

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. M. J. Lohse**

# **Funktionsanalyse $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren auf molekularer und transgener Ebene**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Stefanie Schickinger  
aus Höchstädt a. d. Donau**

**Würzburg, Februar 2008**

**Referent: Prof. Dr. med. L. Hein**

**Koreferent: Prof. Dr. med. M. Gessler**

**Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2008**

**Die Promovendin ist Ärztin**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Rezeptoren als physiologische und pharmakologische Zielstrukturen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Rezeptoren im Nervensystem und im endokrinen System .....	1
1.1.2 Übersicht über verschiedene Rezeptoren .....	1
1.1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	5
<b>1.2 Adrenerge Rezeptoren</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Einteilung und Funktion adrenerger Rezeptoren .....	6
1.2.2 $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren .....	8
1.2.2.1 Verteilung und Lokalisation von $\alpha_2$ -Rezeptoren .....	8
1.2.2.2 Signalwege $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren .....	9
1.2.2.3 Physiologische Funktionen $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren .....	10
1.2.3 Charakterisierung $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in PC12-Zellen .....	12
1.2.3.1 Neuronale Differenzierung wird von $\alpha_2$ -Rezeptor-Subtypen moduliert .....	12
1.2.3.2 Lokalisation und Internalisierung in PC12-Zellen .....	14
<b>1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Physikalisch-chemische Grundlagen .....	15
1.3.2 Monitoring und Analyse von Agonist-Effekten auf Rezeptorebene ...	16
<b>1.4 Transgene Tiere</b> .....	<b>17</b>
1.4.1 Techniken zur Generierung transgener Tiere .....	17
1.4.2 Transgene Mäuse mit veränderten $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren .....	19
<b>1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit</b> .....	<b>21</b>

<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	<b>Zellkultur</b>	<b>22</b>
2.1.1	Kultivierung von Zellen	22
2.1.1.1	Kultur von HEK 293-Zellen	22
2.1.1.2	Kultur von PC12-Zellen	22
2.1.2	Lagerung der Zellen	23
2.1.2.1	Einfrieren der Zellen	23
2.1.2.2	Auftauen der Zellen	24
2.1.3	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	24
2.1.4	Vorbereitung der Zellen für die Mikroskopie	24
2.2	<b>Transfektionsmethoden</b>	<b>25</b>
2.2.1	Transfektion mittels Ca <sup>2+</sup> -Phosphat-Präzipitation	25
2.2.2	Transfektion mittels Polyethylenimin-Lösung	26
2.2.3	Elektroporation mittels Nucleofector	27
2.2.4	Überprüfung der Transfektionseffizienz	28
2.2.4.1	Auszählen der Zellen	28
2.2.4.2	X-Gal Färbung	28
2.3	<b>Gewinnung von Plasmid-DNA</b>	<b>28</b>
2.3.1	Herstellung kompetenter Zellen	29
2.3.2	Transformation von E. coli	29
2.3.3	Maxipräparation mittels Qiagen®-Säulen	30
2.3.4	Quantifizierung von DNA	30
2.4	<b>FRET-Messungen</b>	<b>30</b>
2.4.1	Herstellung des FRET-Puffers	30
2.4.2	Herstellung der Agonist-Lösungen	31
2.4.3	Aufbau des Mikroskop-Platzes zur FRET-Messung	31
2.4.4	Messung von Agonist-abhängigen FRET-Änderungen	32
2.4.4.1	Vorbereitung der Zellen	32
2.4.4.2	Optische Anregung der Zellen	32
2.4.4.3	Aufzeichnung der Messungen	32
2.4.5	Visuelle FRET-Darstellung (Imaging)	33

<b>2.5</b>	<b>FRET-Auswertung</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Transgene Tiermodelle</b>	<b>34</b>
2.6.1	Generierung und Haltung $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-transgener Mäuse	34
2.6.2	Genotypisierung $\alpha_{2A}$ -transgener Tiere	34
2.6.2.1	Präparation genomischer DNA	34
2.6.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.6.2.3	Agarosegelelektrophorese	36
2.6.3	Physiologische Messungen	37
2.6.3.1	In vivo Herzkatheter-Untersuchungen	37
2.6.3.2	Bestimmung von Plasma-Katecholamin-Konzentrationen	38
2.6.4	Histologische Untersuchungen	39
2.6.4.1	Herstellung von Paraffinschnitten	39
2.6.4.2	Hämalaun-Eosin- und Sirius-Rot-Färbungen	39
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>40</b>
3.1	Zellkultur	40
3.2	Plasmidvektoren	40
3.3	Enzyme und Kits	40
3.4	Oligonukleotide	41
3.5	Chemikalien und Agonisten	41
3.6	Pufferlösungen	42
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1.	<b>Funktion <math>\alpha_{2A}</math>-adrenerger Rezeptoren im Sympthikus in vivo</b>	<b>43</b>
4.1.1	Transgenes Mausmodell mit $\alpha_{2A}$ -Autorezeptoren	43
4.1.2	Genotypisierung $\alpha_{2A}$ -transgener Mäuse	44
4.1.3	Physiologische Charakterisierung der $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäuse	46
4.1.3.1	Messung von Blutdruck und Herzfrequenz	46
4.1.3.2	Bestimmung von Plasma-Katecholamin-Konzentrationen	47

4.1.4	Anatomische und histologische Untersuchungen $\alpha_{2A}$ -transgener Herzen .....	49
4.1.4.1	Entwicklung einer kardialen Hypertrophie .....	49
4.1.4.2	Entstehung einer interstitiellen Fibrose .....	50
<b>4.2.</b>	<b>Charakterisierung des <math>\alpha_{2A}</math>-Rezeptors mittels FRET in PC12-Zellen .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	FRET-Mikroskopie zur Bildgebung .....	52
4.2.2	Vergleich der FRET Signale in undifferenzierten und differenzierten Zellen .....	53
4.2.2.1	Amplitude der FRET-Signaländerung .....	53
4.2.2.2	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen .....	55
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
5.1	$\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren im Sympathikus .....	59
5.2	Ursachen und Therapieansätze einer chronischen Herzinsuffizienz .....	61
5.3	Funktion der $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptoren in der Nebenniere .....	62
5.4	Detektion der $\alpha_2$ -Rezeptoraktivierung durch FRET-Mikroskopie.	64
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Rezeptoren als physiologische und pharmakologische Zielstrukturen

### 1.1.1 Rezeptoren im Nervensystem und im endokrinen System

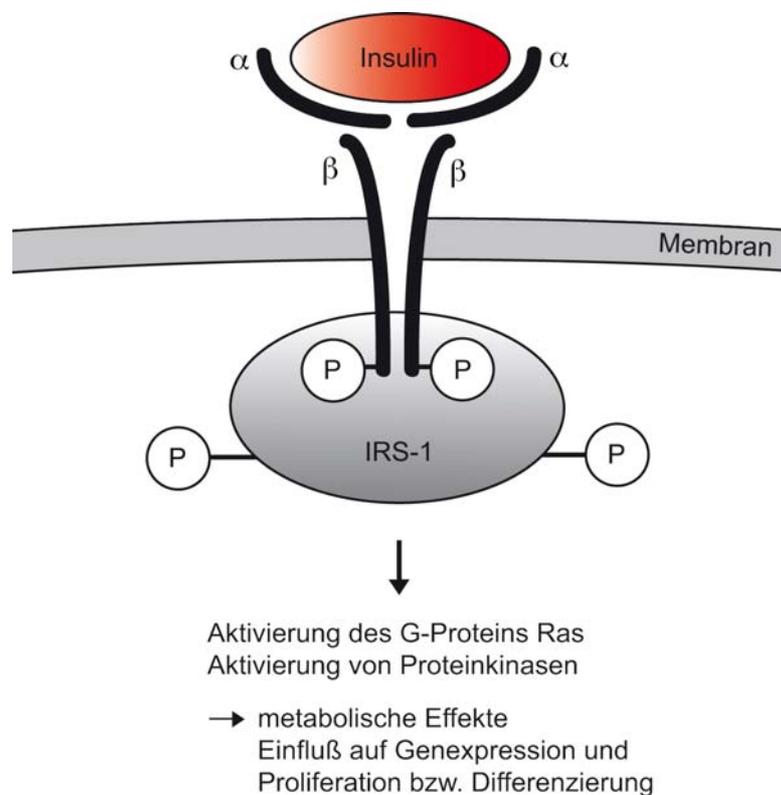
Die Kommunikation im menschlichen und tierischen Organismus erfolgt über zwei ineinander greifende, jedoch völlig unterschiedliche Systeme: das Nervensystem und das endokrine System (Hormonsystem). Beide Systeme vermitteln die Steuerung zahlreicher Vorgänge und Funktionen des Organismus und interagieren so auf vielfältige Art und Weise miteinander. Während das Nervensystem dazu in der Lage ist, innerhalb weniger Millisekunden auf Veränderungen zu reagieren, wirkt das endokrine System in einem Zeitraum von Minuten bis Tagen und ist damit für die Steuerung längerfristiger Funktionen, wie Stoffwechsel, Wachstum und Verhalten verantwortlich. Ein weiterer Unterschied ist die Funktionsweise beider Systeme: Die Signalübermittlung des Nervensystems erfolgt über elektrische und chemische Mechanismen miteinander kommunizierender Neurone, die des Hormonsystems über den Transport der jeweiligen Botenstoffe auf dem Blutweg. Wichtigste Gemeinsamkeit beider Systeme ist die Weiterleitung der Signale ins Zellinnere über die Bindung von Hormonen und Neurotransmittern an Rezeptoren der Zellmembranen oder im Zellinneren. Dabei können diese molekularbiologischen Zielstrukturen aktiviert oder gehemmt werden, so dass die Liganden entweder Agonisten oder Antagonisten der jeweiligen Rezeptoren darstellen. Über diverse, im Zellinneren angestoßene Signalkaskaden werden schließlich die gewünschten Effekte ausgelöst.

### 1.1.2 Übersicht über verschiedene Rezeptoren

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionsweise lassen sich vier verschiedene Rezeptortypen unterscheiden:

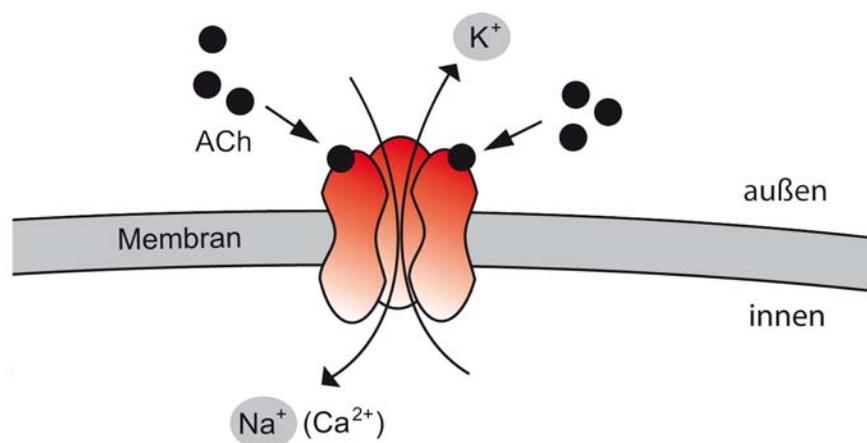
1. Enzym-Rezeptoren
2. Ionenkanal-Rezeptoren
3. DNA-bindende Rezeptoren
4. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Zur Gruppe der Enzymrezeptoren gehört z.B. die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, der z.B. der Insulinrezeptor zugeordnet werden kann. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Dimerisierung und, entsprechend der Tyrosinkinaseaktivität, zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. An die Phosphotyrosinreste bindende Proteine mit sog. SH2-Domänen werden auf diese Weise aktiviert und lösen so weitere intrazelluläre Signalwege, wie die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras und diverser Kaskaden von Proteinkinasen aus. Am Ende stehen schließlich neben einer Reihe metabolischer Effekte die Einflussnahme auf die Genexpression und Proliferation bzw. Differenzierung (Buxton, 2005).



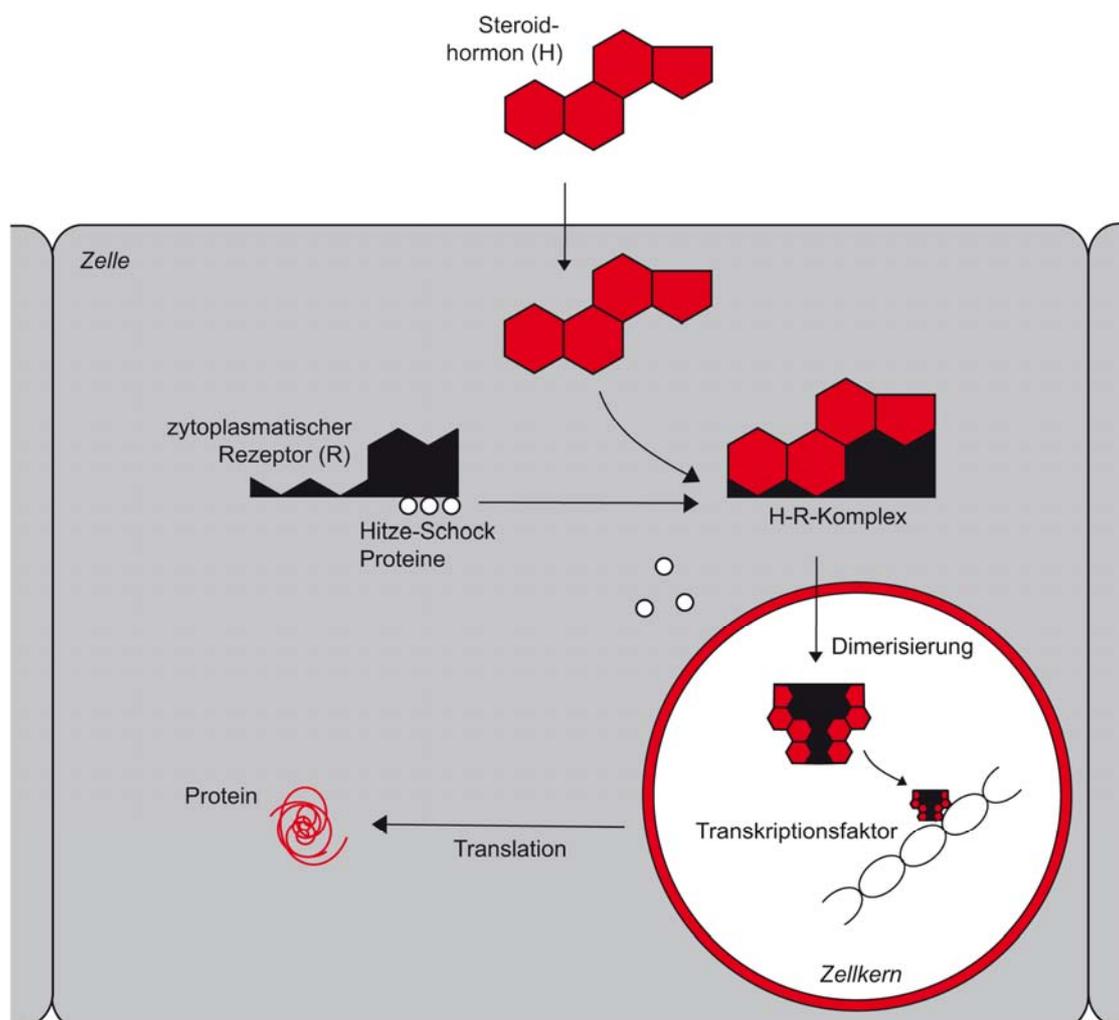
**Abb. 1: Darstellung des Insulinrezeptors als Beispiel der Tyrosinkinase-Rezeptoren**

Wichtige Vertreter aus der Gruppe der Ionenkanal-Rezeptoren sind postsynaptische Zielstrukturen des zentralen und peripheren Nervensystems. NMDA-Rezeptoren, deren Ligand der excitatorische Neurotransmitter Glutamat darstellt, vermitteln die wichtigsten Lernvorgänge und erregenden Eingänge von den Sinnessystemen zum Kortex. Der physiologische Gegenspieler sind GABA-Rezeptoren, die über den bedeutendsten inhibitorischen Transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) erregt werden. Während Glutamat den Ionenkanal für Kationen öffnet und damit zur Depolarisation führt, sorgt GABA z.B. für den Einstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen und damit für eine Hyperpolarisation. Ein weiterer erwähnenswerter Ionenkanal-Rezeptor, der eine besondere Rolle an der motorischen Endplatte und damit an der willkürlichen Innervation des Skelettmuskels spielt, ist der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor. Der Neurotransmitter Acetylcholin aktiviert diese ligandengesteuerten Ionenkanäle, so dass die postsynaptische Membran depolarisiert und ein Endplattenpotential ausgelöst wird. Dieses wiederum löst über die Aktivierung spannungsgesteuerter  $\text{Na}^+$ -Kanäle ein Muskelaktionspotential aus, welches sich über das gesamte Sarkolemm ausbreitet und die Kontraktion des Skelettmuskels einleitet.



**Abb. 2: Darstellung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors als Beispiel der Ionenkanalrezeptoren**

Eine weitere Methode der Signalübermittlung, die verstärkt im Hormonsystem ihre Bedeutung hat, erfolgt über sog. DNA-bindende Rezeptoren, die damit die Rolle eines Transkriptionsfaktors übernehmen. Dabei handelt es sich meist um Steroidrezeptoren, da v.a. Steroidhormone, wie Schilddrüsen-, Sexual- und Vitamin D-Hormone, ebenso wie Gluco- und Mineralocorticoide gebunden werden (Buxton, 2005). Aufgrund ihrer guten Permeabilität durch die Plasmamembran binden diese Hormone im Cytosol an ihren Rezeptor, der daraufhin aktiviert wird, dimerisiert und im Zellkern an spezifische Basensequenzen der DNA bindet. Damit können diese Hormone regulierend auf die Genexpression einwirken.



**Abb. 3: Darstellung der Steroidrezeptoren als Beispiel der DNA-bindenden Rezeptoren**

Eine große Gruppe von Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die aufgrund ihrer molekularen Struktur mit 7  $\alpha$ -Helices durch die Plasmamembran auch 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren genannt werden. Die adrenergen Rezeptoren des sympathischen Nervensystems gehören zur Gruppe der GPCR. Ein Meilenstein war im Jahr 2007, ca. zwei Jahrzehnte nach der Klonierung des ersten G-Protein-gekoppelten Rezeptors, die Aufklärung der Kristallstruktur von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren. Entscheidend daran beteiligt war die Arbeit der Forschungsteams um Brian Kobilka Stanford University, USA (Rasmussen et al., 2007; Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). In den folgenden Kapiteln wird auf diese Art von Rezeptoren mit weiteren Einzelheiten eingegangen.

### 1.1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind charakteristischerweise an der Zelloberfläche lokalisiert. Der Aminoterminus der Aminosäurekette befindet sich extrazellulär, der Carboxyterminus intrazellulär. Dazwischen ist die Plasmamembran von 7  $\alpha$ -Helices, die über verschieden lange Schleifen miteinander verbunden sind, durchsetzt (Rasmussen et al., 2007; Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007).

Nach Bindung eines Agonisten ist eine Konformationsänderung des Rezeptors zu beobachten, der damit in einen „aktivierten Zustand“ übergeht. Durch Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen, die an die Rezeptoren gekoppelt sind und aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen, werden die Signale ins Zellinnere weitergeleitet. Nach Rezeptoraktivierung wird das an der  $\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht (Lambright et al., 1996). Die daraufhin verminderte Affinität der  $\alpha$ - zu den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten lässt das G-Protein in zwei Teile dissoziieren. Diese stoßen nun je nach Rezeptor und G-Protein über sekundäre Botenstoffe weitere Signalwege an (Buxton, 2005).

Je nach Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit lassen sich G-Proteine in verschiedene Familien einteilen (Wettschureck und Offermanns, 2005).  $G_q$ -Proteine führen

über die Stimulation der Phospholipase C $\beta$  zur Bildung der intrazellulären Botenstoffe Inositoltriphosphat und Diacylglycerin. Während G $_s$ -Proteine zu einer Stimulation der Adenylatcyclase und damit zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels führen, wird die Adenylatcyclase über G $_{i/o}$ -Proteine gehemmt und der cAMP Spiegel gesenkt (Wettschreck und Offermanns, 2005). Nach intrazellulärer Weiterleitung des Signals treten verschiedene Mechanismen in Kraft, die eine weitere Signaltransduktion verhindern und zu einer Abschaltung und Desensibilisierung des Rezeptors führen. Durch die GTPase-Aktivität der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert, sodass die G-Protein Untereinheiten aufgrund der wieder erhöhten Affinität reassoziieren. Des Weiteren sorgen aktivierte Proteinkinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) für eine Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptordomänen, so dass die Bindung von  $\beta$ -Arrestinen ermöglicht werden kann (Lohse et al., 1990; Ferguson et al., 1996). Der nun entstandene Komplex sequestriert und wird per Endozytose in Vesikeln ins Zellinnere transportiert. Dort wird er entweder lysosomal abgebaut oder durch Dephosphorylierung einem Recycling zurück an die Zelloberfläche zugeführt (Lohse et al., 1993).

## 1.2 Adrenerge Rezeptoren

### 1.2.1 Einteilung und Funktion adrenerger Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, können in 9 verschiedene Subtypen unterteilt werden:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  (Bylund et al., 1994). Unterschiede lassen sich in der Verteilung und der Art der Signaltransduktion erkennen. So spielen Adrenozeptoren als Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität für die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin nicht nur eine wichtige Rolle im sympathischen peripheren Nervensystem, sondern finden sich auch im ZNS, beispielsweise zur Regulation der Sympathikusaktivität (Gilsbach und Hein, 2008). Während  $\alpha_1$ -Rezeptoren an G $_q$ -Proteine gekoppelt sind und durch die Expression in der Gefäßmuskulatur entscheidend an der Blutdrucksteigerung

des Organismus beteiligt sind, steuern  $\alpha_2$ -Rezeptoren über  $G_{i/o}$ -Proteine mit überwiegend hemmender Funktion z.B. die Exozytose und Sekretion von Neurotransmittern und Insulin. Eine herausragende Rolle im kardiovaskulären System spielen  $\beta$ -Rezeptoren (Engelhardt et al., 1999), deren Stimulation eine Aktivierung von  $G_s$ -Proteinen zur Folge hat. Dies führt im Falle des  $\beta_1$ -Subtyps zu einer gesteigerten Herzaktion, da  $\beta_1$ -Rezeptoren am Herzen lokalisiert sind und über die Öffnung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen sowohl positiv inotrop, chronotrop, als auch dromotrop wirken. Im Falle des  $\beta_2$ -Subtyps lässt sich durch ein Absinken des intrazellulären  $Ca^{2+}$  eine Erschlaffung glatter Muskulatur und damit vorwiegend eine Dilatation, z.B. von Gefäßen, Bronchiolen und der Uterusmuskulatur beobachten (Johnson M, 1998).

$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$
↓	↓	↓	↓
$G_q$	$G_{i/o}$	$G_s$	$G_s$
↓	↓	↓	↓
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phospholipase <math>C\beta \uparrow</math></li> <li>→ <math>IP_3</math> → <math>Ca^{2+} \uparrow</math></li> <li>DAG → <math>PKC \uparrow</math></li> <li>• Hyperpolarisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenylatcyclase ↓</li> <li>→ <math>cAMP \downarrow</math> → <math>PKA \downarrow</math></li> <li>• <math>Ca^{2+} \downarrow</math></li> <li>• Hyperpolarisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenylatcyclase ↑</li> <li>→ <math>cAMP \uparrow</math> → <math>PKA \uparrow</math></li> <li>• <math>Ca^{2+} \uparrow</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenylatcyclase ↑</li> <li>→ <math>cAMP \uparrow</math> → <math>PKA \uparrow</math></li> <li>• <math>Ca^{2+} \downarrow</math></li> </ul>
Kontraktion von <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchien</li> <li>• Uterus</li> <li>• Sphinkteren</li> <li>• Gefäßmuskulatur</li> </ul>	Hemmung der Exozytose bzw. Sekretion von <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotransmittern</li> <li>• Insulin</li> </ul>	Herzantrieb <ul style="list-style-type: none"> <li>• positiv inotrop</li> <li>• positiv dromotrop</li> <li>• positiv chronotrop</li> </ul>	Dilatation von <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gefäßen</li> <li>• Bronchien</li> <li>• Uterus</li> </ul>

**Tab. 1: Übersicht über die adrenergen Rezeptoren, deren zugehörigen G-Proteine, die ablaufende Signalkaskade und die daraus resultierenden physiologischen Funktionen. ( $\beta_3$ -adrenerge Rezeptoren sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt.)**

## 1.2.2 $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren

### 1.2.2.1 Verteilung und Lokalisation $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

In der Vergangenheit konnten mit unterschiedlichen Methoden drei verschiedene Subtypen von  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren nachgewiesen werden:  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  und  $\alpha_{2C}$  (zur Übersicht: Gilsbach und Hein, 2008). Zum einen zeigten Rezeptor-Ligand-Bindungsversuche aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der  $\alpha_2$ -Antagonisten Prazosin und Oxymetazolin diese Anzahl von Subtypen mit unterschiedlichem Verteilungsmuster im Organismus (Bylund et al., 1985). Zum anderen konnten in einem Zeitraum von drei Jahren drei verschiedene Gene für  $\alpha_2$ -Rezeptoren kloniert werden. Zuerst gelang dies Kobilka für den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor (Kobilka et al., 1987). Es folgte das Gen für den  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor (Regan et al., 1989) und den  $\alpha_{2B}$ -Rezeptor (Lomasney et al., 1990).

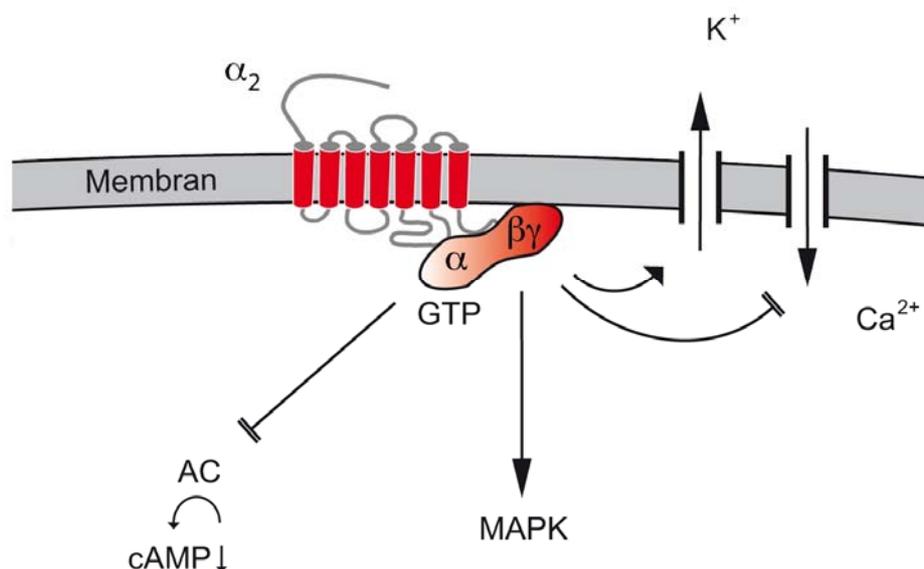
Während  $\alpha_{2B}$ -Rezeptoren vorwiegend in Lunge, Niere und Gefäßen (Eason et al., 1993) und vermutlich vor allem postsynaptisch zu finden sind, spielen  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren eine große Rolle im Nervensystem (Hein et al., 1999). Sie haben nicht nur peripher präsynaptisch eine wichtige Bedeutung, sondern auch innerhalb zentraler Areale, wie z.B. im Bereich des Hippocampus, des Locus coeruleus und des Cortex. Dabei übersteigt die Expressionsdichte des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors die des  $\alpha_{2C}$ -Rezeptors um das Zehnfache (Bücheler et al., 2002). Weitere Untersuchungen zeigten zudem ein Vorkommen des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptors in der Nebenniere (Brede et al., 2002) und den Gefäßen (Chotani et al., 2000).

Weitere Unterschiede lassen sich in der subzellulären Verteilung der Rezeptoren und dem Verhalten nach der Aktivierung durch einen Agonisten erkennen. So befindet sich der  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor praktisch immer an der Zelloberfläche und zeigt keine Endozytose nach Aktivierung, während der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten vorzufinden ist (Daunt et al., 1997). Bei niedrigen Temperaturen jedoch ist es auch ihm möglich, an die Zelloberfläche zu gelangen (Jeyaraj et al., 2001). Wie ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit Phosphorylierung, Internalisierung und Recycling nach Stimulation verhält sich der  $\alpha_{2B}$ -adrenerge Rezeptor (Daunt et

al., 1997). Vor allem in HEK-Zellen und Fibroblasten konnten diese Eigenschaften im Detail nachgewiesen werden. Die weiterführende Charakterisierung der  $\alpha_2$ -Rezeptoren in Phäochromozytomzellen erfolgt in den nächsten Kapiteln.

### 1.2.2.2 Signalwege $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

Die Signalwege aller  $\alpha_2$ -Rezeptorsubtypen sind an die inhibitorischen G-Proteine  $G_{i/o}$  gekoppelt (Cotecchia et al., 1990). Dabei wird zum einen durch die  $\alpha_i$ -Untereinheit die Adenylatcyclase gehemmt und so der Spiegel des cyclischen AMP gesenkt, zum anderen führt die  $\beta\gamma$ -Untereinheit zu verschiedenen Effekten. Neben der Stimulation von  $K^+$ -Kanälen (Surprenant et al., 1992), die eine Hyperpolarisation der Zelle hervorruft, ist eine Hemmung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen (Li et al., 1998) zu beobachten. Des Weiteren wird durch  $\alpha_2$ -Rezeptoren der Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, wie z.B. ERK 1/2 angeschaltet (Koch et al., 1994; Peng et al., 1998), der seinerseits verschiedene Wirkungen z.B. bezüglich Zellproliferation und Wachstum aufweist.



**Abb. 4: Signalwege  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren.** Die Adenylatcyclase (AC) wird durch die  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_i$ -Proteins in ihrer Funktion gehemmt, während durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit  $K^+$ -Kanäle geöffnet, spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle geschlossen und Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPK) aktiviert werden.

### 1.2.2.3 Physiologische Funktionen $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

Die aus den beschriebenen Signalwegen resultierenden Effekte sind vielfältiger Natur. Zusammenfassend vermitteln  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren v.a. inhibitorische Funktionen von Adrenalin und Noradrenalin. Sie spielen aufgrund ihrer Gefäßlokalisierung und regulierenden Effekte auf den Sympathikotonus eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. Daneben haben diese Rezeptoren eine ganze Reihe neuronaler Funktionen (Gilsbach und Hein, 2008).

Der  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor ist durch seine präsynaptische Lokalisation der wichtigste Autorezeptor und Regulator der Noradrenalinfreisetzung (Altman et al., 1999). Bei erhöhten Noradrenalinspiegeln im synaptischen Spalt wird über einen Rückkopplungsmechanismus die weitere Freisetzung des Transmitters gehemmt (Hein et al., 1999). Die  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Subtypen spielen hier eine untergeordnete Rolle. Ergänzend kann erwähnt werden, dass sie v.a. bei niedrigen Aktionspotentialfrequenzen und Noradrenalin-Konzentrationen zur präsynaptischen Autoinhibition beitragen, während der  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor bei hohen Frequenzen und mit hoher Geschwindigkeit reagiert (Hein et al., 1999). Zentral vermittelt der  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor einen hypotensiven Effekt (Link et al., 1996; Mac Millan et al., 1996), weshalb  $\alpha_2$ -Agonisten, wie z.B. Clonidin in der Bluthochdrucktherapie eingesetzt werden. Aufgrund ihrer sedierenden und den Schlaf-Wach-Rhythmus beeinflussenden Wirkung (Scheinin et al., 1998) finden derartige Substanzen auch Anwendung zur Prämedikation in der Anästhesie. Die Aktivierung zentraler  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren zeigt zudem einen anti-epileptogenen Effekt bei Mäusen (Janumpalli et al. 1998).

Die analgetische Wirkung des Lachgases, das nach wie vor häufig in der Anästhesie eingesetzt wird, beruht auf der Aktivierung einer noradrenergen Bahn im Rückenmark, an deren Ende ein  $\alpha_{2B}$ -Rezeptor steht (Guo et al., 1999). Weitere Wirkungen dieses Rezeptorsubtyps sind vasokonstriktischer Art, wodurch der initiale Blutdruckanstieg in der Hochdrucktherapie mit  $\alpha_2$ -Agonisten erklärt werden kann. Zudem werden  $\alpha_2$ -Agonisten zur lokalen Abschwellung von Schleimhäuten in Form von Nasentropfen (McLeod et al.,

2001) und zur Senkung des Augeninnendrucks beim Engwinkelglaukom (Greenfield et al., 1997) eingesetzt.

Der  $\alpha_{2C}$ -adrenerge Rezeptor dagegen hat wohl nur einen geringen Effekt auf den Blutdruck, obwohl er bei Kälte auch zu einer Vasokonstriktion führen kann (Chotani et al., 2000), was z.B. beim M. Raynaud eine Rolle spielen soll. Durch die Expression in der Nebenniere spielt er ferner eine wichtige Rolle bei der Regulation des Adrenalinhaushalts (Brede et al., 2002; Gilsbach et al., 2007). Er kontrolliert als Autorezeptor die Freisetzung von Adrenalin aus der Nebenniere. Zudem vermittelt der  $\alpha_2$ -Agonist Moxonidin über die Wechselwirkung mit dem  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor eine Analgesie auf spinaler Ebene (Fairbanks et al., 2002). Im ZNS hat der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor über die Hemmung der sensorischen Informationsweiterleitung (Scheinin et al., 2001) Effekte bei sensomotorischen Defiziten und Krankheiten wie Schizophrenie, Aufmerksamkeits-Defizit-Störungen, posttraumatischen Stress-Situationen und Drogen-Entzug.

In Untersuchungen mit Doppel-„Knock-Out“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren zum Auftreten einer Herzinsuffizienz führt (Hein et al., 1999), während  $\alpha_{2ABC}$ -/-Tiere neue Erkenntnisse bezüglich der Embryonalentwicklung brachten. Diese Mäuse starben aufgrund der Entwicklung eines insuffizienten Gefäßsystems der Plazenta bereits in der Embryonalphase (Philipp et al., 2002a). Hierbei ist der  $\alpha_{2B}$ -Subtyp der bedeutendste Rezeptor, da er in der Plazenta stark exprimiert wird (Muthig et al., 2007).

Des Weiteren fungieren sowohl der  $\alpha_{2A}$ -, als auch der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor als sog. „Heterorezeptoren“ im zentralen und peripheren Nervensystem (Gilsbach und Hein, 2008). Sie hemmen z.B. bei Mäusen die Dopamin-Freisetzung in den Basalganglien (Bücheler et al., 2002) und die Serotonin-Freisetzung im Hippocampus und der Hirnrinde (Scheibner et al., 2001). Ebenso kann die glutamaterge Transmission in afferenten A $\delta$ - und C-Fasern durch Noradrenalin über präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren verhindert werden (Kawasaki et al., 2003).

$\alpha_2A$	$\alpha_2B$	$\alpha_2C$
<ul style="list-style-type: none"> <li>- wichtiger Autorezeptor und Regulator der NA-Freisetzung</li> <li>- Hypotension (Senkung des zentralen Sympathikotonus)</li> <li>- Sedierung</li> <li>- Analgesie</li> <li>- anti-epileptogener Effekt</li> <li>- „Heterorezeptor“ in zentralem u. peripherem Nervensystem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- untergeordnete Rolle als Autorezeptor (u.a. bei niedrigen AP-Frequenzen)</li> <li>- analgetische Wirkung</li> <li>- Vasokonstriktion (Abschwellung von Schleimhäuten, Senkung Augeninnendruck)</li> <li>- Angiogenese in der Plazenta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kälte: Vasokonstriktion (M. Raynaud)</li> <li>- Autorezeptor u. Regulation der Adrenalin-Freisetzung aus der Nebenniere</li> <li>- analgetische Wirkung von Moxonidin</li> <li>- ZNS: Hemmung der sensorischen Informationsweiterleitung</li> <li>- „Heterorezeptor“ in zentralem u. peripherem Nervensystem</li> </ul>

**Tab. 2: Übersicht über die  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren und ihre physiologischen Funktionen (Referenzen siehe Text).**

### 1.2.3 Charakterisierung $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in PC12-Zellen

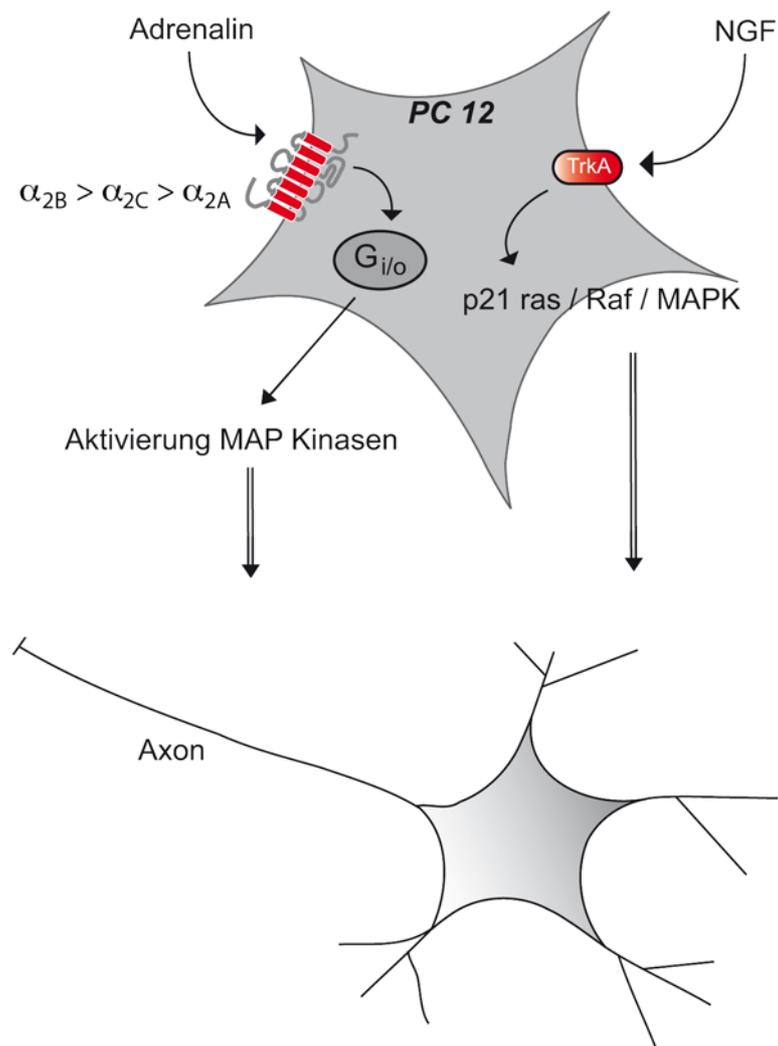
#### 1.2.3.1 Neuronale Differenzierung wird von $\alpha_2$ -Rezeptor-Subtypen moduliert

Während viele Erkenntnisse im Bereich adrenerger Rezeptoren auf Versuchen mit nicht neuronalen Zellen basieren, nimmt die Charakterisierung der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren in einem neuronalen Zelltyp einen wichtigen Stellenwert ein.

Unter bestimmten Umständen zeigen Zellen einer Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie (PC12) Kennzeichen sympathischer Neurone. Differenzierte PC12-Zellen weisen viele Ähnlichkeiten mit postganglionären sympathischen Neuronen auf (Green und Tischler, 1976). Die Behandlung der Zellen mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) führt nach 2-3 Tagen zur deren Ausdifferenzierung. Dabei ist das Wachstum neuronaler Fortsätze, wie Dendriten und Neuriten, ebenso wie die Expression spezifischer, mit neuronalen Funktionen assoziierter Proteine (Green, 1984, Pneunova und Enikolopov, 1995) zu beobachten.

Eine bedeutende Rolle für die neuronale Differenzierung dieser Zellen spielen  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren. So kann bereits an unbehandelten, mit dem  $\alpha_{2A}$ -

adrenergen Rezeptor transfizierten PC12-Zellen eine geringfügige Förderung einer differenzierten Morphologie erkannt werden, wobei das Ausmaß der Veränderung direkt proportional zur Rezeptordichte ist (Taraviras et al., 2002).



**Abb. 5: Neuronale Differenzierung von PC12-Zellen.** Adrenalin führt über die Aktivierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren und die Aktivierung von MAP-Kinasen zur Differenzierung von PC12-Zellen. Der Nervenwachstumsfaktor NGF bewirkt über die Aktivierung des Trk-A-Rezeptors eine neuronale Differenzierung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Zelldifferenzierung durch den Agonisten Adrenalin über eine Aktivierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

verursacht wird. Auch hier ist das Ausmaß der Differenzierung direkt proportional zum Expressionsniveau von  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren (Taraviras et al., 2002). In der weiteren Signaltransduktion scheint die Aktivierung der MAP-Kinasen für die Vermittlung des Adrenalin-Effekts verantwortlich zu sein, da der Grad der Differenzierung durch eine Co-Transfektion mit einem MAP-Kinase-Inhibitor reduziert werden konnte (Taraviras et al., 2002).

Im Gegensatz dazu ist für die NGF-induzierte Differenzierung die Stimulation der p21ras/Raf/MAPK Signalkaskade nach der Bindung an den Trk-A-Rezeptor notwendig (Cowley et al., 1994; Pang et al., 1995). Zusammenfassend zeigt ein Vergleich der  $\alpha_2$ -Subtypen, dass nach einer Rezeptoraktivierung durch Adrenalin der größte Anteil an neuronal differenzierten Zellen bei  $\alpha_{2B}$ -exprimierenden PC12-Zellen, gefolgt von  $\alpha_{2C}$ -Zellen zu finden ist. Der geringste prozentuale Anteil an differenzierten Zellen wurde bei  $\alpha_{2A}$ -transfizierten PC12-Zellen beobachtet (Taraviras et al., 2002). Durch eine gleichzeitige Behandlung der PC12-Zellen mit NGF und Adrenalin konnten außerdem die Effekte der Differenzierung verstärkt werden (Taraviras et al., 2002).

#### 1.2.3.2 Lokalisation und Internalisierung der $\alpha_2$ -Rezeptoren in PC12-Zellen

$\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren sind in neuronalen Zellen je nach Subtyp mit unterschiedlicher Dichte und an unterschiedlicher Stelle lokalisiert. Der  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor ist hauptsächlich in der Plasmamembran über die gesamte Zelle verteilt. In differenzierten PC12-Zellen jedoch findet man ihn v.a. in den Fortsätzen und Axonen (Olli-Lähdesmaki et al., 1999). Während der  $\alpha_{2B}$ -Rezeptor ebenso in der Plasmamembran zu finden ist, zeigt sich der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor vorwiegend in intrazellulären perinukleären Kompartimenten (Olli-Lähdesmaki et al., 1999). Auch in der Internalisierung nach der Rezeptoraktivierung gibt es Unterschiede zwischen den drei Rezeptor-Subtypen, wobei das Ausmaß der Internalisierung vom Subtyp abhängig ist.  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren werden nach Aktivierung am stärksten internalisiert, gefolgt von  $\alpha_{2B}$ - und schließlich  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren (Olli-Lähdesmaki et al., 2003). Im Gegensatz zu nicht-neuronalen Zellen (Daunt et al., 1997) ist in PC12-Zellen eine schnellere Internalisierung des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors zu beobachten (Olli-

Lähdesmaki et al., 2003). Zudem ist der Mechanismus der Endozytose von Rezeptor zu Rezeptor verschieden. So internalisiert der  $\alpha_{2B}$ -Rezeptor ausschließlich in Clathrin-Vesikel, während der  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor sowohl in Clathrin-Vesikeln als auch in Caveolin-Vesikeln zu finden ist (Olli-Lähdesmaki et al., 2003).

### 1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

#### 1.3.1 Physikalisch-chemische Grundlagen

Als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird die von Strahlung unabhängige Energieübertragung von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein zweites benachbartes Fluorophor (Akzeptor) bezeichnet. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung ist dabei immer langwelliger und damit energieärmer als das eingestrahlte Anregungslicht. Dabei müssen mehrere Kriterien erfüllt sein. Das Wichtigste dabei ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Diese Tatsache erfüllt besonders gut das Fluorophorenpaar Cyan fluoreszierendes Protein (CFP) und Yellow fluoreszierendes Protein (YFP). Ein weiteres Kriterium ist der Abstand der beiden Fluorophoren-Partner, welcher nur wenige Nanometer betragen sollte. Der Anteil der Energie des angeregten Donors, der auf den Akzeptor übertragen wird, die sog. FRET-Effizienz  $E$  sinkt mit der sechsten Potenz des Abstandes  $r$ . Dabei ist  $R_0$  der Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50% beträgt, der sog. Förster-Radius (Förster, 1948).

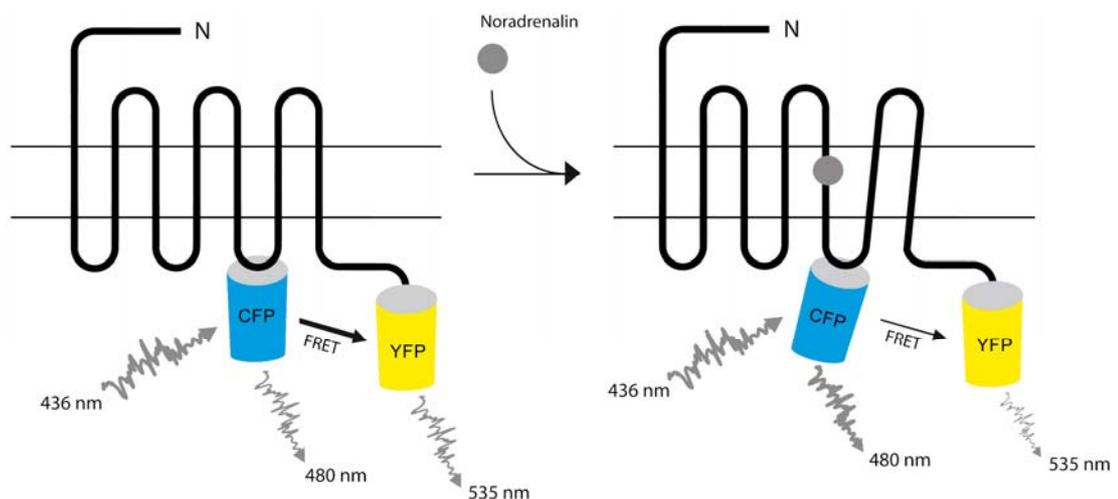
$$E = R_0^6 : (R_0^6 + r^6)$$

Mittels FRET ist somit indirekt über die Abstandsverhältnisse die Interaktion von Proteinen und die Wechselwirkungen von Nukleinsäuren nachweisbar. FRET wird in der Aufklärung von Signaltransduktionswegen und, falls die beiden Fluorophore an dasselbe Protein gekoppelt sind, dem Nachweis von räumlichen Strukturen und Faltungsprozessen von Proteinen eingesetzt (Lohse

et al., 2003; Lohse et al., 2007a; Lohse et al., 2007b; Lohse et al., 2008; Hoffmann et al., 2007).

### 1.3.2 Monitoring und Analyse von Agonist – Effekten auf Rezeptorebene

Es existierte lange Zeit keine Methode zur direkten Analyse von Effekten auf Rezeptorebene, wie z.B. Konformationsänderungen nach einer Aktivierung durch Agonisten. Es gab lediglich indirekte Möglichkeiten über die Messung von physiologischen und biochemischen Antworten auf eine Rezeptoraktivierung. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) stellt nun eine Methode zum direkten Monitoring dar (Lohse et al., 2003; Lohse et al., 2007a; Lohse et al., 2007b). Dabei werden die beiden Fluorophore CFP und YFP in die verschiedenen Rezeptoren integriert und die jeweiligen FRET-Signaländerungen nach Rezeptoraktivierung aufgezeichnet (Abb. 7).



**Abb. 7: Darstellung des FRET-Prinzips anhand eines  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors.** Dabei wurde das CFP in die dritte intrazelluläre Rezeptorschleife und das YFP in den Carboxy-Terminus integriert. Eine Anregung des CFP mit 436 nm führt zum Energietransfer (FRET), damit zur Anregung des YFP und einer Emission bei 535 nm. Nach Rezeptoraktivierung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass nur noch geringes FRET möglich ist und eine stärkere Emission bei 480 nm (entspricht der Emission des CFP) zu verzeichnen ist (modifiziert nach Vilardaga et al., 2003 und Lohse et al., 2003).

Das CFP wurde dabei in einem 7-Transmembran-Rezeptor in der dritten intrazellulären Schleife und das YFP am C-Terminus inseriert [„ $\alpha_{2A}$ -cam, PTHR-cam“ (Vilardaga et al., 2003)]. Eine Anregung des CFP mit 436 nm führt zu einer Emission von CFP bei 480 nm, aber auch zu einer Anregung und Emission von YFP bei 535 nm, womit ein Nachweis von FRET gegeben ist (Vilardaga et al., 2003). Die Zugabe eines Agonisten veränderte das FRET-Signal. Durch die Konformationsänderung und die damit verbundene Wegbewegung der dritten Schleife vom C-Terminus, steigt die Emission des CFP und sinkt die Emission des YFP und damit auch die FRET-Ratio (= YFP/CFP).

In diesem System führte ein voller Agonist zu einem vollen, ein partieller zu einem partiellen und ein Antagonist zu keinem messbaren Effekt (Lohse et al., 2003). Über eine Transfektion von HEK 293- oder CHO-Zellen mit der generierten cDNA, wie z.B.  $\alpha_{2A}$ -cam, konnte zudem nachgewiesen werden, dass die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren durch die Integration der fluoreszierenden Proteine nicht verloren gehen (Lohse et al., 2003; Vilardaga et al., 2003). Mittels FRET ist auch die Möglichkeit gegeben, das Anschalten der Rezeptoren innerhalb von Millisekunden darzustellen. Dabei spielt die Konzentration des Agonisten eine entscheidende Rolle. Steigende Agonist-Konzentrationen führen zu einer schnelleren Signaländerung (Vilardaga et al., 2003).

## **1.4 Transgene Tiere**

### 1.4.1 Techniken zur Generierung transgener Tiere

Durch die Weiterentwicklung der Biotechnologie und von Techniken der Molekularbiologie ist es heute möglich, gezielt zusätzliche Gene in Zellen einzuschleusen und an- oder abzuschalten (Nagy et al., 2003). Mittels dieser Gentransfertechnologie können nun nicht nur Vorgänge einzelner Zellen, sondern Wirkungen und Eigenschaften einzelner Proteine im gesamten Organismus untersucht werden. 1980 gelang es zum ersten Mal, das Genom

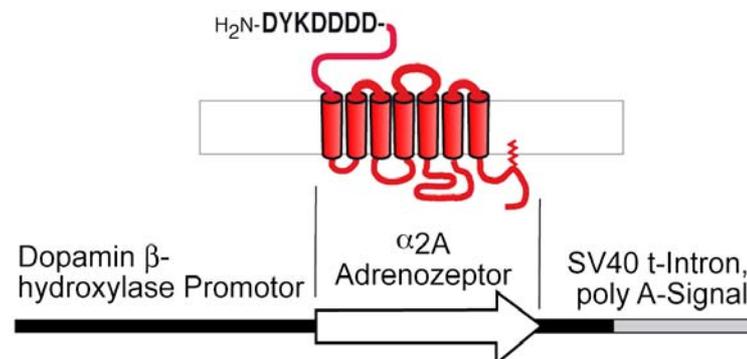
von Säugern gezielt zu verändern (Gordon et al., 1980). Zur Generierung sog. transgener Tiermodelle existieren generell zwei verschiedene Methoden: die Pronukleusinjektion („Pronukleus-Transgene“) und das „Gene-Targeting“ in Stammzellen („Stammzell-Transgene“). Dabei spielen Mausmodelle eine zentrale Rolle (Beck et al., 2000), da sie neben dem Menschen die genetisch am besten untersuchten Säugetiere darstellen. Die Maus ist in der Entwicklung, dem Stoffwechsel und ihrer Erbinformation dem Menschen erstaunlich ähnlich. Sie besitzt ein etwas kleineres Erbgut. 99% der Mausgene weisen ein entsprechendes Pendant im menschlichen Genom auf (Waterston et al., 2002). Die Technik der Pronukleus-Injektion stellt die Mikroinjektion eines Gens in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle dar (Nagy et al., 2003). Dabei werden die befruchteten Eizellen im Einzellstadium dem Spendertier entnommen, das Genkonstrukt aus Promotor und Gen injiziert und schließlich einer scheinträchtigen Maus zur Austragung in den Eileiter transferiert. Das DNA-Konstrukt wird zufällig an einer nicht vorhersehbaren Stelle in das Erbgut integriert. Möglich ist auch die Integration in die Keimbahn, so dass eine Übertragung der Information auf die nächste Generation möglich ist.

Mit der Methode des „Gene-Targeting“ dagegen können zielgerichtet bestimmte Gene ausgeschaltet oder Punktmutationen integriert werden. Dabei spielt die Herstellung sog. „Knock-out“(KO)-Tiere eine bedeutende Rolle. Der Unterschied besteht darin, dass es sich hier um eine Transfektion pluripotenter, aus Blastozysten gewonnener, embryonaler Stammzellen (ES-Zellen), mit dem entsprechenden Genkonstrukt handelt. Das Prinzip der homologen Rekombination führt schließlich zur Inaktivierung eines endogenen Gens. ES-Zellen können unter bestimmten Bedingungen in Kultur gehalten und vermehrt werden, ohne, dass sie ihre Eigenschaft, sich zu allen Geweben des Organismus entwickeln zu können, verlieren. Die manipulierten ES-Zellen werden in Blastozysten oder Embryonen im Morulastadium reinjiziert und in eine scheinträchtige Maus transferiert, um von dieser ausgetragen zu werden. Damit entstehen chimäre Tiere, die zum Teil das Genom der Eltern der Blastozysten und zum anderen Teil die Gene der manipulierten ES-Zellen besitzen. Auch hier ist eine Übertragung auf nachfolgende Generationen

möglich, sofern sich die ES-Zellen zu Keimzellen weiterentwickeln. Ein großer Nachteil dieser Technik ist die Tatsache, dass aufgrund des gemischten genetischen Hintergrunds der entstehenden „Knock-out“-Tiere zur Produktion homozygoter Tiere oft aufwendige Rückkreuzungen notwendig sind. Bisher ist eine derartige gezielte Modifikation von Genen durch homologe Rekombination nur bei der Maus gelungen. Für die Entwicklung dieser Techniken wurden Mario Capecchi, Oliver Smithies und Martin Evans 2007 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

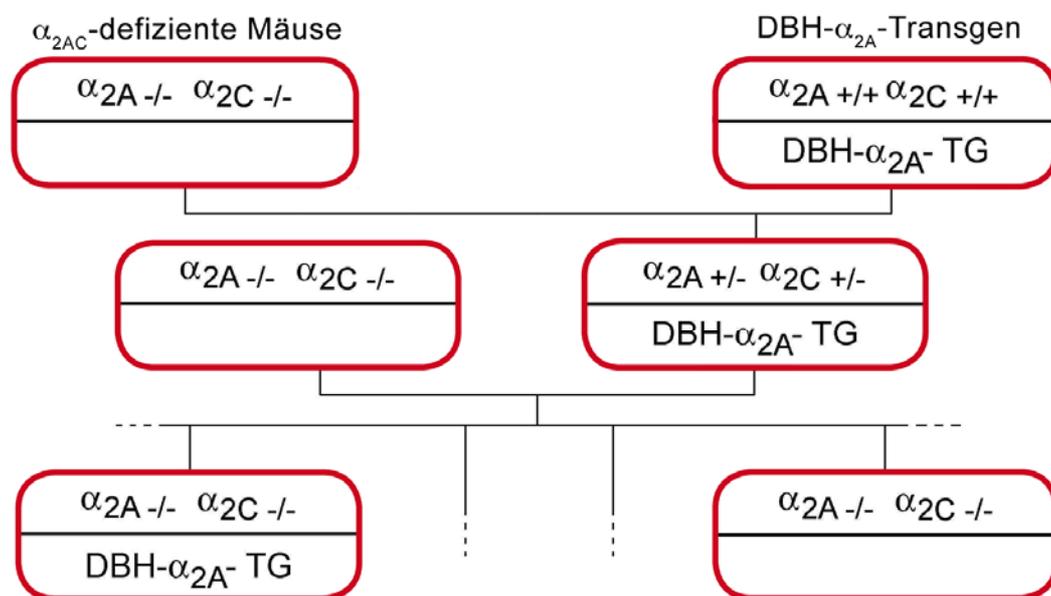
#### 1.4.2 Transgene Mäuse mit veränderten $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren

Mit Hilfe der „Gene-Targeting“ Methode wurden bereits vor einigen Jahren Mauslinien mit jeweils einem deletierten  $\alpha_2$ -Rezeptorgen generiert. So entstanden „Knock-out“-Tiere bezüglich des  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptors (Altman et al., 1999; Link et al., 1995). Verpaarte man diese Tiere miteinander, entstanden heterozygote „Doppel-Knock-out-Tiere“ (z.B.  $\alpha_{2AC}^{+/-}$ ), welche schließlich durch erneute Kreuzung entsprechend der Mendelschen Gesetze mit einer Wahrscheinlichkeit von 6,25% homozygote  $\alpha_{2AC}^{-/-}$  Nachkommen hervorbrachten (Hein et al., 1999). Die Entwicklung dieser KO-Tiere ermöglichte schließlich eine genaue Untersuchung und eindeutige Zuordnung der Funktionen der einzelnen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren (zur Übersicht: Gilsbach und Hein, 2008).



**Abb. 8: Darstellung des transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors unter der Kontrolle der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase**

Weitere Mauslinien, die bereits zu Beginn der Arbeit existierten, exprimierten gewebespezifisch Epitop-markierte  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren unter der Kontrolle des Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Promotors (siehe Abb. 8). Diese transgenen Tiere wurden wiederum mit  $\alpha_{2AC}$ -/-Tieren gekreuzt, um untersuchen zu können, welche Funktionen durch den transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in  $\alpha_{2AC}$ -defizienten Mäusen wieder erfüllt werden (siehe 4.2.1 und Abb. 9).



**Abb. 9:** Kreuzungsschema zur Generierung transgener  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Mäuse ohne endogene  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren.

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Bis heute sind bei weitem nicht alle Funktionen des adrenergen Systems aufgeklärt. Durch die Entwicklung sogenannter „Knock-out“-Mäuse konnten bereits eindeutige Zuordnungen zwischen physiologischen Funktionen und einzelnen Rezeptorsubtypen erfolgen. Offen bleibt allerdings, inwieweit die funktionelle Diversität des adrenergen Systems allein durch die Existenz der verschiedenen Rezeptorsubtypen erklärt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, inwieweit Rezeptorsubtypen, die subzelluläre Lokalisation von Rezeptoren oder der Differenzierungsstatus einer Zelle für die funktionelle Vielfalt der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren *in vivo* verantwortlich sind.

Zunächst sollte anhand eines transgenen Mausmodells getestet werden, ob ein einzelner Rezeptorsubtyp in den verschiedenen Neuronen des sympathischen Nervensystems *in vivo* identische Funktionen hat. Hierfür wurden der kardiale Phänotyp sowie die Plasma-Katecholamine von transgenen Mäusen, die selektiv  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in adrenergen Neuronen exprimierten, eingehend charakterisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geprüft werden, ob die Aktivierung von Rezeptoren von der Morphologie, dem Differenzierungsstatus einer Zelle oder von der subzellulären Lokalisation der Rezeptoren abhängt. Hierfür wurden  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren durch CFP- und YFP-Varianten des grün fluoreszierenden Proteins markiert und mittels FRET-Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

## 2. Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung von Zellen

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in Brutschränken bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 7% gezüchtet. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und, um die Zellen möglichst schonend zu behandeln, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

##### 2.1.1.1 Kultur von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen („human embryonic kidney“) sind menschliche embryonale Nierenzellen. Dem verwendeten Kulturmedium DMEM, das 4,5g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub> und Natriumpyruvat enthält, wurden zusätzlich 10% fötales Kälberserum (FCS), das zum Wachstum erforderliche mitogene Faktoren enthält, und jeweils 1% Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden auf 8,5 cm Schalen kultiviert und alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von ca. 80-90% im Verhältnis 1:9 bzw. 1:12 passagiert. Da HEK-293-Zellen adhärent am Plattenboden wachsen, mussten sie vor der Passagierung durch Trypsin/EDTA-haltigen PBS-Puffer abgelöst werden. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von DMEM-Medium und anschließender Zentrifugation bei 850 rpm für 3 Minuten aufgehoben. Das Pellet konnte nun in frischem Medium resuspendiert und entsprechend auf 9 bzw. 12 Schalen verteilt werden.

##### 2.1.1.2 Kultur von PC12-Zellen

Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Zelllinie ist die PC12-Linie, eine Phäochromocytom-Zelllinie aus Ratten (ATCC-Nummer CRL-1721). Das zur Kultivierung verwendete Medium DMEM (siehe HEK-Zellen) wurde mit 10%

Pferdeserum, 5% FCS und jeweils 1% Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert. Die Zellen wurden in T-75 Flaschen, die mit 20 ml Medium gefüllt wurden, kultiviert, wobei das Medium ca. 2x pro Woche gewechselt und die Zellen 1x pro Woche im Verhältnis 1:6 oder 1:8 passagiert wurden. Dabei konnte die Ablösung der Zellen auf rein mechanischem Weg mittels Pipette und Medium erfolgen, da die Zellen etwas weniger adhärent als HEK-293-Zellen sind. Die Ausdifferenzierung der PC12-Zellen mit Neuritenwachstum erfolgte durch die Verwendung eines Differenzierungsmediums, dem, neben 1% Pferdeserum, 0,5% FCS, und je 1% Glutamin und Penicillin/Streptomycin Nervenwachstumsfaktor (NGF der Ratte) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugesetzt wurden. Stabil transfizierte Zellen wurden durch die Zugabe des Antibiotikums Geneticin (G 418) in einer optimalen Endkonzentration von 0,6 mg/ml in Kultur gehalten. Dadurch wurden die Zellen selektioniert, da sie bei der Transfektion zusätzlich ein Geneticin-Resistenzgen erhalten hatten (Aminoglykosid-Phosphotransferase APH).

## 2.1.2 Lagerung der Zellen

### 2.1.2.1 Einfrieren der Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden ca. 70-80% konfluente, auf einer 8,5 cm Ø Schale gewachsene Zellen, eingefroren. Dazu wurde zuerst das Einfriermedium, das sich aus 8 ml DMEM Medium, 1 ml DMSO, und 1 ml FCS zusammensetzt, in ein 15 ml Falcon pipettiert und anschließend im Gefrierfach vorgekühlt. Zusätzlich mussten sterile Kryoröhrchen beschriftet und ebenfalls zum Vorkühlen in das Gefrierfach gestellt werden. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert bzw. mechanisch von dem Untergrund gelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,5-5 ml Gefriermedium resuspendiert und jeweils 1 ml auf 4 gekühlte Kryoröhrchen verteilt. Um das Absterben der Zellen vor dem Einfrieren zu verhindern, erfordern vor allem die letzten Schritte möglichst zügiges Arbeiten. Die Zellen wurden schließlich über Nacht bei -20°C aufbewahrt und am nächsten Morgen

bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Da sie dort lediglich ca. 2-3 Monate gelagert werden können, wurden sie gegebenenfalls in einem Flüssigstickstofftank konserviert.

#### 2.1.2.1 Auftauen der Zellen

Im Gegensatz zum Einfrieren musste das Auftauen der Zellen möglichst schnell erfolgen. Das Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  rasch aufgetaut und der Inhalt in ein Falcon-Röhrchen mit vorgelegtem Medium überführt. Nach Zentrifugation bei 850 rpm für 3 Minuten wurde der Überstand und damit auch das DMSO abgesaugt, das Pellet anschließend in frischem Medium resuspendiert und in eine Petrischale ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Medium täglich gewechselt, um dann bei ausreichender Konfluenz eine Passage durchzuführen.

#### 2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Für diverse Versuche wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, um eine bestimmte Zellzahl zu verwenden. Dazu wurde die Kammer mit ca. 20-30  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gefüllt und anschließend die Zellzahl der 4 Quadranten unter dem Lichtmikroskop ermittelt und addiert. Für die Berechnung der Anzahl der Zellen/ $\mu\text{l}$  musste diese Zahl mit dem Faktor 10 multipliziert und durch 4 geteilt werden.

#### 2.1.4 Vorbereitung der Zellen für die Mikroskopie

Um die Zellen mikroskopieren zu können, mussten sie auf sterile, runde Deckgläschen ausgesät werden. Dazu wurden Deckgläschen mit Poly-D-Lysin beschichtet, um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten. Nach ca. 10-15 Minuten wurden die Platten mit sterilem PBS gespült und die Zellen anschließend gleichmäßig auf die Deckgläschen verteilt. In ca. 2 ml Medium pro Schale konnten die Zellen über Nacht gut anwachsen.

## 2.2. Transfektionsmethoden

### 2.2.1 Transfektion mittels $\text{Ca}^{2+}$ -Phosphat

Das Prinzip dieser Transfektionsmethode ist eine Mischung aus Plasmid-DNA,  $\text{CaCl}_2$  und Phosphat-Puffer, in der sehr kleine, unlösliche Calcium-Phosphat-Kristalle präzipitieren. Diese enthalten kondensierte DNA, heften sich als Calcium-Phosphat-DNA-Komplexe an die Zellmembranen und werden über Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Die Durchführung dieser Methode, die besonders für HEK-Zellen gut geeignet ist, erstreckte sich allerdings über 2 Tage, so dass die Zellen erst am dritten Tag, also nach ca. 48 Stunden, für Experimente verwendet werden konnten.

Ca. 3-4 Stunden vor der Transfektion wurden Zellen, die ca. 80% konfluent auf einer 8,5 cm Ø Petrischale gewachsen waren, in den jeweils gewünschten Verhältnissen entweder auf 6-Loch-Schalen oder auf eine weitere 8,5 cm Ø Platte verteilt. In der Regel wurde das Zellpellet nach Zentrifugation in 10 ml Medium resuspendiert und jeweils 0,5-1 ml Zellsuspension pro 3,5 cm Ø Schale bzw. 3 ml pro 8,5 cm Ø Platte verwendet. Es musste besonders darauf geachtet werden, dass die Zellen ausreichend vereinzelt wurden. Der Transfektionsansatz wurde gut mit Luft durchgemischt, 10-20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend auf die Zellen getropft.

	pro 3,5 cm Ø Schale	pro 8,5 cm Ø Schale
Plasmid-DNA	7 µg	20 µg
Aqua dest.	135 µl	450 µl
2,5 M $\text{CaCl}_2$	15 µl	50 µl
2x BBS	150 µl	500 µl

2x BBS:      1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
                  50 mM BES  
                  280 mM NaCl  
                  pH 6,95

Daraufhin wurden die Zellen bei 3-5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Der CaPO<sub>4</sub>-Niederschlag sollte am nächsten Tag in Form von Kristallen mikroskopisch sichtbar sein. Ein weiteres Zeichen einer guten Transfektion sind die leicht abgerundeten Zellen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 5-7% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.2 Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)-Lösung

Eine weitere Methode ist die Transfektion mittels PEI-Lösung. Am Tag vor der Transfektion wurden HEK-Zellen so gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 30-50% konfluent waren. Das nun verwendete DMEM Medium enthielt keine Antibiotika, sondern nur 10% FCS und 1% Glutamin. Am nächsten Tag wurde folgender Transfektionsansatz in einem Falcon- oder Eppendorf-Röhrchen zusammenpipettiert:

	6 cm Ø Schale	8,5 cm Ø Schale
Medium	300 µl	1 ml
Plasmid-DNA	3 µg	10 µg
PEI-Lösung	10 µg	30 µg

Das dabei verwendete DMEM-Medium durfte weder Antibiotika, noch FCS oder Glutamin enthalten. Nachdem der Ansatz gut durchmischt und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen wurde, tropfte man ihn direkt auf die Zellen. Nach bereits 5-12 Stunden Inkubation bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> konnte auf normales Medium mit 10% FCS und jeweils 1% Glutamin und Penicillin/Streptomycin gewechselt werden.

Zur Herstellung der PEI-Lösung musste das Polyethylenimin in einem Falcon-Röhrchen abgewogen und mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 10 µg/µl eingestellt werden. Da die Lösung nicht steril filtriert werden kann, sollte sehr sauber gearbeitet werden. Die 10-fache Stammlösung konnte nun für die Transfektion ebenfalls mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt werden.

### 2.2.3 Elektroporation mittels Nucleofector

Die Nucleofector™ Technologie basiert auf zwei Komponenten, zum einen dem Nucleofector-Gerät, zum anderen den Nucleofector™ Kits, die zell-spezifische und optimierte Nucleofector™ Lösungen enthalten.

Für die Transfektion von PC12-Zellen wurde ein Kit mit 2,25 ml „Cell line Nucleofector™ Solution V“, 0,5 ml Supplement, das zur Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt werden musste, sowie Elektroporationsküvetten benötigt.

Die verwendeten PC12-Zellen wurden in T-75-Flaschen mit 20 ml Kulturmedium gehalten, wobei 1-2x pro Woche das Medium gewechselt werden und 1x pro Woche eine Passage stattfinden sollte. Zudem wurden nur Zellen bis Passage 30 für die Transfektion verwendet.

Für eine Transfektion waren 2-3 µg Plasmid-DNA, 100 µl Nucleofector™ Lösung und optimalerweise ca.  $2 \times 10^6$  Zellen nötig. Die Zellzahl sollte nicht weniger als  $1 \times 10^6$  betragen, da sonst ein größerer Anstieg in der Zellmortalität zu erwarten war. Zur Vorbereitung der Transfektion musste die Nucleofector™ Lösung auf Raumtemperatur und 500 µl Medium pro Transfektion im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Des Weiteren wurden Deckgläschen in 6-Loch-Schalen entsprechend beschichtet (siehe 2.1), die Platte mit je 1,5 ml Medium pro Loch und Deckglas befüllt und das Medium im Inkubator bei 37°C vorgewärmt.

Nachdem die Zellen mittels einer Neubauer-Kammer gezählt (siehe 2.1.3) worden waren, wurde die entsprechende Menge Zellsuspension bei 90xg für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 100 µl Nucleofector-Lösung resuspendiert. Es war wichtig, dass die Zellen von diesem Zeitpunkt an nicht länger als 15 Minuten in der Nucleofector-Lösung verblieben, da diese die Überlebensfähigkeit der Zellen und die Transfektionseffizienz reduzierte. Nun konnten 2-3 µg Plasmid-DNA zugegeben und die Suspension in eine Amaxa-Küvette überführt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Lösung den Boden der Küvette vollständig bedeckte und Luftblasen beim Pipettieren vermieden wurden. Die Küvette wurde daraufhin in das Gerät gestellt und das entsprechende Elektroporationsprogramm U-29 ausgewählt. Nach ein paar Sekunden, in denen das Gerät die Elektroporation durchführte, konnte die

Küvette bereits wieder entnommen und der Inhalt zur Vermeidung von zusätzlichen Zellschäden mittels einer Plastikpipette in die vorgewärmten 500 µl Medium gegeben werden. Nun verteilte man die Suspension auf die vorbereiteten Deckgläschen und inkubierte die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.2.4 Überprüfung der Transfektionseffizienz

### 2.2.4.1 Auszählen der Zellen

Die wohl einfachste Methode, die Transfektionseffizienz zu überprüfen, ist das Auszählen einer bestimmten Zellzahl, wobei der Anteil, der ein Reporter gen exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt wurde. Die Transfektionseffizienz wurde entweder durch die GFP-Fluoreszenz der verwendeten Rezeptorkonstrukte oder über die β-Galactosidase als Reporter gen ermittelt.

### 2.2.4.2 X-Gal-Färbung

Für einige Versuche wurde die Transfektionseffizienz mit einem Plasmid überprüft, das das lacZ-Gen unter Kontrolle des Cytomegalieviruspromotors enthielt. Das lacZ-Gen enthält die codierende Sequenz einer β-Galactosidase, welche in der Lage war, das Chromogen X-Gal in ein blaues Produkt zu überführen, das wiederum im Lichtmikroskop zu erkennen war. Dafür wurden die Zellen nach Transfektion auf Eis mit PBS gewaschen und 5 Minuten mit 2% Paraformaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Im Anschluß konnten sie mit der Färbelösung aus 1 mg/ml X-Gal in DMSO, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] und 5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] für ca. 1 Stunde bei 37°C inkubiert werden.

## 2.3 Gewinnung von Plasmid-DNA

Damit Bakterien die Aufnahme von DNA aus dem Medium (Transformation) zeigten, mussten sie in der Kälte mit Ca<sup>2+</sup> oder speziellen Salzmischungen

behandelt werden. Während eines leichten Hitzeschocks konnten die nun kompetenten Zellen die ringförmige Plasmid-DNA aufnehmen.

### 2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung von kompetenten E.coli-Zellsuspensionen zur Transformation mit DNA wurden gefrorene kompetente Zellen mit der Pipettenspitze abgekratzt und in ca. 15 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden 200 µl dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium so lange im 37°C-Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,5 bei 590 nm gemessen werden konnte. Nach Zentrifugation bei 4500 rpm für ca. 10 Minuten wurde schließlich jedes Pellet in ca. 25 ml kalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach weiteren 20 Minuten auf Eis und erneuter Zentrifugation bei 4°C, wurde das Pellet ein zweites Mal, nun in je 5 ml CaCl<sub>2</sub> (50 mM) suspendiert. Die Zugabe von 15% Glycerin erlaubte abschließend das Schockgefrieren der Aliquots in flüssigem Stickstoff und die endgültige Lagerung bei -80°C. Insgesamt musste auf steriles Arbeiten und antibiotikafreie Kulturen geachtet werden.

LB-Medium: 1% NaCl  
1% Trypton  
0,5% Hefe-Extrakt  
in dest. Wasser

### 2.3.2 Transformation von E.coli

Zur Transformation wurden nun 100-200 µl kompetente Zellen, die langsam auf Eis auftauten, und ca. 1 µg dazugegebene Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach dem Hitzeschock für 2 Minuten im 42°C Wasserbad und weiteren 5 Minuten auf Eis wurden 900 µl LB-Medium ohne Ampicillin dazu pipettiert und der Ansatz bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt. Ca. 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten, meist mit Ampicillin (100

µg/ml) als Selektionsantibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Agarplatten: 1% Agar in LB-Medium

### 2.3.3 Maxipräparation mittels Qiagen® – Säulen

Nach der Transformation wurde in einem 1 l-Erlenmeyerkolben 250 ml LB-Medium, das mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt wurde, mit einer auf den Agarplatten hochgewachsenen Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 140 rpm über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4500 rpm das amplifizierte Plasmid mittels Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen® und den verschiedenen Qiagen® Puffern entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das durch erneute Zentrifugation erhaltene Pellet aus Plasmid-DNA wurde in 500 µl Wasser gelöst.

### 2.3.4 Quantifizierung von DNA

Zur Quantifizierung der DNA wurde sie in Wasser verdünnt und die optische Dichte im Photometer bei 260 nm bestimmt. Da eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/µl DNA entspricht, konnte die Konzentration der gemessenen Plasmid-DNA entsprechend berechnet und auf 1 µg/µl eingestellt werden.

## 2.4 FRET – Messungen

### 2.4.1 Herstellung des „FRET-Puffers“

Um die Austrocknung der Zellen während der Messung zu vermeiden und sie in einem möglichst physiologischen Milieu zu halten, wurde „FRET-Puffer“ auf die Deckgläschen gegeben.

„FRET-Puffer“: 144 mM NaCl  
5,4 mM KCl  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl  
10 mM Hepes / NaOH pH 7,3

#### 2.4.2 Herstellung der Agonist-Lösungen

Zur Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve durch FRET-Messungen mussten verschiedene Konzentrationen eines Rezeptor-Agonisten zugegeben werden. In diesem Fall wurden Verdünnungsreihen von Noradrenalin im „FRET-Puffer“ hergestellt und anschließend die Reaktionen der Zellen auf Zugabe des Agonisten gemessen.

#### 2.4.3 Aufbau des Mikroskop-Platzes zur FRET-Messung

Der FRET-Messplatz bestand aus dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 von Zeiss mit einem Filterwürfel für verschiedene Wellenlängen des Lichts und zwei Photodioden (Till Photonics, Planegg Deutschland), die jeweils eine Emissionswellenlänge registrierten, sodass parallel zwei Lichtwellenlängen aufgezeichnet werden konnten. Die Lichtquelle war eine Xenonlampe Polychrom IV (Till Photonics), die über ein optisches Gitter, das beliebig einstellbar war, die Zellen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregte. Über diverse Filter, Strahlenteiler (DCLP 505 nm, DCLP 460 nm) und Spiegel wurde das von den Zellen emittierte Licht zu den Photodioden geleitet und über ein Verstärkersystem digital auf einem Computer (Digidata1322A, Axon Instruments; Clampex 8.1 software, Axon Instruments) aufgezeichnet.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Messplatzes war die Perfusionsvorrichtung (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments) mit 8 befüllbaren Röhrchen, aus denen die verschiedenen Lösungen über ein Schlauchsystem und eine Perfusionsspitze direkt auf die Zellen geleitet werden konnten. Dieser

Vorgang, der über ein Drucksystem ermöglicht wurde, konnte sowohl manuell als auch direkt durch den Computer gesteuert werden.

#### 2.4.4 Messung von agonist-abhängigen-FRET-Änderungen

##### 2.4.4.1 Vorbereitung der Zellen

Die Deckgläschen, auf denen die Zellen entsprechend gewachsen waren, wurden für die Messungen in eine Kammer gespannt, die mit Puffer gefüllt wurde. Bei Raumtemperatur wurde diese wiederum auf dem Tisch des Mikroskops, das mit einem Öl-Immersions-Objektiv einer 100fachen Vergrößerung ausgestattet war, platziert. Die Perfusionsspitze wurde immer auf ca. 3 Uhr im Sichtfeld des Mikroskops so eingestellt, dass der Flüssigkeitsstrom nach Pufferzugabe an locker sitzenden, davon schwimmenden Zellen beobachtet werden konnte.

##### 2.4.4.2 Optische Anregung der Zellen

Die Einstellungen zur Aufnahme der Fluoreszenz-Intensitäten konnten mit Hilfe des Computerprogramms Till pmcC (Till Photonics) getätigt werden. So konnte nicht nur die entsprechende Wellenlänge des Lichts, mit der die Zellen angeregt wurden, sondern auch die Belichtungszeit und die Frequenz der Belichtung, indirekt über die Zykluslänge, d.h. die Zeit, in deren Abstand belichtet werden sollte, bestimmt werden. Während die Anregungswellenlänge des Fluorophor CFP bei 436 nm liegt, musste für die Ermittlung der direkten YFP-Emission das Fluorophor YFP mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt werden. Es wurde für die meisten Versuche ein Belichtungsintervall von 300 ms gewählt und eine Belichtungszeit je nach Leuchtintensität der Zellen von 20 bis 40 ms festgelegt.

##### 2.4.4.3 Aufzeichnung der Messungen

Die Aufzeichnung der verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten erfolgte mit dem Programm Clampex (Axon Instruments). Alle 2 ms wurde ein Fluoreszenzwert

der beiden Fluorophore YFP und CFP gemessen und zusammen mit dem berechneten Fluoreszenz-Verhältnis ( $=YFP/CFP$ ) in einem Kurvenverlauf dargestellt. Durch die entsprechende Eingabe in Clampex konnte die Perfusion analog gesteuert werden, sodass die Zellen mit verschiedenen Lösungen perfundiert und agonist-abhängige FRET-Änderungen gleichzeitig am Bildschirm aufgezeichnet werden konnten.

#### **2.4.5 Visuelle FRET – Darstellung**

Zur fotografischen Erfassung der Fluoreszenz musste ein Messplatz genutzt werden, der neben einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop, das mit einem Öl-Immersion-Plan Neofluar Objektiv mit 63-facher Vergrößerung und 2 Photodioden (480/535 nm) zusätzlich mit einer CoolSNAP-HQ CCD-Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) ausgestattet war. Die Zellen wurden über eine Polychrome IV-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von  $436\pm 10$  nm angeregt und die Emission bei  $535\pm 20$  nm und  $480\pm 15$  nm durch einen Strahlenteiler 505 DCXR registriert. Während die Aufzeichnung mit Hilfe von MetaFluor 5.0 erfolgte, geschah die Auswertung mit dem Programm MetaMorph 5.0 (beides Visitron Systems) und Origin-Software (Microcal, Amherst, MA).

#### **2.5 FRET – Auswertung**

Zur Auswertung der Messungen wurden die Computerprogramme Origin 6.1 und Excel verwendet. Zur korrekten Angabe des Fluoreszenzverhältnisses („Ratio“ =  $YFP/CFP$ ) muss der YFP-Wert korrigiert werden. Ein gewisser Anteil des gemessenen YFP-Werts ist durch eine direkte YFP-Anregung und einer im YFP-Kanal mitgemessenen CFP-Emission bedingt. Die Emission von YFP im 480 nm-Kanal war vernachlässigbar. Daher lautet die Korrekturformel:

$YFP^{FRET} = YFP^{gemessen} - 0,8 \times CFP - 0,06 \times \text{direktes YFP}$ . In Origin konnten nun die Kurven der „Ratio“ nach Korrektur des Ausbleichens und entsprechende Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt werden. Mit Hilfe von Excel wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Werte, wie z.B. der maximalen FRET-Amplitude aufgelistet und graphisch umgesetzt.

## 2.6 Transgene Tiermodelle

### 2.6.1 Generierung und Haltung $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor-transgener Mäuse

Zu Beginn dieser Arbeit waren die benötigten transgenen Mauslinien bereits vorhanden. Die Generierung erfolgte durch Prof. Dr. Lutz Hein zusammen mit der Tierärztin Dr. Eva Schmitteckert mit Genehmigung der Regierung von Unterfranken. Mittels Pronukleusinjektion wurden nebeneinander zwei Mauslinien gezüchtet, die mit Flag- $\alpha_{2A}$ TG11 und Flag- $\alpha_{2A}$ TG25 bezeichnet wurden und in welchen die endogenen  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorgene intakt waren. Um diese auszuschalten, wurden die transgenen Mauslinien mit homozygoten  $\alpha_{2AC}/-$ Mäusen rückgekreuzt, sodass man schließlich in der F2-Generation mit einer Häufigkeit von 25% homozygote  $\alpha_{2AC}/-$ Mäuse erhielt, die gleichzeitig das Transgen exprimierten.

Die Haltung der Mäuse erfolgte gemäß den Tierschutzverordnungen in einer SPF-Anlage in Käfigen mit maximal 5 Tieren. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden und die Ernährung mit Wasser und Pellet-Futter war ad libitum gewährleistet.

### 2.6.2 Genotypisierung $\alpha_{2A}$ -transgener Tiere

#### 2.6.2.1 Präparation genomischer DNA

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den ca. 3 Wochen alten Mäusen eine kleine Schwanzbiopsie (ca. 2-3 mm) entnommen und in 200  $\mu$ l Lysispuffer und

5  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht unter starkem Schütteln bei 55°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 13000 rpm für 1 min wurden die Proben für 8 min auf 100°C erhitzt und anschließend erneut für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die sich im Überstand befindende DNA wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und 1  $\mu$ l davon für die folgende PCR verwendet.

Lysispuffer: 2,5 ml 10% Natriumlauroylsarcosin  
 1 ml 5 M NaCl  
 2,5 g Chelex<sup>®</sup>-100  
 ad 50 ml H<sub>2</sub>O

### 2.6.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden die Gewebebiopsien nach der Isolierung der DNA weiter untersucht. Durch diese Technik können geringe Mengen an genomischer DNA durch sequenzspezifische Primer in großen Mengen amplifiziert werden (Saiki et al., 1988). Die DNA-Fragmente wurden schließlich in der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht.

Bei der Generierung  $\alpha_{2A}$ -transgener Mäuse wurde im Vektor ein „Flag“-Epitop vor die kodierende Sequenz des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors integriert. Dieses Epitop wurde durch eine geeignete Wahl von Primern zur Unterscheidung von  $\alpha_{2A}$ -transgenen Tieren und Wildtyp-Tieren genutzt.

PCR:		Primersequenz (5'→3')	T <sub>m</sub>	Fragmentgröße
Flag- $\alpha_{2A}$	Vorwärtsprimer	ATGTCGACGCCACCTTAGAT	61°	249 bp
	Rückwärtsprimer	AGGCAAACCAGCGTCAGTGT		
$\alpha_{2A}$ -KO (WT-Ansatz)	Vorwärtsprimer	TTCATGTTCCGCCAGGAGCA	61°C	544 bp
	Rückwärtsprimer	AAGGAGATGACAGCCGAGAT		
$\alpha_{2A}$ -KO (KO-Ansatz)	Vorwärtsprimer	GGTGACACTGACGCTGGTTT	59°C	275 bp
	Rückwärtsprimer	CGAGATCCACTAGTTCTAGC		

PCR-Ansatz:

- 1  $\mu$ l Vorwärtsprimer (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l Rückwärtsprimer (10  $\mu$ M)
- 2  $\mu$ l dNTPs (2 mM)
- 2  $\mu$ l 10x PCR-Puffer
- 0,2  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
- 13  $\mu$ l Aqua dest.
- 1  $\mu$ l genomische DNA (1:10 verdünnt)

Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler der Firma Applied Biosystems. Der Ablauf einer PCR bestand aus einem Initialisierungsschritt von 2 min bei 94°C, einem wiederholten dreistufigen Reaktionszyklus und einer 7-minütigen Beendigungsphase bei 72°C, damit angefangene Fragmente zu Ende synthetisiert werden. Der dreistufige Zyklus setzte sich aus einem Denaturierungsschritt mit der Trennung von doppelsträngiger DNA, einem Anlagerungsschritt mit sequenzspezifischer Anlagerung von Primern und einem Amplifikationsschritt mit Anlagerung von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase zusammen. In der Regel wurden 25-30 Zyklen mit 15 s bei 94°C, 20 s bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur  $T_m$  und 25 s, 30 s bzw. 45 s je nach Fragmentgröße bei 72°C durchgeführt.

#### 2.6.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die mittels PCR vervielfältigten DNA-Fragmente wurden anschließend nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Wanderung in einem elektrischen Feld war durch die negative Nettoladung der DNA möglich. Zur Genotypisierung wurden 2%ige Agarose-Gele verwendet, welchen 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l Ethidiumbromid zugesetzt wurde, um die DNA sichtbar machen zu können. Die Geltaschen wurden mit je 15  $\mu$ l der jeweiligen DNA-Probe und, um ein Absinken in die Taschen zu gewährleisten, 1  $\mu$ l eines mit Glycerin versetzten Ladepuffers befüllt. Das Agarose-Gel befand sich in 1x TAE-Puffer und die für 30 min angelegte Spannung betrug 120 V. Als Größenstandard dienten 0,3  $\mu$ g des 100 bp-Markers. Zum Schluss wurden schließlich die aufgetrennten

Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert (E.A.S.Y. –UV-Detektor mit Kamera der Firma Herolab Instruments).

50x TAE-Puffer: 10 mM EDTA  
50 mM (CH<sub>3</sub>COO)Na  
400 mM Tris-HCl pH 8

Ladepuffer: 20 ml 40% Glycerol  
186,1 mg EDTA  
60,57 mg Tris  
125 mg Orange G

100 bp Marker: 25 µl 100 bp-Ladder  
25 µl Orange G Ladepuffer  
200 µl H<sub>2</sub>O

### 2.6.3 Physiologische Messungen

#### 2.6.3.1 In vivo Herzkatheter-Untersuchungen

Zur Messung des systolischen und diastolischen Blutdrucks, sowie der jeweiligen Herzfrequenzraten an lebenden Mäusen wurden Herzkatheter-Untersuchungen durchgeführt. Damit konnte zudem die Reaktion von  $\alpha_{2A}$ -/- Tieren im Vergleich zu transgenen  $\alpha_{2A}$ -Mäusen (Mauslinie AC-/- x A11 Transgen) auf steigende Dosen von  $\alpha_{2A}$ -Agonisten, wie Medetomidin und Clonidin, untersucht werden. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran narkotisiert und die rechte A. carotis freipräpariert. Anschließend wurde ein Katheter in Richtung Herz vorgeschoben und die Druckverhältnisse in der Aorta über eine Drucksonde des Katheters kontinuierlich mit Hilfe eines MacLab/4S-Systems (AD Instruments, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet. Über einen in der linken freipräparierten V. jugularis liegenden Katheter (Polyethylenkatheter, Eppendorf, Hamburg) konnten über eine Mikroinfusionspumpe (Braun,

Messungen, D) steigende Dosen von Pharmaka ( $\alpha_2$ -Agonisten) infundiert werden.

Nach der Tötung der Tiere konnten zudem morphologische Messungen von Größe und Gewicht der einzelnen Organe erfolgen.

#### 2.6.3.2 Bestimmung von Plasma-Katecholamin-Konzentrationen

Mittels „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) wurden die Plasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen im Vergleich zu KO-Tieren bestimmt. Um aus der eröffneten A. carotis Blut zu gewinnen, wurden die Mäuse mit 2,5% Tribromethanol narkotisiert. Schließlich konnte mit heparinisierten Spritzen das Blut entnommen werden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10000xg und 4°C wurde das Plasma im Überstand gewonnen und jeweils 150  $\mu$ l davon mit 30  $\mu$ l Dihydroxybenzylamin als Standard, 300  $\mu$ l Stabilisatormix (1% EDTA, 1,25% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) und 850  $\mu$ l Aqua dest. versetzt.

Nach der Aufbereitung der Proben (2 M Tris, pH 8,7) erfolgte nach Zugabe von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> über einen Filter (GF52, Schleicher & Schuell, Dassel) die Reinigung der Katecholamine. Für die HPLC wurden schließlich 175  $\mu$ l-Fractionen des Eluates eingesetzt. Das HPLC-System setzte sich aus einer Pumpe Typ 515 (Waters, Eschborn), einem automatisierten Injektor WISP 717 (Waters, Eschborn), und einem elektrochemischen Detektor (Coulchem II), der an ein Dreifachelektrodensystem (ESA, Bedford, USA) angeschlossen war, zusammen. Eine exakte Bestimmung der Katecholamin-Plasmakonzentrationen war unter Berücksichtigung des Standards möglich, nachdem die Daten mit Hilfe eines Millennium 2010 Chromatograph-Managers (Waters, Eschborn) ausgewertet wurden. Diese HPLC-Untersuchungen wurden gemeinsam mit Frau M. Babl unter der Anleitung von Dr. R. Wölfel durchgeführt.

## 2.6.3 Histologische Untersuchungen

### 2.6.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Am Ende einer Versuchsserie entnommene Gewebe, wie z.B. die Herzen der Mäuse, wurden in 4%-iger Paraformaldehydlösung bei 4°C gelagert. Das fixierte Gewebe wurde zunächst in einem Automaten dehydratisiert (Pathologisches Institut, Universität Würzburg) und anschließend in flüssigem Paraffinwachs in Blöcke eingebettet, die wiederum bei 4°C gelagert wurden. Mit Hilfe eines Microtoms (Leica RM2165) wurden von den Paraffinblöcken 3-6 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf Objektträger wurden die Schnitte zuerst für 30 Minuten bei 42°C und dann für 30-60 Minuten bei 65°C getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

### 2.6.3.2 Hämalaun-Eosin- und Sirius-Rot-Färbungen

Im Anschluss erfolgte die Färbung der Schnitte. Dazu wurden sie zunächst dreimal zu je 4 Minuten in Xylol entparaffiniert und viermal zu je 2 Minuten in 100% Ethanol rehydriert. Für die HE-Färbung erfolgte nun zur Blaufärbung der Zellkerne für 10 Minuten die Inkubation in Hämalaun-Lösung. Vor der Rotfärbung des Zytoplasmas durch Eosin-Lösung (50 Sekunden) wurde für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült. Nach der Färbung musste erneut kurz in Wasser gespült werden, bevor die Schnitte in Alkohol (einmal 70%, viermal 100% Ethanol für je 2 Minuten) dehydriert wurden. Zur Fertigstellung wurden sie schließlich zweimal für je 3 Minuten in Xylol gewaschen und mit Eukitt eingedeckt.

Ein Teil der histologischen entparaffinisierten Präparate wurde nach der Rehydrierung für 30 Minuten in Sirius-Rot-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit Weigert'scher Lösung gegengefärbt. Nach einem fünfmaligen Waschen mit Ethanol und kurzem Benetzen mit Xylol erfolgte das Eindecken mit dem Roti-Histo-Kitt®.

Die Anfertigung der Schnitte wurde freundlicherweise von Frau Marianne Babl durchgeführt.

### 3. Material

#### 3.1 Zellkultur

DMEM, 4,5% Glucose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pferdeserum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
NGF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Geneticin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aichenbach
DMSO	Applichem, Darmstadt
PC12-Zellen	Institut für angewandte Zellkultur, München
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

#### 3.2 Plasmidvektoren

„alpha2a cam“	Dr. Jean-Pierre Vilardaga
---------------	---------------------------

#### 3.3 Enzyme und Kits

Qiagen® Maxiprep	Qiagen GmbH, Hilden
Nucleofector Kit (Cell Line Solution V)	amaxa biosystems, Köln
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg

### 3.4 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg bezogen.

### 3.5 Chemikalien und Agonisten

Alle im Folgenden nicht erwähnte Substanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich oder Applichem bezogen.

Ethanol	J.T.Baker, Griesheim
Isopropranolol	J.T.Baker, Griesheim
Trypton	Applichem, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Applichem, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Chelex®100 Resin	Biorad Laboratories GmbH, München
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe
Glycylglycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Eppendorf, Hamburg
DNA Größenmarker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Noradrenalin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Medetomidin

Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe

### **3.5 Pufferlösungen**

Alle Pufferlösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

## 4. Ergebnisse

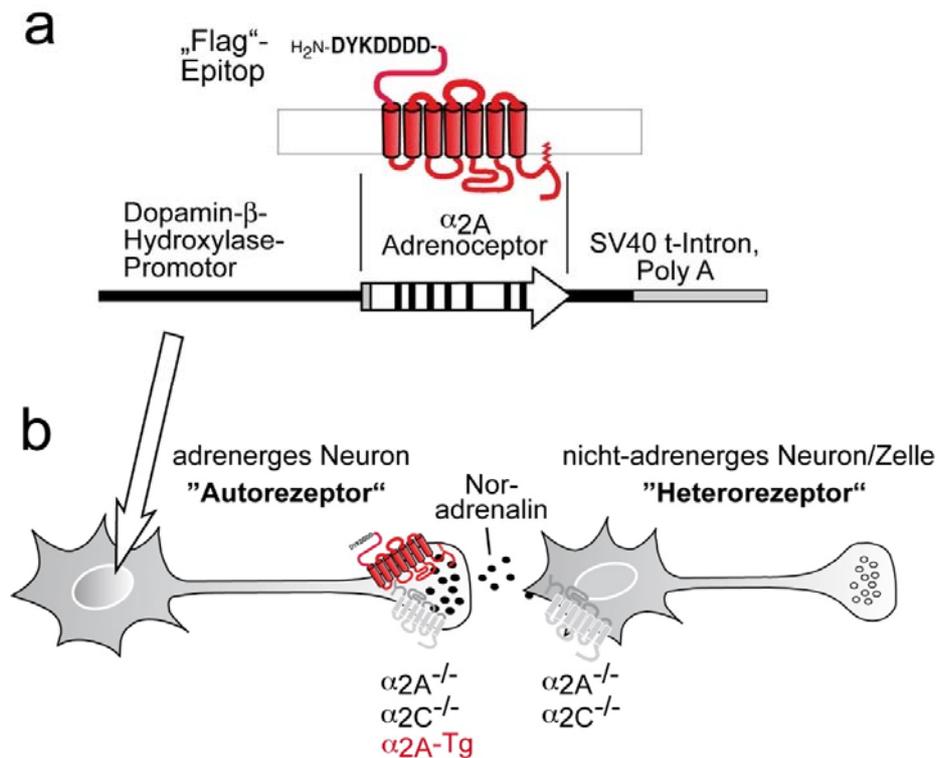
### 4.1 Funktion $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren im Sympathikus in vivo

#### 4.1.1 Transgenes Mausmodell mit $\alpha_{2A}$ -Autorezeptoren

Für diese Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, mit dem selektiv die Funktion von  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren in adrenergen Neuronen untersucht werden kann. Diese Mauslinien wurden bereits vor Beginn der Arbeit von Dr. Marc Brede generiert. Die Generierung des Mausmodells ist schematisch in Abb. 10 dargestellt. Da  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren die wesentlichen Feedbackregulatoren der Neurotransmitterfreisetzung im Sympathikus sind, wurden zum einen Mäuse verwendet, bei denen die Gene für  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren deletiert waren ( $\alpha_{2A}^{-/-}$  bzw.  $\alpha_{2C}^{-/-}$ , Abb. 10). Um die  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren selektiv in adrenergen Neuronen zu exprimieren, wurden zusätzlich durch Pronukleus-Injektion transgene Mäuse generiert, die  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren unter Kontrolle des Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Promotors (DBH) exprimieren (Abb. 10). Der DBH-Promotor bewirkt, dass  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren nur in Zellen gebildet werden, in denen normalerweise auch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase aktiv ist. Dies sind Neurone, in denen Dopamin zu Noradrenalin umgewandelt wird: noradrenerge bzw. adrenerge Neurone im ZNS sowie chromaffine Zellen der Nebenniere. Schließlich wurden  $\alpha_{2A}^{-/-}\alpha_{2C}^{-/-}$  Mäuse mit den DBH- $\alpha_{2A}$ -Transgenen gekreuzt, um Tiere zu erhalten, die nur noch  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in adrenergen Zellen exprimieren.

Für diese Arbeit wurden jeweils drei verschiedene Mauslinien miteinander verglichen. Bei allen Mauslinien war das Gen für den  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor deletiert ( $\alpha_{2C}^{-/-}$ ).

- 1)  $\alpha_{2A}^{+/+}$  Mäuse exprimierten endogene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren, d.h. sowohl  $\alpha_{2A}$ -Auto- als auch Heterorezeptoren.
- 2) Bei  $\alpha_{2A}^{-/-}$  Tieren waren keine funktionellen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren vorhanden.
- 3)  $\alpha_{2A}$ -Tg Mäuse hatten nur  $\alpha_{2A}$ -Autorezeptoren in adrenergen Neuronen.



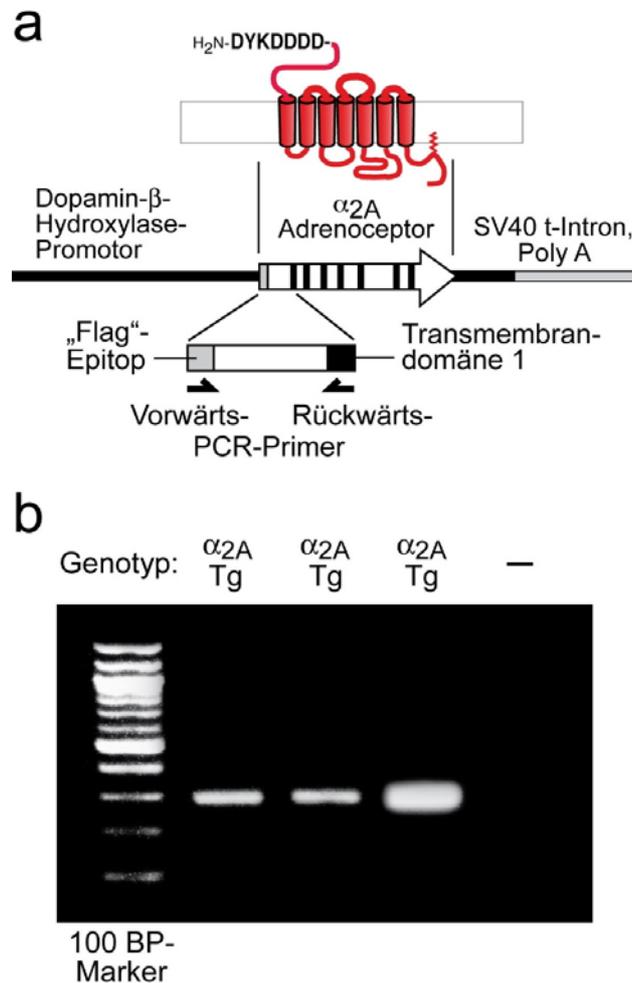
**Abb. 10 a:** Schematische Darstellung des transgenen  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors ( $\alpha_{2A}$ -Tg) unter der Kontrolle des Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Promotors. Das „Flag“-Epitop entspricht der Aminosäuresequenz DYKDDDD.

**Abb.10b:** Gewebespezifische Expression des transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors in adrenergen Neuronen, in denen er als Autorezeptor fungiert und die Freisetzung von Noradrenalin hemmt.  $\alpha_{2A}$ -Tg Mäuse wurden mit Mäusen verpaart, bei denen die  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Gene deletiert waren ( $\alpha_{2A}^{-/-}$ ,  $\alpha_{2C}^{-/-}$ ).

#### 4.1.2 Genotypisierung $\alpha_{2A}$ -transgener Mäuse

Vor der Durchführung der Versuche mit transgenen Mäusen, musste der Genotyp identifiziert werden, um  $\alpha_{2A}$ -transgene Tiere eindeutig von nicht-transgenen Mäusen unterscheiden zu können. Dazu wurde nach der Präparation der genomischen DNA aus einer Schwanzbiopsie eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation mit nachfolgender Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese

durchgeführt. Durch die geeignete Auswahl spezifischer Primer konnte das DBH- $\alpha_{2A}$ -Transgen sicher nachgewiesen werden (Abb. 11).



**Abb. 11: Genotypisierung DBH- $\alpha_{2A}$ -transgener Mäuse.**

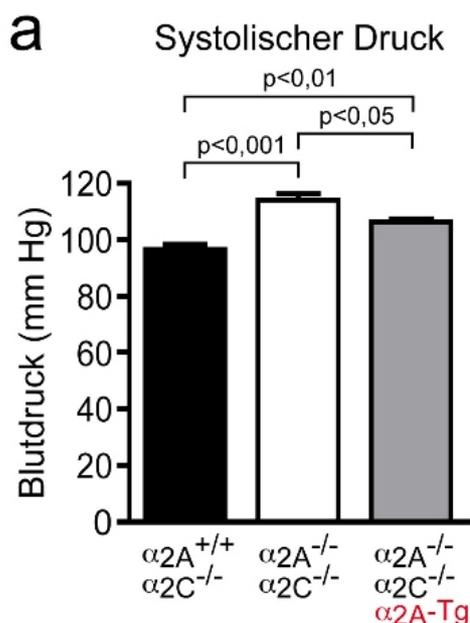
**a:** Schematische Darstellung der Lage der PCR-Primer in der Sequenz des „Flag“-Epitops (Vorwärts-Primer) bzw. in der ersten Transmembrandomäne (Rückwärtsprimer)

**b:** Agarose-Gelelektrophorese des Flag- $\alpha_{2A}$ -PCR Ansatzes. Zur Auftrennung der Fragmente wurde ein 2%iges Agarosegel und zur Größenbestimmung ein 100 Basenpaar-Marker verwendet.  $\alpha_{2A}$ -Tg, transgen; -, nicht transgen.

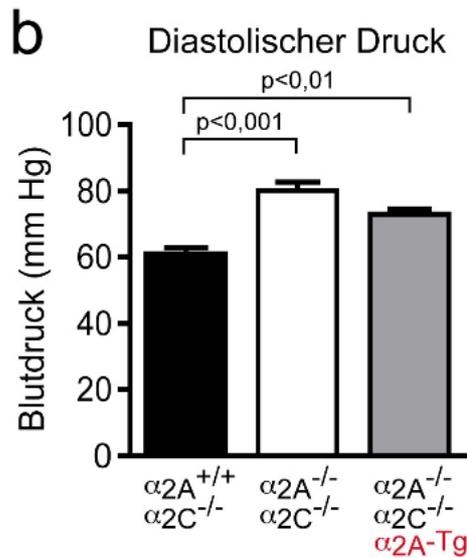
### 4.1.3 Physiologische Charakterisierung der $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäuse

#### 4.1.3.1 Messung von Blutdruck und Herzfrequenz

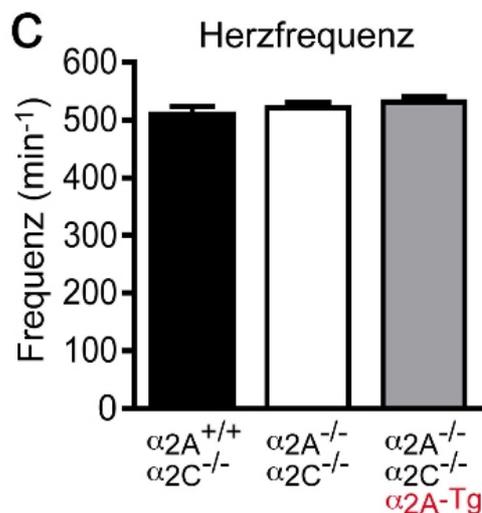
Zur weiteren Charakterisierung  $\alpha_{2A}$ -transgener Mäuse wurden physiologische Parameter, wie Blutdruck und Herzfrequenz mit Hilfe von in vivo Herzkatheteruntersuchungen gemessen. Bei diesen Versuchen zeigte sich bei  $\alpha_{2A}$ -defizienten Tieren eine deutliche Erhöhung des systolischen und auch diastolischen Blutdrucks gegenüber den Wildtyp-Kontrollen ( $\alpha_{2A}^{+/+}$ , Abb. 12 a, b). Bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen konnten ebenso erhöhte systolische und diastolische Blutdruckwerte gemessen werden. Allerdings war das Ausmaß der systolischen Blutdrucksteigerung deutlich geringer als bei den  $\alpha_{2A}^{-/-}$  Mäusen (Abb. 12 a). Das Ergebnis veranschaulichte, dass lediglich eine partielle Rettung der Blutdruck senkenden Funktion des endogenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors durch das Transgen möglich war und der Blutdruck bei  $\alpha_{2A}$ -Tg Tieren etwa 10 mmHg systolisch und 15 mmHg diastolisch erhöht blieb. Die Herzfrequenz zeigte keinen Unterschied zwischen den drei Genotypen (Abb. 12 c). Sie scheint unter diesen Versuchsbedingungen nicht von der Funktion des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors abhängig zu sein.



**Abb. 12 a: Systolischer Blutdruck von  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.** Während einer Isofluran-Narkose war der Blutdruck bei  $\alpha_{2A}^{-/-}$  gegenüber  $\alpha_{2A}^{+/+}$  Tieren signifikant erhöht. Er war bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen zwar höher als bei  $\alpha_{2A}^{+/+}$ , jedoch signifikant niedriger als bei  $\alpha_{2A}^{-/-}$  Mäusen.  $n=10-18$  pro Genotyp.



**Abb. 12 b: Diastolischer Blutdruck von  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.** Während einer Isofluran-Narkose war der Blutdruck bei  $\alpha_{2A}^{-/-}$  gegenüber  $\alpha_{2A}^{+/+}$  Tieren signifikant erhöht.  $n=10-18$  pro Genotyp

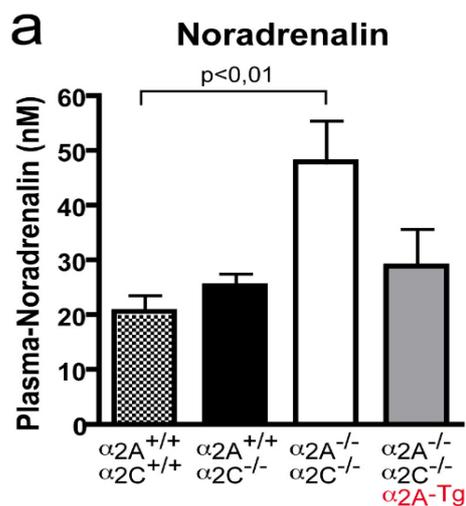


**Abb. 12 c: Herzfrequenz von  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.** Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen messbar.  $n=10-18$  pro Genotyp

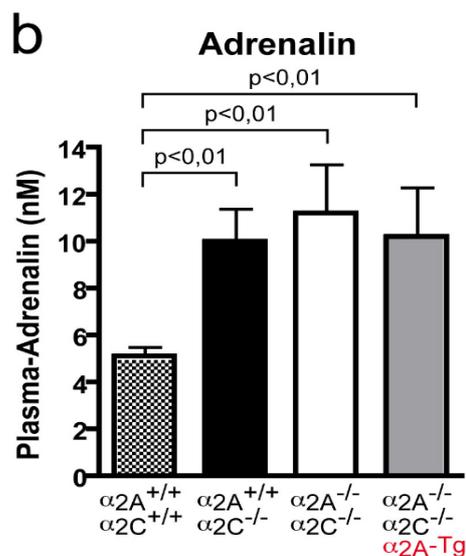
#### 4.1.3.2 Bestimmung von Plasma-Katecholamin-Konzentrationen

Zur Gewinnung eines weiteren physiologischen Parameters wurden mittels HPLC die Plasma-Katecholamin-Konzentrationen bestimmt. Es erfolgte zum einen die Messung der Noradrenalin-Konzentration, die vor allem einen Parameter der Aktivität sympathischer Nerven darstellt. Zum anderen wurde die Adrenalin-Konzentration überprüft, die die Katecholamin-Freisetzung aus den chromaffinen Zellen der Nebenniere widerspiegelt. Der Plasma-Noradrenalin-Spiegel konnte durch den transgenen Rezeptor im Vergleich zur

$\alpha_{2A}^{-/-}$  Gruppe deutlich gesenkt werden und erreichte das Niveau der  $\alpha_{2A}^{+/+}$  Kontrollmäuse (Abb. 13 a). Die Plasma-Noradrenalin-Konzentration war vom  $\alpha_{2C}$ -Genotyp unabhängig.  $\alpha_{2C}^{+/+}$  und  $\alpha_{2C}^{-/-}$  Mäuse zeigten keine Unterschiede in der zirkulierenden Noradrenalin-Konzentration (Abb. 13 a). Für das Adrenalin stellte sich ein anderes Bild dar (Abb. 13 b). Hier führte die Deletion des  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorgens zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Adrenalin-Konzentration, während die Deletion des  $\alpha_{2A}$ -Gens keinen Einfluss hatte (Abb. 13 b). Auch die transgene Expression von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren unter der Kontrolle des DBH-Promotors konnte die erhöhten Plasma-Adrenalin-Spiegel nicht normalisieren.



**Abb. 13 a: Plasma-Noradrenalin-Konzentration bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.** Die Noradrenalin-Konzentration war bei  $\alpha_{2A}^{-/-}$  deutlich erhöht, im Transgen jedoch nicht signifikant höher als bei  $\alpha_{2A}^{+/+}$  Tieren. Der transgene Rezeptor übernahm die Funktion des endogenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors im Sinne eines inhibitorischen Autorezeptors.  $n=9-14$  pro Genotyp.



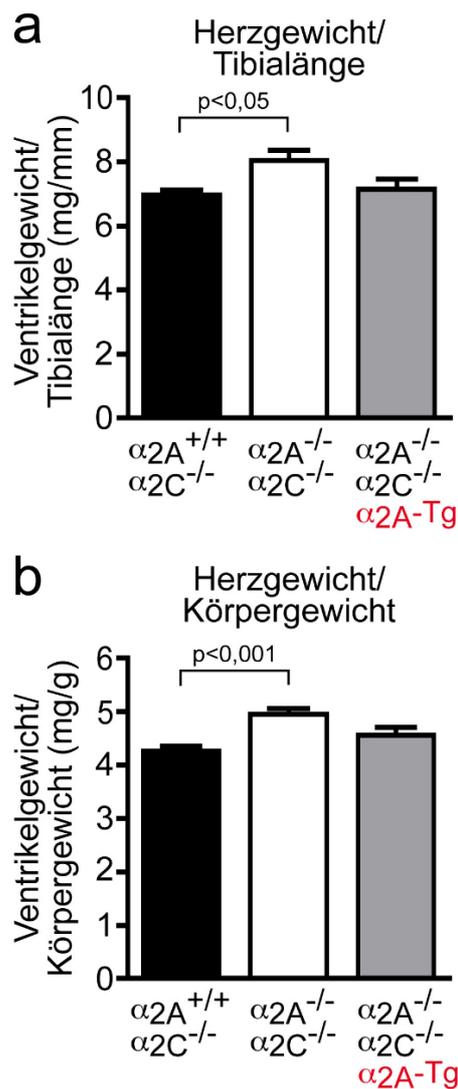
**Abb. 13 b: Plasma-Adrenalin-Konzentration bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.** Die Adrenalin-Konzentration im Transgen war auf dem Niveau der  $\alpha_{2A}^{+/+}\alpha_{2C}^{-/-}$  bzw.  $\alpha_{2A}^{-/-}\alpha_{2C}^{-/-}$  Tiere und konnte nicht auf das Kontrollniveau gesenkt werden. Der transgene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor funktionierte im Nebennierenmark nicht wie in sympathischen Nerven.  $n=9-14$  pro Genotyp.

Zusammenfassend zeigen diese Messungen, dass der transgene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in sympathischen Nervenfasern die Noradrenalin-Freisetzung hemmen konnte, während er in der Nebenniere jedoch nicht so reagierte, wie es erwartet worden wäre. Die Adrenalin-Freisetzung ist somit nicht von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren, sondern entscheidend von  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren abhängig (Brede et al., 2003). Die Expression konnte mittels quantitativer RT-PCR in mikrodisssezierten chromaffinen Zellen nachgewiesen werden (Dr. Ralf Gilsbach, Freiburg, pers. Mitteilung).

#### 4.1.4 Anatomische und histologische Untersuchungen $\alpha_{2A}$ -transgener Herzen

##### 4.1.4.1 Entwicklung einer kardialen Hypertrophie

Neben physiologischen Parametern wurden nun anatomische Vergleiche zwischen  $\alpha_{2A}^{+/+}\alpha_{2C}^{-/-}$  WT-Tieren,  $\alpha_{2AC}^{-/-}$  und  $\alpha_{2A}$ -Transgenen gezogen. Nach den in vivo durchgeführten Herzkatheteruntersuchungen wurde das Gewicht der inneren Organe bestimmt. Um eine Aussage über die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie treffen zu können, wurde das Herzgewicht bestimmt. Das Ventrikelgewicht wurde jeweils im Verhältnis zum Körpergewicht und im Verhältnis zur Tibialänge dargestellt (Abb. 14). Dabei zeigte sich in beiden Berechnungen eine signifikante Erhöhung des relativen Herzgewichtes bei  $\alpha_{2AC}$ -defizienten Mäusen, jedoch zudem eine ebenso deutliche Normalisierung bei zusätzlicher Expression des  $\alpha_{2A}$ -Transgens (Abb. 14).



**Abb. 14: Kardiale Hypertrophie nach Deletion der  $\alpha_{2AC}$ -Rezeptorgene .**

**a:** Darstellung des Verhältnisses von Herzgewicht zur Tibiallänge von  $\alpha_{2A}^{+/+}\alpha_{2C}^{-/-}$  Tieren, sowie  $\alpha_{2AC}^{-/-}$  und  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen.

**b:** Darstellung des Verhältnisses von Herzgewicht zum Körpergewicht.

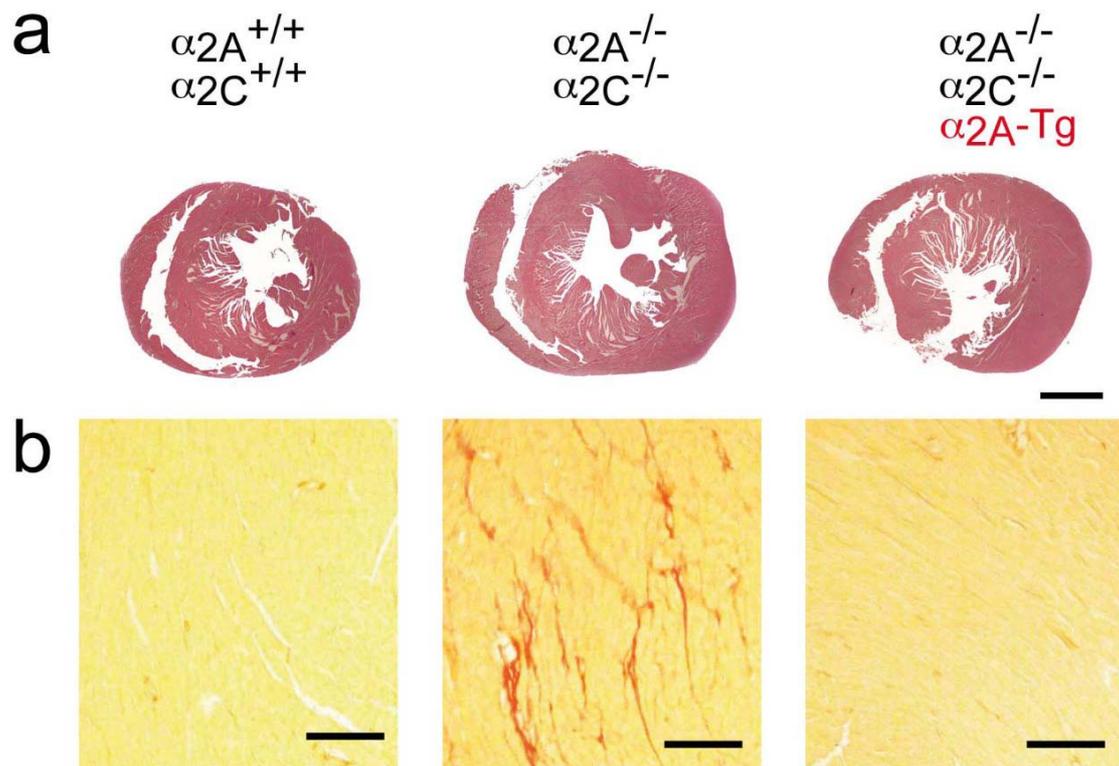
Erkennbar ist jeweils die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei  $\alpha_{2AC}$ -defizienten Mäusen, nicht jedoch bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Tieren.

$n=10-18$  pro Genotyp.

#### 4.1.4.2 Entstehung einer interstitiellen Fibrose

Um die Untersuchungen des Herzens zu vervollständigen, wurden histologische Schnitte angefertigt. Es sollte neben der Entwicklung einer Hypertrophie auch die Entstehung einer interstitiellen Fibrose überprüft werden. Hierfür wurden nicht nur Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE), sondern auch Sirius-Rot-Färbungen durchgeführt. Durch die Sirius-Rot-Färbung wurden die Kollagenfasern, welche das Korrelat der interstitiellen Fibrose darstellen, leuchtend rot angefärbt, während das Zytoplasma durch die Pikrinsäure gelb und die Zellkerne aufgrund der Weigert'schen Lösung braun erschienen. In den HE gefärbten transversalen Schnitten waren bei niedriger Vergrößerung

keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar (Abb. 15 a). Die Sirius-Rot gefärbten Schnitte zeigten jedoch eine deutliche interstitielle Fibrose in  $\alpha_{2AC}^{-/-}$  Herzen, welche jedoch in den Herzen  $\alpha_{2A}$ -transgener Tiere nicht in Erscheinung trat (Abb. 15 b). Somit konnte der  $\alpha_{2A}$ -transgene Rezeptor die Funktion des endogenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors vollständig ersetzen.



**Abb 15: Interstitielle Fibrose nach Deletion der  $\alpha_{2AC}$ -Rezeptorgene.**

**a:** In der oberen Reihe sind HE-gefärbte transversale Herzschnitte dargestellt. Erkennbar ist jeweils der große muskelstarke linke Ventrikel und, links davon gelegen, die rechte Kammer. Maßstab 1 mm.

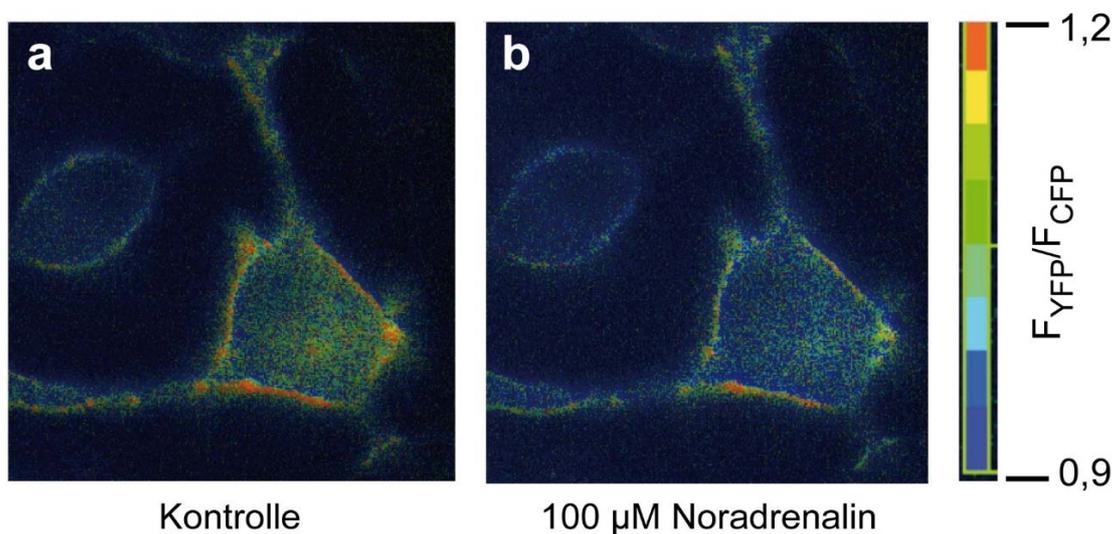
**b:** In der unteren Reihe sind in derselben Schnittebene entsprechende Sirius-Rot-Färbungen abgebildet. In  $\alpha_{2AC}^{-/-}$  Herzen wurde eine deutliche Fibrose nachgewiesen, welche sich im Transgen nicht ausgebildet hatte. Maßstab 50  $\mu$ m.

## 4.2 Charakterisierung des $\alpha_{2A}$ -Rezeptors mittels FRET in PC12-Zellen

### 4.2.1 FRET-Mikroskopie zur Bildgebung

Für diese Versuche wurde ein  $\alpha_{2A}$ -Rezeptorkonstrukt eingesetzt, das in der dritten intrazellulären Domäne die cyan fluoreszierende Variante (CFP) sowie am C-Terminus die gelb fluoreszierende Version (YFP) des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) enthielt (s. Kapitel 1.3.2; Vilardaga et al., 2003). Dieser Rezeptor wird im folgenden  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP genannt. Ein DNA-Plasmid mit der entsprechenden Nukleotidsequenz wurde entweder transient oder stabil in PC12-Zellen transfiziert.

Zunächst wurde in einem Fluoreszenz-Mikroskop die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Rezeptoren untersucht (Abb. 16). Dabei waren die  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptoren vorwiegend in der Plasmamembran und entlang der Axone, weniger im Zellinneren, lokalisiert (Abb 16 a). Nach Aktivierung der Rezeptoren mit dem Agonisten Noradrenalin war zudem eine deutliche Abnahme des FRET-Signals zu verzeichnen (Abb. 16 b).



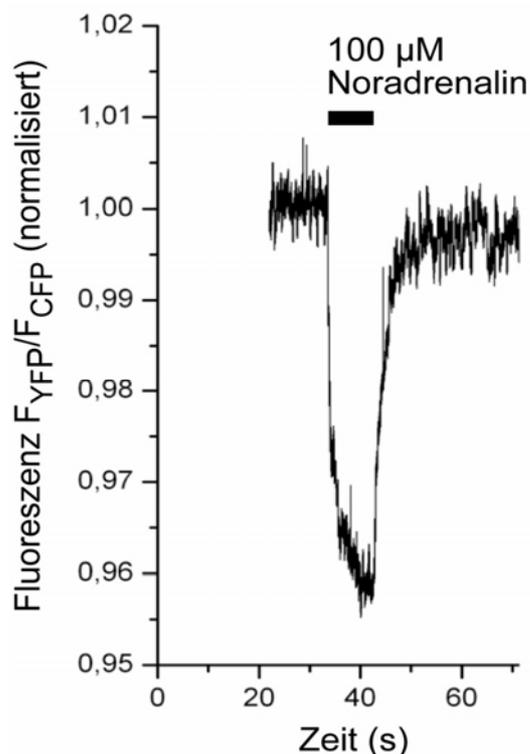
**Abb. 16 a b:** Expression von fluoreszierenden  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren ( $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP) in PC12-Zellen. Dargestellt ist das Fluoreszenzverhältnis  $F_{YFP}/F_{CFP}$  in Form einer Falschfarbendarstellung. Gegenüber der Kontrolle (a) ist nach Rezeptoraktivierung mit Noradrenalin (b) eine deutliche Abnahme des FRET-Signals zu erkennen.

Die Abnahme des FRET-Signals war sowohl in der Plasmamembran des Zellkörpers als auch der Zellfortsätze zu sehen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf Konformationsänderungen des Rezeptors, in welchem sich die beiden Fluorophore YFP am C-Terminus und CFP in der dritten intrazellulären Schleife von einander wegbewegen bzw. ihre Orientierung ändern.

#### 4.2.2 Vergleich der FRET-Signale in undifferenzierten und differenzierten Zellen

##### 4.2.2.1 Amplitude der FRET-Signaländerung

Um die Eigenschaften des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors in PC12-Zellen genauer zu analysieren, wurden die FRET-Signale und Signaländerungen nach Rezeptoraktivierung in undifferenzierten PC12-Zellen, in differenzierten Zellkörpern und schließlich in Axonen miteinander verglichen. Dazu wurden PC12-Zellen mit dem  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptor transfiziert und ein Teil der Zellen mittels Nervenwachstumsfaktor zur Ausdifferenzierung neuronaler Fortsätze veranlasst.

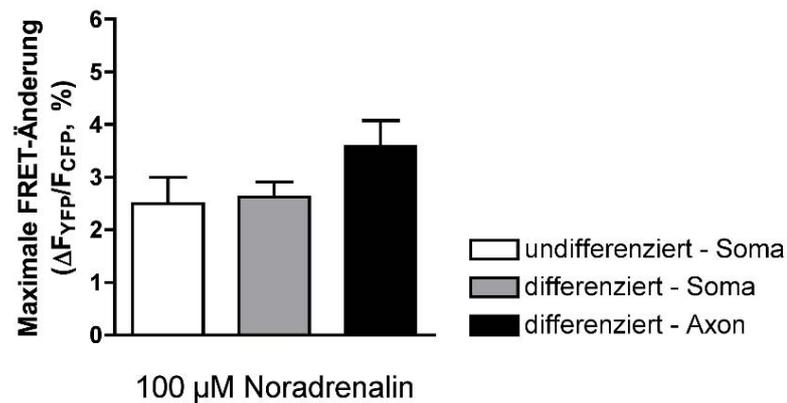
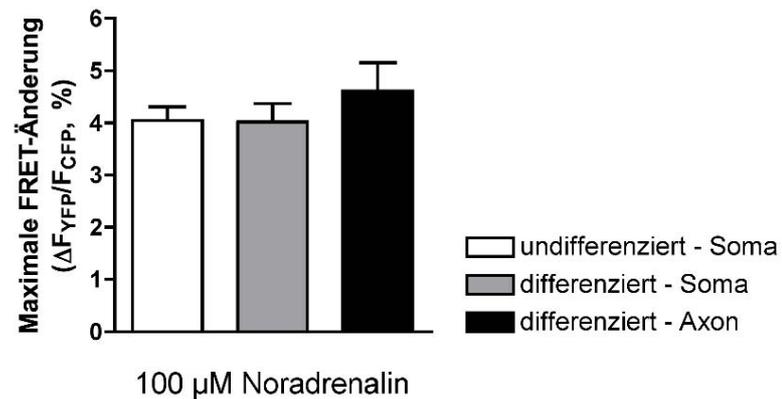


**Abb. 17: Darstellung der FRET-Signaländerung nach Aktivierung des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors in PC12-Zellen durch 100  $\mu$ M Noradrenalin.**

Die Messung erfolgte sowohl an stabil transfizierten Zelllinien als auch an transient transfizierten PC12-Zellen, um auch hier mögliche Unterschiede der Rezeptoreigenschaften entdecken zu können. Die Änderung des FRET-Signals wurde jeweils in der Zellmembran des Somas bzw. der Axone mittels FRET-Mikroskopie quantifiziert. Eine Originalregistrierung ist in Abbildung 17 exemplarisch dargestellt.

Nach transienter Transfektion nahm das FRET-Signal in Gegenwart von Noradrenalin um 2,5% in undifferenzierten Zellen, 2,6% in differenzierten Zellkörpern und 3,6% in den Axonen ab (Abb. 18 a). Damit existierte kein signifikanter Unterschied der Agonist-vermittelten FRET-Änderung zwischen differenzierten und undifferenzierten PC12-Zellen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in stabil transfizierten  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP Zelllinien (Abb. 18 b). Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der maximalen FRET-Amplitude in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation oder der Differenzierung detektiert werden. Allerdings war die mittlere Abnahme des FRET-Signals in stabil transfizierten Zellen bei 4% bis 4,6%, was signifikant größer war als die maximale FRET-Amplitude in transient transfizierten Zellen.

Sowohl durch die visuelle FRET-Darstellung (Abb. 16), als auch über die Aufzeichnung der FRET-Amplituden wurde deutlich, dass  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in PC12-Zellen zur Zellmembran des Zellkörpers und der Fortsätze transportiert werden. Die maximale Reaktion des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors auf den Agonisten Noradrenalin war weder von der Differenzierung der Neurone noch der Lokalisation des Rezeptors abhängig. Die Konformationsänderungen des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors, die sich in der Abnahme des FRET-Signals widerspiegeln, scheinen bei hohen Agonist-Konzentrationen innerhalb einer Zelle gleich zu sein.

**a** Transient transfizierte PC12-Zellen**b** Stabil transfizierte PC12-Zellen

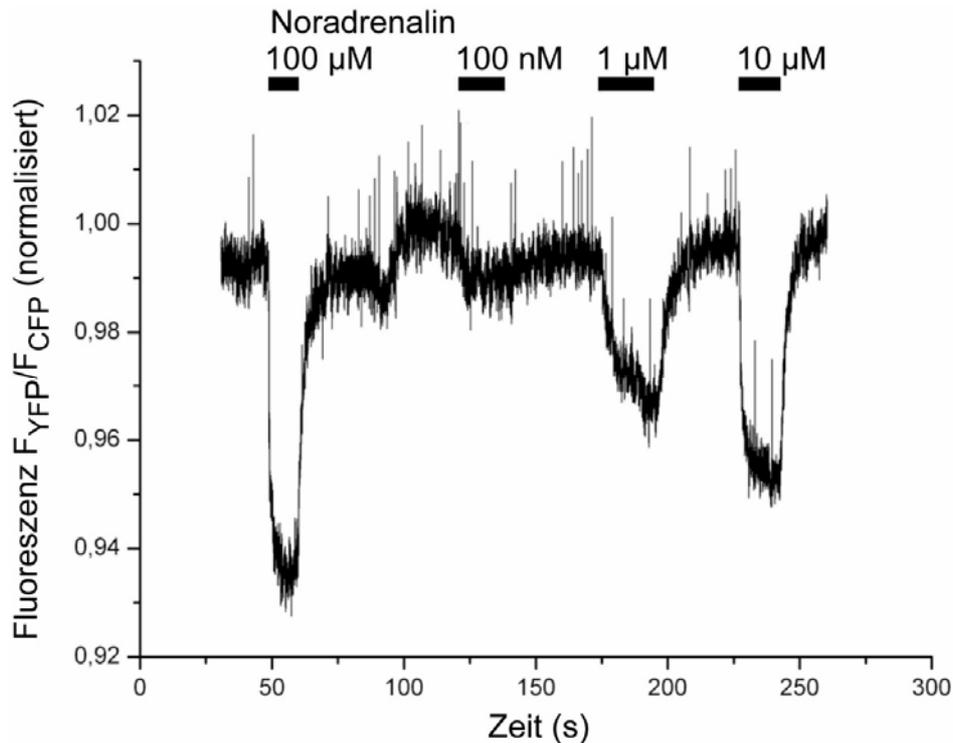
**Abb. 18: FRET-Signaländerung nach Aktivierung des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors in PC12-Zellen.**

**a:** Ergebnisse nach transienter Transfektion. **b:** stabil transfizierte PC12-Zellen. Dargestellt sind die maximalen Änderungen des FRET-Signals nach Rezeptoraktivierung mit 100  $\mu$ M Noradrenalin.  $n=6-8$  pro Gruppe.

## 4.2.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Zur Weiteren Analyse des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors wurden nicht nur maximale FRET-Signaländerungen aufgezeichnet und verglichen sondern auch Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den Agonisten Noradrenalin erstellt. Den transfizierten Zellen wurden steigende Konzentrationen des Agonisten zugeführt und jeweils vorhandene Reaktionen gemessen. Dabei zeigte sich,

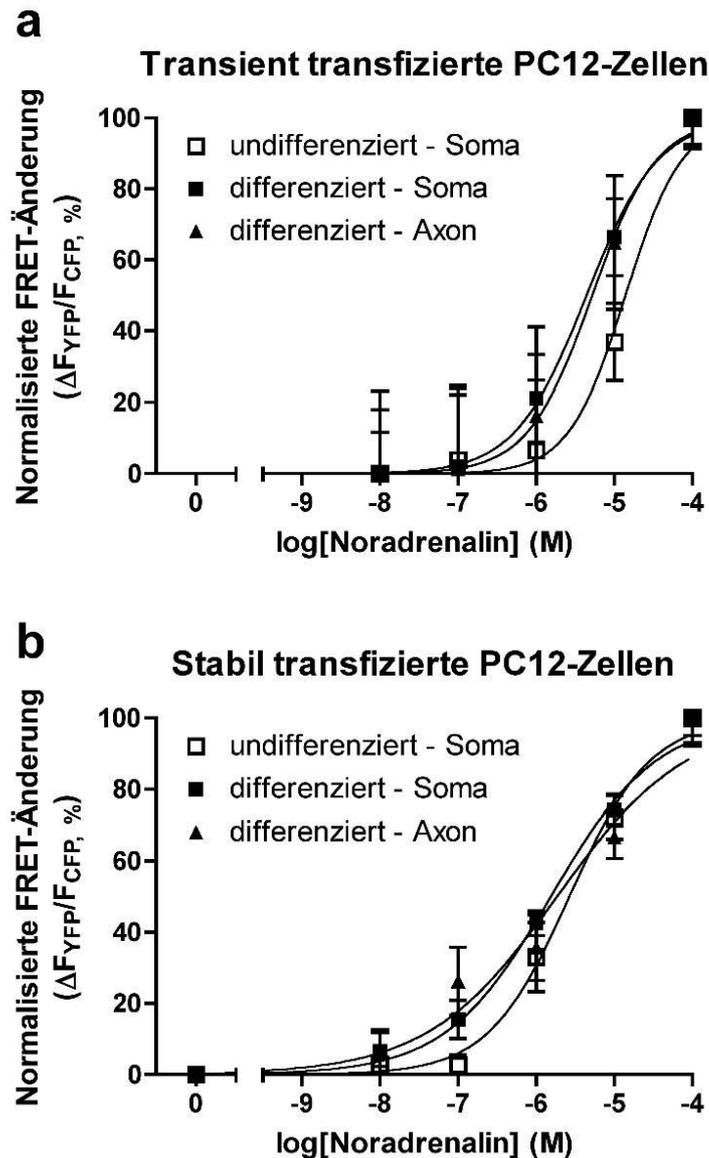
dass steigende Konzentrationen auch zu größeren Abnahmen des FRET-Signals führten (Abb. 19).



**Abb. 19: Darstellung der FRET-Signaländerung nach Aktivierung des  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptors in PC12-Zellen durch Noradrenalin. Das Ausmaß der FRET-Signaländerung korreliert mit der Höhe der eingesetzten Noradrenalin-Konzentration.**

Insbesondere transient transfizierte Zellen reagierten in undifferenziertem Zustand erst bei höheren Noradrenalin-Konzentrationen mit einer FRET-Änderung als differenzierte Zellen (Abb. 20 a). Die  $EC_{50}$ -Werte für die halbmaximale Rezeptoraktivierung lagen bei undifferenzierten Zellen bei 13,2  $\mu$ M (95% Konfidenzintervall 8,2 – 21  $\mu$ M) im Vergleich zu 4,4  $\mu$ M im Soma differenzierter Zellen (95% Konfidenzintervall 2,9 – 6,6  $\mu$ M). Innerhalb der differenzierten Zellen ergaben sich keine Unterschiede in der Potenz von Noradrenalin, die  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptoren zu aktivieren. Im Gegensatz zu den transient transfizierten Zellen waren die  $EC_{50}$ -Werte der

Rezeptoraktivierung nach stabiler Transfektion nicht von der Differenzierung oder subzellulären Lokalisation abhängig (Abb. 20 b). Die halbmaximale Rezeptoraktivierung erfolgte nach stabiler Transfektion bei 2,7  $\mu\text{M}$  in undifferenzierten Zellen sowie bei 1,6  $\mu\text{M}$  im Soma bzw. 4,1  $\mu\text{M}$  in Axonen differenzierter Zellen.



**Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Aktivierung von  $\alpha_{2A}$ -CFP-YFP-Rezeptoren durch Noradrenalin nach transienter (a) bzw. stabiler Transfektion (b) in PC12-Zellen.  $n=5$  (transiente Transfektion),  $n=6-8$  pro Gruppe (stabile Transfektion).**

## 5. Diskussion

Adrenerge Rezeptoren haben eine große Bedeutung als Zielmoleküle für Arzneistoffe. Insgesamt neun verschiedene G-Protein-gekoppelte adrenerge Rezeptoren wurden kloniert, die die physiologischen Funktionen von Adrenalin und Noradrenalin vermitteln (Gilsbach und Hein, 2008). Bisher stehen jedoch nur wenige Pharmaka zur Verfügung, die spezifisch die Funktion einzelner adrenerger Rezeptor-Subtypen modulieren. Therapeutisch eingesetzte Agonisten und Antagonisten unterscheiden jeweils nur zwischen den  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptorgruppen. Insbesondere fehlen Pharmaka, die selektiv die sechs verschiedenen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Rezeptorsubtypen beeinflussen. Allerdings sind auch die physiologischen Funktionen und die pharmakologische Bedeutung dieser Rezeptorsubtypen noch nicht vollständig aufgeklärt. Um ein besseres Verständnis der Funktion dieser Rezeptoren zu erreichen, widmet sich diese Arbeit einem speziellen Rezeptor, dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor.  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren sind die essenziellen inhibitorischen Feedbackregulatoren der Noradrenalin-Freisetzung in adrenergen Neuronen und somit wichtige Regulatoren der Sympathikusaktivität (Hein et al., 1999; Altman et al., 1999). Wenn die drei  $\alpha_2$ -Rezeptorsubtypen *in vitro* heterolog in verschiedenen Zelllinien exprimiert werden, lassen sie sich in ihrer Funktion nur schwer voneinander unterscheiden (Bünemann et al., 2001). So stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Rezeptorsubtypen oder ihre subzelluläre Lokalisation und der Differenzierungsstatus einer Zelle für die funktionelle Komplexität der  $\alpha_2$ -Rezeptoren in verschiedenen Geweben *in vivo* verantwortlich sind.

Diese Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Zum einen wurden transgene Mäuse charakterisiert, bei denen die deletierten  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorgene selektiv durch einen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in adrenergen Neuronen ersetzt wurden. In diesem Modell sollte getestet werden, ob ein spezieller Rezeptorsubtyp, der in verschiedenen Neuronen des Sympathikus exprimiert wird, *in vivo* auch

identische Funktionen im peripheren Nervensystem hat. Zum zweiten wurde untersucht, ob die Aktivierung von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in einer Phäochromozytomzelllinie (PC12-Zellen) in der Zellkultur von dem Differenzierungsstatus der Zellen oder von der subzellulären Lokalisation der Rezeptoren abhängig ist. Hierfür wurden  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren durch Varianten des grün fluoreszierenden Proteins markiert und mittels FRET-Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren im transgenen Modell in vivo zwar die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenfasern, nicht aber die Exozytose von Adrenalin aus dem Nebennierenmark inhibieren können. Obwohl die Feedbackkontrolle der Neurotransmitterfreisetzung in Sympathikusneuronen und in chromaffinen Zellen im Prinzip über ähnliche Signalwege abläuft, kann der transgene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor zwar den genetischen Verlust endogener  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren im Sympathikus kompensieren, nicht aber den  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor im Nebennierenmark ersetzen. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in neuronalen Fortsätzen wie z. B. in sympathischen Nervenfasern prinzipiell besser aktiviert werden können als in der Plasmamembran des Soma, d.h. in der Zellmembran chromaffiner Zellen. In PC12-Phäochromozytomzellen, die durch NGF zum Auswachsen neuronaler Fortsätze stimuliert wurden, war die Aktivierung von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren jedoch nicht vom Differenzierungsstatus der Zellen oder von der subzellulären Lokalisation abhängig.

### **5.1 $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren im Sympathikus**

Mittels transgener und gen-defizienter Mausmodelle wurden den einzelnen adrenergen Rezeptoren bereits in der Vergangenheit eindeutige physiologische Funktionen zugeordnet (aktuelle Übersicht bei Gilsbach und Hein, 2008). Es existieren bereits weit reichende Erkenntnisse über die Vorgänge im kardiovaskulären System und über Signalweiterleitungen innerhalb des

Nervensystems. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung und Funktionsweise des  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors in verschiedenen adrenergen Neuronen in vivo und in vitro untersucht werden. Für die in vivo Untersuchungen wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, das Epitop-markierte  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren unter der Kontrolle der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase exprimiert.

$\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren sind verantwortlich für den blutdrucksenkenden Effekt von  $\alpha_2$ -Agonisten wie Clonidin und Moxonidin, zum einen über zentrale Wirkmechanismen (Link et al., 1996; Mac Millan et al., 1996; Altman et al., 1999), zum anderen über die periphere präsynaptische Inhibition der Noradrenalin-Freisetzung (Hein et al., 1999; Trendelenburg et al., 2003). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten die  $\alpha_{2AC}$ -defizienten Tiere in dieser Arbeit eine deutliche Erhöhung des systolischen wie auch diastolischen Blutdrucks. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in sympathischen Neuronen für die Blutdruckkontrolle in vivo verantwortlich sind. Der transgene  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor war in der Lage, die Funktion des endogenen Rezeptors zu übernehmen. Es wurde allerdings nur eine partielle Normalisierung des Blutdrucks im Vergleich zu  $\alpha_{2AC}/-$  Mäusen beobachtet. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten kommen in Frage. Denkbar wäre ein verminderter zentraler Effekt, da der transgene Rezeptor nur in adrenergen Neuronen exprimiert wurde. Auch die erhöhten Adrenalin-Plasmaspiegel könnten für die Blutdrucksteigerung bei den  $\alpha_{2A}$ -Transgenen im Vergleich zur Kontrolle verantwortlich sein.

Untersuchungen der Herzfrequenz ergaben ebenfalls eindeutige Ergebnisse. Weder bei  $\alpha_{2AC}/-$  Tieren noch bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen Mäusen wurde die Herzfrequenz beeinflusst, was den Schluss nahe legte, dass sie unter diesen Versuchsbedingungen nicht durch den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor gesteuert wird. Stattdessen spielen hier  $\beta_1$ -Rezeptoren über ihre positiv chronotrope Wirkung die größte Rolle (Engelhardt et al., 1999).

Als Beleg, dass die transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in vivo in Sympathikusneuronen aktiv waren, dienen die Messungen der Plasma-

Noradrenalin-Konzentration. Die Expression des transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptors führte zu einer vollständigen Normalisierung des Plasma-Noradrenalin-Spiegels. Während die Deletion von  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Genen zu einer signifikanten Herzhypertrophie und Fibrose führte, waren diese Effekte bei  $\alpha_{2A}$ -transgenen nicht zu sehen. Die „kardioprotektive“ Funktion des endogenen  $\alpha_2$ -Rezeptors wurde also vom transgenen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in Sympathikusneuronen vollständig ersetzt. Diese Befunde belegen, dass für die Kontrolle des Sympathikotonus und der Ausbildung einer Herzhypertrophie und Fibrose präsynaptische  $\alpha_{2A}$ -Autorezeptoren eine essenzielle Rolle spielen.

## 5.2 Ursachen und Therapieansätze einer chronischen Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der Haupttodesursachen in den entwickelten Ländern. Sie stellt die Unfähigkeit des Herzens dar, ein für den Organismus ausreichendes Blutvolumen zu transportieren, um den Körper mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (American Heart Association, 2001). Eine der häufigsten Ursachen für die Ausbildung einer chronischen Insuffizienz sind Hypertonie und koronare Herzerkrankung. Kompensatorische Folgen sind eine Hypertrophie des Herzens, teilweise mit fibrotischem Umbau des Gewebes und verstärkter adrenerger Innervation des Herzens. Dies mündet in eine Art „Circulus vitiosus“, der zwar zum einen die verminderte kardiale Kontraktilität versucht aufrecht zu erhalten, zum anderen jedoch langfristig eine Dekompensation des Systems mit weiterer Schwächung des Herzens und fortschreitender Insuffizienz herbeiführt (Cohn et al., 1984; Port et al., 2001). Um der gesteigerten sympathischen Aktivierung des Herzens entgegenzuwirken und das Herz langfristig vor einer Dekompensation zu schützen, stellt die Verabreichung von  $\beta$ -Blockern eine der wichtigsten therapeutischen Möglichkeiten dar.

Vor diesem Hintergrund wurde auch bereits getestet, inwieweit die Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung über  $\alpha_2$ -Rezeptoren die Progression der

Herzinsuffizienz bessern kann (Coats et al., 1999; Van Kerckhoven et al., 2000; Swedberg et al., 2002). Die publizierten experimentellen und klinischen Studien mit  $\alpha_2$ -Agonisten wie Clonidin oder Moxonidin (Manolis et al., 1995) belegten zwar eine Reduktion der Plasma-Noradrenalin-Spiegel. Allerdings zeigte insbesondere die internationale multizentrische MOXCON-Studie, dass Moxonidin zu einer Verschlechterung der Prognose von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz führt (Cohn et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die ausgeprägte Bradykardie und Blutdrucksenkung, die mit einer  $\alpha_2$ -Rezeptorstimulation einhergeht (Altman et al., 1999). Darüber hinaus können  $\alpha_2$ -Agonisten wie z. B. das Clonidin weitere, nicht  $\alpha_2$ -adrenerge Zielproteine beeinflussen, die zur therapeutischen Wirkung beitragen. So konnte gezeigt werden, dass Clonidin bei  $\alpha_{2ABC}^{-/-}$  Mäusen einen zusätzlichen Effekt in kardialen Schrittmacherzellen des Sinusknotens hat (Knaus et al., 2007a). Über die Blockade sog. HCN (Hyperpolarisations-aktivierter Kationen-) Schrittmacher Kanäle reduzierte Clonidin die diastolische Depolarisation und damit die Frequenz des Schrittmacherpotentials im Sinusknoten (Knaus et al., 2007a).

Schließlich könnte auch die Tatsache, dass verschiedene  $\alpha_2$ -Subtypen die Katecholamin-Freisetzung in vivo kontrollieren, für das Therapieversagen der  $\alpha_2$ -Agonisten bei der Herzinsuffizienz verantwortlich sein. Während im Sympathikus vor allem die  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren als Inhibitoren der Noradrenalin-Freisetzung fungieren, steht die Adrenalin-Freisetzung in der Nebenniere unter der Kontrolle von  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren.

### **5.3 Funktion der $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptoren in der Nebenniere**

Im adrenergen Nervensystem spielt nicht nur der Transmitter Noradrenalin eine Rolle, sondern auch die Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark. Noradrenalin ist der wesentliche Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, das für die Innervation der Gewebe und Organe verantwortlich

ist. Adrenalin dagegen wird in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks produziert und in den Blutkreislauf ausgeschüttet (Hoffmann et al., 2001). Adrenalin wirkt somit in der Körperperipherie wie ein klassisches Hormon (Young et al., 1998). Die chromaffinen Zellen der Nebenniere sind modifizierte post-ganglionäre sympathische Neuronen des sympathischen Nervensystems.

Während die Kontrolle und Autoinhibition der präsynaptischen Noradrenalinfreisetzung durch präsynaptische Rezeptoren seit langem bekannt ist (Trendelenburg et al., 2003; Hein et al., 1999), gab es erst in den letzten Jahren erste Erkenntnisse über die Regulation der Adrenalinausschüttung über einen ähnlichen Mechanismus. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass der  $\alpha_{2C}$ -Subtyp die entscheidende Rolle bei der Feedbackkontrolle der Adrenalin-Freisetzung spielt (Brede et al., 2003b; Moura et al., 2006; Knaus et al., 2007b). In isolierten chromaffinen Zellen von Mäusen hemmt der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen und damit die Exozytose von Adrenalin (Brede et al., 2003b). Bei  $\alpha_{2C}$ -defizienten Mäusen wurden folglich erhöhte Adrenalin-Spiegel im Plasma und Urin nachgewiesen. Die pathophysiologische Bedeutung der Nebenniere für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz wurde durch neuere Erkenntnisse hervorgehoben. Bei Ratten, die nach experimentellem Herzinfarkt eine Insuffizienz entwickelten, konnten erhöhte GRK2-Konzentrationen in der Nebenniere gemessen werden, welche wiederum für ein Abschalten der  $\alpha_2$ -Signalwege in chromaffinen Zellen und dadurch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verantwortlich waren (Lymperopoulos et al., 2007).

Vor diesem Hintergrund ist ein Befund dieser Arbeit bemerkenswert: Die transgene Expression von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren in den chromaffinen Zellen der Nebenniere konnte den genetischen Verlust von  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren nicht kompensieren. So wurde der Plasma-Adrenalin-Spiegel bei transgenen Tieren nicht auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse normalisiert. Obwohl der transgene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor in der Nebenniere exprimiert wird (pers. Mitteilung von Dr. Ralf Gilsbach, Freiburg), funktionierte er in vivo in der Nebenniere nicht so wie

erwartet. Damit zeigt sich eindeutig, dass der  $\alpha_{2C}$ -Rezeptor der Nebenniere nicht durch den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor ersetzbar ist. Dies könnte zum einen durch unterschiedliche Kopplungsmechanismen von  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren bedingt sein. Zum anderen wären verschiedene Signalwege der Rezeptorsubtypen in der Feedback-Hemmung der Nebenniere und des Sympathikus denkbar. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, ob  $\alpha_2$ -Agonisten in vivo die Noradrenalin-Freisetzung effektiver hemmen können als die Freisetzung von Adrenalin aus der Nebenniere. Wenn dies allerdings der Fall wäre, dann wäre auch plausibel, weshalb  $\beta$ -Rezeptorantagonisten das Herz wirksamer vor dem Einfluss von Katecholaminen schützen als dies  $\alpha_2$ -Agonisten, zumindest in den erwähnten klinischen Studien, tun konnten.

#### **5.4 Detektion der $\alpha_2$ -Rezeptoraktivierung durch FRET-Mikroskopie**

Ein in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnenes Verfahren zum direkten Monitoring von Effekten auf Rezeptorebene ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Die neuronale Charakterisierung des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors in dieser Arbeit erfolgte unter anderem mit Hilfe der FRET-Technik. Durch die Abnahme des FRET-Signals konnten dabei Konformationsänderungen des Rezeptors auf die Aktivierung durch Noradrenalin direkt veranschaulicht werden.

Lange Zeit existierte keine direkte Methode zur Analyse von Agonisteffekten auf Rezeptorebene. Über die Messung von physiologischen oder biochemischen Effekten konnten indirekt Aussagen über die Funktion der einzelnen Rezeptoren und ihrer Subtypen gemacht werden. Die ersten Erfolge in der Entwicklung eines direkten Verfahrens zur Detektion von Konformationsänderungen eines Rezeptors hatten zum Beispiel Gether und Kobilka (Gether et al., 1995) anhand von gereinigten, mit Fluorophoren markierten  $\beta_2$ -Rezeptoren, die in die große Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran-Helices (Kobilka et al., 1987) gehören.

Es existierten bereits Daten, die bei der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eine Bewegung der Transmembran-Helices, v.a. von Helix III und Helix VI, vermuten ließen (Farrens et al., 1996, Wieland et al., 1996). Mittels des von Gether und Kobilka entwickelten Verfahrens konnten Konformationsänderungen nach Aktivierung von  $\beta_2$ -Rezeptoren direkt über Fluoreszenzänderungen aufgezeichnet werden. Vermutlich aufgrund der nicht natürlichen, im Labor konstituierten und in Lipidmembranen eingebauten Rezeptoren zeigten sich allerdings nur sehr langsame Fluoreszenzänderungen (Gether et al., 1995), die der Wirklichkeit wohl eher nicht entsprachen. Ein weiteres Bestreben war deshalb die Entwicklung einer Methode zur zeitlich hochaufgelösten Messung und Darstellung von Konformationsänderungen nach Rezeptoraktivierung in lebenden Zellen (Vilardaga et al., 2003). Dafür wurden blau (cyan) und gelb (yellow) fluoreszierende Varianten des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) in der dritten intrazellulären Rezeptorschleife und am C-Terminus des PTHR- und  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors eingebaut, HEK 293 Zellen damit transfiziert und nach der auch in dieser Arbeit verwendeten Methode FRET-Messungen durchgeführt (Vilardaga et al., 2003). Lohse und Mitarbeitern gelang es zudem, einen direkten Zusammenhang zwischen FRET-Änderungen und Rezeptoraktivierung zu beweisen. Weiterhin zeigten Versuche mit vollen und partiellen Agonisten, sowie Antagonisten die erwünschten Effekte. Partielle Agonisten führen zu einer partiellen FRET-Abnahme, während neutrale Antagonisten kein FRET-Signal hervorbrachten (Lohse et al., 2003; Vilardaga et al., 2003). Durch die Verwendung dieser Rezeptor-Konstrukte im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass die Konformationsänderungen im  $\alpha_{2A}$ -Rezeptorprotein unabhängig von der subzellulären Lokalisation der Rezeptoren innerhalb der Zelle sowie von deren neuronalem Differenzierungsstatus sind. Noradrenalin konnte somatische und axonale  $\alpha_2$ -CFP-YFP Rezeptoren in den PC12-Zellen mit gleicher Effektivität und Potenz aktivieren. Lediglich in undifferenzierten, transient transfizierten PC12-Zellen waren dreifach höhere Noradrenalin-Konzentrationen für die halbmaximale Aktivierung erforderlich. Da diese Versuche relativ kurz nach der Transfektion der Zellen erfolgten, ist die Faltung der  $\alpha_2$ -CFP-YFP Rezeptoren

unter diesen Bedingungen möglicherweise noch nicht vollständig abgeschlossen. Da die  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren unabhängig von der Lokalisation oder der zellulären Differenzierung immer im gleichen Maße Agonist-vermittelte Konformationsänderungen zeigten, kann geschlossen werden, dass die Rezeptoraktivierung allein nicht für dessen biologische Funktion ausreichend ist. Insbesondere in der Nebenniere scheinen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren nicht in der Lage zu sein, die Freisetzung von Adrenalin zu hemmen wie die nahe verwandten  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren. Dieser Befund ist der erste Hinweis aus *in vivo* Untersuchungen, dass die  $\alpha_2$ -Rezeptoren nicht nur durch ihre zell- und gewebespezifischen Expressionsmuster unterschiedliche Funktionen haben. Auch innerhalb eines Zelltyps sind diese Rezeptoren wahrscheinlich an unterschiedliche Signalwege gekoppelt, die distinkte physiologische Funktionen vermitteln.

## 6. Zusammenfassung

$\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren, von denen drei verschiedene Subtypen ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) kloniert wurden, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und vermitteln vielfältige physiologische Funktionen der Transmitter Adrenalin und Noradrenalin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Rezeptorsubtypen, die subzelluläre Lokalisation von Rezeptoren oder der Differenzierungsstatus einer Zelle für die funktionelle Diversität der  $\alpha_2$ -Rezeptor-Effekte *in vivo* verantwortlich sind.

Im ersten Teil des Projektes wurde ein transgenes Mausmodell untersucht, bei dem selektiv  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren unter Kontrolle des Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase Promotors in adrenergen Neuronen exprimiert wurden. In diesem Modell sollte getestet werden, ob ein einzelner Rezeptorsubtyp in den verschiedenen Neuronen des sympathischen Nervensystems *in vivo* identische Funktionen hat. Transgene  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren hemmten *in vivo* zwar die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenfasern nicht aber die Exozytose von Adrenalin aus dem Nebennierenmark. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Rezeptorfunktion von der Morphologie, dem Differenzierungsstatus der Zellen oder von der subzellulären Lokalisation der Rezeptoren abhängt. Hierfür wurden  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren durch Varianten des grün fluoreszierenden Proteins markiert und mittels FRET-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In PC12 Phäochromozytomzellen, die durch NGF zum Auswachsen neuronaler Fortsätze stimuliert wurden, waren die Agonist-bedingten Konformationsänderungen von  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren jedoch weder vom Differenzierungsstatus der Zellen noch von deren subzellulärer Lokalisation abhängig. Lediglich in transient transfizierten Zellen waren im Vergleich zu stabil transfizierten Zellen höhere Agonist-Konzentrationen zur Rezeptoraktivierung erforderlich.

Diese Befunde zeigen, dass zusätzlich zur Diversität der Rezeptorsubtypen auf Proteinebene der zelluläre Kontext, in dem ein Rezeptor exprimiert wird, eine ganz wesentliche Rolle für dessen Funktion spielt.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AC	Adenylatcyclase
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
AP	Aktionspotential
Bp	Basenpaar
BES	N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Calciumphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	codierende DNA
CFP	“Cyan fluorescence protein” (Blau fluoreszierendes Protein)
cGMP	cyclisches Guaninmonophosphat
(CH <sub>3</sub> COO)Na	Natriumacetat
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerin
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminomethylether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen

---

FRET	“Fluorescence Resonance Energy Transfer” (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	“Green fluorescence protein” (Grün fluoreszierendes Protein)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun-Eosin
HEK	“Human Embryonic Kidney” (Menschliche, Embryonale Niere)
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kaliumhexacyanoferrat(III)
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kaliumhexacyanoferrat(II)
KO	„Knock-Out“
l	Liter
LB-Medium	Medium zur Kultur von Bakterien nach Luria und Bertani
M	Molar (mol/Liter)
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

---

MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Natriumsulfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NGF	“Nerve growth factor” (Nervenwachstumsfaktor)
NMDA	N-Methyl-, D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Nonidet-P40, Detergens
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC12	Phäochromozytom Zellen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEI	Polyethylenimin
PKA	Proteinkinase A
PTHrP	Parathormon-Rezeptor
s	Sekunde
SPF	“specific pathogen free” (Pathogen-freie Maushaltung)
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TG	Transgen
T <sub>m</sub>	Hybridisierungstemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrK	Tyrosinkinase
WT	Wildtyp
YFP	“Yellow fluorescence protein” (Gelb fluoreszierendes Protein)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Literaturverzeichnis

Ahlquist RP (1948)

A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153, 586-600

Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, Kobilka BK und Hein L (1999)

Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56, 154-161

American Heart Association.

*Heart and Stroke Statistical Update*. Dallas Tex: American Heart Association (2001)

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF und Fisher EM (2000)

Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24, 23-25

Brede M, Wiesmann F, Jahns R, Hadamek K, Arnolt C, Neubauer S, Lohse MJ und Hein L (2002)

Feedback inhibition of catecholamine release by two different  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation* 106, 2491-2496

Brede M, Roell W, Ritter O, Wiesmann F, Jahns R, Haase A, Fleischmann BK und Hein L (2003a)

Cardiac Hypertrophy is associated with decreased eNOS Expression in Angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor-deficient mice. *Hypertension* 42, 1177-1182

Brede M, Nagy G, Philipp M, Sorensen JB, Lohse MJ und Hein L (2003b)

Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *Mol Endocrinol* 17, 1640-1646

- Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V und Hein L (2004)  
 $\alpha_2$ -adrenergic subtypes – novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biology of the Cell* 96, 343-348
- Bücheler MM, Hadamek K und Hein L (2002)  
Two  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes,  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$ , inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109, 819-826
- Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ und Hein L (2001)  
Activation and deactivation kinetics of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor-activated GIRK currents. *J Biol Chem* 276, 47512-47517
- Buxton ILO (2005)  
Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, S. 1-39,  
Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Brunton L, Lazo J und Parker K, *McGraw-Hill*, 11. Auflage, 2005
- Bylund DB (1985)  
Heterogeneity of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 22, 835-843
- Bylund DB, Eickenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR und Trendelenburg U (1994)  
International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46, 121-136
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK und Stevens RC (2007)  
High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265

Coats AJ (1999)

Heart failure 99: the MOXCON story. *Int J Cardiol* 71, 109-111

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB und Rector T (1984)

Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311, 819-823

Cohn JN, Pfeffer MA, Rouleau J, Sharpe N, Swedberg K, Straub M, Wiltse C, Wright TJ und MOXCON Investigators (2003)

Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). *Eur J Heart Fail* 5, 659-667

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ (1994)

Activation of MAP kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852

Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D und Flavahan NA (2000)

Silent  $\alpha_C$ -adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1075-1083

Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ und Regan JW (1990)

Multiple second messenger pathways of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 265, 63-69

Daunt DA, Hurt C, Hein L, Kallio J, Feng F und Kobilka BK (1997)

Subtype-specific intracellular Trafficking of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 51, 711-720

Eason MG und Liggett SB (1993)

Human  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype distribution: widespread and subtype-selective expression of  $\alpha_2C10$ ,  $\alpha_2C4$  and  $\alpha_2C2$  mRNA in multiple tissues. *Mol Pharmacol* 44, 70-75

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F und Lohse MJ (1999)

Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7059-7064

Fairbanks CA, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Posthumus IJ und Wilcox GL (2002)

$\alpha_2c$ -Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 282-290

Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL und Khorana HG (1996)

Requirement of rigid body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770

Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L und Caron MG (1996)

Role of  $\beta$ -arrestin in mediating agonist-promoted G-protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366

Förster Th (1948)

Intramolecular energy transfer and fluorescence. *Ann Phys* 2, 55

Gether U, Lin S und Kobilka BK (1995)

Fluorescent labeling of purified  $\beta_2$ -adrenergic receptor: Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* 270, 28268-28275

Gilsbach R, Brede M, Beetz N, Moura E, Muthig V, Gerstner C, Barreto F, Neubauer S, Vieira-Coelho MA und Hein L (2007)

Heterozygous  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor-deficient mice develop heart failure after transverse aortic constriction. *Cardiovasc Res* 75, 728-737

Gilsbach R und Hein L (2008)

Presynaptic metabotropic receptors for acetylcholine and adrenaline/noradrenaline.

Pharmacology of Neurotransmitter Release. Handbook of Experimental Pharmacology 184. Südhof TC, Starke K, *Springer Verlag Berlin, Heidelberg*, 2008

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA und Ruddle FH (1980)

Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380-7384

Greenfield DS, Liebmann JM und Ritch R (1997)

Brimonidine: a new  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist for glaucoma treatment. *J Glaucoma* 6, 250-258

Green LA (1984)

The importance of both early and delayed responses in the biological actions of nerve growth factor. *Trends Neurosci* 7, 91-94

Green LA und Tischler AS (1976)

Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428

Guo TZ, Davis MF, Kingery WS, Patterson AJ, Limbird LE und Maze M. (1999)

Nitrous oxide produces antinociceptive response via  $\alpha_2$ -adrenergic  $\alpha_{2B}$ - and or  $\alpha_{2C}$ - adrenoceptor subtypes in mice. *Anesthesiology* 90, 470-476

Hein L und Kobilka BK (1997)

Adrenergic receptors – from molecular structure to in vivo functions. *Trends Cardiovasc Med* 7, 137-145

Hein L, Altman JD und Kobilka BK (1999)

Two functionally distinct  $\alpha_2$ -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402, 181-184

Hoffmann C, Zürn A, Bünemann M und Lohse MJ (2007)

Conformational changes in G-protein coupled receptors – the quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol* 1-9

Hoffmann BB und Taylor P (2001)

Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous system. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. Goodman&Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 10<sup>th</sup> ed. New York: *McGraw-Hill*, 115-154

Janumpalli S, Butler LS, Mac Millan LB, Limbird LE und McNamara JO (1998)

A point mutation (D79N) of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor abolishes the antiepileptogenic action of endogenous norepinephrine. *J Neurosci* 18, 2004-2008

Jeyaraj SC, Chotani MA, Mitra S, Gregg HE, Flavahan NA und Morrison KJ (2001)

Cooling evokes redistribution of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors from Golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 60, 1195-1200

Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H und Yoshimura M (2003)

$\alpha_2$ -Adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology* 96, 367-374

- Knaus AE, Zong X, Beetz N, Jahns R, Lohse MJ, Biel M und Hein L (2007a)  
Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine. *Circulation* 115, 872-880
- Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R und Hein L (2007b)  
 $\alpha_{2A}$ -Adrenoceptor subtypes – unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int* 51, 277-281
- Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ und Regan JW (1987)  
Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *Science* 238, 650-656
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF und Lefkowitz RJ (1994)  
Direct evidence that  $G_i$ -coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by  $G\beta\gamma$  activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12706-12710
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE und Sigler PB (1996)  
The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-31
- Li YW, Guyenet PG und Bayliss DA (1998)  
Voltage-dependent calcium currents in bulbospinal neurons of neonatal rat rostral ventrolateral medulla: modulation by  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 79, 583-594
- Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS und Kobilka BK (1995)  
Targeted inactivation of the gene encoding the mouse  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol* 48, 48-55

Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS und Kobilka BK (1996)

Cardiovascular regulation in mice lacking  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 273, 803-805

Löffler G (2001)

Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, *Springer Verlag Berlin, Heidelberg*, 4. Auflage

Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990)

$\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550

Lohse MJ (1993)

Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179, 171-188

Lohse MJ, Vilardaga JP und Bünemann M (2003)

Direct optical recording of intrinsic efficacy at a G protein-coupled receptor. *Life Sciences* 74, 397-404

Lohse MJ, Bünemann M, Hoffmann C, Vilardaga JP und Nikolaev VO (2007a)

Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. *Curr Opin Pharmacol* 7, 547-553

Lohse MJ, Hoffmann C, Nikolaev VO, Vilardaga JP und Bünemann M (2007b)

Kinetic analysis of G-protein-coupled receptor signaling using fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Adv Protein Chem* 74, 167-188

Lohse MJ, Hein P, Hoffmann C, Nikolaev VO, Vilardaga JP und Bünemann M (2008)

Kinetics of G-protein-coupled receptor signals in intact cells. *Br J Pharmacol* 1-8

Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990)

Expansion of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5094-5098

Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD und Koch WJ (2007)

Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med* 13, 315-323

MacDonald E, Kobilka BK und Scheinin M (1997)

Gene-targeting – homing in on  $\alpha_2$ -adrenoceptor-subtype function. *Trends in Pharmacol. Sciences* 18, 211-219

MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT und Limbird LE (1996)

Central hypotensive effects of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Science* 273, 801-805

Manolis AJ, Olympios C, Sifaki M, Handanis S, Bresnahan N, Gavras I und Gavras H (1995)

Suppressing sympathetic activation in congestive heart failure: a new therapeutic strategy. *Hypertension* 26,719-724

McLeod RL, Erickson CH, Mingo GG und Hey JA (2001)

Intranasal application of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist BHT-920 produces decongestion in the cat. *Am J Rhinol* 15, 407-415

Moura E, Afonso J, Hein L und Vieira-Coelho MA (2006)

$\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br J Pharmacol* 149, 1049-1058

Muthig V, Gilsbach R, Haubold M, Philipp M, Ivacevic T, Gessler M und Hein L (2007)

Upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 contributes to angiogenesis defects in the placenta of alpha 2B-adrenoceptor deficient mice. *Circ. Res.* 101, 682-691

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001)

Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 8. Auflage

Nagy A, Gersenstein M und Vintersten K (2003)

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.*, 3. Auflage

Olli-Lähdesmaki T, Kallio J und Scheinin M (1999)

Receptor subtype-induced targeting and subtype-specific internalization of human  $\alpha_2$ -adrenoceptors in PC12 cells. *J Neurosci* 19, 9281-9288

Olli-Lähdesmaki T, Scheinin M, Pohjanoksa K, Kallio J (2003)

Agonist-dependent trafficking of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes: dependence on receptor subtype and employed agonist. *Eur J Cell Biol* 82, 231-239

Pang L, Sawada T, Decker SJ und Saltiel AR (1995)

Inhibition of MAP kinase kinase blocks differentiation of PC12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* 270, 13585-13588

Peng M, Li Y, Luo Z, Liu C, Laties AM und Wen R (1998)

$\alpha_2$ -Adrenergic agonists selectively activate extracellular signal-regulated kinases in Muller cells in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 1721-1726

Philipp M, Brede M, Hadamek K, Gessler M, Lohse MJ, Hein L (2002a)

Placental  $\alpha_2$ -adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nature Genetics* 31, 311-315

Philipp M, Brede M und Hein L (2002b)

Physiological significance of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R287-295

Philipp M und Hein L (2004)

Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 101, 65-74

Pneunova N und Enikolopov G (1995)

Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375, 68-73

Pohjanoksa K, Jansson CC, Luomala K, Marjamaki A, Savola JM und Scheinin M (1997)

$\alpha_2$ -Adrenoceptor regulation of adenylyl cyclase in CHO cells: dependence on receptor density, receptor subtype and current activity of adenylyl cyclase. *Eur J Pharmacol*, 335, 53-63

Port JD und Bristow MR (2001)

Altered  $\beta$ -adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33, 887-905

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI und Kobilka BK (2007)

Crystal structure of the human  $\beta_2$ -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387

Regan JW, Kobilka TS Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ und Kobilka BK (1988)

Cloning and expression of a human kidney cDNA for an  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6301-6305

Röser Ch (2005)

Rezeptor-Signaltransduktion in transgenen Mausmodellen: Prä- versus postsynaptische Funktionen  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Universität Würzburg

Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC und Kobilka BK (2007)

GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266-1273

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491

Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K (2001)

$\alpha_2$ -Adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol* 132, 925-933

Scheinin H, Aantaa R, Anttila M, Hakola P, Helminen A und Karhuvaara S (1998)

Reversal of the sedative and sympatholytic effects of dexmedetomidine with a specific  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist atipamezole: a pharmacodynamic and kinetic study in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 89, 574-584

Scheinin M, Sallinen J und Haapalinna A (2001)

Evaluation of the  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target studies in transgenic mouse models. *Life Sci* 68, 2277-2285

Silbernagl S, Despopoulos A (2001)

Taschenatlas der Physiologie, *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 5. Auflage

Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR und Liggett SB (2000)

A four amino acid deletion polymorphism in the third loop of the human  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *J Biol Chem*, 275, 23059-23064

Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H und Limbird LE (1992)

A point mutation of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science*, 257, 977-980

Swedberg K, Bristow MR, Cohn JN, Dargie H, Straub M, Wiltse C, Wright TJ: Moxonidine Safty and Efficacy (MOXSE) Investigators (2002)

Effects of sustained-release moxonidine, an imidazoline agonist, on plasma norepinephrine in patients with chronic heart failure. *Circulation* 105, 1797-1803

Taraviras S, Olli-Lähdesmäki T, Lympelopoulos A, Charitonidou D, Mavroidis M, Kallio J, Scheinin M und Flordellis Ch (2002)

Subtype-specific neuronal differentiation of PC12 cells transfected with  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *European J of Cell Biol* 81, 363-374

- Trendelenburg AU, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K (2003)  
All three  $\alpha_2$ -adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368, 504-512
- Van Kerckhoven R, van Veen TA, Boomsma F, Saxena PR und Schoemaker RG (2000)  
Chronic administration of moxonidine suppresses sympathetic activation in a rat heart failure model. *Eur J Pharmacol* 397, 113-120
- Vilardaga JP, Bünemann M, Krasel C, Castro M und Lohse MJ (2003)  
Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat. Biotechnol* 21, 807-812
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. (2002)  
Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562
- Wettschureck N und Offermanns S (2005)  
Mammalian G-proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204
- Wieland K, Zuurmond HM, Andexinger S, IJzerman AP und Lohse MJ (1996)  
Stereospecificity of agonist binding to  $\beta_2$ -adrenergic receptor involves Asn-293. *Proc Natl Sci U S A* 93, 9276-9281
- Young JB, Landsberg L (1998)  
Catecholamines and the adrenal medulla. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams textbook of endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 665-728

# DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mich während der Erstellung der Dissertation unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse, für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Hein, für die Themenstellung und die Ermöglichung der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe. Für die Betreuung der Dissertation und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sei ihm herzlich gedankt.

Frau Kerstin Hadamek und Frau Birgit Thur, für die Einarbeitung, die stete Unterstützung bei der Lösung zahlreicher Probleme und die vielen motivierenden Gespräche in dieser Zeit.

Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Carsten Hoffmann, für die Einarbeitung in die FRET-Technologie und die stete hilfsbereite Unterstützung.

Frau Marianne Babl, für die Durchführung der HPLC-Messungen und die Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hein und des pharmakologischen Instituts, für die freundliche Aufnahme und das sehr kollegiale Arbeitsklima.

Meiner Familie und allen Freunden, für das Verständnis und die immer wieder aufmunternde Unterstützung während dieser Zeit.