular adenosine in turn activates P1 receptors and is recycled into the nerve terminal or into adjacent cells. To date several ecto-nucleotidases have been cloned and functionally characterized. We are presently investigating their differential cellular localization in the central and peripheral nervous system. The selective expression of one of the ecto-nucleotidases by neural stem cells in the adult rodent brain supports the notion that nucleotides play a role also in the control of adult neurogenesis.

Key words: ATP; ecto-nucleotidase; microglia; neurogenesis; synaptic vesicle

Einführung

ATP gehört zu den am besten allgemein bekannten organischen Molekülen. Als Energieträger ist es an der Steuerung zahlreicher intrazellulärer Prozesse beteiligt. Dazu gehören die Bereitstellung der Energie für motorische Funktionen wie etwa bei der Aktin-Myosin-Interaktion im Rahmen der Muskelkontraktion, bei der Zellbewegung oder beim Organelltransport. ATP energetisiert Molekül- und Ionentransporte innerhalb der Zelle oder über die Plasmamembran und es liefert die Energie für die Synthese einer Unzahl biologischer Substanzen. Schließlich wird der Funktionszustand eines Großteils der Proteine durch die Übertragung von

Phosphatresten gesteuert, welche wiederum aus dem ATP stammen. Nicht zu vergessen ist seine Bedeutung bei der Synthese von Ribonucleinsäuren, in die es als Adenin-Base eingebaut wird.

ATP auch als extrazelluläre Signalsubstanz? Das würde bedeuten, dass Zellen ihre wichtigste Energiewährung nach außen abgeben, dass diese über spezifische Rezeptoren ihre Wirkung an der Zelloberfläche entfaltet und schließlich ohne weiteren energetischen Nutzen für die Zelle verloren ist – ein Gegenargument, das man auch heute noch gelegentlich zu hören bekommt. Dabei wird leicht übersehen, dass auch alle anderen Signalmoleküle innerhalb der Zelle unter Energieverbrauch hergestellt werden

müssen. Dann könnte die Zelle aber auch gleich ATP als Signalsubstanz freisetzen. Wie wir heute wissen, stellen Nucleotide (nicht nur das ATP), eine ubiquitäre Gruppe von extrazellulären Signalsubstanzen dar, im Nervensystem und in anderen Geweben. Offensichtlich wurden ATP und andere Nucleotide schon sehr früh in der Entwicklungsgeschichte als extrazelluläre Signalstoffe eingesetzt. Eine Analyse der vorhandenen Daten spricht dafür, dass Nucleotidrezeptoren bereits bei Protozoen gefunden werden und bei Invertebraten und Vertebraten gleichermaßen verbreitet sind.

Vesikuläre Speicherung und Freisetzung von ATP

Schon um 1930 wurde eine Wirkung von Adennucleotiden auf die Herzfunktion beschrieben. Dass ADP die Thrombozytenaggregation stimuliert, ist seit 40 Jahren bekannt. Von großer Bedeutung war schließlich der Nachweis, dass ATP in bestimmten sekretorischen Zellen vesikulär gespeichert und auf ein Signal hin nach außen sezerniert wird. Dazu gehören die sog. *dense bodies* der Thrombozyten oder die chromaffinen Granula der Zellen des Nebennierenmarks. Im Jahre 1974 gelang der Arbeitsgruppe von Victor Whittaker am biochemischen Institut der Universität Cambridge der Nachweis, dass ATP in hoher Konzentration in synaptischen Vesikeln gespeichert wird und zwar in den Azetylcholin-speichernden Vesikeln der Nervenendigungen, die das elektrische Organ des Zitterrochens innervieren. Heute wissen wir, dass ATP auch in synaptischen Vesikeln cholinergner Nervenendigungen des Säugers, in Noradrenalin-speichernden Vesikeln und in synaptischen Vesikeln des zentralen Nervensystems enthalten ist (Zimmermann 1994). ATP wird aus Nervenendigungen freigesetzt. Aber wo wirkt es?

Unsere ersten Versuche, Anfang der siebziger Jahre eine elektrogene Wirkung von ATP am Skelettmuskel des Frosches nachzuweisen, misslangen. Neueste Befunde zeigen, dass ATP auf Muskelfasern eine metabotrope Wirkung ausübt und die Synthese von synaptischen Enzymen wie der Azetylcholinesterase und von Azetylcholinrezeptoren stimuliert. Erfolgreicher waren frühe Untersuchungen an der glatten Muskulatur. Dort bewirkt ATP eine schnelle Depolarisation der Muskelfaser und eine nachfolgende Muskelkontraktion. Eine andere Frage war, wie ATP in die synaptischen Vesikel gelangt und ob es gegebenenfalls nach der Freisetzung abgebaut und in seinen Bestandteilen rezirkuliert wird, ähnlich wie Azetylcholin

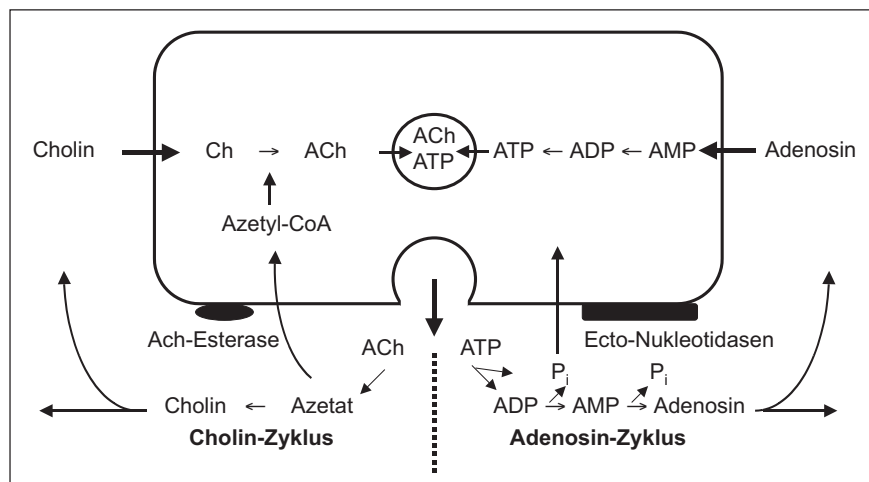


Abb. 1: Speicherung, Freisetzung und Rezirkulieren der Ko-Transmitter Azetylcholin (ACh) und ATP an einer cholinergen Synapse. Azetylcholin wird extrazellulär zu Cholin (Ch) und Acetat abgebaut, ATP zu Adenosin und Phosphat (P_i). Die Bestandteile werden in die Nervenendigung rezirkuliert und stehen für eine Neusynthese von Azetylcholin und ATP sowie eine Wiederbeladung der Vesikel zur Verfügung.

nach der Hydrolyse durch Azetylcholinesterase. In der Tat ergaben unsere an der damaligen Abteilung für Neurochemie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführten Untersuchungen, dass ATP aus synaptischen Vesikeln ausgeschüttet wird, dass es extrazellulär enzymatisch bis zum Adenosin abgebaut wird und dass das Adenosin wieder über einen hochaffinen Aufnahmemechanismus in die Nervenendigung aufgenommen wird. Die Wiederaufnahme in die Vesikel erfolgt über einen Nukleotidtransporter. Bietet man Nervenendigungen auf extrazellulärem Wege radioaktiv markiertes Adenosin, so findet man bald darauf radioaktiv markiertes ATP in den synaptischen Vesikeln. Die Ner-

venendigungen können also aufgenommenes Adenosin zum ATP rephosphorylieren und erneut vesikulär speichern. Wir kamen zu dem Schluss, dass die Nervenendigungen für ATP einen Adenosin-Zyklus besitzen, ganz analog zu dem bereits früher beschriebenen Cholin-Zyklus für das Azetylcholin (Abbildung 1). Heute gibt es zahlreiche Befunde, die eine Freisetzung von ATP auch aus nichtneuronalen Zellen des Nervengewebes belegen, z.B. aus Astrozyten, aus Endothelzellen der Blutgefäße oder aus Mikrogliazellen. Neben einer exocytotischen Freisetzung werden auch Transporter-getragene Freisetzungsmechanismen diskutiert oder die Freisetzung durch Connexin-Hemikanäle (Schwiebert 2003).

Rezeptoren für ATP und andere Nucleotide

In der Folgezeit häuften sich die Hinweise auf eine physiologische Wirkung von ATP in verschiedenen peripheren Organen und auch im Nervensystem. Pharmakologische Untersuchungen legten die Existenz von ATP-spezifischen Rezeptoren nahe. Der eigentliche Durchbruch kam schließlich im Jahre 1993 mit der Klonierung, heterologen Expression und funktionellen Charakterisierung der ersten ATP-Rezeptoren. In einem Fall handelte es sich um einen neuen Typ von Ionenkanal, der weder eine Homologie zu den Rezeptoren der Superfamilie nikotinischer Azetylcholinrezeptoren noch zu den ionotropen Glutamatrezeptoren aufwies (Schwiebert 2003). Eine Rezeptoruntereinheit besitzt lediglich zwei Transmembrandomänen mit einer großen extrazellulären Schleife, welche die ATP-Bindungsstelle besitzt. Inzwischen kennt man sieben verschiedene Untereinheiten für derartige Rezeptoren (Tabelle 1), die als P2X-Rezeptoren bezeichnet werden (P2X₁ bis P2X₇, in der Reihenfolge ihrer Beschreibung). Mit einer Ausnahme (P2X₆) können alle diese Untereinheiten funktionelle homooligomere Komplexe bilden; aber auch mehrere heterooligomere P2X-Rezeptoren wurden beschrieben. Diese Rezeptoren werden ausschließlich von ATP als endogenem Liganden aktiviert. Der Ionenkanal ist durchlässig für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-Ionen und daher besonders zu einer schnellen Signalübertragung und einer lokalen Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration befähigt. P2X-Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem weit verbreitet, wo sie eine Rolle bei der schnellen synaptischen Transmission und auch bei der Modulation der synaptischen Übertragung spielen.

Ebenfalls 1993 wurde der erste Vertreter einer weiteren Klasse von ATP-Rezeptoren kloniert, der metabotropen, G-Protein gekoppelten Nucleotid-Rezeptoren (P2Y-Rezeptoren). Dieser Rezeptorfamilie gehören inzwischen acht verschiedene Spezies an (Schwiebert 2003), die sich in ihrer Ligandenspezifität unterscheiden (Tabelle 1). In menschlichem Gewebe ist nur einer davon ein eigentlicher ATP-Rezeptor. Es gibt drei verschiedene Rezeptoren für ADP, einen für UDP und schließlich einen, der von ATP oder UTP aktiviert wird. Das jüngste Mitglied der Proteinfamilie (P2Y₁₄) erwies sich als Rezeptor für Nucleotidzucker wie UDP-Glucose. Wegen der breiten Ligandenspezifität spricht man heute generell von Nucleotidrezeptoren (P2-Rezeptoren) mit den Untergruppen P2X und P2Y. Wie die P2X-Rezeptoren sind auch die

Tab. 1: Nucleotidrezeptoren

P2X-Rezeptor (Ionenkanal)	Agonist	P2Y-Rezeptor (G-Protein gekoppelt)	Bevorzugter Agonist
Homooligomere: P2X _{1,2,3,4,5,7}	ATP	P2Y ₁	ADP
Heterooligomere :		P2Y ₂	ATP = UTP
P2X _{2/3}	ATP	P2Y ₄	UTP
P2X _{4/5}	ATP	P2Y ₆	UDP
P2X _{2/6}	ATP	P2Y ₁₁	ATP
P2X _{4/6}	ATP	P2Y ₁₂	ADP
		P2Y ₁₃	ADP
		P2Y ₁₄	UDP-Glucose

P2X-Rezeptoren sind Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-permeable Ionenkanäle, die entweder Hetero- oder Homooligomere ausbilden. Die Untereinheiten weisen je zwei Transmembrandomänen auf und sind in ihrer Membrantopographie den E-NTPDasen sehr ähnlich (vgl. Abbildung 3). P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt (vorzugsweise Adenylylcyclase oder Phospholipase C). Die Ligandenspezifität variiert gering zwischen einzelnen Spezies. Angegeben sind die Eigenschaften menschlicher Rezeptoren.



P2Y-Rezeptoren in Nervengewebe weit verbreitet und entfalten ihre Wirkung u.a. bei der Modulation synaptischer Antworten. Die neuerdings entdeckten astrozytären Kalziumwellen, eine neue Form der Erregungsausbreitung im Gehirn, werden wesentlich durch extrazellulär freigesetztes ATP und P2Y-Rezeptoren getragen.

ATP kann nicht nur über die klassischen Nukleotid-Rezeptoren wirken. Kürzlich haben wir einen bestimmten Subtyp der ionotropen Glutamaterezeptoren als ein weiteres Ziel für extrazelluläres ATP identifiziert (Ortinou et al. 2003). ATP kann NMDA-Rezeptoren inhibieren, wobei der NR2B-Untereinheit eine zentrale Rolle zukommt. Dies lässt sich sowohl an heterolog exprimierten Rezeptoren, als auch an kultivierten hippokampalen Zellen nachweisen. ATP vermindert den durch NMDA induzierten Zelltod.

Extrazellulärer Abbau, Ekto-Nukleotidasen

Schwierig gestaltete sich die Identifizierung der Enzyme, die extrazelluläre Nukleotide hydrolysieren können, der Ekto-Nukleotidasen. Als erstes klonierten wir im Jahre 1991 das Enzym, welches die Hydrolyse vom AMP zum Adenosin katalysiert, die Ekto-5'-Nukleotidase, damals noch aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens. Dieses Enzym ist über einen Glykosylphosphatidylinosit-(GPI-) Anker mit der Plasmamembran verbunden (Zimmermann 2001). Im Gehirn wird es vornehmlich von Astrozyten exprimiert. Im Säuger genom findet sich für diese Enzymspezies ein einziges Gen. Einige Jahre später (1996) gelang die erste Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines Enzyms, welches extrazelluläres ATP und ADP spalten kann (Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase, E-NTPDase). Die Erwartung, dass es mit einem Enzym getan sei, erfüllte sich nicht. Wir und andere klonierten und charakterisierten eine ganze Reihe von verwandten Enzymen, die sich in der Substratspezifität, in den gebildeten Produkten und in der zellulären Lokalisierung unterscheiden (Zimmermann 2001). Die ursprünglicheren Vertreter dieser Enzymfamilie sind intrazellulär lokalisiert, wo sie eine wichtige Rolle bei der Glykosylierung von Proteinen und Lipiden im ER bzw. Golgi-Apparat spielen dürften. Bisher sind drei Spezies bekannt, die an der Zelloberfläche liegen (NTPDase1 bis NTPDase3) (Abbildung 3). Alle drei Enzyme

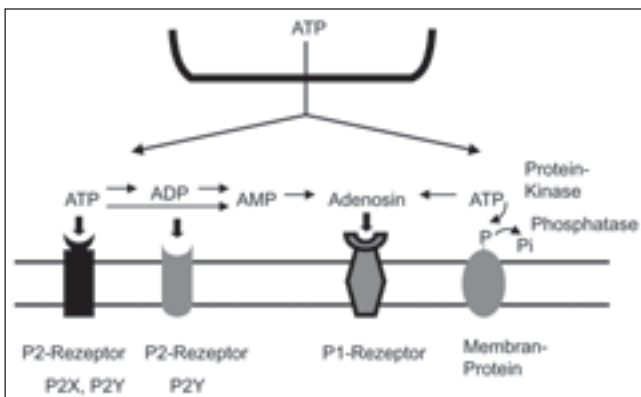


Abb. 2: Extrazellulärer Metabolismus von freigesetztem ATP und mögliche Rezeptorwirkungen. ATP und ADP werden je nach Rezeptortyp (P2X, P2Y, vgl. Tabelle 1) wirksam. Am Ende der Hydrolyse-Kaskade steht das Adenosin, das seinerseits P1-Rezeptoren aktiviert. Nicht dargestellt sind in einigen Zellsystemen zusätzlich existierende enzymatische Wege, über die vom AMP oder vom ADP ausgehend, ATP extrazellulär synthetisiert wird. Die Phosphorylierung von Membranproteinen durch Ekto-Proteinkinasen ist ebenfalls gut dokumentiert.

Analyze this!

Innovative tools for behavioral research

Noldus Information Technology bv

Wageningen, The Netherlands

Phone: +31-317-497677

E-mail: info@noldus.nl

Noldus Information Technology GmbH

Freiburg, Germany

Phone: +49-761-4701600

E-mail: info@noldus.de

Noldus Information Technology Inc.

Leesburg, VA, U.S.A.

Phone: +1-703-771-0440

Toll-free: 1-800-355-9541

E-mail: info@noldus.com

Scientists studying animal behavior have an increasing need for accurate quantitative data. As a behavioral neuroscientist, you need sensitive observational research tools with a maximum degree of automation. Our integrated solutions for data collection, analysis, management and visualization are today's premier tools for the study of behavior, locomotion and acoustics.

EthoVision - Video tracking system for automation of behavioral experiments

The Observer - System for collection and analysis of observational data, live or from video

UltraVox - System for automatic monitoring of ultrasonic vocalizations

Noldus
Information Technology

www.noldus.com

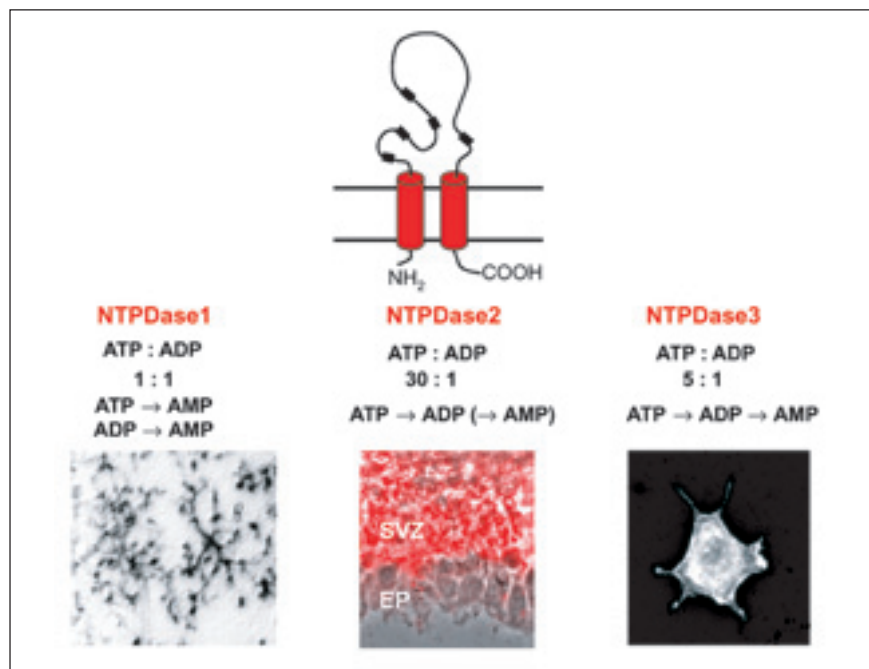


Abb. 3: Membrantopographie, wichtige funktionelle Eigenschaften und zelluläre Verteilung der drei zelloberflächenständigen Mitglieder der E-NTPDase-Familie (NTPDase1 bis NTPDase3). Gezeigt sind für jedes Enzym das Verhältnis der Hydrolyseraten für ATP und ADP sowie die gebildeten Produkte. NTPDase1 wird von Mikrogliazellen (und auch Endothelzellen) stark exprimiert, NTPDase2 liegt auf Typ-B-Zellen (rot) der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel vor (vgl. Abbildung 4, farbiges Schema). NTPDase3 wurde auf der Oberfläche von kultivierten PC12-Zellen nachgewiesen, die von Zellen des Nebennierenmarks der Ratte abgeleitet sind. EP, Ependym

werden im Säugerhirn exprimiert. NTPDase1 bis NTPDase3 hydrolysieren sowohl Purinal als auch Pyrimidinnukleotide. Der Einfachheit halber wird hier nur die Hydrolyse von Adeninnukleotiden zitiert. NTPDase1 hydrolysiert ATP und ADP etwa gleich gut. NTPDase2 hat eine sehr starke Präferenz für ATP und hydrolysiert ADP nur sehr langsam. NTPDase3 nimmt eine funktionelle Mittelstellung ein. Besonders interessant ist der Befund, dass NTPDase1 das ATP direkt zum AMP abbaut, ohne Freisetzung des Intermediats ADP. Dagegen hydrolysiert NTPDase2 ATP zum ADP, welches sich dann extrazellulär anreichert. NTPDase 3 nimmt wiederum eine Zwischenposition ein. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Ligandenpräferenzen der Nukleotid-Rezeptoren besteht die Möglichkeit, dass derartige Enzyme ein Nukleosidtriphosphat als Liganden eliminieren und gleichzeitig ein Nukleosiddiphosphat als Liganden extrazellulär produzieren (vgl. Abbildung 2). Vertreter dieser oberflächenständigen Untergruppe der E-NTPDasen fehlen im Genom der Bäckerhefe, von *C. elegans* oder von *Drosophila*. Sie finden sich erstmals im Genom von Wirbeltieren. Das gleiche gilt übrigens auch für die P2X-Rezeptoren. Gab es eine Ko-Evolution des

schnellen ATP-Signalweges mit dieser Gruppe von Ekto-Enzymen?

NTPDase1, Mikroglia und Blutfluss

Wichtige Aufschlüsse zur Funktion dieser Enzyme ergaben sich nach der Herstellung spezifischer Antikörper und erster Knock-out-Mäuse. Mit Hilfe eines Antikörpers und einer Knock-out-Maus konnten wir die NTPDase1, welche ATP und ADP etwa gleich gut spaltet, im Gehirn und im peripheren Nervensystem lokalisieren. Das Enzym wird sehr stark von Mikrogliazellen exprimiert. Nach transients globaler Vorderhirn-Ischämie findet man eine Hochregulation in aktivierten Mikrogliazellen, insbesondere im Bereich des Hippocampus und in der besonders verletzlichen CA1-Region. Parallel wird die Ekto-5'-Nukleotidase, welche AMP zum Adenosin hydrolysiert, verstärkt synthetisiert. Mikrogliazellen sind ein entscheidender Bestandteil des Immunsystems des zentralen Nervensystems. Bei Verletzungen, aber auch bei degenerativen Erkrankungen, werden sie aktiviert, teilen sich, verändern ihre Form und wandern zu geschädigten Gewebereichen. Sie sind nicht nur zur Phagozytose und zur Abgabe reaktiver Sauerstoffspezies befähigt, sondern

sezernieren auch eine Reihe von Cytokinen, die proinflammatorisch wirken. Daher kann eine zu starke Aktivierung der Mikroglia eine überschießende Abwehrreaktion einleiten, welche die Gewebeschäden noch verstärkt. Mikrogliazellen exprimieren unter anderem den P2X₇-Rezeptor, der die besondere Eigenschaft aufweist, sich zu einer großen, für niedermolekulare Substanzen permeablen Pore zu öffnen, was letztlich zum Zelltod führen kann. Die hohe Ekto-Nukleotidase-Aktivität der Mikrogliazellen könnte daher einen wichtigen Schutzmechanismus darstellen: einerseits für die Mikroglia selbst und andererseits für das umgebende Gewebe. Zusätzlich wirkt das am Ende der Hydrolysekaskade gebildete Adenosin entzündungshemmend. Die Deletion des NTPDase1-Gens verändert nicht die Anzahl der Mikrogliazellen. Jedoch sind die zahlreich verzweigten Fortsätze der Zellen stark reduziert.

NTPDase1 wird auch auf der inneren Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Dort dürfte dem Enzym eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Blutflusses in den Mikrogefäßen zukommen. Es spaltet neben ATP auch ADP, einen zentralen Initiator der Thrombozytenaggregation (Zimmermann 1999). Die Hydrolyse des ADP schränkt die Aggregation ein und garantiert effektiven Blutfluss.

Ein neues Kapitel: NTPDase2 und adulte Neurogenese

Eine besondere Überraschung erlebten wir, als wir die Verteilung der NTPDase2 in Nervengewebe untersuchten. Im zentralen Nervensystem von Nagern wird das Enzym in Gehirnregionen exprimiert, in denen auch im adulten Stadium noch Stammzellen aktiv sind (Braun et al. 2003). Ursprünglich war man davon ausgegangen, dass die Bildung von Nervenzellen beim Säuger während der Embryonalentwicklung abgeschlossen wird. Untersuchungen der letzten Jahre wiesen allerdings nach, dass sich auch im adulten Säugerhirn noch Stammzellen befinden, aus denen Nervenzellen weiterhin und kontinuierlich gebildet werden. Dies betrifft die subventrikuläre Zone (SVZ) der beiden Seitenventrikel (Abbildung 4) und den Gyrus dentatus des Hippocampus. Die im Bereich der SVZ gebildeten Neuronenvorläufer bleiben zunächst undifferenziert und wandern auf einem definierten Weg, dem sog. rostralen Migrationsstrom in den *Bulbus olfactorius*. Zahlreiche der neugebildeten Zellen sterben ab, andere wandern im *Bulbus olfactorius* aus dem rostralen Migrationsstrom aus und differenzieren sich dort in Interneurone. Vieles spricht dafür, dass astrozytenartige Zellen der



SVZ die eigentlichen Stammzellen darstellen (Typ-B-Zellen), aus denen schnell proliferierende Typ-C-Zellen entstehen, die wiederum Neuroblasten (Typ-A-Zellen) bilden. Die wandernden Zellen bilden ein eigentümliches räumliches Arrangement. Bündel von Typ-A-Zellen wandern in engem Kontakt und sind von einer Hülle aus langgestreckten Typ-B-Zellen umschlossen. Gegenwärtig ist praktisch nichts darüber bekannt, welche Faktoren die Typ-C- und Typ-A-Zellen entstehen lassen, warum die Typ-A-Zellen auf ihrer Wanderung undifferenziert bleiben und warum sie im Bulbus olfactorius in Neurone ausdifferenzieren können.

Im adulten Hippocampus erhält sich im Bereich des Gyrus dentatus eine Population sog. residuärer Radialglia, die ebenfalls als Vorläuferzelle fungieren kann und zum Einbau neuer Neuronen in die Körnerschicht führt. Dieser Einbau kann zu einer gesteigerten Langzeitpotenzierung an den Synapsen der Moosfasern in der CA3-Region und zu einer verbesserten Lernfähigkeit von Mäusen führen, bei denen der Einbau neuer Neuronen gesteigert ist.

Unser Befund, dass sowohl die Typ-B-Zellen der SVZ als auch die residuale Radialglia des Gyrus dentatus die NTPDase2 kräftig exprimieren, weist darauf hin, dass dem extrazellulären Signalweg über ATP oder andere Nukleotide eine wichtige regulatorische Funktion bei der adulten Neurogenese zukommen dürfte. Da NTPDase2 ATP spaltet und gleichzeitig ADP bildet (vgl. Abbildung 3), könnte es sowohl eine Rolle bei der Inaktivierung extrazellulärer Nucleosidtriphosphate als auch bei der Bildung extrazellulärer Nucleosiddiphosphate spielen. Diesen Aspekt untersuchen wir gegenwärtig. Die neuronalen

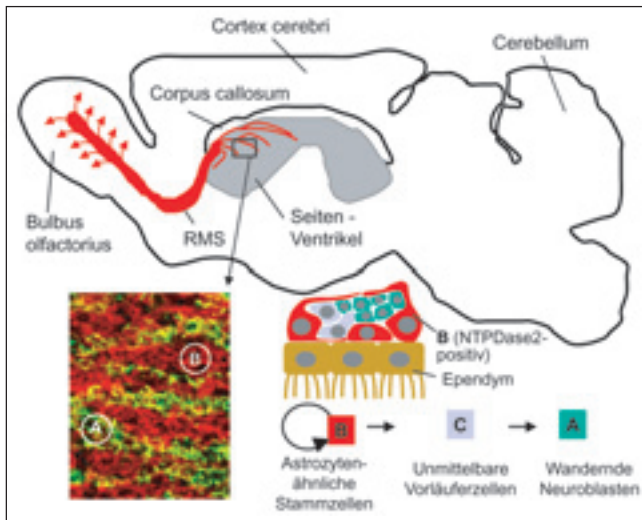


Abb. 4: Darstellung der neurogenen Zone des adulten Nagerhirns im Bereich der Seitenventrikel und Verteilung der NTPDase2. Die subependymal gebildeten neuronalen Vorläuferzellen wandern bündelweise über den rostralen Migrationsstrom (RMS) in den Bulbus olfactorius, wo sie sich zu Neuronen differenzieren können. Man geht heute davon aus, dass die astrozytenähnlichen Typ-B-Zellen die eigentlichen Stammzellen sind, aus denen über eine Zwischenstufe (Typ-C-Zellen) die wandernden Neuroblasten (Typ-A-Zellen) gebildet werden. Typ-B-Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche das Enzym NTPDase2. Die relative Anordnung der drei Zelltypen unterhalb des Ependyms ist im farbigen Schema dargestellt (Querschnitt). Das Fluoreszenzbild (Sagittalschnitt) zeigt die Doppelmarkierung eines Bereiches der SVZ in der die wandernden Typ-A-Zellen grün (Antikörper gegen PSA-NCAM) und die Typ-B-Zellen rot (Antikörper gegen NTPDase2) markiert sind. Die wandernden Neuroblasten werden jeweils von Bündeln NTPDase2-positiver Typ-B-Zellen umhüllt.

F · S · T

FINE SCIENCE TOOLS

*Fine surgical instruments
and accessories
for research*

- Spring scissors
- Forceps
- Scalpels
- Sutures
- Retractors
- Clamps
- And much more

Fine Science Tools GmbH

Fahrtgasse 7 - 13
D-69117 Heidelberg
Germany

Tel.: +49 (0) 62 21 / 90 50 50

Fax: +49 (0) 62 21 / 60 00 01

E-Mail: europe@finescience.com

Web: www.finescience.com



Glaskapillaren zur Herstellung von

Mikroelektroden, Mikropipetten, Patch-Pipetten, etc.



Direkt vom Hersteller:

glas für
wissenschaft
labor
industrie
technik

hilgenberg

In allen Längen lieferbar...

auch mit feurpolierten Enden ...

... aus Borosilicat-, Soda-, Quarz- und Bleiglas

Verschiedene Formen:

- rund, eckig
- multibarrel
- Theta, Filament
- 2-Loch, 4-Loch
- usw.

Verschiedene Wandstärken:

- super dünn
- dünn
- normal
- dick
- sehr dick ...



Neu:

Spezialnadeln ab 70 µm Durchmesser, zum Befüllen von Mikroelektroden und Mikropipetten!

Hilgenberg GmbH, Strauchgraben 2, D - 34323 Malsfeld

Tel. ++49 (0) 5661 7303 0 Fax ++49 (0) 5661 7303 11

Email info@hilgenberg-gmbh.de Internet: www.hilgenberg-gmbh.de

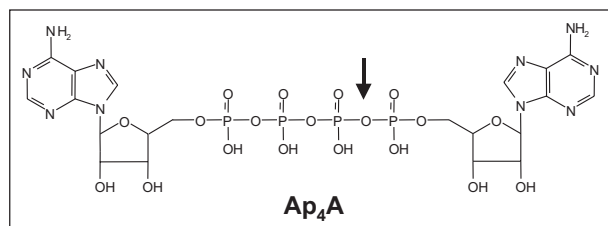


Abb. 5: Struktur von Diadenosintetraphosphat (Ap₄A) mit Spaltstelle für Ektoneukleotidpyrophosphatasen/-phosphodiesterasen. Als Produkte der Spaltung entstehen ATP und ADP.

Stammzellen des adulten Gehirns lassen sich in der Kulturschale vermehren und bilden dort bei Zugabe mitogener Substanzen wie etwa dem „epidermal growth factor“ sog. Neurosphären, kugelige Zellhaufen, die in der Nährlösung schwimmen. Aus diesen Neurosphären werden nach Entzug des Mitogens Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten gebildet. Dies bietet uns eine exzellente Möglichkeit, die Rolle von Signalmolekülen bei der Kontrolle der adulten Neurogenese *in vitro* einer genauen Analyse zu unterwerfen.

Weitere Enzyme und die Dinukleosidpolyphosphate

Die Situation ist allerdings komplizierter als bisher dargestellt. Neben den E-NTPDasen finden sich in vielen Geweben weitere Enzyme, die extrazelluläre Nucleotide spalten können. Die Situation ist also ganz anders als bei der Acetylcholinesterase, für die ein einziges Gen, allerdings mit mehreren Spleißvarianten, existiert. Zu den weiteren Nucleotidspaltenden Enzymen gehören die GPI-verankerten alkalischen Phosphatasen und die sog. Nucleotidpyrophosphatasen/-phosphodiesterasen (E-NPPs) (Zimmermann 2001). Zur letzteren Enzymgruppe gehören drei Vertreter (NPP1 bis NPP3). Wir zeigten kürzlich, dass diese Enzyme in der Lage sind, eine weitere Gruppe von Nucleotiden zu spalten, die sowohl in peripherem Gewebe als auch im Gehirn als Signalsubstanzen fungieren, die Dinukleosidpolyphosphate (Abbildung 5). In diesen Verbindungen sind zwei Nucleoside über eine Kette von zwei bis sieben Phosphatresten verbunden. In unterschiedlichen Geweben nachgewiesen wurden Diadenosinpolyphosphate (Ap_nAs), Diguanosinpolyphosphate (Gp_nGs) und auch gemischte Adenosinpolyphosphoguanosine (Ap_nGs). Sie können wie die anderen Nucleotide vesikulär gespeichert werden (Zimmermann 1994). Diadenosinpolyphosphate entfalten ihre Wirkung sowohl an einigen der P2X- und P2Y-Rezeptoren als auch an einer eigenen Gruppe von bisher molekular nicht charakterisierten Dinucleotid-Rezeptoren. An Nervenendigungen können diese Nucleotide die Wirkung von ATP modulieren. Die Hydrolyse der Dinukleosidpolyphosphate erfolgt jeweils asymmetrisch. Nach Hydro-

lyse etwa von Ap₄A entsteht entsprechend ATP und AMP. Die E-NPPs stellen also eine weitere Gruppe von Enzymen dar, die für die Regulation von Nucleotidwirkungen im Nervensystem eine wichtige Rolle spielen dürften.

Endprodukt der extrazellulären Hydrolysekaskaden ist jeweils das Nucleosid; im Falle des ATP das Adenosin (vgl. Abbildung 2). Adenosin ist seinerseits ein Signalstoff und entfaltet seine Wirkung über vier verschiedene Rezeptoren, sog. P1-Rezeptoren, die alle G-Protein gekoppelt sind (Schwiebert 2003). Adenosin wird zellulär direkt über Transporter freigesetzt und auf dem oben beschriebenen Wege zusätzlich extrazellulär gebildet. Auch Adenosin ist ein ganz wichtiger Modulator der synaptischen Übertragung im zentralen Nervensystem. Da erstaunt es nicht, dass es oft schwierig ist, die Wirkung von ATP oder ADP gegenüber der des Adenosins abzugrenzen.

Ausblick

Zukünftige Studien erfordern eine eingehende Analyse der proteinären Eigenschaften der Ektoneukleotidasen ebenso wie funktionelle Untersuchungen zu ihrer Wirkung an definierten zellulären Signalwegen innerhalb des Nervensystems. Dies schließt die Entwicklung spezifischer Hemmstoffe und die Ausschaltung der Gene *in vitro* und *in situ* ein. Für das Verständnis des Wechselspiels der verschiedenen Subtypen von Nucleotidrezeptoren und Ektoneukleotidasen bedarf es einer exakten immunzytologischen Lokalisierung auf elektronenmikroskopischer Ebene. Unter den vielfältigen Funktionen, die von Nucleotiden gesteuert werden können, erscheint die Rolle, die diese bei der Neurogenese einnehmen, besonders faszinierend. Das Verständnis der adulten Neurogenese wird wichtige praktische Konsequenzen haben. Dies betrifft insbesondere die Weiterentwicklung zelltherapeutischer Ansätze, wie sie möglicherweise in Zukunft zur Therapie akuter oder chronischer Schädigungen des Nervengewebes eingesetzt werden können.

Literatur

Braun, N., Sévigny, J., Mishra, S., Robson, S.C., Barth, S.W., Gerstberger, R., Hammer, K. und

Zimmermann, H. (2003): Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1355-1364.

Ortinou, S., Laube, B. und Zimmermann, H. (2003): ATP inhibits NMDA receptors after heterologous expression and in cultured hippocampal neurons, and attenuates NMDA-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* 23: 4996-5003.

Schwiebert, E.M. (2003): *Extracellular nucleotides and nucleosides. Release, receptors, and physiological effects.* Amsterdam, Boston, Heidelberg: Academic Press.

Zimmermann, H. (1994): Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17: 420-426.

Zimmermann, H. (1999): Nucleotides and cd39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. *Nature Med.* 5: 987-988.

Zimmermann, H. (2001): Ectonucleotidasen: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56.

Eine ausführliche Literaturliste kann beim Autor angefordert werden.

Danksagung

Herrn PD Dr. Norbert Braun (Frankfurt) danke ich für die Bereitstellung der Immunfluoreszenzaufnahmen.

Kurzbiographie

Univ. Prof. Dr. Herbert Zimmermann: 1964-1969 Studium Chemie und Biologie, LMU München. 1971 Promotion Zoologie, Universität Regensburg. 1972/73 Postdoc, Biochemisches Institut der Universität Cambridge/England. 1973-1979 Wiss. Mitarbeiter, M. P. I. für Biophysikalische Chemie, Göttingen. 1980-1983 Prof. C3 für Ethologie und Neurobiologie, Universität Oldenburg. Seit 1983 Prof. C4 für Zoologie, Universität Frankfurt am Main. Forschungsarbeiten zum Mechanismus der synaptischen Transmitterfreisetzung, zur Rolle der Astroglia bei der neuronalen Informationsverarbeitung, zur Rolle der Nucleotide, insbesondere der Ektoneukleotidasen bei der zellulären Signalvermittlung im Nervensystem.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Herbert Zimmermann
 Biozentrum der J. W. Goethe-Universität
 AK Neurochemie
 Marie-Curie-Str. 9
 D-60439 Frankfurt am Main
 Tel.: ++49 (0) 69 7982 9602
 Fax: ++49 (0) 69 7982 9606
 e-mail: h.zimmermann@zoology.uni-frankfurt.de