

Die Rolle von α_2 -adrenergen Rezeptoren während der Embryonalentwicklung der Maus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Melanie Philipp
aus Grub am Forst

Würzburg 2002

Die Rolle von α_2 -adrenergen Rezeptoren während der Embryonalentwicklung der Maus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Melanie Philipp
aus Grub am Forst

Würzburg 2002

Eingereicht am: 20. Dezember 2002.....
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin J. Lohse
2. Gutachter: Prof. Dr. Claus Herdeis.....
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Martin J. Lohse.....
2. Prüfer: Prof. Dr. Claus Herdeis.....
3. Prüfer: Prof. Dr. Lutz Hein.....
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Die Rolle von α_2 -adrenergen Rezeptoren während der Embryonalentwicklung der Maus“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 20.Dezember 2002

I.	Zusammenfassung/Summary	9
II.	Einleitung	11
1	Das adrenerge System	12
1.1	Geschichte der adrenergen Rezeptoren	12
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	12
1.3	Gliederung der adrenergen Rezeptoren	14
2	α_2-Adrenerge Rezeptoren	14
2.1	Signalwege von α_2 -Rezeptoren	15
2.2	Der Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen	16
2.2.1	Einteilung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen	16
2.2.2	Die Rezeptortyrosinkinasen-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung	17
2.2.3	Die GPCR-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung	18
2.3	Subzelluläre Lokalisation von α_2 -Rezeptoren	18
2.4	Verteilung von α_2 -Rezeptoren im Organismus	19
2.5	Physiologische Funktionen von α_2 -Rezeptoren	20
2.6	Transgene Mäuse mit Deletionen der Gene für α_2 -adrenerge Rezeptoren	20
3	Die embryonale Entwicklung der Maus	22
3.1	Von der Eizelle bis zur Geburt	22
3.2	Die extraembryonalen Organe	23
3.2.1	Funktion	23
3.2.2	Der Dottersack	23
3.2.3	Die Plazenta	24
3.3	Das adrenerge System während der Embryonalentwicklung	25
4	Ziele dieser Arbeit	26
III.	Methoden	27
1	Kreuzung und Genotypisierung von α_2-KO-Mäusen	27
1.1	Maushaltung	27
1.2	Generierung von α_{2AB} -KO- und α_{2BC} -KO-Mäusen	27
1.3	Generierung von α_{2ABC} -KO-Mäusen	27

1.4	Präparation genomischer DNS	27
1.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
1.6	Agarosegelelektrophorese	29
2	Histologische Untersuchungen	29
2.1	Herstellung von Kunstharzschnitten	29
2.1.1	Perfusionsfixierung von narkotisierten Mäusen	29
2.1.2	Epon-Einbettung von Geweben mit Durcupan® ACM (Fluka)	30
2.1.3	Anfertigung der Kunstharzschnitte	30
2.2	Ermittlung von Plazentaparametern	30
2.3	Herstellung von Paraffinschnitten	31
2.3.1	Paraffineinbettung von Gewebe	31
2.3.2	Anfertigung der Paraffinschnitte	31
2.3.3	HE-Färbung von Paraffinschnitten	31
2.3.4	Sirius Rot-Färbung von Paraffinschnitten	32
2.4	Herstellung von Kryostatschnitten	32
2.4.1	Herstellung von Kryostatschnitten ohne Vorfixierung	32
2.4.2	Herstellung von Kryostatschnitten mit Vorfixierung	32
3	Physiologie von α_{2ABC}-KO-Embryonen	32
3.1	Entnahme von Embryonen	32
3.2	Photographie von Embryonen	33
3.3	Messung der Herzfrequenz von Mausembryonen	33
3.4	Catecholaminbestimmung in Embryonen	33
4	Lokalisation von α_2-Rezeptoren während der Embryonalentwicklung	34
4.1	Nachweis der α_2 -Rezeptoren per RT-PCR	34
4.1.1	Präparation von Gesamt-RNS mit saurer Phenolextraktion	34
4.1.2	Quantifizierung von RNS	35
4.1.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNS	35
4.2	RT-PCR von RNS	35
4.2.1	Reverse Transkription für den α_{2A} - und den α_{2B} -Rezeptor	36
4.2.2	Reverse Transkription für den α_{2C} -Rezeptor	36
4.2.3	PCR der cDNS	36
4.3	Nachweis der α_2 -Rezeptoren mittels Radioligandenbindungsstudien	37
4.3.1	Präparation von Membranen	37
4.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	38
4.3.3	Bestimmung der Rezeptordichte in Plazenten	38
4.4	Lokalisation der Rezeptoren in der Plazenta	39
4.4.1	Autoradiographie	39
4.4.2	RNS <i>in situ</i> -Hybridisierung an Paraffinschnitten von Plazenten zur Lokalisation von Riesenzellen und Spongiotrophoblastzellen	39
4.4.2.1	Herstellung Digoxigenin-markierter RNS-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	39

4.4.2.2	RNS- <i>in situ</i> -Hybridisierung an Paraffinschnitten	40
5	Signaltransduktion von α_2-Rezeptoren in Embryonalgewebe und in Zellen	42
5.1	Bestimmung von cAMP in Embryonalgewebe	42
5.2	Gewinnung von Plasmid-DNS	43
5.2.1	Kultur von <i>E.coli</i>	43
5.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	43
5.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	43
5.2.4	Plasmidpräparation mithilfe von Qiagen®- Säulen	44
5.2.5	Quantifizierung von DNS	44
5.3	Kultur von eukaryontischen Zellen	44
5.3.1	Transfektion von eukaryontischen Zellen	45
5.3.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz	45
5.4	Stimulation von Zellen und Gewebe	45
5.4.1	HEK-Zellen	45
5.4.2	Dottersäcke	46
5.4.3	Plazenten	46
5.5	Nachweis von ERK1/2 in Plazentaschnitten	46
5.5.1	Perfusion von kontrolliert verpaarten Mäusen mit 0,9% NaCl	46
5.5.2	Immunhistochemie	46
5.6	Western Blot Analyse von Zell- und Gewebelysaten	47
5.6.1	Herstellung von Zell- und Gewebelysaten zur Western Blot Analyse	47
5.6.2	Quantifizierung von Proteinen mit Amidoschwarz	48
5.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
5.6.4	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	49
5.6.5	Immunologische Detektion von immobilisierten Proteinen	50
6	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	51
IV.	Material	52
1	Bakterienstämme	52
2	Plasmidvektoren	52
3	Antikörper	52
4	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	52
5	Enzyme und Kits	53
6	Medien zur Zell- und Gewebekultur	54
7	Oligonukleotide	54
8	Pufferlösungen	54
9	Verbrauchsmaterial	54
IV.	Ergebnisse	55
1	Generierung von α_2-KO-Mäusen	55

1.1	α_{2AB} -KO-Mäuse	55
1.2	α_{2BC} -KO-Mäuse	56
1.3	α_{2ABC} -KO-Mäuse	57
2	Charakterisierung von α_2-Doppel-KO-Mäusen	58
2.1	Entwicklung und Verhalten	58
2.2	Herzuntersuchung	58
3	Embryonale Letalität von α_{2ABC}-KO-Mäusen	60
3.1	Zeitpunkt des Todes von α_{2ABC} -KO-Mäusen	60
3.2	Äußere Merkmale der α_{2ABC} -KO-Embryonen	61
3.3	Untersuchung des Herzen von α_{2ABC} -KO-Embryonen	61
3.3.1	Morphologie der Herzen von α_{2ABC} -KO-Embryonen	61
3.3.2	Herzfrequenzmessung von Embryonen	62
3.3.4	Bestimmung des L-DOPA-Spiegels von α_{2ABC} -KO-Embryonen	63
4	Expression von α_2-Rezeptoren während der Embryonalentwicklung	63
5	Morphologische Veränderungen extraembryonaler Organe	64
5.1	Dottersackdefekte von α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5	64
5.2	Plazentadefekte von α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5	65
5.2.1	Plazentamorphologie	66
5.3	Bestimmung der Rezeptordichte in Plazenten an Tag E10,5	68
5.4	Lokalisierung der α_2 -Rezeptoren in der Plazenta	70
5.5	Nachweis spezifischer Plazentazelltypen mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	71
5.6	Veränderungen in der Signaltransduktion nach α_{2ABC} -Deletion	72
6	α_2-Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in Embryonalgewebe	72
6.1	α_2 -Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung im Dottersack	72
6.2	α_2 -Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in der Plazenta	73
6.3	Basale ERK1/2-Phosphorylierung in frisch präpariertem Embryonalgewebe von α_{2ABC} -KO-Embryonen	74
6.4	Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase	75
6.5	cAMP-Konzentration in extraembryonalen α_{2ABC} -KO-Geweben	75
7	Wechselwirkung zwischen α_2-Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen	77
7.1	Kinetik der α_2 -Rezeptor-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung	77
7.2	Kinetik der PDGF β -Rezeptor-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung	78
7.3	ERK1/2-Phosphorylierung nach Co-Stimulation mit UK14304 und PDGF-BB in HEK293-Zellen	78
7.4	ERK1/2-Phosphorylierung nach Co-Stimulation mit UK14304 und PDGF-BB in	79

	Dottersäcken	
7.5	Transaktivierung in α_{2ABC} -KO-Dottersäcken	80
V.	Diskussion	82
1	Untersuchung von α_2 -Doppel-KO-Mäusen	82
2	Embryonale Letalität von α_{2ABC} -KO-Mäusen	84
3	Signaltransduktion in WT- und α_2 -KO-Geweben	89
4	Wechselwirkung von α_2 -Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen	93
5	Relevanz der erbrachten Befunde für die menschliche Embryonalentwicklung	95
VI.	Literaturverzeichnis	98
VII.	Abkürzungsverzeichnis	112
	Lebenslauf	115
	Bisherige Publikationen und Kongreßbeiträge	116

I. Zusammenfassung/Summary

α_2 -Rezeptoren, die weiter in α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} unterteilt werden, gehören zur Gruppe der adrenergen Rezeptoren innerhalb der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind maßgeblich an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt. Vieles, was heute über α_2 -Rezeptoren bekannt ist, wurde mithilfe von α_2 -defizienten Mäusen, sogenannten „Knock-Out“-Mäusen (KO) herausgefunden, von denen bislang drei Einzel-KOs und der Doppel-KO der Subtypen A und C existieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Kreuzung der vorhandenen KO-Linien Mauslinien generiert, die defizient für α_{2A} und α_{2B} , für α_{2B} und α_{2C} oder alle drei α_2 -Rezeptoren sind. Während α_{2AB} -KO-Mäuse ungefähr entsprechend der Mendelschen Verteilung geboren wurden, zeigte sich, dass α_{2BC} -KO-Mäuse teilweise und α_{2ABC} -KO-Mäuse sogar komplett embryonal letal waren. Die morphologischen Untersuchungen legten den Zeitpunkt der embryonalen Letalität der α_{2ABC} -KO-Mäuse auf den Tag E10,5 der Embryonalentwicklung fest und konnten zeigen, dass diese Letalität in einem Vaskularisierungsdefekt innerhalb der extraembryonalen Organe Plazenta und Dottersack begründet lag. Diese Organe stellen die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff sicher und sorgen somit für dessen Entwicklung. Durch RT-PCR-Experimente konnte die mRNA für alle drei α_2 -Rezeptorsubtypen an Tag E10,5 sowohl im Embryo als auch in Plazenta und Dottersack nachgewiesen werden. Autoradiographische Experimente und Radioligandenbindungsstudien an Plazenten machten deutlich, dass der Großteil an α_2 -Rezeptoren im embryonalen Teil der Plazenta exprimiert wird, nämlich in den Riesenzellen und in der sich daran anschließenden Spongiotrophoblastschicht, und dass hierbei α_2 -Rezeptoren vom B-Subtyp vorherrschen. In den genannten Zellen konnte mittels Immunhistochemie eine α_2 -Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 gezeigt werden, die auch in kultivierten WT-Dottersäcken beobachtet werden konnte. Unter basalen Bedingungen zeigte sich, dass die ERK1/2-Phosphorylierung in Gewebe von α_{2ABC} -KO-Embryonen drastisch vermindert war, während andere Signalwege, die von α_2 -Rezeptoren angestoßen werden können, nicht beeinträchtigt waren. Versuche in einem Zellkulturmodell und mit kultivierten WT-Dottersäcken ergaben eine physiologisch relevante Wechselwirkung zwischen dem α_{2B} -Rezeptor und dem PDGF β -Rezeptor, einer Rezeptortyrosinkinase, als deren Mechanismus sich in Co-Kultur-Experimenten mit α_{2B} -Rezeptor-transfizierten Zellen und α_{2ABC} -defizienten Dottersäcken die

Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen herausstellte.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass α_2 -Rezeptoren bei der Maus über eine Transaktivierung von ERK1/2 die Vaskularisierung der Plazenta und des Dottersacks bedingen und damit eine normale Embryonalentwicklung sicherstellen.

α_2 -Receptors belong to the family of adrenergic receptors within the superfamily of G-protein coupled receptors. They are involved in the regulation of many physiological processes.

Most of the known functions have been investigated using mice deficient in α_2 -receptors. To date, single knockout mouse lines exist for each subtype of α_2 -receptors and also the α_{2AC} -knockout. In this study the remaining double knockouts and the triple-knockout were generated by crossing the existing knockout mice. While mice deficient for the α_{2A} - and the α_{2B} -receptor were born with the expected Mendelian ratio, embryonic lethality occurred in the α_{2BC} -knockout mice, and this was complete in mice lacking all three α_2 -receptors. Morphological examinations revealed that α_{2ABC} -mice die around midgestation because of a defect in vascularisation in the extra-embryonic organs placenta and yolk sac. These are the organs which support the embryo with nutrients and oxygen and are therefore essential for embryonic development. RT-PCR-experiments detected mRNA for all three subtypes of α_2 -receptors on day E10.5 of embryonic development in embryo, placenta and yolk sac. Autoradiography and radioligand binding studies showed that most of the α_2 -receptors are expressed in the embryonic part of the placenta, in particular in giant cells and the underlying spongiotrophoblast layer. The α_{2B} -receptor is the main subtype in these tissues. Immunohistochemistry of stimulated placenta slices demonstrated α_2 -receptor mediated phosphorylation of the MAP-kinase ERK1/2, which was also observed in cultivated yolk sacs of WT-mice. In freshly prepared tissue of α_{2ABC} -knockout embryos ERK1/2-phosphorylation was dramatically decreased, while other signaling pathways of α_2 -receptors were unaffected. Experiments using cell culture and cultivated yolk sacs of WT-mice revealed a physiologically relevant interaction between α_{2B} -receptors and PDGF β -receptors, a receptor tyrosine kinase. The mechanism of this interaction was elucidated in co-culture experiments of α_{2B} -receptor transfected cells and α_{2ABC} -knockout yolk sacs as a G-protein coupled receptor initiated transactivation of receptor tyrosine kinases.

In this study it was demonstrated that in mice α_2 -receptors are responsible for the vascularisation of placenta and yolk sac by transactivation of ERK1/2, and that they are, therefore, necessary for proper embryonic development.

II. Einleitung

Das adrenerge System spielt im Körper für das Herz-Kreislauf-System, die Blutzuckerregulation oder auch im Hinblick auf kognitive Fähigkeiten eine weit reichende Rolle. Neben all diesen Funktionen, die vor allem im adulten Organismus untersucht wurden, rückt auch immer wieder die Frage nach dem Einfluß auf die Embryonalentwicklung in den Vordergrund. Stress zum Beispiel wird über das adrenerge System vermittelt. Aber ist Stress, der durch ein abnorm reguliertes adrenerges System bedingt sein kann, gesund oder ist er schädlich für die Frucht im Mutterleib? In Anbetracht der Tatsache, dass 12 bis 19 % aller diagnostizierten Schwangerschaften mit einem spontanen Abort enden (Giacomucci *et al.*, 1994) und viele Schwangerschaften, noch bevor sie entdeckt werden, enden (Wilcox *et al.*, 1988), herrscht in der Öffentlichkeit und in der Wissenschaft großes Interesse an den Ursachen hierfür. Häufig ist ein Defekt in der Plazentaentwicklung entscheidend für einen plötzlichen Abort während des ersten Trimenons. Ob und inwieweit adrenerge Rezeptoren, die Hauptschaltstellen des adrenergen Systems auf molekularer Ebene, in diesem Zusammenhang Angriffspunkte für die sichere Diagnose oder Therapie von Risikoschwangerschaften darstellen könnten, ist bislang ungewiß. Ebenso gering sind die Kenntnisse, ob Schädigungen durch eine Behandlung mit Medikamenten, die an adrenergen Rezeptoren angreifen, bedingt sein können. So werden zwar β -Blocker nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung bei Bluthochdruck in der Schwangerschaft eingesetzt, aber vor allem wenn die Therapie zu Beginn des zweiten Trimenons anfängt, tritt eine deutliche Wachstumsverzögerung des Embryos auf (Frishman *et al.*, 1988). Auch Agonisten für α_2 -Rezeptoren, die den „Stress“ im Körper regulieren können, werden zur Behandlung Schwangerer verwendet, doch sind keine Kenntnisse über die Auswirkungen auf das Kind vorhanden, wenn die Therapie schon in den ersten drei Schwangerschaftsmonaten einsetzt. Hilfestellung bei der Beantwortung der Frage, ob und welche Rolle α_2 -Rezeptoren während der Embryonalentwicklung spielen und inwieweit eine Behandlung mit dementsprechenden Pharmaka sicher ist, können neben der klinischen Forschung am Menschen transgene Tiermodelle bieten, denen große Fortschritte im Verständnis über der Regulation physiologischer Prozesse zu verdanken sind. Mit ihnen ist es möglich einzelnen Rezeptorsubtypen spezifische Funktionen zuzuordnen, wenn, wie im Falle der α_2 -Rezeptoren, keine subtypspezifischen Antagonisten existieren.

1 Das adrenerge System

1.1 Geschichte der adrenergen Rezeptoren

Der Rezeptorbegriff wurde erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich (Himmelweit *et al.*, 1908) und James N. Langley (Langley, 1909) unabhängig voneinander geprägt. Beide stimmten überein, dass es an der Zelloberfläche Zielstrukturen geben muß, an die Substanzen binden können, um auf diese Art Signale in die Zelle weiterleiten zu können. Nicht zuletzt stützte sich diese Theorie auf Langleys Beobachtung der gegensätzlichen Wirkung von Nicotin und Curare, wofür er die Begriffe „Agonist“ und „Antagonist“ wählte, die bis heute in der Rezeptorphanakologie benutzt werden (Langley, 1905). Ihm ist auch die Entdeckung sympathomimetischer Eigenschaften von Nebennierenextrakten zuzuschreiben (Langley, 1901) und damit eigentlich auch die des Adrenalins, des ersten adrenergen Liganden. Der erste Antagonismus für adrenerge Rezeptoren ergab sich aus den Arbeiten von H. H. Dale, der mit Secale-Alkaloiden forschte (Dale, 1906). Erst lange Zeit später jedoch, 1948, charakterisierte R. P. Ahlquist die Rezeptoren des adrenergen Nervensystems, indem er sie in α - und β -Rezeptoren unterteilte (Ahlquist, 1948). Recht schnell spielten adrenerge Rezeptoren in der Therapie eine Rolle. So kam beispielsweise 1964 der erste β -Rezeptor-Blocker zur Hypertoniebehandlung zum Einsatz (Black *et al.*, 1962). Man begann die adrenergen Rezeptoren mithilfe neuer pharmakologischer Liganden und mit den neu entwickelten Techniken der Rezeptorligandenbindung und cDNS-Klonierung in verschiedene Subtypen zu unterteilen. Heute kennt man 9 verschiedene adrenerge Rezeptoren: 3 α_1 -, 3 α_2 - und 3 β -Rezeptoren. Für α_2 -Rezeptoren beschrieb D. Bylund 1988 (Bylund, 1988) erstmals die Unterteilung in drei Subtypen, α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} , deren Gene beim Menschen auf den Chromosomen 10, 2 und 4 liegen (Regan *et al.*, 1988; Yang-Feng *et al.*, 1987).

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Lefkowitz, 2000). Diese sind an der Zelloberfläche lokalisiert und setzen sich aus einem extrazellulären Aminoterminus, sieben die Zellmembran durchspannenden α -Helices, die von verschiedenen langen Schleifen verbunden werden, und einem intrazellulären Carboxyterminus zusammen. Im Falle des β_2 -Rezeptors, an dem viele Untersuchungen zur Rezeptoraktivierung durchgeführt wurden, führt neben der Ausbildung von Wasserstoffbrücken der Hydroxygruppen des aromatischen Rings mit zwei Serinen (Ser20, Ser207) in der Transmembrandomäne V die Bindung des

Agonisten Isoprenalin an ein Aspartat (Asp113) der dritten Transmembrandomäne zur Bewegung der sechsten Helix, so dass eine Konformationsänderung des Rezeptors eintritt (Gether, 2000). Dadurch befindet sich der Rezeptor in einem aktivierten Zustand. In der Zelle wird infolge dessen ein an den Rezeptor gekoppeltes G-Protein, das aus α -, β - und γ -Untereinheiten besteht, zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit animiert (Lambright *et al.*, 1996). Darauf folgt eine Dissoziation von α - und $\beta\gamma$ - Untereinheit, welche beide für sich diverse Signalkaskaden in der Zelle anstoßen, aber auch bremsen können. Hydrolyse des GTP zu GDP bewirkt eine Reassoziierung der G-Protein-Untereinheiten und somit ein Abschalten des Signals. Währenddessen stellt der aktivierte Rezeptor ein Ziel für diverse Proteinkinasen wie die Proteinkinase A (Roth *et al.*, 1991) oder auch die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) dar (Benovic *et al.*, 1986). Nach Phosphorylierung durch die Kinasen können Arrestine an intrazelluläre Rezeptordomänen gebunden werden (Ferguson *et al.*, 1996; Lohse *et al.*, 1990). Danach werden viele Rezeptoren in das Innere der Zelle transportiert (von Zastrow *et al.*, 1992), wo sich nun entscheidet, ob die internalisierten Rezeptoren in Vesikeln durch lytische Prozesse degradiert oder wieder zurück an die Zelloberfläche gebracht werden (Lohse *et al.*, 1993) (siehe Abbildung 1).

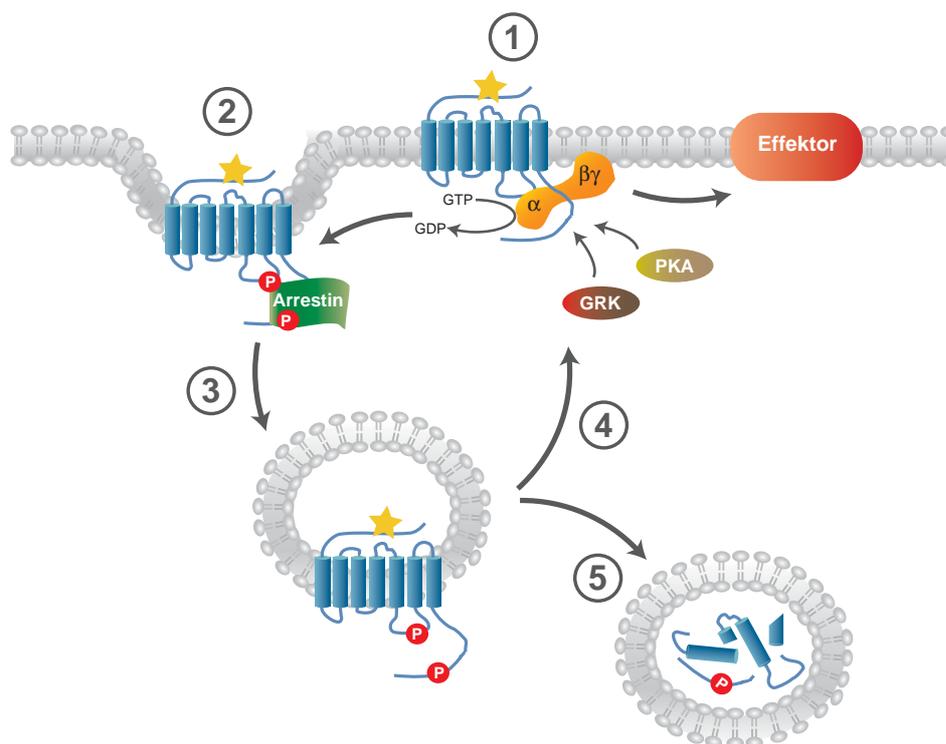


Abb. 1: Schematische Darstellung der Mechanismen der Signalübertragung und der Rezeptordesensibilisierung von GPCRs: (1) Infolge einer Agonist-vermittelten Konformationsänderung findet an der α -Untereinheit des G-Proteins ein Austausch von GDP zu GTP statt, wodurch α - und $\beta\gamma$ -

Untereinheiten dissoziieren und Effektoren beeinflussen. Der aktivierte Rezeptor stellt nun ein Substrat für Proteinkinasen, wie G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) oder die Proteinkinase A (PKA) dar. (2) Die Phosphorylierung schaltet den Rezeptor ab und schafft die Voraussetzung für die Assoziation mit Arrestinen und anderen Proteinen, die über eine Einstülpung der Membran zur Internalisierung des Rezeptors in Vesikel führt (3). Von hier aus kann der Rezeptor entweder zur Zelloberfläche zurücktransportiert werden (4) oder in Lysosomen überführt werden, in denen die Degradierung erfolgt (5).

1.3 Gliederung der adrenergen Rezeptoren

Bislang sind beim Menschen und den meisten Säugetieren 9 adrenerge Rezeptoren beschrieben worden: je 3 α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} und β_1 , β_2 , β_3 . (Bylund *et al.*, 1994). Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Verteilung im Organismus, sondern auch durch ihre Signalweiterleitung. So sind α_1 -Rezeptoren vornehmlich an G_q -Proteine gekoppelt, α_2 -Rezeptoren an G-Proteine des inhibitorischen Typs ($G_{i/o}$) und β -Rezeptoren vor allem an G_s -Proteine. Daraus erklären sich viele physiologische Unterschiede der drei adrenergen Rezeptorgruppen. α_1 -Rezeptoren vermitteln in erster Linie Vasokonstriktion (Guimaraes *et al.*, 2001), während α_2 -Rezeptoren maßgeblich an der Regulation des Sympathikotonus beteiligt sind (Hein *et al.*, 1999) und β -Rezeptoren eine große Rolle im kardiovaskulären System spielen (Chruscinski *et al.*, 2001; Engelhardt *et al.*, 1999) und dort auch als therapeutische Angriffspunkte genutzt werden. Ein weiterer Unterschied zwischen α_2 - und β -Rezeptoren besteht darin, dass α_2 -Rezeptoren in erster Linie präsynaptisch lokalisiert sind, β -Rezeptoren hingegen postsynaptisch.

2 α_2 -Adrenerge Rezeptoren

Durch die Entdeckung von gewebespezifisch unterschiedlichen Affinitäten von Prazosin und Oxymetazolin in Rezeptor-Ligand-Bindungsexperimenten folgerte man, dass es mehrere Subtypen von α_2 -Rezeptoren mit unterschiedlicher Verteilung im Organismus geben muß (Bylund, 1985): Der erste auf diese Weise lokalisierte α_2 -Rezeptor war der α_{2B} -Rezeptor (Latifpour *et al.*, 1982). So wurde der α_{2A} -Rezeptor erstmals auf Blutplättchen lokalisiert (Regan *et al.*, 1986), der α_{2B} -Rezeptor wurde in neonataler Rattenlunge detektiert (Latifpour *et al.*, 1982) und der α_{2C} -Rezeptor konnte durch Experimente mit Opossum-Nieren identifiziert werden (Blaxall *et al.*, 1991). Außerdem wurden α_2 -Rezeptoren per Homologie-Klonierung identifiziert. Die Klonierung der

menschlichen α_2 -Rezeptoren gelang für den α_{2A} -Rezeptor 1987 (Kobilka *et al.*, 1987), die des α_{2C} -Subtyps 1988 (Regan *et al.*, 1988) und 1990 wurde auch das Gen für den dritten α_2 -Rezeptor kloniert (Lomasney *et al.*, 1990). Ein vierter, anfangs α_{2D} benannter Rezeptor bei Nagern stellte sich als α_{2A} -Rezeptor heraus, bei dem verglichen mit dem humanen α_{2A} -Rezeptor eine Aminosäure in der fünften Trans-membrandomäne ausgetauscht war, so dass ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber Yohimbin auftrat (Link *et al.*, 1992).

2.1 Signalwege von α_2 -Rezeptoren

Alle drei α_2 -Rezeptoren sind an inhibitorische G-Proteine der Subtypen G_i und G_o gekoppelt (Cotecchia *et al.*, 1990). Nach Rezeptoraktivierung hemmt die α_i -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatcyclase, wodurch weniger cyclisches AMP gebildet wird (Pohjanoksa *et al.*, 1997). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit hingegen verringert die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Hemmung von N-Typ-Calciumkanälen (Li *et al.*, 1998) und bewirkt damit eine verminderte Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenendigungen in den synaptischen Spalt. Zusammen mit der $\beta\gamma$ -vermittelten Stimulation von Kaliumkanälen (Surprenant *et al.*, 1992) und einer dadurch bedingte Hyperpolarisation kommt es zur Hemmung der neuronalen Funktion. Darüber hinaus schalten $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die von aktivierten α_2 -Rezeptoren freigesetzt werden, den Signalweg der Mitogen-aktivierten Protein-kinasen an (Koch *et al.*, 1994), der im weiteren noch näher beleuchtet werden soll (siehe Abbildung 2).

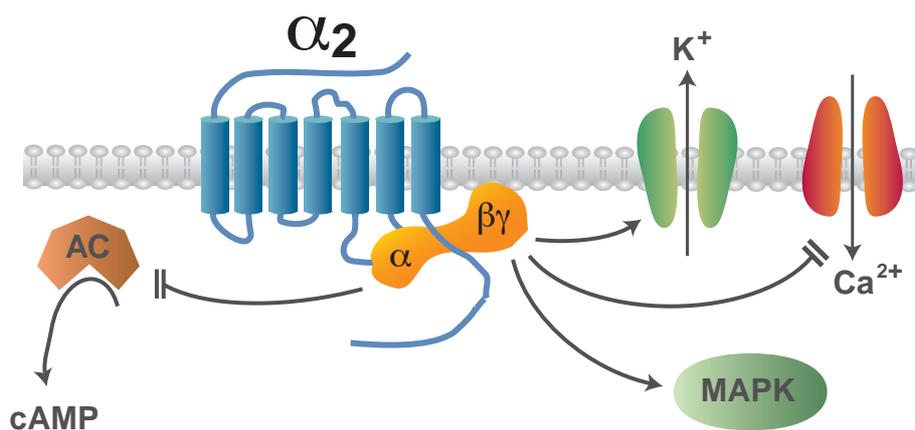


Abb. 2: Signalwege von α_2 -Rezeptoren: Die Adenylatcyclase (AC) wird über die α_i -Untereinheit des G_i -Proteins in ihrer Funktion gehemmt, wohingegen $\beta\gamma$ -vermittelt Kalium-Kanäle geöffnet, spannungsabhängige Calcium-Kanäle geschlossen und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktiviert werden.

2.2 Der Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

2.2.1 Einteilung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

In der Literatur sind bis dato vier Familien von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beschrieben (Schaeffer *et al.*, 1999). Es gibt drei extrazellulär regulierte Kinasen (ERK1, 2 und 5), die in zwei verschiedene Gruppen eingeordnet werden, die Reihe der 38 kD großen p38 MAP-Kinasen und die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), die auch unter dem Synonym c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) bekannt sind. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Gliederung und die Eigenschaften von MAP-Kinasen:

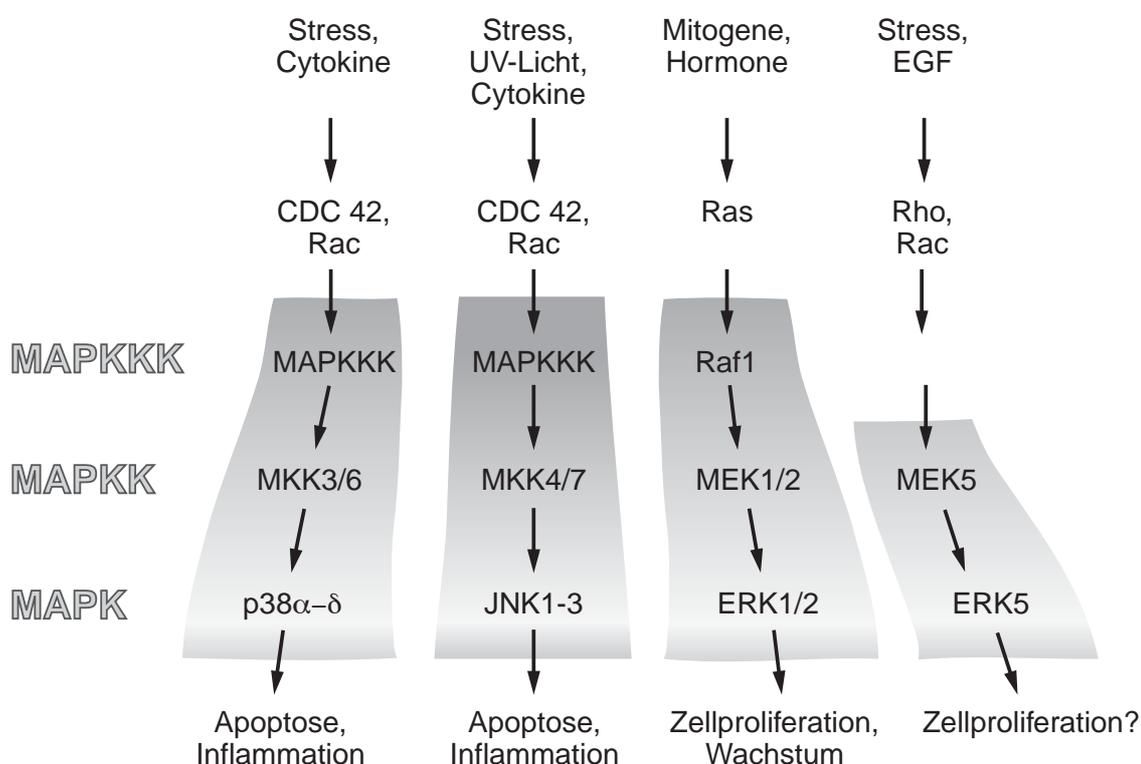


Abb. 3: Übersicht über die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und deren prinzipielle Aktivierung und Wirkung

Die prinzipielle MAPK-Kaskade läuft immer gleich ab: Über ein Signal von außerhalb der Zelle wird eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) phosphoryliert, die ihrerseits eine MAPK-Kinase (MAPKK) durch Phosphorylierung aktiviert und damit die Aktivierung der eigentlichen MAP-Kinasen bedingt. Im Folgenden soll nur die Gruppe der MAP-Kinasen ERK1/2 beschrieben werden, da diese unter anderem von α_2 -Rezeptoren aktiviert werden (Peng *et al.*, 1998).

2.2.2 Die Rezeptortyrosinkinasen-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung

Der klassische Aktivator für ERK1/2 wird durch die Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) repräsentiert (Ullrich *et al.*, 1990). RTKs sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die nur eine Transmembrandomäne besitzen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie in der Regel nach Bindung eines Liganden dimerisieren oder schon in Ruhe als Dimere vorliegen und als Folge davon häufig durch Autophosphorylierung von Tyrosinen im intrazellulären Teil des Rezeptors in einen aktiven Zustand übergehen. Über die Adaptorproteine Shc und Grb2 erfolgt eine Verknüpfung mit Sos („Son of Sevenless“), einem GDP/GTP-Austauschfaktor, der membranständiges Ras aktiviert (Schlessinger, 1993).

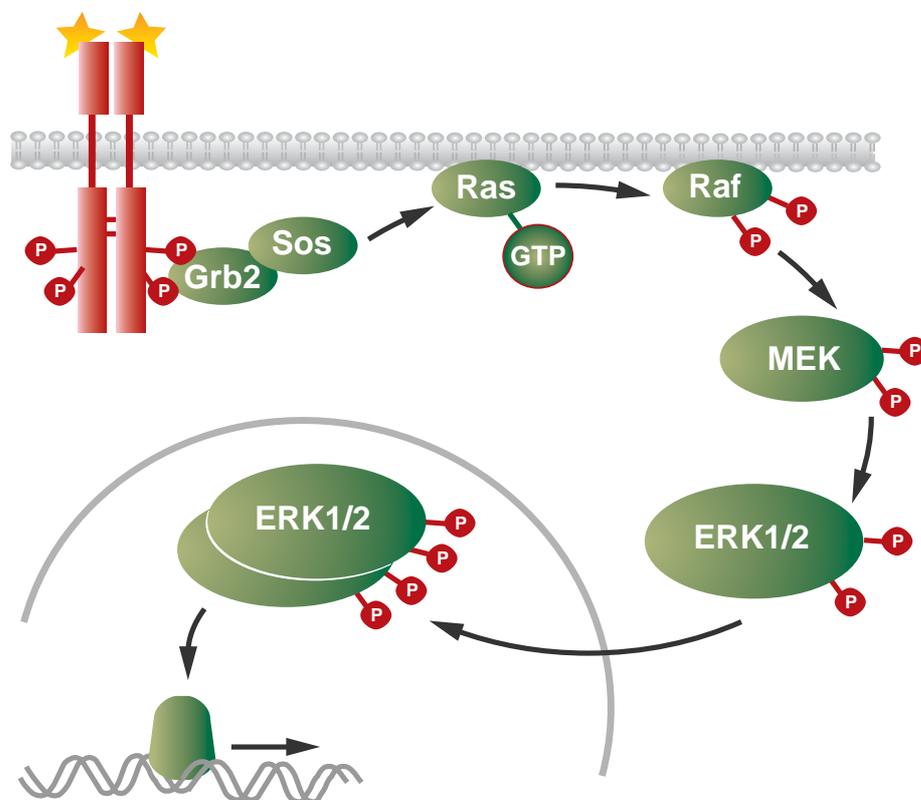


Abb. 4: Signalkaskade der ERK1/2-Aktivierung ausgehend von Rezeptortyrosinkinasen, die nach Bindung des Liganden dimerisieren und im intrazellulären Teil autophosphorylieren.

Dieses transloziert die Raf-Kinase zur Membran, um sie durch Phosphorylierung an den Tyrosinen in Position 340 und 341 zu aktivieren (Ghosh *et al.*, 1994). Mek1 und 2 stellen nun ein Substrat für die phosphorylierte Raf-Kinase dar und phosphorylieren ihrerseits, nachdem sie erst an einem Threonin und danach an einem Tyrosin phosphoryliert wurden, ERK1 und 2 (Gardner *et al.*, 1994). ERK1 und 2, die zu den

Serin-Threonin-Kinasen gehören, dimerisieren und wandern in den Zellkern (Adachi *et al.*, 1999), wo sie über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 (Rao *et al.*, 1994) Zellproliferation und –differenzierung induzieren.

2.2.3 Die GPCR-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung

Die anfängliche Vermutung, nur Wachstumsfaktoren würden ERK1/2 aktivieren, mußte recht früh korrigiert werden, als sich herausstellte, dass sehr wohl auch GPCRs in der Lage sind, diesen Signalweg anzustoßen (Luttrell *et al.*, 1990). Da GPCRs nicht die erforderlichen Src Homologie 2-Domänen besitzen, an die Adaptorproteine binden könnten, und außerdem nicht zur Autophosphorylierung neigen, verläuft hier der Weg, wie es auch für andere von GPCRs initiierten Signalwege gilt, über das gebundene G-Protein. Dabei kann sowohl die α -Untereinheit den Anstoß geben als auch die $\beta\gamma$ -Komponente (Gutkind, 2000; Naor *et al.*, 2000). Beiden Möglichkeiten ist gemeinsam, dass der Weg vom Signal außerhalb der Zelle zur MAP-Kinase länger ist als im Falle des klassischen RTK-Wegs. Für α_2 -Rezeptoren gibt es in der Literatur Hinweise, dass alle drei Subtypen über $G\beta\gamma$ die Kaskade anstoßen können (Cussac *et al.*, 2002; Hawes *et al.*, 1995; Schramm *et al.*, 1999). Der Unterschied zum bekannten RTK-Weg besteht darin, dass noch die Src-Kinase zwischengeschaltet ist (Della Rocca *et al.*, 1997). Im Falle des α_{2A} -Rezeptors wird dabei über die Phospholipase C Src aktiviert, das Shc phosphoryliert. Shc wiederum fungiert als Adaptorprotein und stellt die Verbindung zu Grb2 und dem Rest der Kaskade her.

2.3 Subzelluläre Lokalisation von α_2 -Rezeptoren

Grundlegend lassen sich die 3 Subtypen von α_2 -Rezeptoren nochmals in 2 Gruppen teilen: α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptoren sind vorwiegend präsynaptisch lokalisiert und hemmen hier die Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt (Hein *et al.*, 1999). Dabei agiert der α_{2C} -Rezeptor eher bei niedrigeren Aktionspotentialfrequenzen als der α_{2A} -Rezeptor. Obwohl sich die Aktivierungskinetiken von α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptoren für GIRK-Kanäle bei gleicher Rezeptorexpression nicht unterscheiden, geht die Deaktivierung des α_{2C} -Rezeptor beträchtlich langsamer vonstatten, was auf eine höhere Affinität für Noradrenalin zurückgeführt werden kann (Bünemann *et al.*, 2001). Dem gegenüber steht der α_{2B} -Rezeptor, der sich wahrscheinlich immer auf der post-synaptischen Seite befindet und dort Signale weiterleitet. Weitere Unterschiede zwischen den drei Subtypen bestehen in ihrer Verteilung in der Zelle und ihrem Verhalten

nach Agonistaktivierung (siehe Abbildung 5): Während der α_{2A} -Rezeptor praktisch immer an der Zelloberfläche verbleibt und der α_{2C} -Rezeptor vorwiegend intrazellulär anzutreffen ist, verhält sich der α_{2B} -Rezeptor wie ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Das heißt, nach Stimulation mit einem Agonisten wird der α_{2B} -Rezeptor phosphoryliert, internalisiert und schließlich wieder zur Zellmembran zurücktransportiert (Daunt *et al.*, 1997). Dies gilt so weit zumindest für HEK-Zellen und Fibroblasten, in Neuronen konnten die Rezeptoren bislang noch nicht endgültig lokalisiert werden. Jedoch gelang es in Phäochromozytomzellen: Hier befindet sich der α_{2A} -Rezeptor nach Ausdifferenzierung in den Fortsätzen, während der α_{2B} -Rezeptor an der Plasmamembran verbleibt und der α_{2C} -Rezeptor in einem perinukleären Kompartiment lokalisiert ist (Olli-Lahdesmaki *et al.*, 1999). Neuere Befunde zeigen jedoch, dass der α_{2C} -Rezeptor auch in HEK-Zellen zur Zelloberfläche kommen kann, wenn man die Zellen niedrigeren Temperaturen aussetzt (Jeyaraj *et al.*, 2001).

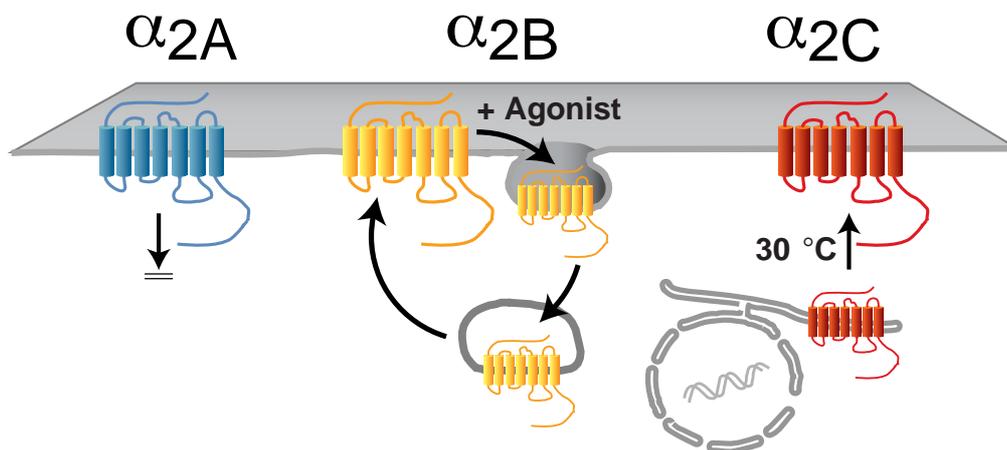


Abb. 5: Intrazelluläre Lokalisation und Transport von α_2 -Rezeptoren in HEK-Zellen (Philipp *et al.*, 2002)

2.4 Verteilung von α_2 -Rezeptoren im Organismus

α_2 -Rezeptoren sind weit über den ganzen Organismus verteilt, wobei der α_{2B} -Subtyp vorwiegend in Lunge, Niere und Gefäßen exprimiert wird (Eason *et al.*, 1993). Die anderen beiden Subtypen werden hauptsächlich in zentralen Arealen des Nervensystems gefunden, wie Hippocampus, Locus coeruleus und Cortex. Dabei übertrifft der α_{2A} -Rezeptor den α_{2C} -Rezeptor zehnfach in seiner Expressionsdichte (Bücheler *et al.*, 2002). Neben der Lokalisation im Gehirn wurde der α_{2C} -Rezeptor außerdem in der Nebenniere (Brede *et al.*, 2002) und in Gefäßen gefunden (Chotani *et al.*, 2000).

2.5 Physiologische Funktionen von α_2 -Rezeptoren

Aufgrund der modulierenden Wirkung auf den Sympathikotonus und der Gefäß-lokalisierung spielen α_2 -Rezeptoren im Herz-Kreislauf-System eine große Rolle. So verursacht der α_{2A} -Rezeptor einen zentral vermittelten hypotensiven Effekt (Link *et al.*, 1996; MacMillan *et al.*, 1996), den man bei der Therapie von Bluthochdruck mit Clonidin, einem α_2 -Rezeptor-Agonisten nutzt. Allerdings kommt es dabei immer zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Sedierung, da α_2 -Rezeptoren auch den Wach-Schlaf-Rhythmus beeinflussen (Scheinin *et al.*, 1998), was der Grund dafür ist, dass α_2 -Rezeptoragonisten Verwendung in der Anästhesie finden (Maze *et al.*, 2001). Die vasokonstriktive Wirkung des α_{2B} -Subtyps, die bei der hypotensiven Therapie mit α_2 -Rezeptorliganden durch einen initialen Blutdruckanstieg beobachtet werden kann, wird außerdem zur Abschwellung von Schleimhäuten in Form von Nasentropfen bei Schnupfen (McLeod *et al.*, 2001) und zur Senkung des Augeninnendrucks beim Engwinkelglaukom verwendet (Greenfield *et al.*, 1997). Hingegen scheint der Effekt des α_{2C} -Rezeptors auf den Blutdruck eher klein zu sein, doch ist dies noch nicht vollständig geklärt, da dieser Rezeptor wohl bei Kälte auch eine Vasokonstriktion bedingen kann (Chotani *et al.*, 2000). Deshalb wird er auch mit Morbus Raynaud, also schmerzhaften Gefäßspasmen der Extremitäten bei Kälte, in Verbindung gebracht (Freedman *et al.*, 1995).

Neben der Wirkung auf den Blutdruck konnte anhand von Doppel-KO-Mäusen gezeigt werden, dass das Fehlen von α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptoren das Auftreten einer Herzinsuffizienz begünstigt (Hein *et al.*, 1999). Ein Grund, weshalb hier nun der α_{2C} -Rezeptor eine so große Rolle spielt, könnte sein, dass er durch Expression in der Nebenniere den Adrenalinhaushalt regelt (Brede *et al.*, 2002).

Während innerhalb des Herz-Kreislaufsystems die einzelnen α_2 -Rezeptoren eine unter Umständen gegensätzliche Wirkung ausüben, wirken sie hinsichtlich von Schmerzen ähnlich, wenn nicht sogar synergistisch, indem sie die Schmerzüberleitung unterbinden (Fairbanks *et al.*, 1999; Fairbanks *et al.*, 2002). So vermittelt der α_{2B} -Rezeptor die analgetische Wirkung des zur Narkose eingesetzten Lachgases (Guo *et al.*, 1999).

2.6 Transgene Mäuse mit Deletionen der Gene für α_2 -adrenerge Rezeptoren

Zur Untersuchung der spezifischen Eigenschaften eines Proteins im Organismus kommen häufig transgene Tiermodelle zum Einsatz. Dabei erweisen sich die sogenannten „Knock-out“-Tiere mit einer Deletion des Gens, das für das zu untersuchende Protein kodiert, in bestimmten Fällen als hilfreicher als solche, die das

Protein überexprimieren. Die Generierung von „Knock-Outs“ (KO) erreicht man durch Einschleusung eines Vektors in embryonale Stammzellen (ES-Zellen). Dieser Vektor enthält neben Selektionsmarkern das gewünschte Gen, das insoweit verändert wurde, dass fremde Sequenzen eingeführt wurden, die vorzeitige Stop-Codons enthalten. In der ES-Zelle wird das veränderte Gen durch homologe Rekombination anstelle der intakten endogenen DNS-Sequenz in das Genom integriert und führt damit zu einer Gendeletion, dem „Knock-out“ (Zimmer, 1992). Durch Injektion werden die genetisch veränderten ES-Zellen in Blastozysten von Spendertieren eingebracht bzw. mit Embryonen im Achtzellstadium der Morula aggregiert, wo die ES-Zellen aufgrund ihrer Omnipotenz hinsichtlich der Differenzierung spontan in die normale Entwicklung integriert werden. Die auf diese Weise veränderten Embryos werden in scheinträchtige Ammen transplantiert und von diesen ausgetragen. Die neugeborenen Mäuse stellen chimäre Tiere dar, die, wenn genetisch veränderte ES-Zellen auch zur Ausbildung der Fortpflanzungsorgane beigetragen haben, ihre neue Erbinformation entsprechend der Mendelschen Gesetze auf nachfolgende Generationen übertragen können. Man spricht dann von Keimbahntransmission.

Mit den bislang bekannten 3 α_2 -Rezeptoren ergibt sich die Möglichkeit von 7 unterschiedlichen KO-Mäusen: 3 Einzel-KOs (Altman *et al.*, 1999; Link *et al.*, 1995), 3 Doppel-KOs und ein dreifacher KO. Bisher gibt es alle 3 Mauslinien, denen je ein α_2 -Rezeptor fehlt, und die Kombination aus fehlendem α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptor (Hein *et al.*, 1999). Außerdem wurde eine Mauslinie generiert, deren α_{2A} -Rezeptor eine Punktmutation trägt (D79N), die zu einem funktionellen „Knock-out“ führt, obwohl die Maus sehr wohl noch das Protein an sich besitzt (Lakhlani *et al.*, 1997). Mit diesen KO-Modellen wurden den α_2 -Rezeptorsubtypen zum ersten Mal eindeutig spezifische Funktionen zugewiesen: Die α_{2A} -vermittelte Hypotension, der α_{2B} -verstärkte Lachgaseffekt während der Narkose oder der Einfluß des α_{2C} -Rezeptors auf Verhaltensmuster (Sallinen *et al.*, 1999) wurden erstmalig mit diesen Einzel-KO-Mäusen gefunden und bewiesen. Der Doppel-KO erbrachte den Beweis, dass sowohl α_{2A} - als auch α_{2C} -Rezeptor die Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt hemmen. Diese Mäuse entwickeln innerhalb weniger Monate durch anhaltend erhöhte Plasmanoradrenalin Spiegel eine Herzinsuffizienz. Neben der Regulation des freien Noradrenalins modulieren α_{2C} -Rezeptoren, anhand von eben diesen KO-Mäusen gezeigt, auch die Exocytose von Adrenalin aus der Nebenniere.

3 Die embryonale Entwicklung der Maus

3.1 Von der Eizelle bis zur Geburt

Mit der Befruchtung der Eizelle beginnt die embryonale Entwicklung der Maus; anders als beim Menschen werden nicht nur ein oder zwei Eizellen befruchtet, sondern je nach Mäusestamm 6 bis 12. Nach 24 Stunden befindet sich der Mausembryo im Zweizellstadium, umgeben von der Zona pellucida, einer Glykoproteinhülle. Über das Vier- bis Achtzellstadium der Morula entwickelt sich nach weiteren 48 Stunden eine Blastozyste, von der die Zona pellucida am nächsten Tag abgestreift wird, so dass die Einnistung erfolgen kann. An den Tagen fünf und sechs der Embryonalentwicklung

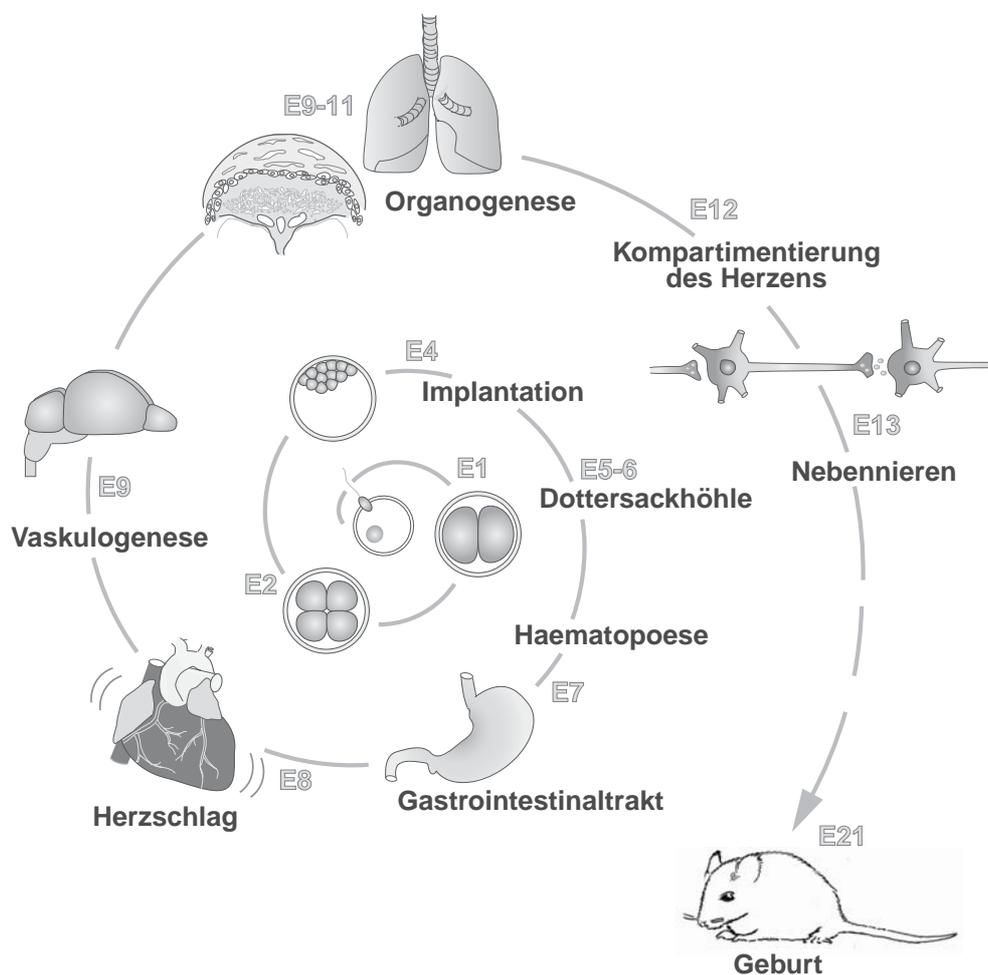


Abb. 6: Schematischer Überblick über die 21 Tage dauernde Embryonalentwicklung der Maus

(E5, E6) formt sich eine Dottersackhöhle und der Trophoblast lässt sich in Cyto- und Syncytiotrophoblast unterteilen. Um den Tag E7 herum werden die Anlagen für Neural-

rohr, Eingeweide und Herz ausgebildet. Der Dottersack enthält zu diesem Zeitpunkt bereits Blutinseln, die das erste embryonale Blut produzieren, das am darauffolgenden Tag durch das zu schlagen beginnende Herz in die ersten Blutgefäßen des Dottersacks fließen kann. Zu diesem Zeitpunkt bilden sich auch die Anfänge des Gehirns und ein Gefäßsystem im Embryo heraus und das Neuralrohr fängt an, sich zu schließen. Am 9. Tag der Entwicklung sind die ersten Komponenten des Nervensystems fertig, die Dorsalganglien. Jetzt beginnt auch die Entwicklung einer Plazenta. Der 10 Tage alte Embryo besitzt bereits Lungenanlagen und ein funktionsfähiges sympathisches Nervensystem. Erst einen Tag später aber bildet sich der Parasympathikus heraus und das Herz, das nun in vier Kammern unterteilt vorliegt, ist mit einem ausgereiften Gefäßsystem verbunden. Bis zum Tag E21, wenn die fertige Maus geboren wird, entwickeln sich neben den äußeren Merkmalen wie Lippen, Finger auch Muskulatur und Geschlechtsorgane, wobei die Geschwindigkeit, mit der der Embryo wächst, stark reduziert wird und das Augenmerk vermehrt auf Ausdifferenzierung und Vervollständigung des jungen Organismus liegt (Theiler, 1989).

3.2 Die extraembryonalen Organe

3.2.1 Funktion

Ab dem 10. Embryonaltag existieren für den Embryo zwei Blutkreisläufe: Einer, der vom Embryo über die Arteria vitellina zum Dottersack führt und einer, der durch Verknüpfung mit der Nabelschnur die Plazenta durchfließt. Diese beiden Zirkulationen stellen den Garant für die optimale Versorgung des Embryos mit Gasen und Nährstoffen und andererseits auch die Ausscheidung dar.

3.2.2 Der Dottersack

Wenn der proteolytische Abbau von mütterlichem Gewebe, in das der Embryo hineinwächst, nicht mehr ausreicht, um den Embryo zu ernähren, setzt eine Beschleunigung der Dottersackentwicklung ein. Diese findet bei der Maus um den Tag E6,5 statt. Der Dottersack besteht schließlich aus einem dem Embryo zu-gewandten viszeralem und einem parietalem Endoderm, das zum mütterlichen Gewebe hin an die Reichertsche Membran grenzt. Direkt an diese sind teilweise Trophoblastzellen angeordnet, die direkten Kontakt zu mütterlichem Gewebe und Blut haben. Im Dottersack startet auch die Blutgefäßbildung des Embryo und zwar zu einem Zeitpunkt, zu dem die Plazenta noch nicht vorhanden ist. Hierbei entstehen aus anfänglichen

Blutinseln, die Hämangioblasten enthalten, die Vorstufen für die primitiven Erythrozyten und die Endothelzellen. Es setzt eine Wanderung der Endothelzellen ein, die Gefäße etablieren (Boucher *et al.*, 1996). Erst viel später übernimmt die Leber des Embryos die vom Dottersack unabhängige Blutbildung, bevor in der neonatalen Phase das Knochenmark für die Erythropoese zuständig wird.

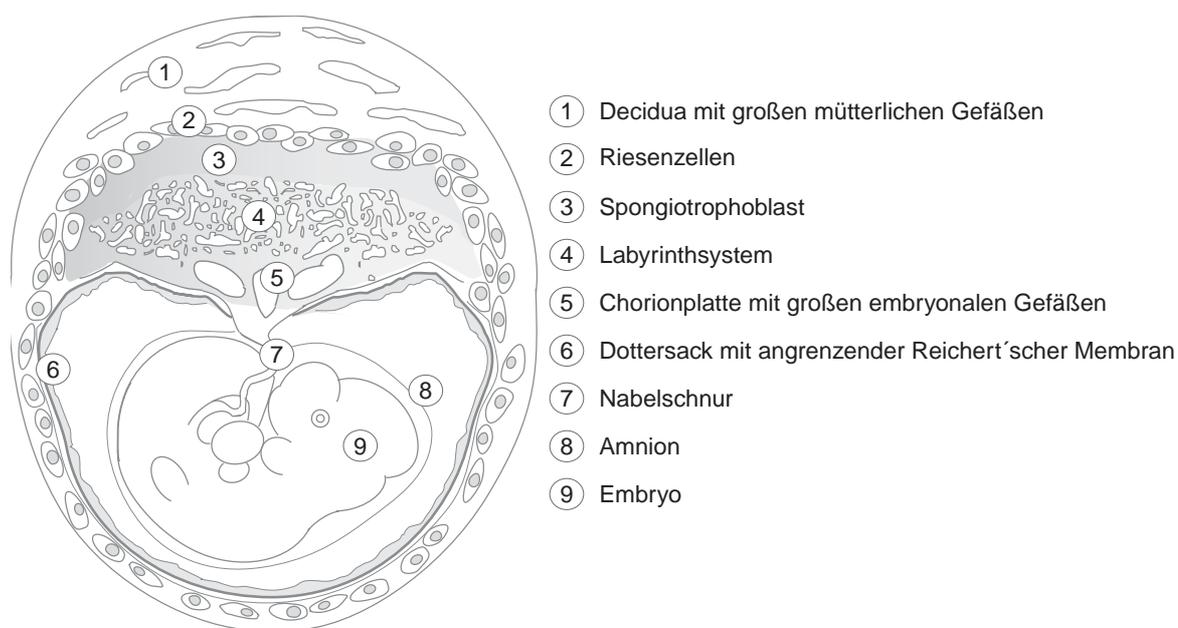


Abb. 7: Schema der murinen Plazenta, die sich aus einem mütterlichen Teil (1) und einem embryonalen Teil (2-7) zusammensetzt, mit Dottersackhöhle und darin befindlichem Embryo an Tag 10,5.

3.2.3 Die Plazenta

Bis zum Tag E14 wächst der Dottersack weiter, doch bereits ab Tag E9 bis Tag E10 wird seine Aufgabe, den Embryo zu versorgen, sukzessive von der Plazenta übernommen und er beginnt, wenn diese vollständig ausgebildet ist, zu degenerieren. Die Plazenta, die sich grob in einen mütterlichen und einen embryonalen Teil gliedern lässt, entsteht durch eine Fusion von Allantois und Chorionplatte, wodurch die Ausdifferenzierung von Trophoblaststammzellen angestoßen wird. Diese sind der Ausgangspunkt für den embryonalen Teil der Plazenta, der bei der Maus aus einer Chorionplatte besteht, in die die Nabelschnur mündet, einem Labyrinthsystem, dem darüber liegenden Spongiotrophoblasten und den sogenannten Riesenzellen, welche für die Verankerung im Myometrium der Mutter verantwortlich sind (Rinkenberger *et al.*, 2000). Das komplex aufgebaute Labyrinth besteht aus Syncytiotrophoblastzellen,

die wie Äste in den mütterlichen Teil, die Decidua wachsen. Diese Äste, in denen die embryonalen Gefäße liegen, werden vom mütterlichen Blut umspült, aus dem Nährstoffe und Gase in das embryonale Blut diffundieren. Damit das mütterliche Blut im Labyrinth mit geringerem Druck fließt, wandern invasive Riesenzellen in die mütterlichen Blutgefäße im Bereich des Spongiotrophoblasten, der zusammen mit den Syncytiotrophoblasten die Plazentaschranke darstellt, ein und verdrängen an dieser Stelle die Endothelzellen. Neben dieser invasiven Funktion agieren die polyploiden Riesenzellen als unermüdliche Fabriken für Wachstumsfaktoren, Proteasen und Proteinaseinhibitoren, die sie sowohl in den embryonalen als auch in den mütterlichen Plazentateil sezernieren. Damit stellen sie als zentrale Schaltstelle die optimale Differenzierung der Plazenta sicher. Aber auch in der Decidua, durch die große mütterliche Blutgefäße fließen, werden viele adjuvante Faktoren produziert, die die Plazentaentwicklung beeinflussen (Duc-Goiran *et al.*, 1999). Die weitreichende Bedeutung der Plazenta wird klar, wenn man bedenkt, dass Fehler in der Etablierung einer voll funktionsfähigen Plazenta immer in Fruchttod und Resorption des Embryo resultieren (Cross, 2001).

3.3 Das adrenerge System während der Embryonalentwicklung

Neben den wichtigen Aufgaben im adulten Organismus spielt das adrenerge System auch während der Embryonalphase eine bedeutende Rolle. Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), die relevanten Enzyme zur Noradrenalin synthese, können in der Maus ab E8,5 detektiert werden. Die Relevanz dieser Enzyme und damit auch die des Noradrenalins wird durch die embryonale Letalität von KO-Mäusen für TH und DBH verdeutlicht, die zwischen E11,5 und E17,5 an einer Herzschwäche sterben (Thomas *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995). Ebenso versterben Mäuse mit einer Deletion für GATA3, einem Transkriptionsfaktor innerhalb des sympathischen Nervensystems, intrauterin bedingt durch eine Noradrenalinverarmung (Lim *et al.*, 2000). Adrenalin hingegen wird erst einige Zeit später gebildet (E13,5), wenn die Nebennieren angelegt sind. Vorher besitzt der Embryo nur sehr geringe Mengen an Adrenalin, die über einen aktiven Transport aus dem mütterlichen Blut in den embryonalen Kreislauf gelangen. Adrenerge Rezeptoren werden kurz nach dem ersten Auftreten von TH und DBH exprimiert. So sind β -Rezeptoren bereits an Tag E9,5 aktiv und üben einen Einfluß auf das noch unkompartimentierte Herz aus (Liu *et al.*, 1999). Mäuse, denen β_1 -Rezeptoren fehlen, sterben zum Teil aufgrund eines unzureichend ausgebildeten Herzens (Rohrer *et al.*, 1996). Zum gleichen Zeitpunkt wie die β -Rezeptoren kann auch der α_{2A} -Rezeptor gefunden werden, der weit über den Embryo verteilt ist, aber hauptsächlich im bisher bestehenden zentralen Nervensystem lokalisiert

ist (Wang *et al.*, 1997). Dem gegenüber steht der α_{2B} -Rezeptor, der in einem kurzen Zeitfenster (E11,5 bis E14,5) praktisch nur in der Leber zu finden ist, die ab diesem Zeitpunkt sukzessive die Erythropoese übernimmt (Wang *et al.*, 1997). In embryonalen Ratten konnte dieser Rezeptor auch zu späteren Stadien der Embryonalentwicklung gefunden werden, erneut in der Leber, aber auch im Nervensystem und in der Plazenta, wobei seine Lokalisation möglicherweise auf die Expression in hämatopoetischen Zellen zurückgeführt werden kann (Cussac *et al.*, 2001; Legrand *et al.*, 1993). Die humane Plazenta stimmt hiermit überein, auch in ihr konnten α_2 -Rezeptoren (α_{2A} und α_{2B}) detektiert werden (Falkay *et al.*, 1994), wobei die größte Rezeptordichte wohl am Ende des ersten Trimenons liegt und danach sukzessive abnimmt, während β -Rezeptoren zum Ende der Schwangerschaft hin in der Plazenta zunehmen (Falkay *et al.*, 1994). Als letzter der drei α_2 -Rezeptoren wird der α_{2C} -Rezeptor im murinen Embryo gebildet (ab E14,5). Er konnte hauptsächlich im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1997).

4 Ziele dieser Arbeit

Bis zum heutigen Tag sind noch lange nicht alle Funktionen des adrenergen Systems an sich und der α_2 -Rezeptoren im Speziellen aufgeklärt worden. In Anbetracht der Tatsache, dass Mäuse, die selbst kein Noradrenalin mehr zu bilden vermögen, intrauterin versterben, erschien es plausibel, dass auch α_2 -Rezeptoren eine maßgebliche Rolle während der Entwicklung spielen könnten. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache untermauert, dass α_{2B} -KO-Mäuse nicht entsprechend einer Mendelschen Verteilung geboren werden, wenn man heterozygote Elterntiere verpaart (Link *et al.*, 1996). Daher wurden Vermutungen geäußert, dass hier eine partielle embryonale Letalität vorliegt (Cussac *et al.*, 2001). Deshalb sollten die bisher noch nicht existierenden α_2 -KO-Mäuse, denen mehrere α_2 -Gene fehlen, generiert werden und vor allem während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Das Augenmerk bei der Charakterisierung sollte hierbei auf den Mäusen mit einer Deletion für alle drei α_2 -Rezeptoren liegen. Im weiteren bestand die Aufgabe, die Signaltransduktion von α_2 -Rezeptoren während dieser Phase der Entwicklung, vor allem im Hinblick auf die MAP-Kinasen, zu untersuchen.

III. Methoden

1 Kreuzung und Genotypisierung von α_2 -KO-Mäusen

1.1 Maushaltung

Die Mäuse wurden in einer SPF-Anlage entsprechend den Tierschutzbestimmungen in Käfigen mit bis zu 5 Tieren und einem Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Helligkeit gehalten.

1.2 Generierung von α_{2AB} -KO- und α_{2BC} -KO-Mäusen

Um α_2 -Doppel-KO-Mäuse zu erhalten, wurden die entsprechenden Einzel-KO-Mäuse miteinander verpaart. Die so erhaltenen doppelt heterozygoten Mäuse wurden miteinander verpaart, so dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 6,25 % doppelt homozygote α_{2AB} -KO-Mäuse bzw. α_{2BC} -KO-Mäuse geboren werden sollten.

1.3 Generierung von α_{2ABC} -KO-Mäusen

α_{2AC} -KO-Mäuse wurden mit α_{2B} -KO-Mäusen gekreuzt, um über die Zwischenstufe von dreifach heterozygoten Tieren solche zu erhalten, bei denen bis auf eine Kopie des α_{2B} -Rezeptors alle Gene für α_2 -Rezeptoren deletiert waren. Diese Mäuse ($\alpha_{2A/-} B+/- C-/-$) wurden miteinander verpaart, so dass nach Mendel zu 25 % Mäuse geboren werden sollten, denen alle drei α_2 -Rezeptoren fehlten.

1.4 Präparation genomischer DNS

Gewebebiopsien der transgenen Mäuse wurden in 200 μ l Chelexpuffer mit dem Zusatz von 3,75 μ l Proteinase K-Lösung 20 mg/ml mindestens drei Stunden bei 55 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde das Chelex-Harz bei 100 °C angeschmolzen. Die DNS

befand sich nach erneutem 3minütigen Zentrifugieren im Überstand und konnte ohne weitere Behandlung zur PCR-Analyse verwendet werden.

Chelex-Puffer: 0,1 M NaCl
0,5 % Natriumlauroylsarcosin
5 % Chelex®-100
in Wasser

1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Mäuse aus den diversen Verpaarungen wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion nach Saiki (Saiki *et al.*, 1988) benutzt, die es ermöglicht, spezifische Abschnitte eines Gens in so großen Mengen zu amplifizieren, dass diese Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden können.

	Primer	T _m	Fragment
α_{2A} -WT	5'-GGTGACACTGACGCTGGTTT 5'-AAGGAGATGACAGCCGAGAT	56 °C	410 bp
α_{2A} -KO	5'-GGTGACACTGACGCTGGTTT 5'-CGAGATCCACTAGTTCTAGC	56 °C	260 bp
α_{2B} -WT	5'-CTCTTCTGTACCTCCTCCAT 5'-CATAGATTCGCAGGTAGACG	55 °C	320 bp
α_{2B} -KO	5'-TGGATGTGGAATGTGTGCGA 5'-CATAGATTCGCAGGTAGACG	55 °C	212 bp
α_{2C} -WT	5'-CATCTTGTCCTCCTGCATAG 5'-TCTCATCCGGCTCCACTTCA	57 °C	230 bp
α_{2C} -KO	5'-GGGAAGACAATAGCAGGCAT 5'-TCTCATCCGGCTCCACTTCA	57 °C	250 bp

PCR-Ansatz: 1 μ l genomische DNS aus Chelex-Abbau
0,5 μ M Vorwärtsprimer
0,5 μ M Rückwärtsprimer
200 μ M dNTP
1x Taq-Puffer
1 U Taq-Polymerase

Für gewöhnlich wurden nach 2 min Denaturierung der DNS bei 94 °C 30 Zyklen (bestehend aus 15 s 94 °C, 20 s bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur T_m und 25 s 72 °C) durchgeführt, an die sich 7 min 72 °C anschlossen, damit gewährleistet war, dass alle angefangenen Fragmente zu Ende synthetisiert wurden. Verwendet wurden hierfür Thermocycler der Firma Applied Biosystems. Nach Ende der PCR wurde der Reaktionsansatz mit 10 % Ladepuffer versetzt und in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

1.6 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNS, die per PCR erhalten wurde, dienten je nach Größe der DNS-Fragmente 1 bzw. 2 %ige Agarosegele, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Damit ein Absinken in die Geltaschen gewährleistet war, wurde der DNS-Lösung zur Erhöhung der Dichte 10 % eines mit Glycerin versetzten Ladepuffers zugegeben. Als Größenstandard wurden 0,3 µg des 100 bp-Markers der Firma New England Biolabs verwendet. Die Auftrennung per Elektrophorese erfolgte bei Spannungen von 8 bis 12 V/cm Trennstrecke in 1x TAE-Laufpuffer und wurde durch UV-Licht (265 nm) sichtbar gemacht.

50x TAE-Puffer: 10 mM EDTA
 50 mM (CH₃COO)Na
 400 mM Tris-HCl pH 8

Ladepuffer: 0,25 % (M/V) Bromphenolblau
 50 % (V/V) Glycerin
 50 % (V/V) H₂O

2 Histologische Untersuchungen

2.1 Herstellung von Kunstharzschnitten

2.1.1 Perfusionsfixierung von narkotisierten Mäusen

Um Gewebe für eine nachfolgende Einbettung in Kunstharz optimal zu fixieren, wurden Mäuse perfundiert. Kontrolliert verpaarte Mäuse wurden mit Tribromethanol narkotisiert (15 µl/g Körpergewicht einer 2,5 %igen Lösung in *tert*-Isoamylalkohol) und auf Styropor in einer Wanne aufgespannt. Nach dem Öffnen des Brustkorbs wurde eine Kanüle in

die linke Herzkammer eingeführt, der rechte Vorhof mit einer kleinen Schere aufgeschnitten und durch eine Kanüle mit konstantem Druck die frisch angesetzte Perfusionslösung eingeleitet. Die Perfusion galt als beendet, wenn die Leber deutlich bleich geworden war. Anschließend wurden die Embryonen entnommen und über Nacht bei 4 °C in 4% Paraformaldehyd nachfixiert und danach bei 4 °C in PBS bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Perfusionslösung: 2 % Paraformaldehyd
 0,2 % Glutaraldehyd
 in PBS

2.1.2 Epon-Einbettung von Geweben mit Durcupan® ACM (Fluka)

Perfusionsfixiertes Gewebe wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 min 50 %, 70 %, 90 % und zweimal EtOH abs.) dehydratisiert und für 10 min in eine Mischung aus zwei Teilen EtOH abs. und einem Teil M1 eingelegt. Nach 10 min Inkubation in einem Teil EtOH abs. und zwei Teilen M1 folgten zweimal 15 min M1 bei 50 °C. Schließlich wurde in M2 umgebettet und nach 30 min bei 50 °C erfolgte die Polymerisation über einen Zeitraum von 48 h hinweg bei 70 °C.

M1, M2: Herstellung nach Anweisung des Herstellers

2.1.3 Anfertigung der Kunstharzschnitte

In Epon eingebettetes Gewebe wurde mit einem Rotationsmicrotom (Leica RM2165) in 1 µm dicke Schnitte geschnitten, die mit Toluidinblau (1 %ige Lösung, mit 1 % Borax gepuffert) angefärbt und anschließend mit dem Roti-Histo-Kitt® eingedeckt wurden. Die Schnitte wurden freundlicherweise von Kerstin Hadamek (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) angefertigt.

2.2 Ermittlung von Plazentaparametern

Zur Quantifizierung der strukturellen Eigenschaften der Plazenta wurde mit einer mit einem Mikroskop (Zeiss Axiovert 135) verbundenen Digitalkamera (Spot Insight Color, Diagnostics Instruments, Inc.) von Wildtyp-, α_{2AC} - und α_{2ABC} -KO-Plazentaschnitten (Epon-Einbettung) (E10,5) jeweils das Labyrinth fotografiert. Auf die digitalen Bilder

wurde in Adobe Photoshop ein Raster gelegt und ausgezählt, welcher Strukturtyp unter den Rasterschnittpunkten lag; dies wurde auf die ganze Labyrinthfläche bezogen. Außerdem wurden die Grenzen der embryonalen und mütterlichen Gefäße markiert und über die Anzahl der so erzeugten Pixel der Anteil an der Gesamtlabyrinthfläche ermittelt.

2.3 Herstellung von Paraffinschnitten

2.3.1 Paraffineinbettung von Gewebe

Unmittelbar nach der Präparation wurde das Gewebe über Nacht in 4% Paraformaldehydlösung bei 4 °C fixiert. Anschließend erfolgten 2 15minütige Waschgänge mit PBS und einer mit 0,9% NaCl. In einer ansteigenden Isopropanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 %, zweimal 100 %) wurde das Gewebe dehydratisiert, um dann über eine Isopropanol-Chloroform-Zwischenstufe (1:1) in Chloroform überführt zu werden. Für die Einbettung wurde das Gewebe so lange bei 60 °C in offenen Gefäßen, die mit Chloroform-Paraffin gefüllt waren, inkubiert, bis das Chloroform komplett verdampft war. Nach dreimaligem Wechsel des flüssigen Paraffinwachses wurde das Gewebe in Blöcke eingebettet, die bei 4 °C gelagert wurden.

2.3.2 Anfertigung der Paraffinschnitte

Mit einem Microtom (Leica RM2165) wurden 4 bis 8 µm dicke Schnitte aus Paraffinblöcken geschnitten, die in einem 37 °C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf Polylysin-beschichtete Objektträger wurden die Schnitte bei 42 °C getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.3.3 HE-Färbung von Paraffinschnitten

Die Schnitte wurden mit CHCl_3 entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydratisiert. Danach wurden die Schnitte 10 min in 0,5 % Hämatoxylin inkubiert, mit Leitungswasser gespült, 5 min mit 0,1 % Phloxin gefärbt und erneut mit Leitungswasser gespült. Aufgrund der Wasserlöslichkeit des Phloxins wurden die Schnitte vor dem Eindecken in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder dehydratisiert und mit Xylol nachgewaschen.

2.3.4 Sirius Rot-Färbung von Paraffinschnitten

Die entparaffinisierten Schnitte wurden nach ihrer Rehydratisierung 30 min in Sirius Rot-Lösung gefärbt, kurz in Wasser gewaschen und anschließend mit Weigert'scher Lösung gegengefärbt. Daraufhin erfolgte fünfmaliges Waschen mit EtOH abs., kurzes Benetzen mit Xylol und danach das Eindecken mit dem Roti-Histo-Kitt®.

Sirius Rot-Lösung: 0,1 % Sirius Rot F3B in gesättigter Pikrinsäurelösung

Weigert'sche Lösung: 1 Teil 1 %ige Hämatoxylin-Lösung in EtOH abs.
1 Teil 60 mM FeCl₃-Lösung in 0,1 % HCl

2.4 Herstellung von Kryostatschnitten

2.4.1 Herstellung von Kryostatschnitten ohne Vorfixierung

Frisch präpariertes Gewebe wurde direkt in Aluminiumschälchen mit Tissue-Tek® überschichtet und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die fertigen Blöcke wurden bei -80 °C gelagert. An einem Kryostatschneidetisch (Leica CM3050S) wurden im folgenden 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger überführt. Nach kurzem Trocknen waren die Schnitte bereit für nachfolgende Inkubationsschritte. Die Kryostatschnitte wurden ebenfalls von Kerstin Hadamek angefertigt.

2.4.2 Herstellung von Kryostatschnitten mit Vorfixierung

In 4 % Paraformaldehyd fixiertes Gewebe wurde zweimal 15 min mit PBS gewaschen und wurde danach bei 4 °C in zwei mehrstündigen Schritten mit Saccharose gesättigt (10 % und 20 % Saccharose in PBS). Hinterher wurde die gleiche Prozedur wie bei unfixiertem Gewebe angewendet (s.o.).

3 Physiologie von α_{2ABC} -KO-Embryonen

3.1 Entnahme von Embryonen

6 bis 9 Wochen alte Weibchen wurden mit Männchen über Nacht verpaart und am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf kontrolliert. War ein Pfropf vorhanden, so

galt dieser Tag – unter der Annahme, dass die Befruchtung um Mitternacht stattgefunden hatte – als Tag E0,5 der Embryonalentwicklung. 9 bzw. 10 Tage später wurde die trächtige Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen, die zu diesem Zeitpunkt etwa 2 (Tag E9,5) bis 5 mm (Tag E10,5) groß sind, aus dem Uterus herauspräpariert. Auf einer Wärmeplatte wurden schließlich die Embryonen von umgebendem extraembryonalen Geweben getrennt. Der Genotyp wurde jeweils unter Verwendung eines kleinen Dottersackstücks ermittelt. Für die nachfolgenden Experimente wie Western Blot-Analyse oder Catecholaminbestimmung wurde das Embryonalgewebe sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2 Photographie von Embryonen

Die Photos wurden mit einer Kamera der Firma Minolta (Typ X-300s), die über einen Adapter mit einer Stereolupe (Leica MZ6) verbunden wurde, mit Belichtungsautomatik aufgenommen. Die Embryonen wurden zur besseren Kontrastierung in vorgewärmtes PBS überführt.

3.3 Messung der Herzfrequenz von Mausembryonen

Während des Präparierens der Embryonen wurde gezählt, wie oft das Herz innerhalb von 30 s schlug. Dafür lagen die Embryonen in einer Petrischale mit Hepes-gepuffertem DMEM-Medium, die auf einer Wärmeplatte von 41°C stand.

3.4 Catecholaminbestimmung in Embryonen

Die Bestimmung der Catecholaminspiegel geschah mit Unterstützung von Carsten Arnolt und Marianne Babl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Graefe (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg).

Gefrorene Embryonen (E10,5) wurden auf einer Feinwaage gewogen und anschließend in 1 ml $0,4\text{M HClO}_4$ und $100\ \mu\text{l}$ $2,2\text{mM DHBA}$ als internem Standard mit einem Stabhomogenisator zerkleinert. Danach wurden die Catecholamine über Nacht bei 4°C extrahiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde 1 ml des Überstandes mit $500\ \mu\text{l}$ Stabilisatormix, $350\ \mu\text{l}$ $2\text{M Tris pH } 10$ und $20\ \text{mg Aluminiumoxidkügelchen}$ versetzt und 5 min über Kopf geschüttelt, so daß die Catecholamine an das Aluminiumoxid banden. Die Kügelchen wurden abfiltriert und zweimal mit Wasser gewaschen. Am Schluß wurden die so aufgereinigten Catecholamine in zwei $100\ \mu\text{l}$ Schritten mit $0,1\text{M}$

HClO₄ von den Kügelchen eluiert und über einen automatisierten Injektor (WISP 717, Waters) in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Detektion nach Passage der Reversed Phase-Säule erfolgte elektrochemisch. Mittels eines Millennium 2010 Chromatograph-Managers (Waters) wurden die Messungen ausgewertet und im Nachhinein auf die Embryomasse bezogen.

Stabilisatormix: 27 mM EDTA
 50 mM Na₂SO₃

4 Lokalisation von α_2 -Rezeptoren während der Embryonalentwicklung

4.1 Nachweis der α_2 -Rezeptoren per RT-PCR

4.1.1 Präparation von Gesamt-RNS mit saurer Phenolextraktion

Alle hierbei verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt und sämtliche Arbeiten wurden unter größtmöglicher Sauberkeit durchgeführt, um Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

Das unmittelbar nach dem Präparieren in flüssigem Stickstoff eingefrorene Gewebe wurde mit einem Stabhomogenisator in 800 μ l Lysislösung zerkleinert und nacheinander mit 100 μ l 2 M (CH₃COO)Na pH 4,0, 800 μ l Phenol und 150 μ l CHCl₃/Isoamylalkohol (25:1) versetzt. Nach 15 min Eiskühlung wurde 10 min bei 14000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde mit Isopropanol im Überschuß die RNS für 30 min bei -20 °C gefällt und 10 min bei 14000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Das RNS-Pellet wurde mit 300 μ l Lysislösung resuspendiert und mit Isopropanol ein zweites Mal gefällt (30 min bei -20 °C). Das so gewonnene Pellet wurde mit 75 % EtOH gewaschen, kurz getrocknet und nachfolgend in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

DEPC-Wasser: 0,1 % (V/V) DEPC in Millipore-Wasser mehrere Stunden rühren, dann autoklavieren

Lysislösung: 20 mM *N*-Lauroylsarcosin
 25 mM Natriumcitrat
 4 M Guanidiniumthiocyanat
 0,7 % (M/V) Mercaptoethanol

4.1.2 Quantifizierung von RNS

Die Gehaltsbestimmung von RNS wurde in einer geeigneten wässrigen Verdünnung mithilfe eines UV-Photometers (Shimadzu UV-1601) bei 260 nm in Quarzküvetten vorgenommen. Einer Absorption von 1 entsprach die Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNS. Für eine ausreichende Reinheit sollte der Absorptionskoeffizient (260 nm/280 nm) größer als 1,8 sein.

4.1.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNS

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNS wurden 1,2%ige Agarosegele verwendet, denen 1,8 % Formaldehyd (V/V) und 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt waren. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die RNS mit RNS-Ladepuffer versetzt, 10 min bei 65 °C hitzedenaturiert und anschließend eisgekühlt. Die Elektrophorese selbst wurde bei einer Spannung von 7 V/cm Trennstrecke durchgeführt. Mithilfe von UV-Licht konnten die Banden für die 28s- und 18s-rRNS detektiert werden.

10x RNS-Gelpuffer:	10 mM EDTA 50 mM (CH ₃ COO)Na 200 mM MOPS pH 7,0
RNS-Laufpuffer:	1x RNS-Gelpuffer mit 0,75 % (V/V) Formaldehyd
RNS-Ladepuffer:	16 μl gesättigte Bromphenolblaulösung 80 μl 0,5 M EDTA pH 8 100 μl Wasser 720 μl Formaldehyd 37 % 2 ml Glycerol 100 % 3084 μl Formamid 4 ml 10x RNS-Gelpuffer

4.2 RT-PCR von RNS

Da die Gene für α_2 -Rezeptoren nicht über Introns verfügen, die die Möglichkeit bieten, Primer zu wählen, mithilfe derer in cDNS umgeschriebene RNS von genomischer DNS unterschieden werden kann, mußte vor Beginn der RT-PCR die präparierte RNS

von verbliebenen Restmengen an DNS befreit werden. Dafür wurde eine einstündige Inkubation mit DNaseI bei 37 °C durchgeführt und nachfolgend eine RNS-Gelelektrophorese, um sicher zu stellen, dass keine Degradierung der RNS damit verursacht wurde.

4.2.1 Reverse Transkription für den α_{2A} - und den α_{2B} -Rezeptor

1 μ g RNS wurde durch den RT-Mix erst 15 min bei 42 °C transkribiert in cDNS, diese dann 5 min bei 99 °C hitzedenaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

RT-Mix: 2,5 μ M Oligo-dTTP
 1 mM dNTP
 5 mM DTT
 1x Superscript Puffer
 2-4 U RNasin
 20 U Superscript Reverse Transkriptase

4.2.2 Reverse Transkription für den α_{2C} -Rezeptor

1 μ g RNS wurde mit dem RT-Mix 10 min bei 70 °C inkubiert, dann sofort auf Eis gestellt. Nachfolgend wurden 200 U reverse Transkriptase zugegeben und eine Stunde lang bei 42 °C transkribiert. Nach 10minütigem Denaturieren bei 95 °C wurden die Ansätze bei 0 °C zwischengelagert bis zur PCR.

RT-Mix: 2,5 μ M RT-Primer für α_{2C} (5'-TAAAGAGCGGTTCTGGCA)
 500 μ M dNTP
 5 mM DTT
 1x Superscript Puffer
 2-4 U RNasin

4.2.3 PCR der cDNS

Mit 2 μ l der durch die reverse Transkription entstandenen cDNS wurde eine Rezeptor-subtyp-spezifische PCR durchgeführt. Diese ergab für den α_{2A} -Rezeptor ein 276 bp großes Fragment und für den α_{2B} -Rezeptor eines von 466 bp, die beide in einem 2%igem Agarosegel detektiert wurden. Für den Nachweis des α_{2C} -Rezeptors wurde

die PCR mit 3 μ l des Produktes aus der reversen Transkription angesetzt (35 Zyklen). Das damit erhaltene Fragment war 551 bp lang und wurde ebenfalls mit einem 2%igen Agarosegel nachgewiesen.

	Primer	T_m	Fragment
α_{2A}	5'-CATCAGCCTTGACCGCTACTG 5'-CGCACGTAGACCAGGATCATG	58 °C	276 bp
α_{2B}	5'-TCATCCTCTTCACCATTTTCGG 5'-CTGGAAGCCAAGATGTACCAGG	60 °C	466 bp
α_{2C}	5'-TTC ACC GTG GTA GGC AAT 5'-TTT CTC GCT GAG CGT ACG	54 °C	551 bp

PCR-Mix: wie unter „Genotypisierung von α_2 -Mehrfach-KO-Mäusen“ beschrieben

PCR-Bedingungen: 2 min 94 °C
30 s 94 °C
1 min bei T_m
1 min 72 °C
7 min 72 °C

} 32-35 Zyklen

4.3 Nachweis der α_2 -Rezeptoren mittels Radioligandenbindungsstudien

4.3.1 Präparation von Membranen

Jeweils 5 bis 8 Plazenten von Tag E10,5 der Embryonalentwicklung wurden mit einem Ultraturaxhomogenisator (Janke & Kunkel) in 5 ml eines hypotonen Lysepuffers zerkleinert. Die so erhaltene Suspension wurde 10 min bei 1500xg und 4 °C zentrifugiert, um Zellkerne und größere Fragmente abzutrennen. Der Überstand, der die Zellmembranen enthält, wurde anschließend bei 145000xg bei 4 °C 30 min lang zentrifugiert. Das so erhaltene Membranpellet wurde in 1 ml Bindungspuffer resuspendiert. Nach sorgfältigem Homogenisieren mit einem Glashomogenisator erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1974).

Hypotoner Lysepuffer: 2 mM EDTA
5 mM Tris
pH 7,4

Bindungspuffer: 4 mM EGTA
 4 mM EDTA
 32 mM Hepes
 80 mM NaCl
 pH 7,6

4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur einfachen Proteinbestimmung in Suspensionen von Zellmembranen wurde die Methode nach Bradford benutzt, die auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine und demzufolge auf der meßbaren Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm basiert. Mit der aus 1 ml Bradford-Lösung plus 5 µl Suspension resultierenden Absorption wurde die Konzentration anhand einer Kalibriergerade mit BSA errechnet.

4.3.3 Bestimmung der Rezeptordichte in Plazenten

Die Dichte von α_2 -Rezeptoren in der Plazenta an Tag E10,5 der Embryonalentwicklung wurde mit 60 bis 70 µg Protein in Form der Membransuspensionen (s.o.) untersucht. Hierfür wurde mit 7 unterschiedlichen Konzentrationen des Radioliganden [³H]-RX821002 die totale Bindung des Liganden an α_2 -Rezeptoren und die unspezifische Bindung in Anwesenheit von 1 µM Atipamezol ermittelt, aus deren Differenz sich die spezifische Bindung ergab. Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

	Totale Bindung	Unspezifische Bindung
Membransuspension	50 µl	50 µl
[³ H]-RX821002	50 µl	50 µl
Atipamezol		50 µl
Bindungspuffer	100 µl	50 µl

Nach dem Zusammenmischen der einzelnen Komponenten wurden die Reaktionen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend an einem Vakuum-Millipore-Topf über GF/B-Filter abgesaugt. Die Filter wurden dreimal mit einer eisgekühlten 25 mM Glycylglycin-Lösung pH 7,5 gewaschen, in Szintillationsröhrchen überführt und mit 4 ml Szintillationslösung überschichtet. Nach 4 Stunden wurden die Proben am β -Counter (Beckman LS1801) ausgezählt.

4.4 Lokalisation der Rezeptoren in der Plazenta

4.4.1 Autoradiographie

Plazenten (E10,5) wurden direkt nach der Entnahme aus dem Uterus in Tissue Tek® eingebettet und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt, die auf Objektträger überführt wurden. Die Schnitte wurden mit [³H]-RX821002 (8 nM in Autoradiographiepuffer) benetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Darauffolgend wurden die Schnitte zweimal mit kaltem Autoradiographiepuffer gewaschen, mit Wasser gespült und luftgetrocknet. Anschließend wurde ein [³H]-Autoradiographiefilm für 8 bis 12 Wochen bei –80 °C aufgelegt und nach erfolgter Exposition entwickelt.

Autoradiographiepuffer: 1,5 mM EDTA
 50 mM Tris pH 7,5

4.4.2 RNS *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten von Plazenten zur Lokalisation von Riesenzellen und Spongiotrophoblastzellen

Zum Zwecke der Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expression von Genen wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung gewählt. Hierbei wurde eine Digoxigenin-markierte, zur zellulären RNS komplementäre, einzelstängige RNS an die gewebe-spezifische RNS der Zelle angelagert und immunhistochemisch über einen Antikörper, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt war, detektiert. Mit dieser Phosphatase wurde ein Chromogen in einen Farbstoff umgesetzt, der sich dort ablagerte, wo die markierte RNS mit der endogenen einen Doppelstrang ausgebildet hatte. Die *in situ*-Hybridisierungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. Gessler (Biozentrum, Universität Würzburg) erstellt.

4.4.2.1 Herstellung Digoxigenin-markierter RNS-Sonden durch *in vitro*-Transkription

10 µg Plasmid-DNS, die das Gen enthielt, das detektiert werden sollte, wurden am 5´-Ende der gewünschten Sequenz mit Restriktionsenzymen linearisiert. Eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Transkription war, dass hinter dem zu analysierenden Gen im Plasmid eine Bindestelle für RNS-Polymerasen (T3-, T7- oder SP6-Promotor) war, wo die Polymerase zum Abschreiben der Antisense-Sonde andocken

konnte. Vorher jedoch wurde der Restriktionsansatz mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) gereinigt und mit 1/10 Volumen 3 M (CH₃COO)Na und 2,5 Volumen EtOH abs. bei –20 °C gefällt, um das Restriktionsenzym wieder zu entfernen. Die so präzipitierte DNS wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Für die nachfolgende *in vitro*-Transkription wurden 2 bis 4 µl linearisierter Plasmid-DNS (entsprechend 1 bis 2 µg DNS) benutzt. Der Transkriptionsansatz wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach 15 min bei 37 °C mit DNase verdaut, um sämtliche DNS wieder zu entfernen. Um die dabei erhaltene RNS-Qualität zu testen, wurden 2 µl davon auf einem denaturierenden Agarosegel einer Elektrophorese überführt. Der Rest wurde mit 7 µl NH₄(CH₃COO) und 75 µl kalten EtOH abs. gefällt (30 min –80 °C). Die pelletierte RNS wurde mit 70 % EtOH gewaschen, kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 100 µl DEPC-Wasser bei 50 °C gelöst. Für die Hybridisierung im Anschluß wurde die RNS 1:10 mit Hybridisierungslösung verdünnt und bei –20 °C aufbewahrt.

Transkriptionsansatz: 14,5 µl linearisierte Plasmid-DNS
 2 µl 10x Transkriptionspuffer
 1,5 µl Digoxigenin-Labeling-Mix
 1,2 µl RNS-Polymerase
 0,8 µl RNasin

Hybridisierungslösung: 5 mM EDTA
 100 µg/ml Heparin
 100 µg/ml tRNA aus Hefe
 0,2 % (M/V) Tween 20
 0,5 % (M/V) CHAPS
 1,3 x SSC pH 5
 50 % Formamid (deionisiert)

4.4.2.2 RNS-*in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Alle Lösungen, die vor und während der Hybridisierung benutzt wurden, wurden mit höchster Sauberkeit und mit DEPC-Wasser hergestellt. Auf absolute RNase-Freiheit wurde geachtet.

Um die zelluläre RNS der markierten Sonde zugänglich zu machen, mußte zuerst das Paraffin von der Einbettung entfernt werden: Dafür wurden die Schnitte erst zweimal 10 min in CHCl₃ gewaschen und dann zweimal für 5 min in EtOH abs. In einer abstei-

genden Ethanolreihe wurden die Schnitte schrittweise wieder rehydratisiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS mußten die Schnitte durch eine 30minütige Behandlung mit 4% Paraformaldehyd neu fixiert werden. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde durch zwei Waschgänge mit PBS entfernt. Durch eine Inkubation mit Proteinase K während 10 min wurden einerseits RNS-bindende Proteine von der RNS gelöst und andererseits Zellmembranen permeabel gemacht, damit die endogene RNS in der Zelle für die markierte RNS zugänglich war. Nach 5minütigem Spülen mit PBS wurde ein erneut mit Paraformaldehyd fixiert (30 min), zweimal mit PBS, zweimal 2 min mit 2x SSC und schließlich zweimal mit Tris/Glycin-Puffer für 15 min gewaschen. Nach kurzem Abtropfen wurden die Objektträger mit den Schnitten in Heraeus-Quadriperm-Kästen gelegt und die Schnitte mit jeweils 55 µl in Hybridisierungslösung (versetzt mit 0,1% tRNS) verdünnter, denaturierter RNS-Sonde bedeckt. Die Schnitte wurden dann mit Parafilm abgedeckt und in einer feuchten Kammer über Nacht im Wasserbad bei 70 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 20 min 5x SSC bei Raumtemperatur und danach 40 min bei 60 °C mit vorgewärmtem 0,5x SSC/20% Formamid gewaschen. Letztere Waschlösung wurde erneuert und auf 37 °C abgekühlt, bevor die Schnitte 15 min lang bei 37 °C in NTE inkubiert wurden und danach 30 min bei 37 °C mit RNase A (10 µg/ml in NTE) behandelt wurden, um nicht gebundene Sonde wieder zu beseitigen. Nach einem neuerlichen Waschschrift für 15 min bei 37 °C in NTE wurden die Schnitte nochmals für 30 min bei 60 °C in 0,5x SSC/20% Formamid inkubiert und zum Schluß bei Raumtemperatur 30 min in 2x SSC. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 1% Blockreagenz in 1x MABT bedeckt und über Nacht bei 4 °C mit dem anti-Digoxigenin-Antikörper (1:5000 in der gleichen Lösung verdünnt), an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt war, inkubiert. Am dritten Tag wurden die Schnitte erst siebenmal (10 bis 20 min) in TBST gewaschen, dann zweimal 10 min in NTMT und schließlich 10 min mit NTMT, das 2 mM Levamisol enthielt. Zum Färben wurde BM-Purple-Lösung, von der die unlöslichen Partikel kurz abzentrifugiert wurden, auf die Schnitte pipettiert und für mehrere Tage unter Lichtausschluß so belassen, bis eine zufriedenstellende Färbung durch Umsetzung des BM-Purple in einen blauen Farbstoff durch die alkalische Phosphatase erreicht wurde. Wenn es länger als eine Woche dauerte, bis ein deutliches Farbprodukt erkennbar war, wurde die Färbelösung mehrmals erneuert. Die Färbung wurde durch Waschen in NTMT (zweimal 15 min) und PBS gestoppt und die Schnitte konnten mit vorgewärmter Kaisers Glyceringelatine dauerhaft eingedeckt werden.

Proteinase K: 10 µg/ml Proteinase K
 20 mM Tris
 1 mM EDTA

20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl pH 5
Tris-Glycin-Puffer:	0,1 M Tris 0,1 M Glycin
NTE:	5 mM EDTA 10 mM Tris-HCl pH 7,0 500 mM NaCl
MABT:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 1 % (V/V) Tween 20
TBST:	2,7 mM KCl 25 mM Tris-HCl pH 7,5 140 mM NaCl 0,1 % (V/V) Tween 20
NTMT:	10 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl pH 9,5 0,1 % (V/V) Tween 20
BM-Purple-Färbelösung:	10 ml BM-Purple 2 mM Levamisol 0,1 % (V/V) Tween 20

5 Signaltransduktion von α_2 -Rezeptoren in Embryonalgewebe und in Zellen

5.1 Bestimmung von cAMP in Embryonalgewebe

Gefrorenes Gewebe wurde mithilfe eines Minipistills in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zerstoßen und in 2 % (V/V) HClO₄ unter Zusatz von 100 μ M IBMX 15 min bei Raumtemperatur extrahiert. Diese Suspension wurde mit 1M KOH neutralisiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurde in einer Tischzentrifuge

bei 13000 rpm 3 min zentrifugiert. Mit dem Überstand, mit dem nachfolgend eine Proteinbestimmung mit Amidoschwarz durchgeführt wurde, wurde in geeigneten Verdünnungen die cAMP-Konzentration mit dem cAMP [¹²⁵I] Direct Biotrak Szintillation Proximity Assay[®] System von Amersham Biosciences bestimmt.

5.2 Gewinnung von Plasmid-DNS

5.2.1 Kultur von *E.coli*

E.coli-Kulturen zum Zwecke einer Vorkultur wurden in 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte angeimpft und bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler bei 200 rpm mehrere Stunden hoch gezogen. Diese Vorkultur wurde zu einer 400 ml-Maxikultur expandiert. Die Stammhaltung erfolgte mit 20 % Glycerin bei –80 °C.

LB-Medium: 0,5 % (M/V) Hefe-Extrakt
 1 % (M/V) NaCl
 1 % (M/V) Trypton

5.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

250 ml LB-Medium wurden in einem 1 l Schüttelkolben mit einer *E.coli*-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei Raumtemperatur bis zu einer optischen Dichte von 0,6 ($\lambda=600$ nm) unter Schütteln inkubiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur 10 min bei 5000xg abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml eisgekühltem TSB resuspendiert und in 100 μ l Portionen zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80 °C aufbewahrt.

TSB: 20 mM MgSO₄
 5 % (V/V) DMSO
 10 % (M/V) PEG 3000
 in LB-Medium
 pH 6,1

5.2.3 Transformation von *E. coli*

1 μ l Plasmid-DNA wurden mit 100 μ l 1x KCM-Puffer und 100 μ l kompetenter Bakterien

vermischt, die schonend auf Eis aufgetaut wurden. Auf eine 20minütige Inkubation auf Eis folgte eine 10minütige bei Raumtemperatur. Hiernach wurden 800 μl autoklaviertes LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und 50 min bei 37 °C geschüttelt. Vom Transformationsansatz wurde ein Teil auf eine Agarplatte mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert.

5x KCM-Puffer: 150 mM CaCl_2
 250 mM MgCl_2
 500 mM KCl

Agarplatten: 1,5 % (M/V) Agar in LB-Medium

5.2.4 Plasmidpräparation mithilfe von Qiagen®- Säulen

Die Extraktion der amplifizierten Plasmide erfolgte nach Anweisung des Herstellers mit Anionenaustauschersäulen (Qiagen-tip 500). Der Gehalt der dabei erhaltenen DNS wurde auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

5.2.5 Quantifizierung von DNS

Die DNS wurde entsprechend in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zur Überprüfung der Reinheit wurde der Koeffizient der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm herangezogen, der größer als 1,6 sein sollte, um störende Proteinverunreinigungen ausschließen zu können.

5.3 Kultur von eukaryontischen Zellen

Die Kultur von HEK293-Zellen erfolgte in DMEM, dem 10 % FCS_L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt wurden, bei 37 °C und 7 % CO_2 . Alle zwei Tage, bevor 80 % Konfluenz erreicht wurden, wurde eine Passagierung durchgeführt. Dies geschah durch Ablösen der adhären Zellen mit Trypsin. Die Zell-suspension wurde mit dem gleichen Volumen Medium versetzt und 3 min bei 130xg zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet erfuhr eine Resuspendierung in Medium und wurde gleichmäßig auf 3 bis 7 neue Petrischalen verteilt.

5.3.1 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Drei bis vier Stunden vor Transfektion mit der Calciumphosphatmethode nach Chen & Okayama (Chen *et al.*, 1987) wurden die Zellen einer Petrischale mit 9 cm Durchmesser auf 6-Loch-Schalen verteilt. Der Transfektionsansatz bestehend aus 6 µg DNS, 15 µl 2,5 M $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 135 µl 2x BBS und 150 µl Wasser (berechnet für ein Loch einer 6-Loch-Schale) wurde nach kräftigem Durchmischen 10 bis 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Nachdem die Zellen über Nacht bei 37 °C und 3 % CO_2 standen, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. 24 bis 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere Versuche benutzt.

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

5.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Ob und inwieweit die Transfektionsreagenzien zu einer zufriedenstellenden Transfektion führten, wurde durch Transfektion eines Plasmids ermittelt, das nach dem Promotor des Cytomegalievirus das lacZ-Gen, also die codierende Sequenz für die β -Galactosidase enthält. Dieses Enzym vermag das Chromogen X-Gal in ein blaues Produkt zu überführen, anhand dessen die Transfektionseffizienz per Lichtmikroskopie abgelesen werden kann. Dafür wurden die transfizierten Zellen mit 2 % Paraformaldehyd / 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend eine bis mehrere Stunden bei 37 °C mit der Färbelösung bestehend aus 1 g/ml X-Gal, 2 mM MgCl_2 und 5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in PBS inkubiert.

5.4 Stimulation von Zellen und Gewebe

5.4.1 HEK-Zellen

48 Stunden nach Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte ein Mediumwechsel von serumhaltigem zu einem gänzlich serumfreien Medium, in dem die Zellen 12 Stunden später mit dem α_2 -Agonisten Brimonidin (UK14304) (1 µM), 30 ng/ml PDGF-BB oder 10 % FCS für 5 bis 60 min stimuliert wurden. Anschließend wurde das Medium ab-

gesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

5.4.2 Dottersäcke

Die an Tag E10,5 aus dem Uterus entnommenen Maudottersäcke wurden in RPMI 1640-Medium, das kein FCS enthielt, überführt. Das Medium wurde dreimal im 5-Minuten-Abstand erneuert, um Reste an endogenen Wachstumsfaktoren und Catecholaminen herauszuspülen. Nach 24 Stunden Kultur bei 5 % CO₂ und 37 °C wurden die Dottersäcke für 10 min mit 1 µM UK14304, 30 ng/ml PDGF-BB oder 10 % FCS stimuliert und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Lysatherstellung wurden sie bei -80 °C gelagert.

5.4.3 Plazenten

Verwendet wurden in Viertel geschnittene Plazenten (E10,5), nachdem sie durch Perfusion mit 0,9 % (M/V) NaCl von mütterlichem Blut befreit wurden. Diese Plazentastücke wurden mehrmals mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen und in solchem anschließend 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 30minütiger Stimulation mit 1 µM UK14304 wurden die Plazentastücke in Tissue[®]-Tek eingebettet.

5.5 Nachweis von ERK1/2 in Plazentaschnitten

5.5.1 Perfusion von kontrolliert verpaarten Mäusen mit 0,9 % NaCl

Um möglichst viel von den endogenen Catecholaminen und Wachstumsfaktoren, die mit dem Blut der trächtigen Maus die Plazenta durchströmen, zu entfernen, wurden schwangere Mäuse, wie vorher für die Perfusionsfixierung beschrieben, mit isotonischer Kochsalzlösung perfundiert.

5.5.2 Immunhistochemie

Kryostatschnitte von Mäusen, die mit 0,9 %iger NaCl perfundiert wurden, wurden 10 min mit 4 % (M/V) Paraformaldehyd auf Eis fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 5 min mit 0,3 % (V/V) H₂O₂ behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Stellen mit der Blocklösung benetzt und in einer

feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Dann wurde die Blocklösung durch den ersten Antikörper (Kaninchen-anti-ERK bzw. Kaninchen-anti-phosphoERK, jeweils 1:50 verdünnt in Blocklösung) ersetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert, woran sich dreimaliges Waschen mit PBS schloß. Nach zweistündiger Behandlung mit einem Biotin-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG wurde wieder zweimal mit PBS inkubiert. Darauf folgte für zwei Stunden eine Inkubation mit einem ABC-Komplex und erneutes Waschen mit PBS. Zur Sichtbarmachung des Antigen-Antikörperkomplexes wurde eine DAB-H₂O₂-Lösung (aus Tabletten von Sigma) auf die Schnitte aufgetropft, die spezifisch dort färbt, wo der erste Antikörper gebunden ist. Nach 5 min (ERK-Färbung) bzw. 10 min (phospho-ERK-Färbung) wurde der Färbeprozess durch Waschen mit PBS gestoppt und die Schnitte wurden mit Giemsa gegengefärbt.

Blocklösung, Biotin-gekoppelter Zweitantikörper und ABC-Komplex waren dem Vectastain® Elite Kit (Vectorlabs) entnommen.

5.6 Western Blot Analyse von Zell- und Gewebelysaten

5.6.1 Herstellung von Zell- und Gewebelysaten zur Western Blot Analyse

Um Zellen nach Transfektion bzw. Gewebe weitergehend proteinchemisch untersuchen zu können, mußten Lysate hergestellt werden. Hierfür wurden Zellen schlicht mit unten aufgeführtem Lysepuffer 5 min geschüttelt, während noch gefrorenes Gewebe mit einem Glashomogenisator zu einer Suspension verarbeitet wurde. Das nun aufgrund von Nukleinsäuren zähflüssige Lysat erfuhr eine 5minütige Behandlung mit Benzonase, die jede Art von Nukleinsäuren komplett degradiert, so dass leichtes Pipettieren möglich wurde. Nach Zusatz von 10 % Agarosegelladepuffer folgte zuerst 10 Minuten Inkubation bei 60 °C und danach eine kurze Eiskühlung. Nun war das Lysat bereit zur Weiterverarbeitung in einer Western Blot-Analyse.

	Lysepuffer	Benzonase	Lademenge auf SDS-Gel
HEK-Zellen*	200 µl	150 U	25 µl Lysat
Dottersack	300 µl	175 U	0,8-1,5 µg Protein
Plazenta	300 µl	150 U	1,5-4,5 µg Protein

*bezogen auf 1 Loch einer 6-Loch-Schale

Lysepuffer:	1 μ M Benzamidin-HCl
	10 μ M PMSF
	100 μ M Na_3VO_4
	5 mM $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$
	50 mM NaF
	50 mM Tris-HCl pH 6,7
	2% (M/V) SDS
	2% (M/V) Mercaptoethanol
	10 μ g/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen

5.6.2 Quantifizierung von Proteinen mit Amidoschwarz

Um den Proteingehalt der Lysate für die Western Blot Analyse, also von bereits gefärbten Lösungen zu ermitteln, wurde die Amidoschwarz-Methode gewählt, die zudem noch sensitiver als die Coomassie Blau-Methode ist. Dafür wurden je 10 μ l des Lysates auf 1 cm breite Abschnitte einer Celluloseacetatmembran aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde diese Membran in Amidoschwarzlösung 5 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Entfärbelösung entfernt, die mehrmals erneuert wurde. Nach dem Trocknen wurde die Membran in die bereits erwähnten 1 cm breiten Stücke geschnitten und in jeweils 1 ml Auflöselösung bei 50 °C aufgelöst. Der endgültige Proteingehalt errechnete sich schließlich aus der bei 672 nm gemessenen Absorption, die in Bezug zu einer mit BSA ermittelten Kalibriergerade gesetzt wurde.

Amidoschwarzlösung: 0,5% (M/V) Amidoschwarz
5% (V/V) Eisessig
50% (V/V) Methanol

Entfärbelösung: 5% (V/V) Eisessig
50% (V/V) Methanol

Auflöselösung: 2 g Trichloressigsäure
2 ml Eisessig
16 ml Ameisensäure

5.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht benutzt. Dabei wurden die durch das SDS denaturierten Proteine in SDS-Laufpuffer zuerst in einem niedrig-prozentigen Sammelgel (5%) bei 80 V fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel (10%) mit 150 V separiert. Als Größenstandard diente ein kDA-Marker.

Sammelgel:	125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,01 % (M/V) APS 0,1 % (M/V) SDS 0,1 % (V/V) TEMED 5 % (V/V) Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
Trenngel:	375 mM Tris-HCl pH 6,8 0,01 % (M/V) APS 0,1 % (M/V) SDS 0,1 % (V/V) TEMED 10 % (V/V) Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
10x SDS-Laufpuffer:	1,92 M Glycin 0,25 M Tris-HCl pH 8,2 1 % (M/V) SDS

5.6.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Der Transfer der aufgetrennten Proteine (Western Blot) aus dem SDS-Gel auf PVDF-Membranen geschah in einer Naßblot-Apparatur (Biorad bzw. Hoefer), nachdem die Membranen mit Methanol benetzt worden waren. In die Apparatur kam ein Sandwich aus 3 Lagen in Transblotpuffer getränktem Filterpapier, SDS-Gel, Membran und einer zweiten Schicht aus Filterpapier. Der Transfer erfolgte bei 300 mA (Biorad-System) bzw. 1 A (Hoefer-System) für eine Stunde. Danach wurde die Membran in einer PonceauS-Lösung geschwenkt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Wasser abgewaschen, so dass nur noch die Banden der transferierten Proteine sichtbar waren. Nach Markierung der Banden des Größenmarkers wurde die Membran mit PBS entfärbt.

Transblot-Puffer:	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % (V/V) Methanol
Ponceau S-Lösung:	0,2 % (M/v) Ponceau S 3 % (M/V) Trichloressigsäure

5.6.5 Immunologische Detektion von immobilisierten Proteinen

Der Nachweis der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurde mittels spezifischer Antikörper erbracht. Dafür wurden zuerst die unspezifischen Stellen der Membran mit Blocklösung für mindestens zwei Stunden abgesättigt und danach der Überschuss mit PBS gründlich weg gewaschen. Nun wurde die Membran über Nacht bei 4 °C im ersten Antikörper geschwenkt, der in Westernwaschpuffer verdünnt und mit 0,05 % (M/V) NaN_3 versetzt worden war (Kaninchen-anti-ERK und Kaninchen-anti-phosphoERK: jeweils 1:1000 verdünnt, Maus-anti- β Actin: 1:5000 verdünnt). Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit Westernwaschpuffer folgte eine mindestens zweistündige Inkubation mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (verwendet wurden anti-Kaninchen-IgG, 1:10000, und anti-Maus-IgG, 1:5000 verdünnt in Westernwaschpuffer). Danach wurde wieder dreimal 5 min gewaschen. Die mit dem West Pico Super Signal® Chemolumineszenz-Detektionskit benetzten Membranen, die zwischen zwei Kopierfolien gelegt worden waren, wurden in einer Röntgenfilmkassette einem Chemolumineszenzfilm exponiert, der anschließend entwickelt wurde.

Blocklösung:	1 % (M/V) Ovalbumin 2 % (M/V) Magermilchpulver in PBS
--------------	-------------------------------------------------------------

Westernwaschpuffer:	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,2 % (M/V) BSA 0,2 % (V/V) NP-40
---------------------	-------------------------------------------------------------------

10x PBS:	1,4 mM KH_2PO_4 1,4 M NaCl 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 26,8 mM KCl
----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6 **Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Abbildungen von Embryonen, Plazenten und Dottersäcken wurden unter Zuhilfenahme der Programme Photoshop und Illustrator (Adobe) erstellt, während zur Auswertung und graphischen Darstellung von Daten die Programme Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad) verwendet wurden.

Zur Quantifizierung von Western Blots wurden die entwickelten Chemolumineszenzfilme eingescannt und die Schwärze der Banden mit dem Programm Photoshop (Adobe) ermittelt. Anschließend erfolgte eine Auswertung mit dem Programm Prism (GraphPad), mit dem außerdem statistische Tests durchgeführt wurden.

III. Material

1 Bakterienstämme

E.coli XL1-Blue

Stratagene

2 Plasmidvektoren

pcDNA3- α_{2B}

pCS2-mPL1

pCS2-tpbp

pBlue-PDGFR β

Prof. Cotecchia, Lausanne

Prof. Gessler, Würzburg

Prof. Gessler, Würzburg

Prof. Hoppe, Würzburg

3 Antikörper

Kaninchen-anti-p42/44-MAPK Antikörper

Kaninchen-anti-Phospho-p38-MAPK Antikörper

Kaninchen-anti-Phospho-p42/44-MAPK Antikörper

Maus-anti- β -Actin

Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG

Peroxidase-gekoppeltes anti-Maus IgG

Cell Signaling Technologies

Cell Signaling Technologies

Cell Signaling Technologies

Sigma

Dianova

Dianova

4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In der folgenden Aufstellung nicht erwähnte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen, alle Chemikalien für die *in situ*-Hybridisierung von Roche.

Agar

Agarose

Amidoschwarz

Atipamezol

Gibco BRL

Peqlab

Applichem

Orion Corp.

Bradford-Reagenz	Biorad
BSA	Applichem
Chelex® 100 Resin	Biorad
Desoxyribonukleotide	Eppendorf
Dithiothreitol	Applichem
DNS-Längenstandards	NEB
Ethanol	J. T. Baker
Hefe-Extrakt	Gibco BRL
[³ H]-RX821002	Amersham Biosciences
Isopropanol	J. T. Baker
Lumasafe™ plus Szintillationsflüssigkeit	Lumac-LSC
Methanol	J. T. Baker
NP-40	Applichem
Paraformaldehyd	Applichem
PDGF-BB	Prof. Hoppe, Würzburg
Proteinlängenstandard	Peqlab
RNasin	Promega
Trichloressigsäure	Applichem
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Gibco BRL
Trypton	Applichem

5 Enzyme und Kits

Sämtliche Produkte für die *in situ*-Hybridisierung wurden von Roche bezogen.

Benzonase	Merck
cAMP [¹²⁵ I] Direct Biotrak SPA®	Amersham Biosciences
DNase I, RNase-frei	Applichem
Durcupan® ACM	Fluka
Qiagen® Maxiprep	Qiagen
Superscript® Reverse Transkriptase	Gibco BRL
Super Signal® West Pico Chemolumineszenz Detection Kit	Pierce
Taq-DNS-Polymerase	Eppendorf
Vectastain® Elite Kit	Vectorlabs

6 Medien zur Zell- und Gewebekultur

DMEM 4,5% Glucose	Pan
FCS	Sigma
Glutamin	Pan
Penicillin/Streptomycin	Pan
RPMI 1640	ICN
Trypsin/EDTA	Pan

7 Oligonukleotide

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

8 Pufferlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser und gemäß den Vorschriften hergestellt. Lösungen für die Verwendung in Experimenten mit RNS wurden mit Millipore-Wasser bereitet, das vorher mit 0,1 % (V/V) DEPC behandelt und anschließend autoklaviert wurde (DEPC-Wasser).

9 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	Hartenstein
Celluloseacetat-Folien	Sartorius
Chemolumineszenzfilme Biomax [®] ML	Kodak
[³ H]-Hyperfilm [®]	Amersham Biosciences
Fujifilm 200 Sensia II Fujichrome [®]	Fuji
GF/B Glasfaserfilter	Millipore
Objektträger	Hartenstein
Petrischalen	Nunc
PVDF-Membranen (Immobilon [®])	Millipore
Stickstoff	Messer Griesheim
Tissue-Tek [®]	Miles Inc.

IV. Ergebnisse

1 Generierung von α_2 -KO-Mäusen

Mäuse, die selektiv nur noch einen α_2 -Rezeptor exprimieren, stellen ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung subtypspezifischer Funktionen und Liganden dar. Deshalb sollten zu Beginn der Arbeit die bisher noch nicht vorhandenen α_2 -Doppel-KO-Mäuse durch Kreuzung der bestehenden α_2 -KO-Linien miteinander generiert werden. Der sich daran logisch anschließende Dreifach-KO bot die Möglichkeit, α_2 -Rezeptor vermittelte Funktionen von solchen abzugrenzen, bei denen bisher nicht klar war, ob sie ausschließlich von α_2 -Rezeptoren vermittelt werden, oder ob weitere Rezeptorsysteme maßgeblichen Einfluß darauf haben.

1.1 α_{2AB} -KO-Mäuse

Um α_{2AB} -KO-Mäuse zu erhalten, wurden α_{2A} -KO-Mäuse und α_{2B} -KO-Mäuse miteinander verpaart. Die aus dieser Verpaarung entstehenden Tiere, die für beide α_2 -Rezeptoren einen heterozygoten Genotyp aufwiesen, wurden abermals gekreuzt. Deren Nachkommen sollten mit einer Wahrscheinlichkeit von 6,25 % nach Mendel homozygote KOs für beide α_2 -Rezeptoren sein, was auch der Fall war: 6 von 127 Mäusen wiesen eine Deletion für beide Rezeptoren auf. Der Genotyp dieser Nach-

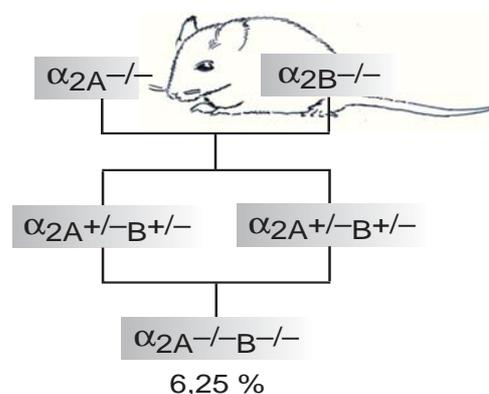


Abb. 8: Kreuzungsschema zur Generierung von α_{2AB} -KO-Mäusen

Schwanz- oder Ohrbiopsien durch PCR für die WT- und KO-Allele der entsprechenden Rezeptoren überprüft. Da die Primer so gewählt waren, daß sie einerseits bei gleichen Temperaturen hybridisierten und andererseits die resultierenden Fragmente für WT und KO sich deutlich in ihrer Größe unterschieden, wurden die Reaktionen für WT und KO für einen Rezeptorsubtyp in einem einzigen Ansatz durchgeführt. Abbildung 9 zeigt je ein Beispiel für eine α_{2A} - und eine α_{2B} -PCR. DNS-Proben, die sowohl für den α_{2A} -

als auch für den α_{2B} -Rezeptor nur eine Bande für das KO-Allel, aber keine für das WT-Allel produzierten, kennzeichneten Mäuse als α_{2AB} -Doppel-KOs. Homozygote Verpaarungen solcher Mäuse lieferten Nachkommen, für die keine Genotypüberprüfung mehr notwendig war, da alle den gleichen Genotyp hatten, nämlich α_{2A} -KO und α_{2B} -KO.

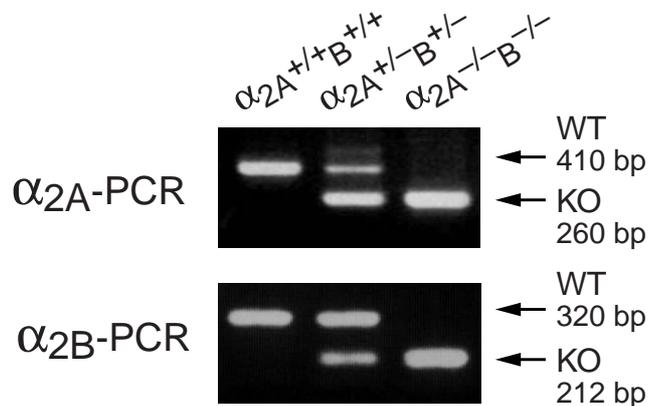


Abb. 9: PCR von genomischer DNS für den α_{2A} -Rezeptor (oberes Gel) und den α_{2B} -Rezeptor (unteres Gel). Die Banden stehen exemplarisch für Wildtyp-, heterozygote und homozygote KO-Genotypen.

1.2 α_{2BC} -KO-Mäuse

Auf die gleiche Art wie bei den α_{2AB} -KO-Mäusen wurde bei der Generierung der α_{2BC} -KO-Mäuse verfahren (siehe Abbildung 10). Allerdings wurden die PCRs für die WT- und die KO-Form des α_{2C} -Rezeptors in getrennten Ansätzen durchgeführt, da die erzeugten Fragmente sich nicht deutlich genug in ihrer Größe unterschieden. In Abbildung 11 ist exemplarisch je ein Agarosegel für eine α_{2C} -WT-PCR und eines für eine α_{2C} -KO-PCR zu sehen. Die Detektion des Genotyps für den α_{2B} -Rezeptor erfolgte wie vorher beschrieben.

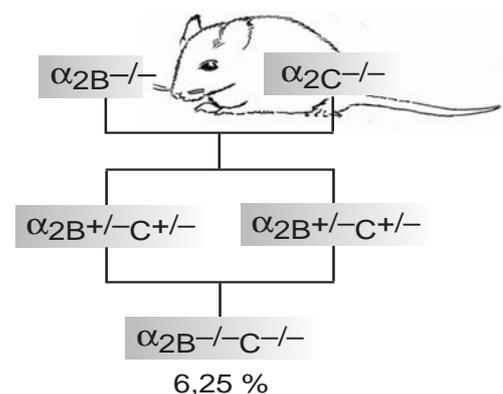


Abb. 10: Kreuzungsschema zur Generierung von α_{2BC} -KO-Mäusen.

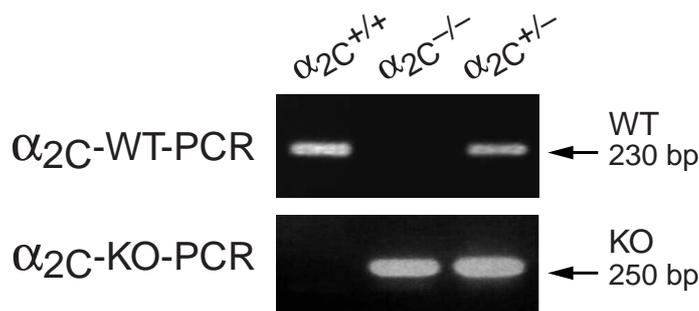


Abb. 11: Genotypisierung im Hinblick auf α_{2C} -Rezeptoren. Das obere Agarosegel zeigt ein Beispiel für die WT-Variante, während das untere die Identifizierung des KOs erlaubt.

Abermals sollten mit einer Häufigkeit von 6,25 % Doppel-KOs aus der Verpaarung geboren werden, doch war dies nicht der Fall. Nur zwei von 148 Mäusen, die aus einer doppelt heterozygoten Verpaarung stammten, wiesen eine homozygote Deletion für den α_{2B} - und den α_{2C} -Rezeptor auf. Die Generierung von α_{2BC} -Doppel-KOs erwies sich somit schwieriger als erwartet. Darüber hinaus ließen sich homozygote α_{2BC} -Doppel-KO-Tiere nur schwer verpaaren.

1.3 α_{2ABC} -KO-Mäuse

Da auch Mäuse untersucht werden sollten, denen alle α_2 -Rezeptoren fehlen, wurden die bereits vorhandenen α_{2AC} -Doppel-KO-Mäuse mit α_{2B} -KO-Mäusen gekreuzt. Über den Zwischenschritt dreifach heterozygoter α_2 -KO-Mäuse wurden selektiv Tiere generiert, die nur noch eine intakte Kopie des α_{2B} -Rezeptors in ihrem Genom enthielten, aber keine Kopien mehr für den α_{2A} - und den α_{2C} -Rezeptor. Der Nachweis wurde jeweils per PCR erbracht. Diese Mäuse wurden miteinander in einem letzten Kreuzungsschritt verpaart, um zu Mäusen mit einer Deletion für alle drei α_2 -Rezeptoren zu gelangen (siehe Abbildung 12). Dies brachte den Vorteil, dass 25 % aller Nachkommen vollständige α_{2ABC} -KOs sein

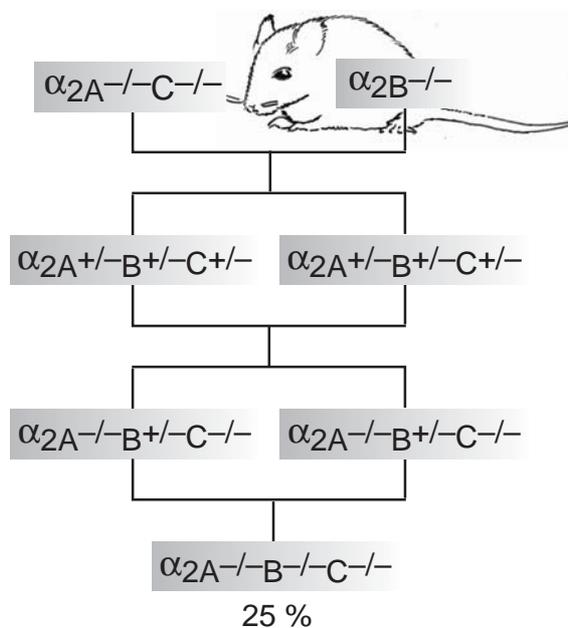


Abb. 12: Vereinfachtes Kreuzungsschema für die Generierung von α_{2ABC} -KO-Mäusen.

sollten und dass diese nur durch eine einzige PCR, nämlich die für den α_{2B} -Rezeptor, detektierbar waren.

Allerdings wurden aus dieser Verpaarung keine homozygoten α_{2ABC} -KO-Mäuse geboren, was einen Hinweis auf eine mögliche embryonale Letalität von α_{2ABC} -KO-Mäusen lieferte. Erst nach 283 Tieren wurde eine Maus mit Deletionen für alle drei α_2 -Rezeptoren geboren, die sich normal entwickelte.

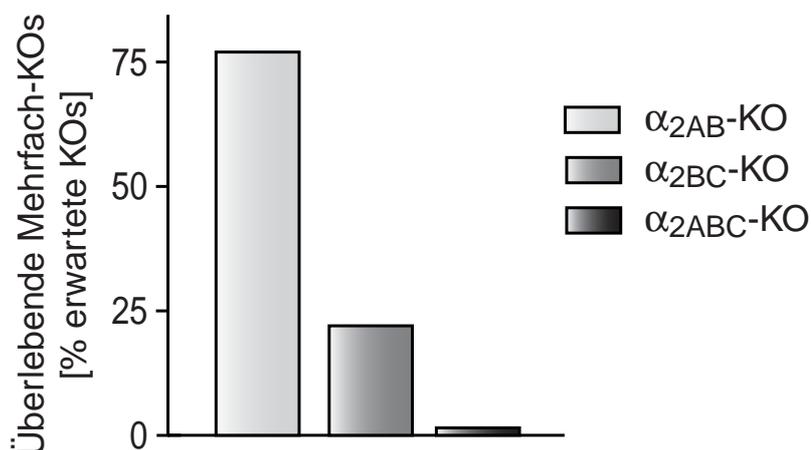


Abb. 13: Graphische Darstellung der tatsächlich erhaltenen Mehrfach-KOs im Alter von drei Wochen bezogen auf die nach Mendel erwartete Zahl.

Bei der nachfolgenden Phänotypisierung lag das Augenmerk hauptsächlich auf den Tieren, die keinerlei α_2 -Rezeptoren mehr exprimierten, den α_{2ABC} -KO-Mäusen, da diese embryonal letal zu sein schienen, und weniger auf den Doppel-KO-Mäusen.

2 Charakterisierung von α_2 -Doppel-KO-Mäusen

2.1 Entwicklung und Verhalten

Im Gegensatz zu den α_{2BC} -Doppel-KO-Mäusen zeigten die α_{2AB} -Doppel-KOs keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Fortpflanzung und entwickelten sich auch normal. Dem gegenüber standen die α_{2BC} -Doppel-KOs, die neben einer erhöhten Aggressivität eine äußerst rasche Zunahme der Körpermasse aufwiesen.

2.3.2 Herzuntersuchung

Mäuse mit Deletionen für den α_{2A} - und den α_{2C} -Rezeptor gleichzeitig entwickeln ab

einem Alter von 14 Wochen eine Herzhypertrophie, die schlußendlich zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz führt (Hein *et al.*, 1999). Die Frage war nun, ob auch die neu generierten α_2 -Doppel-KO-Tiere in gleicher Weise eine krankhafte Herzveränderung erfahren. Um dem auf den Grund zu gehen, wurde das Herz drei bis vier Monate alter männlicher α_{2AB} -Doppel-KO- und α_{2BC} -Doppel-KO-Mäusen entnommen, fixiert und in Paraffin eingebettet geschnitten. Abbildung 14 zeigt eine Gegenüberstellung von einem WT-Herz mit Herzen der drei Doppel-KOs. Bei der Sirius Rot-Färbung, von der ein vergrößerter Ausschnitte jeweils gezeigt ist, erscheint das Zellplasma durch die Pikrinsäure gelb, die Zellkerne wurden durch die Braunfärbung mit Weigert'scher Lösung abgegrenzt. Kollagenfasern, die ein Zeichen für Fibrose darstellen, sehen durch das Sirius Rot leuchtend rot aus. In den transversalen Schnitten war kein direkter Hinweis auf eine gravierende Herzveränderung zu erkennen. Nur die Sirius Rot-Färbung des α_{2BC} -KO-Herzens deutete möglicherweise eine leichte Fibrose an, die jedoch nicht näher untersucht wurde. Von daher war abschließend zu sagen, dass aufgrund der bloßen Ansicht der Herzschnitte über etwaige pathologische cardiovaskuläre Phänotypen der α_{2AB} -KOs und α_{2BC} -KOs kein Urteil gefällt werden konnte.

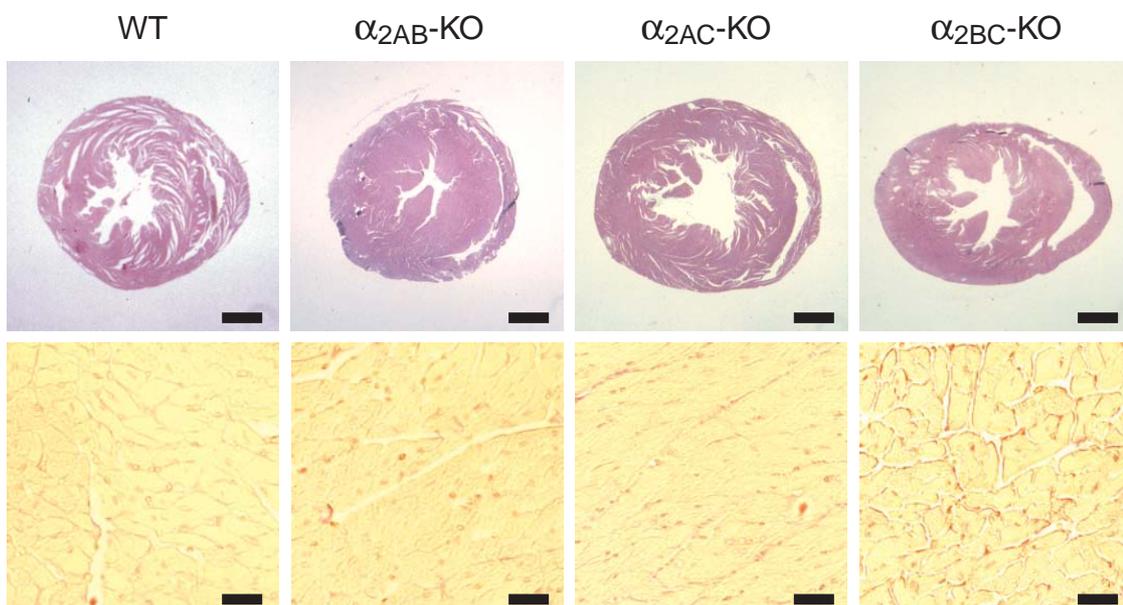


Abb. 14: Paraffinschnitte von Herzen 14 Wochen alter Tiere mit dem über den Bildern bezeichneten Genotyp. Die obere Reihe zeigt die Herzen in einem transversalen Schnitt nach einer HE-Färbung. Zu sehen ist jeweils der große linke Ventrikel und, rechts davon gelegen, der rechte. Maßstab: 1 mm. In der unteren Reihe sind in der gleichen Schnittebene die dazu gehörigen Sirius Rot-Färbungen abgebildet. Maßstab: 25 μ m.

3 Embryonale Letalität von α_{2ABC} -KO-Mäusen

3.1 Zeitpunkt des Todes von α_{2ABC} -KO-Mäusen

Nachdem offensichtlich war, dass Mäuse ohne α_2 -Rezeptoren nicht bis zur Geburt überleben, wurden Mäuse nach dem obigen Generierungsschema gezielt verpaart (siehe Abbildung 12). Damit sollten sich 25 % aller befruchteten Eizellen zu α_{2ABC} -KOs entwickeln. Zu bestimmten Zeitpunkten der 21 Tage dauernden Embryonalperiode wurden die trächtigen Weibchen getötet und die im Uterus befindlichen Embryonen herauspräpariert. Weder an Tag E18,5 noch E17,5 konnten per PCR Embryonen gefunden werden, die α_{2ABC} -KOs waren. Der erste Hinweis auf die tatsächliche Existenz gelang bei einer Präparation an Tag E14,5, wo aus bereits stark mazeriertem embryonalen Material der Nachweis auf eine komplette α_2 -Deletion erbracht werden konnte. Daraufhin wurden Embryonen an Tag E11,5 untersucht, von denen tatsächlich ungefähr 25 % der im Uterus befindlichen Embryonen α_{2ABC} -KOs waren. Allerdings konnten nach Tag E11,5 keine lebenden α_{2ABC} -KO-Embryonen mehr gefunden werden. Die Vitalität wurde dabei an einem schlagenden Herzen festgemacht. Um den genauen Zeitpunkt des Sterbens festzulegen, wurden nun Embryonen an Tag E10,5 und Tag E9,5 entnommen. Dabei stellte sich heraus, dass es ein Zeitfenster für die Sterblichkeit gab, das die Tage E9,5 bis E11,5 umspannte (siehe Abbildung 15).

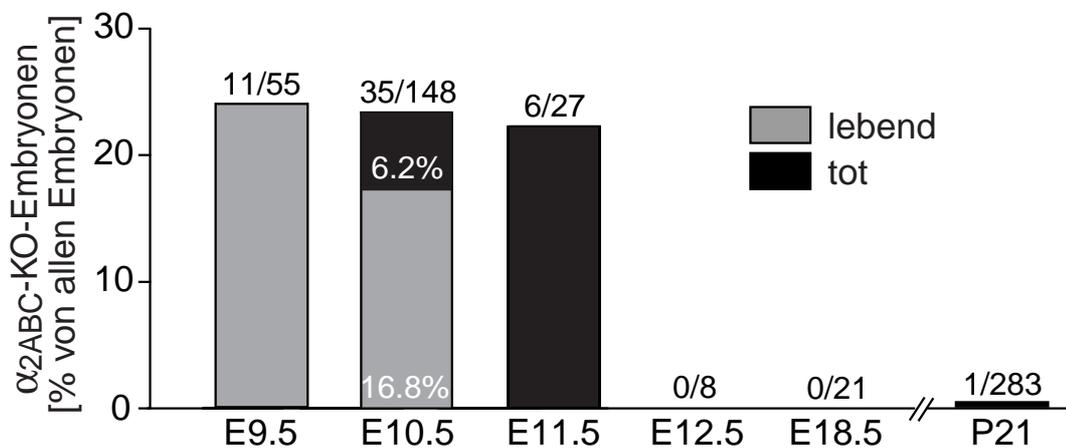


Abb. 15: Letalität der α_{2ABC} -KO-Embryonen. Bis Tag E11,5 konnten Embryonen mit einer Deletion für alle 3 α_2 -Rezeptoren entsprechend der Mendelschen Verteilung bei dieser Art der Verpaarung gefunden werden, allerdings war bereits an Tag E10,5 ein Viertel tot und an Tag E11,5 besaß keiner der α_{2ABC} -KO-Embryonen mehr ein schlagendes Herz. Im Laufe der Experimente wurde nur eine α_{2ABC} -KO-Maus von insgesamt 283 Nachkommen geboren (P21: Tag 21 der postnatalen Entwicklung).

3.2 Äußere Merkmale der α_{2ABC} -KO-Embryonen

An Tag E11,5 wiesen sowohl die Reichert'sche Membran als auch die Plazenta von α_{2ABC} -KOs deutliche Anzeichen von Zersetzung auf, die schon an Tag E10,5 zu beginnen schien. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, zeigten die α_2 -defizienten Embryonen selbst bis Tag E10,5 keine gravierenden Entwicklungsschäden abgesehen vom Neuralrohr, das weniger weit geschlossen war und dessen Ränder meist leicht gewellt waren. Eine Verzögerung im Wachstum war erst mit dem beginnenden Tag E11,5 der Embryonalentwicklung offensichtlich, was aber aller Wahrscheinlichkeit damit zusammenhing, dass der Embryo bereits tot bzw. am Sterben war und somit nicht mehr wuchs, sondern degenerative Prozesse eingeleitet waren. Die zu diesem Entwicklungszeitpunkt normalerweise vorhandenen Organe ließen auf den ersten Blick keine Auffälligkeiten erkennen.

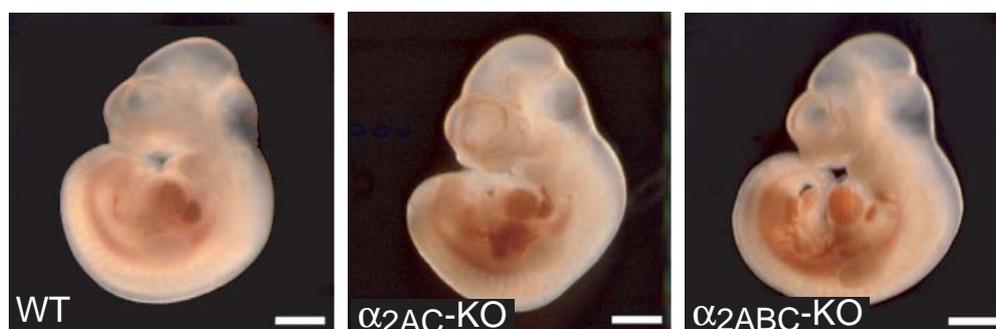


Abb. 16: Photographische Aufnahme von Embryonen an Tag E10,5 mit dem bezeichneten Genotyp. Maßstab: 1 mm.

3.3 Untersuchung des Herzen von α_{2ABC} -KO-Embryonen

3.3.1 Morphologie der Herzen von α_{2ABC} -KO-Embryonen

Um die Todesursache der α_{2ABC} -KOs näher zu bestimmen, wurden Paraffinschnitte von α_{2ABC} -KO-Embryos und α_{2AC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 angefertigt, die eine morphologische Untersuchung des embryonalen Herzens ermöglichten (siehe Abbildung 17). Die Herzen von α_{2ABC} -KO-Embryonen unterschieden sich hierbei nicht von denen der α_{2AC} -KO-Embryonen, die ohne Entwicklungsdefekte entsprechend der Mendel'schen Verteilung geboren werden. Es waren gleich viele Zellschichten innerhalb des Ventrikels ausgebildet und auch der Entwicklungsstand und die Bildung der Herzkammern entsprach dem eines 10 Tage alten Wildtyp-Embryos.

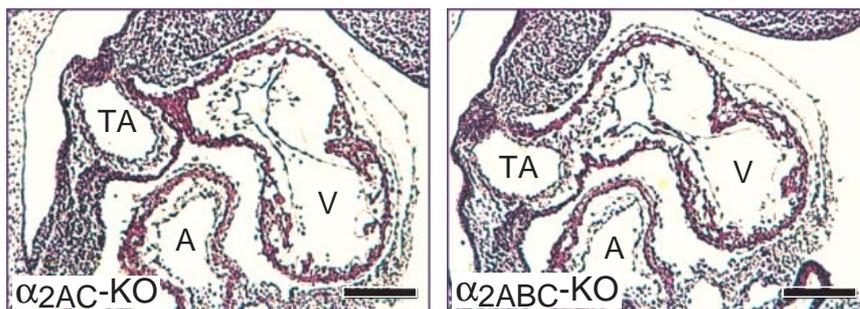


Abb. 17: Sagittale Schnitte von Herzen von α_{2ABC} -KO- und α_{2AC} -KO-Embryonen nach HE-Färbung an Tag E10,5. Zu erkennen ist der Truncus arteriosus (TA), der noch gemeinsame Ventrikel (V) und das Atrium (A). Maßstab: 150 μ m

3.3.2 Herzfrequenzmessung von Embryonen

Obwohl die Herzmorphologie keinerlei Alterationen zeigte, konnte trotz allem nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass das α_{2ABC} -KO-Herz funktionell geschädigt war. Aus diesem Grund wurde ermittelt, mit welcher Frequenz die Herzen der Embryonen schlugen.

Dabei stellte sich heraus, dass die Herzfrequenz verglichen mit WT- und α_{2AC} -KO-Embryonen bis Tag E9,5 unverändert war. Erst ab Tag E10,5 konnte eine deutliche Bradykardie beobachtet werden, die aber einerseits in abgeschwächtem Maße auch bei α_{2AC} -KOs auftrat, andererseits auch darauf zurückgeführt werden konnte, dass ab diesem Tag die α_{2ABC} -KO-Embryonen zu sterben begannen bzw. teilweise schon gestorben waren.

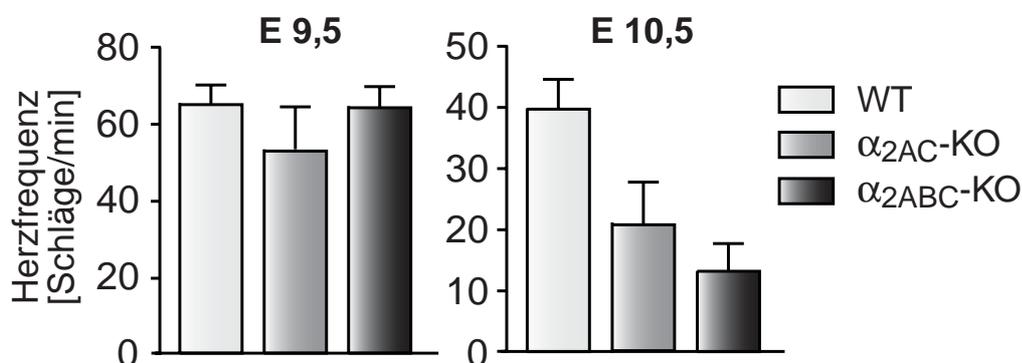


Abb. 18: Schematische Darstellung der Herzfrequenzen von Embryonen an Tag E9,5 und Tag E10,5. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4-17 Embryonen).

3.3.4 Bestimmung des L-DOPA-Spiegels von α_{2ABC} -KO-Embryonen

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die Deletion der präsynaptischen α_2 -Rezeptoren plus die Deletion des postsynaptischen α_{2B} -Rezeptors Auswirkungen auf den Sympathikotonus hat. Dafür wurde per HPLC eine Catecholaminbestimmung durchgeführt. Diese kam zu dem Ergebnis, dass die Catecholaminsynthese prinzipiell unbeeinträchtigt war, da die L-DOPA-Spiegel der α_{2ABC} -KO-Embryonen (E10,5), dessen Synthese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Noradrenalin- und Adrenalin-synthese darstellt, nicht verändert waren (siehe Abbildung 19).

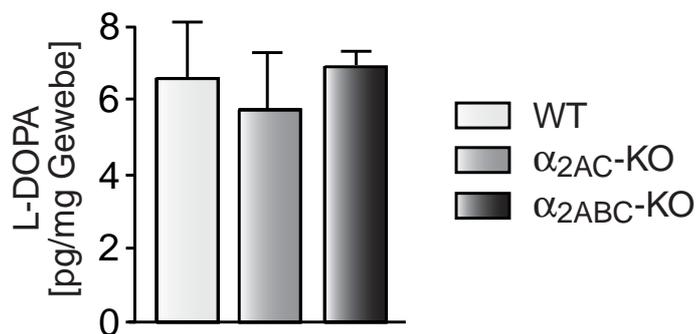


Abb. 19: L-DOPA-Konzentration von WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 bezogen auf ihre Masse. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 6-8 Embryonen pro Genotyp.

4 Expression von α_2 -Rezeptoren während der Embryonalentwicklung

Es ist in der Literatur beschrieben, daß ab Tag E9,5 die mRNA für α_{2A} -Rezeptoren im murinen Embryo transkribiert wird und im Folgenden auch die mRNA für die beiden anderen Subtypen exprimiert wird (Wang *et al.*, 1997). Demnach hätten die α_{2ABC} -KOs aber erst viel später sterben dürfen, nämlich dann, wenn normalerweise alle Rezeptoren exprimiert sind. Daher wurden die Aussagen von Wang *et al.*, die mit *in situ*-Hybridisierung gearbeitet hatten, einer Überprüfung unterzogen. Um die Frage zu beantworten, ob α_2 -Rezeptoren nicht doch schon früher während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, wurden zunächst Versuche unternommen, die Rezeptoren per *in situ*-Hybridisierung nachzuweisen. Da dies allerdings mißlang, sollte der Beweis mithilfe von RT-PCRs erbracht werden. Diese ermöglichten zwar nicht die Lokalisierung auf zellulärer Ebene, hatten aber den Vorteil, selbst geringste Mengen an mRNA detektieren zu können. Experimente mit WT-Gewebe zeigten, dass sowohl im Embryo selbst als auch in den beiden extraembryonalen Organen, Dottersack und

Plazenta, alle drei α_2 -Rezeptorsubtypen bereits ab Tag E9,5 auf mRNA-Ebene exprimiert sind (siehe Abbildung 20).

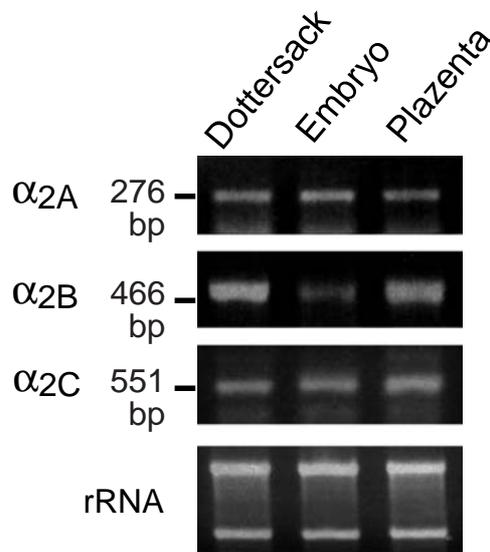


Abb. 20: RT-PCR mit Dottersack, Embryos und Plazenta von WT-Embryonen (E 9,5) für alle 3 α_2 -Rezeptoren. Das unterste Agarosegel zeigt die Banden für die 18s- und 28s-RNS als Zeichen dafür, daß die RNS während der Präparation nicht degradiert wurde.

5 Morphologische Veränderungen extraembryonaler Organe

Aufgrund der neuen Erkenntnisse, dass α_2 -Rezeptoren auch in Dottersack und Plazenta exprimiert werden, erfolgte eine nähere Begutachtung dieser Gewebe. Dabei stellte sich heraus, dass Dottersack und Plazenta von α_{2ABC} -KOs an Tag E10,5 schwere Defekte aufwiesen.

5.1 Dottersackdefekte von α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5

Der 10 Tage alte Mausembryo erfährt die Versorgung mit Gasen und Nährstoffen zu einem überwiegenden Teil durch den Dottersack. Um diese Aufgabe zuverlässig erfüllen zu können, ist ein gut ausdifferenziertes Gefäßsystem im Dottersack vonnöten. Eben dies fehlte dem Dottersack von α_{2ABC} -KO-Embryonen. Bei der Untersuchung stellte sich heraus, dass fast nur große Gefäße vorhanden waren und dass die kleinen, verzweigten Gefäße nur unzureichend ausgebildet waren. Dem gegenüber standen die Dottersäcke von WT- und α_{2AC} -KO-Tieren, die ein feines Netzwerk von Blutgefäßen

zeigten. Außerdem konnte nicht immer die sonst dichte Verbindung der beiden Komponenten des Dottersacks, des viszeralen Endoderms und des Endothels der Blutgefäße beobachtet werden, was den Eindruck verstärkte, daß der Dottersack von α_{2ABC} -KOs nicht nur dünner, sondern auch brüchig im Vergleich zu WT und α_{2AC} -KO war (siehe Abbildung 21).

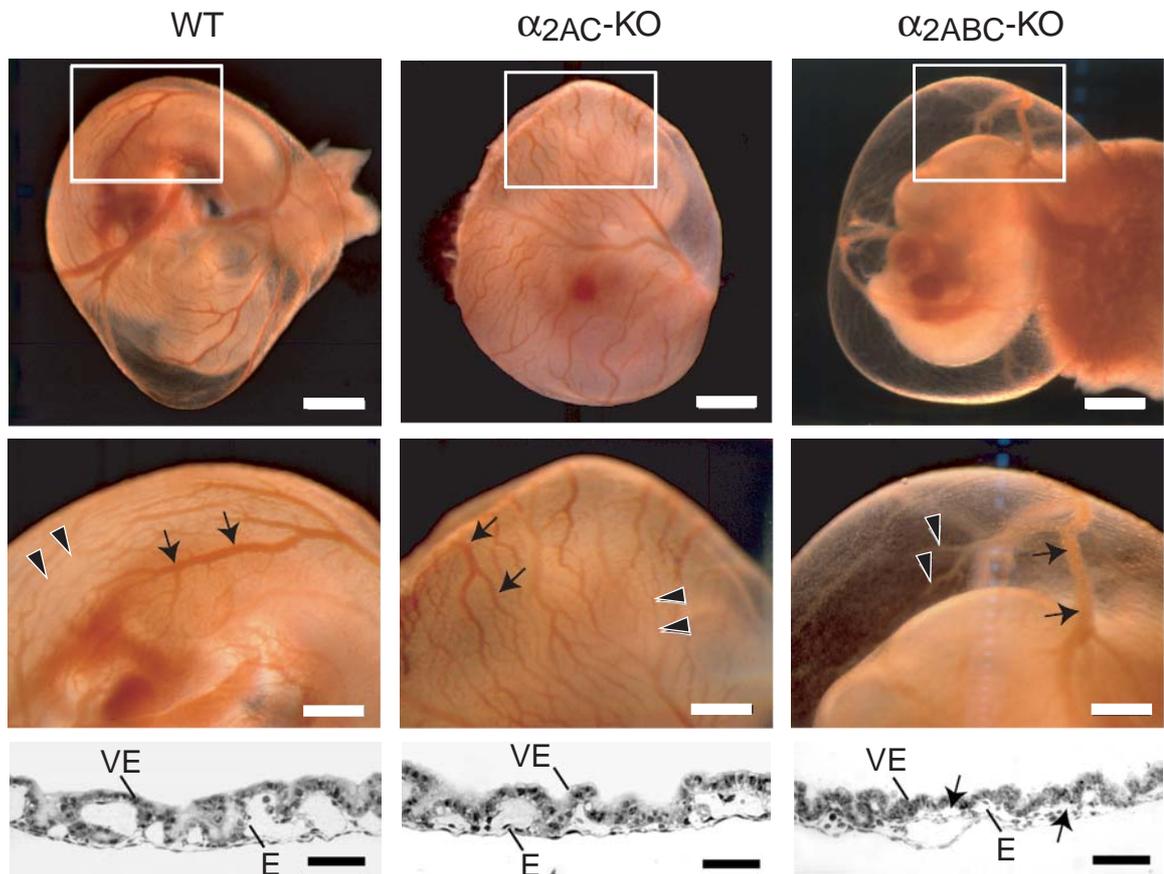


Abb. 21: Photographische Aufnahmen von WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Dottersäcken direkt nach der Präparation (E10,5). Die Pfeile in der mittleren Abbildungsreihe kennzeichnen große Gefäße, die Pfeilköpfe die kleinen. In der untersten Reihe sind Toluidinblau-gefärbte Kunststoffquerschnitte von Dottersäcken abgebildet, die beim α_{2ABC} -KO die Ablösung des Endothels (E) vom viszeralen Endoderm (VE) zeigen (Pfeile). Maßstab: 1 mm, 500 μ m, 125 μ m.

5.2 Plazentadefekte von α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5

Da mit einem Entwicklungsdefekt des Dottersacks meist auch Fehler in der Entwicklung der Plazenta einhergehen, bildete diese den Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen.

5.2.1 Plazentamorphologie

Mit dem Tag E9,5 der Embryonalentwicklung beginnt die Ausbildung einer hämochorialen Plazenta, die sukzessive die Aufgaben des Dottersacks übernimmt.

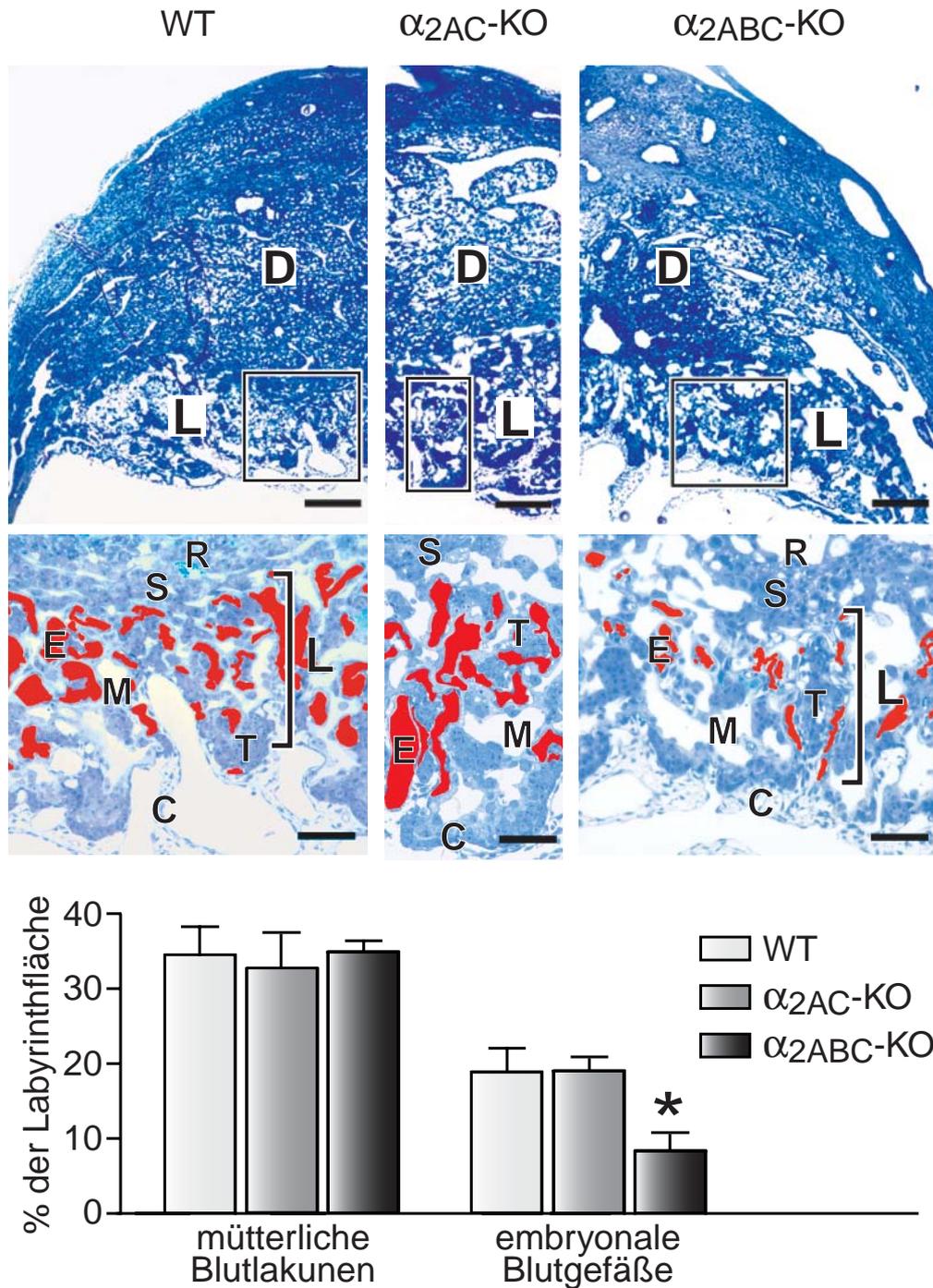


Abb. 22: Toluidinblau-gefärbte Kunststoffschritte (1 μm) perfusionsfixierter Plazenten an Tag E10,5. Die obere Reihe zeigt die Plazenta in einer Übersicht. D, Dezidua, L, Labyrinth. Maßstab: 400 μm . In der zwei-

ten Reihe sind jeweils Vergrößerungen aus dem Labyrinth der Schnitte darüber dargestellt. Zur Verdeutlichung wurden die embryonalen Blutgefäße rot ausgefüllt. Die mütterlichen Lakunen sind durch die Perfusionsfixierung frei von Erythrozyten und erscheinen daher weiß. C, Chorionplatte, E, embryonales Gefäß, M, mütterliche Lakune, R, Riesenzelle, S, Spongiotrophoblast, T, Trophoblastzelle. Maßstab: 175 μm . Im Graphen ist die Fläche von mütterlichen Blutlakunen und embryonalen Blutgefäßen bezogen auf die gesamte Labyrinthfläche aufgetragen (Mittelwerte \pm SEM, $n= 5-10$ Schnitte). Während es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen für die mütterlichen Lakunen gab, war der Anteil der embryonalen Gefäße im Labyrinth der α_{2ABC} -KO-Plazenta signifikant verringert ($*p<0,05$ α_{2ABC} -KO versus α_{2AC} -KO und WT).

Daher ist ein gut ausgebildetes Gefäßsystem im Labyrinth besonders wichtig, um die Diffusion und den Transport von Nährstoffen und Gasen vom mütterlichen Blut in den embryonalen Kreislauf sicher zu stellen. Verglichen mit WT- und α_{2AC} -KO-Plazenten zeigten Plazenten von α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 in diesem Labyrinthsystem eine Vergrößerung der Struktur. Darüber hinaus verfügten die Plazenten von α_{2ABC} -KO-Embryonen über eine signifikant kleinere Fläche von embryonalen Blutgefäßen, während es keine Veränderungen hinsichtlich der mütterlichen Blutlakunen gab (siehe Abbildung 22).

In einer weiteren Vergrößerung (siehe Abbildung 23) wurde darüber hinaus deutlich, dass die Trophoblastzellen um die Gefäße herum clusterartig angeordnet waren. Dadurch wurden die Diffusionswege vom mütterlichen ins embryonale Blut deutlich größer.

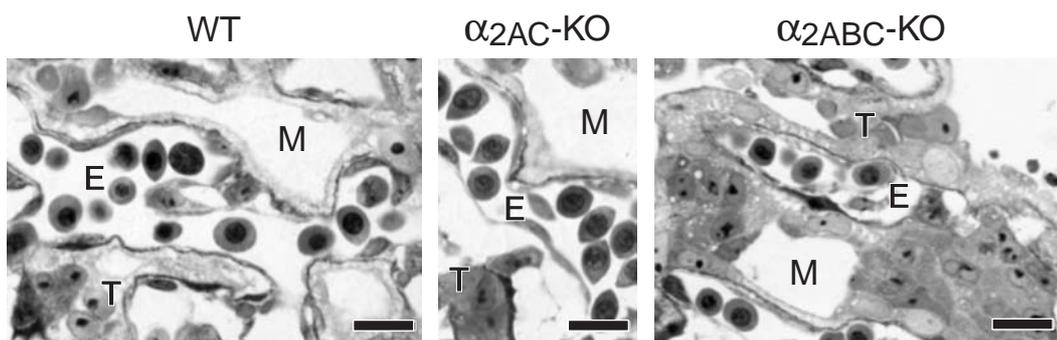


Abb. 23: Ausschnitt aus dem Labyrinth von perfusionsfixierten Plazenten der 3 Genotypen an Tag E10,5 (Toluidinblau-gefärbte Kunststoff-schnitte). E, embryonales Blutgefäß, M, mütterliche Blutlakune, T, Trophoblastzellen. Maßstab: 30 μm

Trotz allem gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der mütterlichen und embryonalen Gefäßquerschnitte oder der in den embryonalen Gefäßen des

Labyrinthsystems enthaltenen Erythrozyten zwischen WT- und α_{2ABC} -KOs bezogen auf die gesamte Fläche des Labyrinths (siehe Abbildungen 24 und 25), was bewies, dass der Defekt eindeutig in einer zu kleinen Fläche der embryonalen Gefäße begründet lag und in einer Fehlverteilung von Tropho-blastzellen, die das äußere Gerüst der Gefäße bilden.

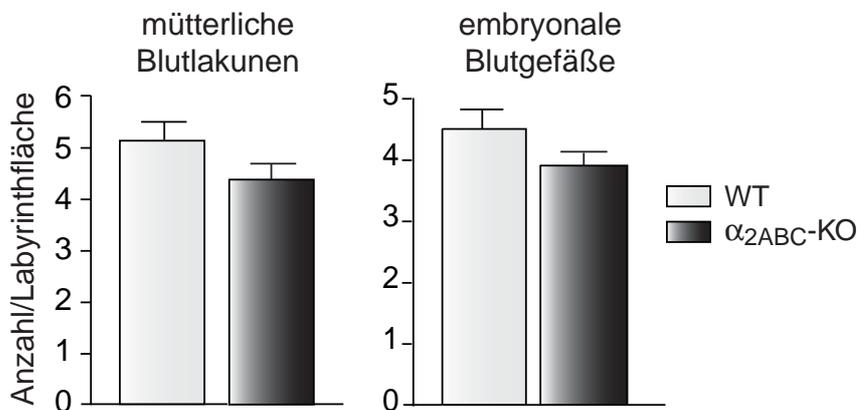


Abb. 24: Graphische Darstellung der Anzahl von mütterlichen und embryonalen Gefäßen bezogen auf die Labyrinthfläche in Mittelwerten \pm SEM (n=10-22).

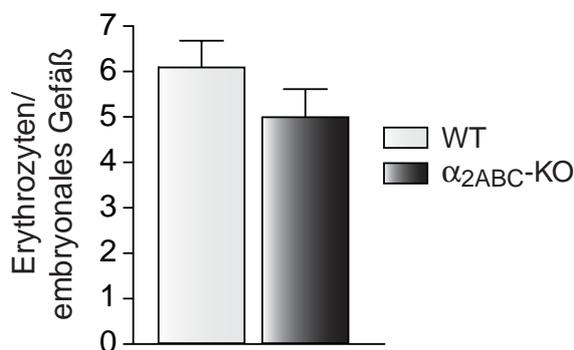


Abb. 25: Graphische Darstellung mittleren Anzahl (\pm SEM) der Erythrozyten pro embryonalem Gefäß im Plazentalabyrinth von WT- und α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 (n=10-22).

5.3 Bestimmung der Rezeptordichte in Plazenten an Tag E10,5

Nachdem die morphologische Ursache für die embryonale Letalität der α_{2ABC} -KO-Embryonen bei den extraembryonalen Geweben gefunden war, sollte die Dichte an α_2 -Rezeptoren im embryonalen Teil der Plazenta ermittelt werden (siehe Abbildung 16). Dafür wurden Radioligandenbindungsstudien mit WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Plazenten durchgeführt. Der mit WT-Plazenten ermittelte Wert verkörperte die Gesamt-

heit von α_2 -Rezeptoren in der Plazenta. Hingegen stellte die Menge an Rezeptoren, die mithilfe von Plazenten von α_{2AC} -KO-Embryonen berechnet wurde, den Anteil von α_{2B} -Rezeptoren in der Plazenta dar. Da hierfür die Plazenten der Geschwistertiere der α_{2ABC} -KO-Embryonen verwendet wurden, mußte in Betracht gezogen werden, dass nur der embryonale Teil der Plazenta ein α_{2AC} -KO war, während im mütterlichen Teil noch immer eine Kopie des Gens für den α_{2B} -Rezeptor vorhanden war. Aus der Differenz der Ergebnisse von WT-Plazenten und denen von α_{2AC} -KO-Embryonen konnte die Menge an α_{2B} -Rezeptoren berechnet werden, die im embryonalen Teil der Plazenta normalerweise exprimiert werden.

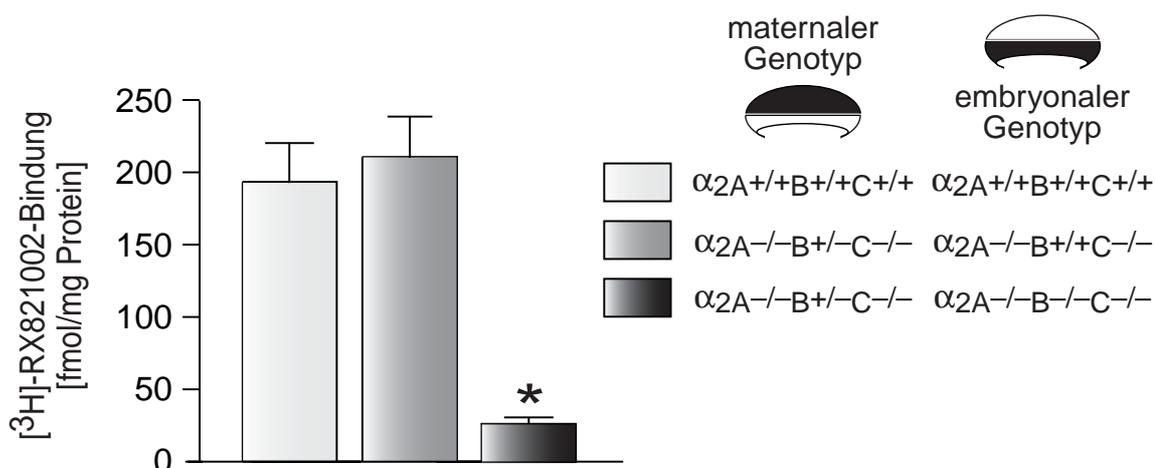


Abb. 26: α_2 -Rezeptor-Dichte in Plazenten (Tag E10,5). Es wurden pro Genotyp je 2 Sättigungskurven mit jeweils Doppelbestimmungen pro [³H]-RX821002-Konzentration durchgeführt und die Mittelwerte \pm SEM aus den maximalen Bindungen ermittelt. In der Legende ist jeweils der Genotyp des maternalen Parts der Plazenta und der des embryonalen angegeben. Somit symbolisiert die weiße Säule WT-Plazenten, die graue α_{2AC} -KO-Plazenten und die schwarze α_{2ABC} -KO-Plazenten.

Daraus ergab sich, dass fast alle α_2 -Rezeptoren in der Plazenta α_{2B} -Rezeptoren sind, da die Bindung in Plazenten von α_{2AC} -KOs ungefähr genauso hoch war wie die in WT-Gewebe. Die verbliebene Bindung in Plazenten von α_{2ABC} -KO-Embryonen bezeichnete demnach den Anteil von α_{2B} -Rezeptoren, die im mütterlichen Teil der Plazenta exprimiert werden. Da dies bezogen auf die Gesamtmenge an α_2 -Rezeptoren in der Plazenta nur einen sehr geringen Prozentsatz ausmachte, mußte der größte Teil α_2 -Rezeptoren in der embryonalen Hälfte exprimiert werden. Damit stand fest, dass im embryonalen Teil der Plazenta in der Hauptsache α_{2B} -Rezeptoren gebildet werden.

5.4 Lokalisierung der α_2 -Rezeptoren in der Plazenta

Als nun der Beweis für die Expression von α_2 -Rezeptoren in der Plazenta nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene erbracht war, sollte eine Lokalisierung per Autoradiographie mit dem gleichen Radioliganden wie für die Bindungsstudien versucht werden. Erneut wurden Plazenten von WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 verwendet (siehe Abbildung 27). Eine deutliche Schwärzung des Films ergab sich durch Bindung des Radioliganden in der Schicht der Riesenzellen sowie in geringerem Ausmaß auch in der Spongiotrophoblastebene. Dieses Signal war in Plazentaschnitten von WT- und α_{2AC} -KO-Embryonen gleichermaßen zu sehen, fehlte aber bei α_{2ABC} -defizienten Plazenten.

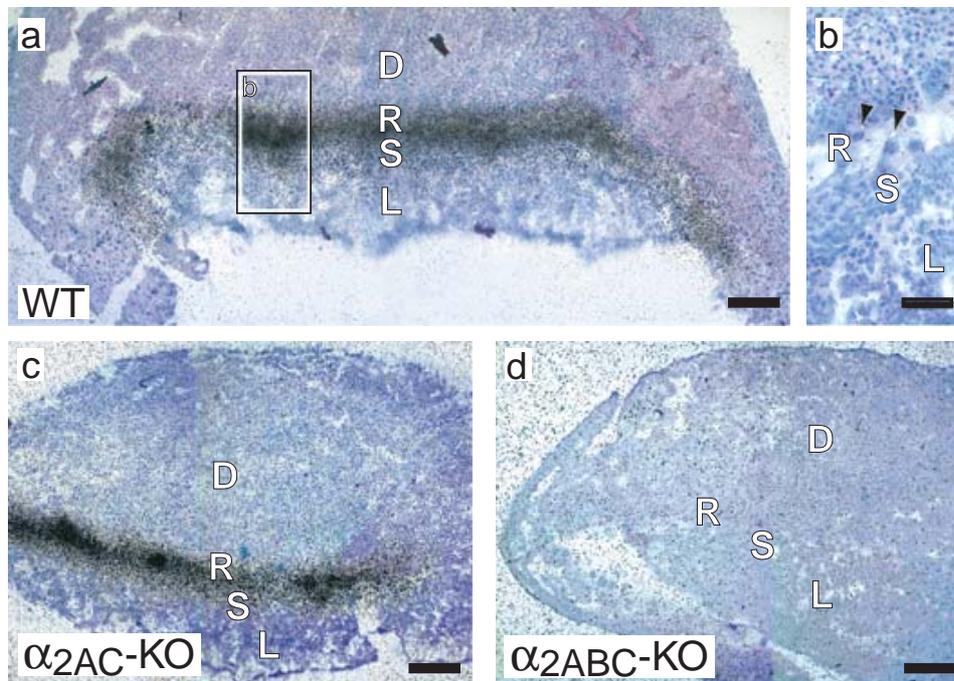


Abb. 27: Autoradiographie von α_2 -Rezeptoren an Kryostatschnitten von Plazenten an Tag E10,5, die mit Giemsa gefärbt wurden. a, c, d) α_2 -Rezeptoren sind in Plazenten von WT- und α_{2AC} -KO-Embryonen (a, c) nur in den Riesenzellen und den darunterliegenden Spongiotrophoblastzellen exprimiert (schwarze Färbung). Die Autoradiographie der Plazenta von α_{2ABC} -KO-Embryonen (d) untermauert den Befund aus den Bindungsstudien, daß praktisch alle α_2 -Rezeptoren im embryonalen Teil der Plazenta sind, da hier keine Schwärzung entstand. Maßstab: 100 μm b) Ausschnitt aus der WT-Plazenta ohne darüber gelegtes Autoradiogramm. Maßstab: 30 μm . D, Dezidua, L, Labyrinth, R, Riesenzellen, S, Spongiotrophoblast.

5.5 Nachweis spezifischer Plazentazelltypen mittels *in situ*-Hybridisierung

Nachdem die Lokalisierung der α_2 -Rezeptoren aufgeklärt war, kam die Frage auf, ob die entsprechenden Zelltypen in den Plazenten der α_{2ABC} -KO-Embryonen überhaupt gebildet werden, da der Entwicklungsdefekt auch im Fehlen einzelner zellulärer Komponenten begründet sein könnte. Zu diesem Zweck wurden *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt, bei denen Spongiotrophoblasten und Riesenzellen mit spezifischen Markern detektiert wurden (siehe Abbildung 28), nämlich murinem plazentarem Lactogen 1 (mPL1) und dem trophoblastspezifischen Faktor (4311). Mit der Sonde gegen mPL1 konnten sowohl in WT- und α_{2AC} -KO-Plazenten als auch in Plazenten von α_{2ABC} -KO-Embryonen erfolgreich Riesenzellen detektiert werden. Ebenso war die Spongiotrophoblastschicht vollständig ausgebildet, wie anhand der Hybridisierungen mit der 4311-Sonde deutlich erkennbar ist.

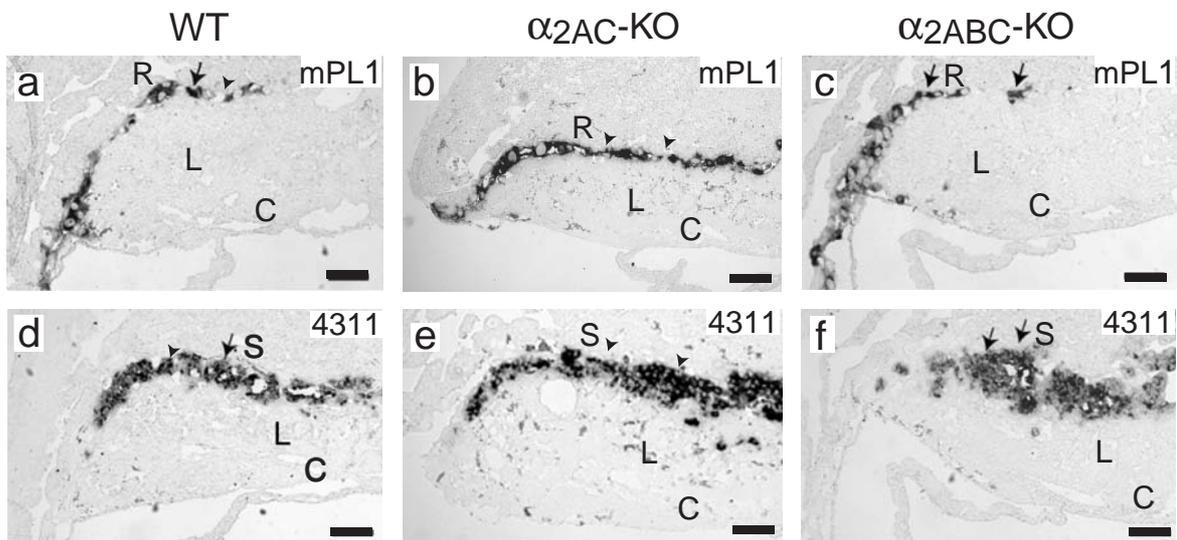


Abb. 28: *In situ*-Hybridisierung an Plazenten von WT-, α_{2AC} - und α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5. Die obere Reihe (a-c) zeigt Hybridisierungen für murines plazentares Lactogen 1 (mPL1), das nur in den Riesenzellen gebildet wird. Hybridisierungen gegen mRNA von 4311, einem Protein des Spongiotrophoblasten, ist in der unteren Reihe (d-f) dargestellt. C, Chorionplatte, L, Labyrinth, R, Riesenzellen, S, Spongiotrophoblast. Größenbalken: 60 μm .

Demnach konnte festgehalten werden, dass der letale Plazentadefekt wohl nicht durch einen Mangel relevanter Zellschichten bedingt ist, sondern möglicherweise auf dem Verlust α_2 -Rezeptor-induzierter Signalkaskaden beruht.

5.6 Veränderungen in der Signaltransduktion nach α_{2ABC} -Deletion

Aufgrund der Befunde, dass weder die Spongiotrophoblast- noch die Riesenzellen in den Plazenten der α_{2ABC} -KO-Embryonen fehlen, lag die Vermutung nahe, daß die Signalweiterleitung innerhalb dieser Zellen verändert war. α_2 -Rezeptoren können verschiedene Signalwege modulieren: Sie hemmen die Adenylatcyclase (Pohjanoksa *et al.*, 1997), blockieren Calcium-Kanäle (Li *et al.*, 1998), erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit von Kalium-Kanälen (Surprenant *et al.*, 1992) und sind in der Lage, MAP-Kinasen zu aktivieren (Peng *et al.*, 1998). Da auffällig viele Maus-Linien, die eine Deletion der Gene der MAP-Kinase-Signalwege tragen, einen vergleichbaren Phänotyp wie die α_{2ABC} -KOs zeigen (Giroux *et al.*, 1999; Mikula *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Saxton *et al.*, 2001; Wojnowski *et al.*, 1998), wurde im weiteren der Schwerpunkt auf ERK1/2 gelegt.

6 α_2 -Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in Embryonalgewebe

6.1 α_2 -Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung im Dottersack

Zunächst sollte untersucht werden, ob über eine Stimulation mit Brimonidin (UK14304) die Phosphorylierung von ERK1/2 initiiert werden kann. Die Stimulation von kultivierten Dottersäcken von WT- und α_{2ABC} -KO-Embryonen (Tag E 10,5) mit UK14304 zeigte, dass dies in WT-Dottersäcken möglich war. Dieser Effekt blieb in α_{2ABC} -KO-Dottersäcken aus, was als Beleg dafür gewertet wurde, dass der WT-Effekt eindeutig α_2 -Rezeptor-vermittelt war (siehe Abbildung 29).

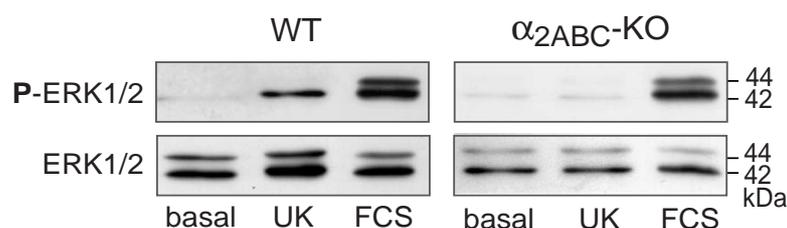


Abb. 29: Western Blot von kultivierten Dottersäcken unter basalen Bedingungen und nach Stimulation (10 min) mit 1 μ M UK14304 bzw. 10 % FCS als Kontrolle. Die obere Reihe zeigt die jeweiligen Blots gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2, die untere die gegen die unphosphorylierte Form. Da bei den ERK1/2-Banden keine großen Unterschiede erkennbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass überall gleich viel Protein geladen wurde. Dies wurde außerdem mittels Hybridisierungen gegen β -Actin überprüft (nicht gezeigt). Es ist ein Beispiel aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt.

6.2 α_2 -Vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in der Plazenta

Da die Plazenta von α_{2ABC} -KO-Embryonen auch einen mütterlichen Anteil des Genotyps ($\alpha_{2A-/-B+/-C-/-}$) enthielt, wurde die ERK-Phosphorylierung in der Plazenta nicht im Western Blot, sondern mittels Immunhistochemie im Gewebeschnitt detektiert. Anhand von frisch präparierten WT-Plazenten (E10,5) konnten die MAP-Kinasen ERK1/2 in allen Teilen der Plazenta lokalisiert werden. Die Stimulierung von α_{2AC} -KO-Plazenten mit dem α_2 -Agonisten UK14304 (1 μ M, 30 min) führte jedoch nur in den Riesenzellen und den Spongiotrophoblastzellen zu einem phospho-ERK-Signal. Das waren eben jene Zelltypen, denen in der Autoradiographie die α_2 -Rezeptorexpression zugeordnet werden konnte. Die Färbung innerhalb des Zellkerns bei α_{2AC} -KO-Plazenten zeigte darüberhinaus, dass durch die α_2 -Rezeptorstimulation ERK1/2 nicht nur phosphoryliert wurden, sondern auch aktiviert wurden. Bei Plazenten von α_{2ABC} -Embryonen blieb diese Phosphorylierung erwartungsgemäß aus.

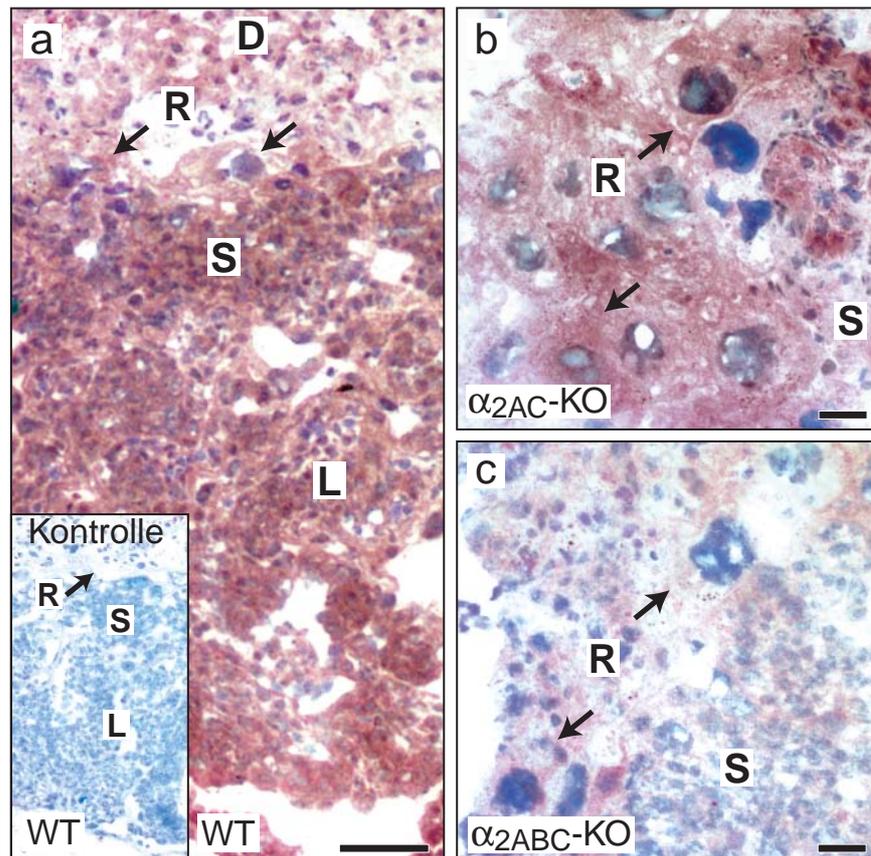


Abb. 30: ERK1/2-Phosphorylierung in der Plazenta durch den α_2 -Agonisten UK14304. Immunhistochemie an Kryostatschnitten (Tag E10,5). a) Übersicht über eine unstimulierte WT-Plazenta, in der ERK1/2 weit verteilt ist. Die kleine Insertion unten links zeigt die Kontrolle, bei der die Färbung ohne den spezifischen Antikörper gegen ERK1/2 durchgeführt wurde. D, Dezidua, L, Labyrinth, R, Riesenzellen, S, Spongiotrophoblast. Maßstab:

30 μm . b,c) Ausschnitte aus Plazenten von α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryonen, die 30 min mit 1 μM UK14304 behandelt wurden. Deutlich erkennbar ist die braune Färbung der Riesenzellen in Zellkern und Cytoplasma und in den Spongiotrophoblastzellen. Die Zellkerne wurden jeweils mit Giemsa gegengefärbt. Gezeigt ist ein Beispiel aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßstab: 10 μm (b,c).

6.3 Basale ERK1/2-Phosphorylierung in frisch präpariertem Embryonalgewebe von α_{2ABC} -KO-Embryonen

Da nun feststand, dass ERK1/2 durch α_2 -Rezeptoren bedingt in Embryonalgewebe phosphoryliert werden kann, sollte überprüft werden, wie stark die ERK1/2-Phosphorylierung in vivo war. Gewebe von α_{2ABC} -KO-Embryonen sollte weniger von der aktiven Form von ERK1/2 enthalten. Deshalb wurde der Grad der Phosphorylierung per Western Blot-Analyse in frisch präpariertem Gewebe untersucht. Tatsächlich war dieser verglichen mit Material von α_{2AC} -KO-Embryonen in Gewebe von α_{2ABC} -KO-Embryonen deutlich verringert, obgleich die Menge an ERK1/2-Protein nicht differierte. So lag in der Plazenta ungefähr ein Drittel weniger von der phosphorylierten Form vor und im Dottersack war praktisch keine Phosphorylierung mehr vorhanden, obwohl die Expression von ERK1/2 an sich durch die zunehmende α_2 -Deletion unbeeinflusst geblieben war (siehe Abbildung 31).

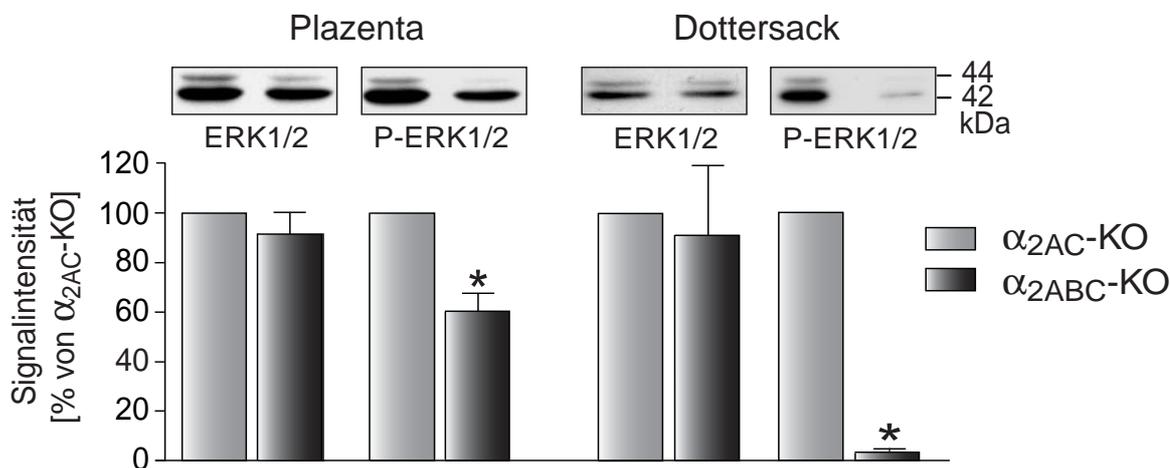


Abb. 31: Graphische Darstellung der Western Blot-Analyse des Gehaltes an unphosphoryliertem und phosphoryliertem ERK1/2 in frisch präpariertem Plazenta- und Dottersackmaterial von α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryonen an Tag E10,5. Die Blots zeigen ein Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten, die entsprechenden Säulen stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. * $p < 0,05$ α_{2ABC} -KO versus α_{2AC} -KO.

6.4 Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase

Deletion des Gens für p38 MAPK führt bei Mäusen infolge einer ungenügenden Plazentavaskularisierung zum gleichen Zeitpunkt wie bei den α_{2ABC} -KO-Embryonen zur embryonalen Letalität. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsgrad von p38 in frisch präpariertem Dottersackgewebe kontrolliert. Der Western Blot zeigte,

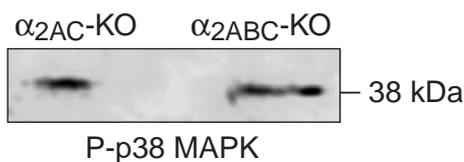


Abb. 32: Western Blot mit Dottersackgewebe an Tag E10,5. Verglichen mit α_{2AC} -KO-Embryonen war der phospho-p38 MAP-Kinase-Gehalt unverändert.

dass sich der α_{2ABC} -KO nicht vom α_{2AC} -KO unterschied (siehe Abbildung 32). Von daher wurde eine Involvierung des p38 MAP-Kinase-Wegs innerhalb der embryonalen Letalität von α_{2ABC} -KO-Embryonen ausgeschlossen.

6.5 cAMP-Konzentration in extraembryonalen α_{2ABC} -KO-Geweben

Um zu überprüfen, inwieweit die fehlende ERK-Aktivierung bei α_{2ABC} -KO spezifisch war oder auch andere α_2 -Rezeptor-vermittelte Signalwege betraf, wurden die Konzentrationen von cAMP in frisch präpariertem Material (Tag E10,5) von WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryos gemessen (siehe Abbildung 33).

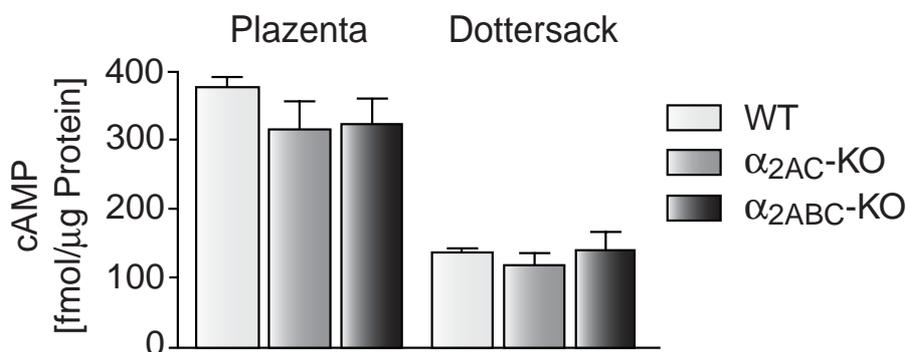


Abb. 33: cAMP-Konzentration in Plazenta und Dottersack von WT-, α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Embryonen (E10,5). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der cAMP-Konzentration bezogen auf die Proteinmenge im Eluat von jeweils 5 Materialproben pro Gewebe. Weder bei der Plazenta noch

beim Dottersack differierten die einzelnen Genotypen voneinander. Die Analyse von Embryonen ergab ebenfalls keinen Unterschied in den cAMP-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis verdeutlichte, dass selektiv nur die Signaltransduktion in Richtung ERK1/2 gemindert war. Die Deletion aller 3 α_2 -Rezeptorsubtypen führte zu keiner Veränderung der cAMP-Konzentration.

7 Wechselwirkung zwischen α_2 -Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die im Laufe der Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die verminderte ERK1/2-Phosphorylierung einzig und allein durch das Fehlen aller α_2 -Rezeptoren bedingt war, oder ob nicht eine Wechselwirkung mit anderen, die MAP-Kinasen stimulierenden Rezeptoren verantwortlich war. In der Literatur sind mehrere Fälle beschrieben, in denen die ERK1/2-Aktivierung durch ein Interagieren von GPCRs und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) erklärt werden kann.

Aus diesem Grunde wurden im letzten Teil dieser Arbeit Experimente durchgeführt, die einen möglichen molekularen Mechanismus der Interaktion zwischen α_2 -Rezeptoren und RTKs aufklären sollten. Zur Untersuchung dieser Wechselwirkung sollte zuerst ein Zellkultursystem etabliert werden. Erst in späteren Versuchen war eine Übertragung auf die bereits vorher eingesetzte Organkultur von Dottersäcken geplant, um die physiologische Relevanz des Zusammenspiels von α_2 -Rezeptoren und RTKs aufzuzeigen. Die Zellkulturversuche wurden mit HEK293-Zellen durchgeführt, die transient mit dem α_{2B} -Rezeptor und dem PDGF β -Rezeptor transfiziert waren. Die Wahl fiel auf den α_{2B} -Rezeptor, weil dieser den dominanten α_2 -Rezeptorsubtyp in der Plazenta darstellt und wohl auch maßgeblich für die embryonale Letalität der α_{2ABC} -KO-Mäuse verantwortlich ist. Als möglicher Interaktionspartner wurde der PDGF β -Rezeptor ausgesucht, da nicht nur die PDGF β -Rezeptor-KO-Maus einen teilweise letalen Phänotyp zeigt, der in Teilen dem der α_{2ABC} -KO-Embryonen ähnelt, obgleich er erst zu einem viel späteren Zeitpunkt eintritt als bei den α_{2ABC} -KOs (Soriano, 1994), als auch die PDGF-BB-KO-Maus. Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl der PDGF β -Rezeptor als auch seine Liganden in der Plazenta exprimiert werden (Leveen *et al.*, 1994).

7.1 Kinetik der α_2 -Rezeptor-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung

Zu Beginn der Suche nach einer möglichen Wechselwirkung mußten die Versuchsbedingungen sowohl für die Experimente mit dem Zellkulturmodell als auch für die Untersuchungen an embryonalem Material ausgetestet werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit der DNS für den α_{2B} -Rezeptor transient transfiziert, nach 48 Stunden über Nacht in FCS-freiem Medium kultiviert und anschließend verschieden lang mit dem Agonisten UK14304 (1 μ M) stimuliert. Wie Abbildung 34 zeigt, ist eine α_2 -Rezeptor-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung bereits nach 5 bis 10 min Stimulation gut detektierbar.

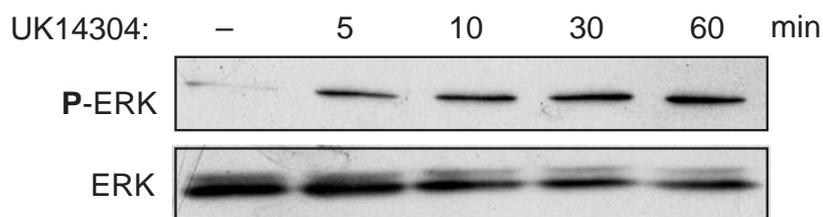


Abb. 34: Western Blot-Analyse der Lysate von α_{2B} -transfizierten HEK293-Zellen, die nach 12stündiger Kultur in serumfreiem Medium über den oben bezeichneten Zeitraum hinweg mit dem α_2 -Agonisten UK14304 in einer Konzentration von 1 μ M stimuliert wurden.

7.2 Kinetik der PDGF β -Rezeptor-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung

Für den PDGF β -Rezeptor wurde in der gleichen Weise verfahren. Der Western Blot zeigte, dass nach 10 min Stimulation mit 30 ng/ml PDGF-BB die Phosphorylierung von ERK1/2 zuverlässig nachweisbar war (siehe Abbildung 35).

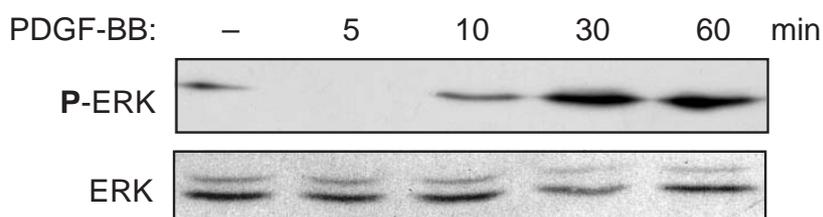


Abb. 35: Western Blot-Analyse der Lysate von PDGF β -Rezeptor-transfizierten HEK293-Zellen, die nach 12stündiger Kultur in serumfreiem Medium 5 bis 60 min mit 30 ng/ml PDGF-BB stimuliert wurden.

7.3 ERK1/2-Phosphorylierung nach Co-Stimulation mit UK14304 und PDGF-BB in HEK293-Zellen

Im nächsten Schritt wurden HEK293-Zellen mit DNS für den α_{2B} - und den PDGF β -Rezeptor co-transfiziert und anschließend 10 min stimuliert. Die gleichzeitige Behandlung mit UK14304 und PDGF-BB wirkte sich verglichen mit den Effekten der Einzelstimulationen mit UK14304 oder PDGF-BB überadditiv auf die ERK1/2-Phosphorylierung aus (siehe Abbildung 36). Das ließ den Schluß ziehen, dass eine Wechselwirkung zwischen den beiden unterschiedlichen Rezeptoren stattfindet, welche die Aktivierung von ERK1/2 verstärkt. Im Kontrollversuch mit untransfizierten Zellen

wurde keine Stimulierung durch UK14304 oder PDGF-BB erreicht (nicht gezeigt).

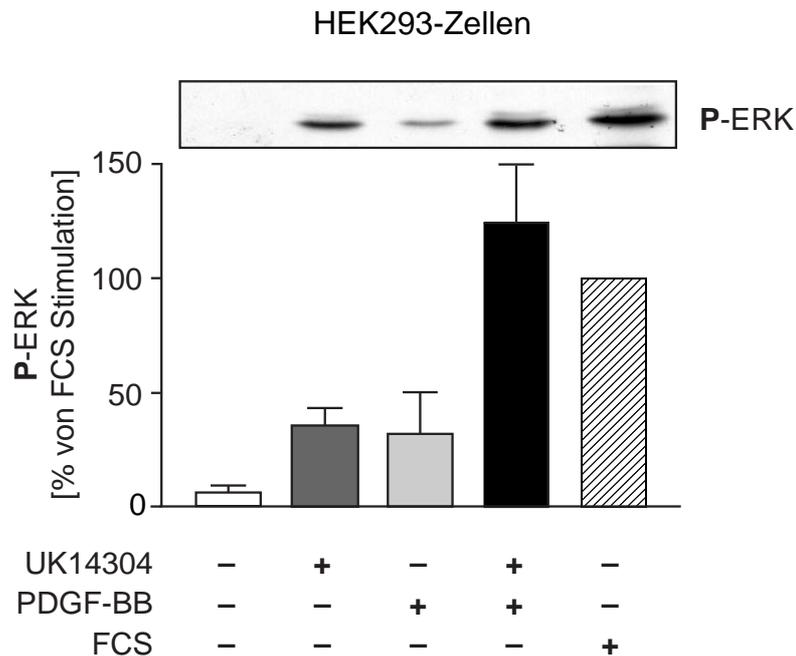


Abb. 36: ERK1/2-Phosphorylierung in α_{2B} -/PDGF β -Rezeptor-co-transfizierten HEK293-Zellen. Die Effekte der Einzelstimulationen mit 1 μ M UK14304 und 30 ng/ml PDGF-BB lagen deutlich über dem basalen Wert der Phosphorylierung. Nach Co-Stimulation erreichte die Phosphorylierung das gleiche Ausmaß wie unter Kontrollbedingungen mit 10 % FCS. Die Intensität der Banden wurde jeweils auf die der FCS-Bande normalisiert. Gezeigt sind ein Beispielblot und die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

7.4 ERK1/2-Phosphorylierung nach Co-Stimulation mit UK14304 und PDGF-BB in Dottersäcken

Bislang ist im wesentlichen in Krebszell-Linien gezeigt worden, dass eine Wechselwirkung von GPCRs und RTKs physiologisch gesehen eine Rolle spielt (Prenzel *et al.*, 1999). Um nun Hinweise zu finden, dass ein solches Zusammenspiel von GPCRs und RTKs auch während der Entwicklung eine lebensnotwendige Voraussetzung sein könnte, wurden Versuche mit Dottersäcken von Tag E10,5 durchgeführt. Im ersten Schritt sollte mithilfe von Dottersäcken von WT-Mäusen die Übertragbarkeit des Zellkulturmodells auf ein wichtiges Organ während der Embryonalentwicklung und damit auch die *in vivo*-Relevanz der Zellkulturversuche überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Dottersäcke über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die endogenen α_{2B} - und PDGF β -Rezeptoren in der gleichen Weise wie

die transfizierten Zellen für 10 min stimuliert (siehe Abbildung 37). Der in den HEK-Zellen beobachtete, überadditive Effekt einer Co-Stimulation trat in der gleichen Weise in den Dottersäcken auf, was deutlich machte, dass eine Interaktion von GPCRs und RTKs auch in dem embryonalen Gewebe stattfindet, welches im Falle der α_{2ABC} -KO-Embryonen schwerwiegend geschädigt ist und wohl maßgeblich zu deren embryonaler Letalität beiträgt.

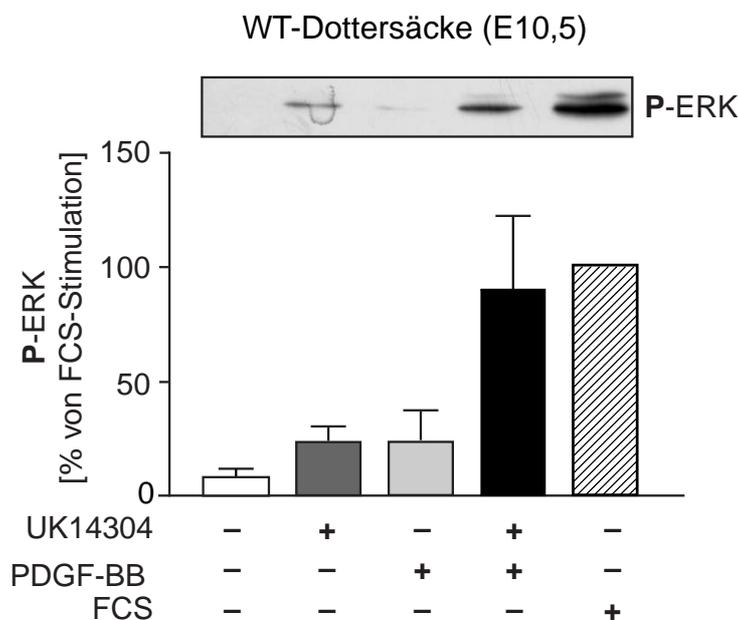


Abb. 37: ERK1/2-Phosphorylierung in WT-Dottersäcken (E10,5). Ebenso wie bei den Zellversuchen lag der Effekt der Einzelstimulation mit 1 μ M UK14304 oder 30 ng/ml PDGF-BB über dem basalen Wert der Phosphorylierung. Nach Co-Stimulation erreichte die Phosphorylierung ebenfalls den gleichen Grad wie die FCS-Kontrolle (10% FCS). Die Intensität der Banden wurde jeweils auf die FCS-Bande normalisiert. Dargestellt ist ein Beispielblot aus vier unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

7.5 Transaktivierung in α_{2ABC} -KO-Dottersäcken

Zur Beleuchtung des möglichen Mechanismus der Wechselwirkung zwischen GPCRs und RTKs in embryonalem Gewebe wurden α_{2ABC} -KO-Dottersäcke über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Diese Dottersäcke wurden am nächsten Tag in eine Co-Kultur mit HEK293-Zellen überführt, die transient mit dem α_{2B} -Rezeptor transfiziert waren. Nach Stimulation des α_{2B} -Rezeptors in den Zellen mit 1 μ M UK14304 wurden die Dottersäcke sofort eingefroren und die Zellen lysiert. Die nachfolgende Western

Blot-Analyse zeigte auch in den α_{2ABC} -defizienten Dottersäcken ERK1/2-Phosphorylierung (siehe Abbildung 38), obwohl die Expression von ERK1/2 an sich unverändert blieb. Als Kontrolle wurden Western Blots für β -Aktin durchgeführt, die zeigten, dass es keine gravierenden Variationen in der geladenen Proteinmenge gab und außerdem Western Blots von den stimulierten Zellen aus der Co-Kultur, um zu demonstrieren, dass die ERK1/2-Phosphorylierung α_{2B} -mediert war. Somit wurde die ERK1/2-Aktivierung in den α_{2ABC} -Dottersäcken auf eine α_{2B} -Rezeptor-vermittelte Transaktivierung von RTKs zurückgeführt, die durch die Sekretion eines Botenstoffs in den Extrazellularraum zustande kam. Der Mechanismus der beobachteten Interaktion zwischen α_{2B} -Rezeptor und PDGF β -Rezeptor schien damit geklärt und aufgrund der Verwendung von α_{2ABC} -KO-Dottersäcken auch eine physiologische Relevanz bewiesen. Als letzte Kontrolle sollten jedoch diese Versuche mit untransfizierten HEK-Zellen wiederholt werden, um zu zeigen, dass wirklich eine α_{2B} -Rezeptor-vermittelte Transaktivierung vorliegt.

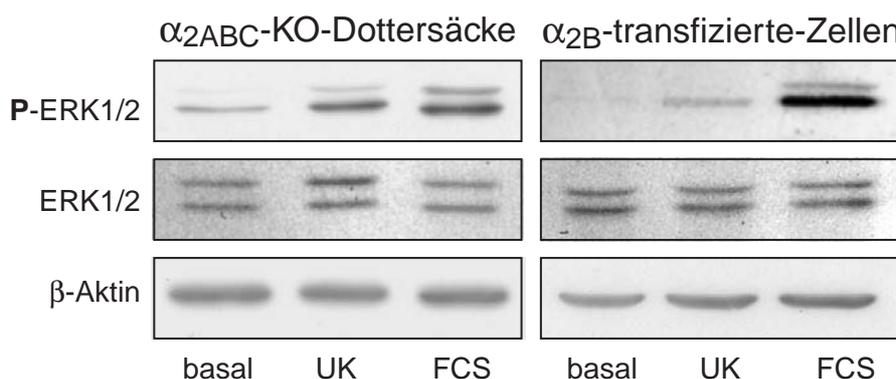


Abb. 38: Western Blot-Analyse der Transaktivierung von RTKs in α_{2ABC} -KO-Dottersäcken (Tag E10,5). Serumfreie Co-Kulturen von transient transfizierten HEK293-Zellen und α_{2ABC} -KO-Dottersäcken wurden jeweils 10 min mit 1 μ M UK14304 oder 10 % (V/V) FCS stimuliert. Es sind Beispielblots aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

V. Diskussion

Untersuchungen am Menschen sind nur allzu oft Grenzen gesetzt, die mithilfe geeigneter Tierversuche überschritten werden können. Zum einen, weil die Zeitspanne zur Erlangung der Erkenntnisse deutlich kürzer ist, und zum anderen weil viele Versuche noch innerhalb der ethischen Grenzen durchgeführt werden können, die am Menschen undenkbar wären. So kann unter Zuhilfenahme von Mäusen, deren Genom gezielt modifiziert wurde, großes Wissen über komplexe Mechanismen sowohl auf physiologischer als auch auf molekularer Ebene erlangt werden. Transgene Mäuse mit Deletionen für α_2 -Rezeptoren lieferten in den letzten Jahren bereits weit reichende Erkenntnisse über die Regulation des Blutdrucks oder auch der Signalweiterleitung innerhalb des Nervensystems. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Forschung an α_2 -Rezeptoren noch lange nicht am Ende ist, sondern immer wieder demonstriert, welche wichtige Rolle α_2 -Rezeptoren während des Lebens spielen.

1 Untersuchung von α_2 -Doppel-KO-Mäusen

α_2 -Rezeptoren lassen sich in drei Subtypen untergliedern, die trotz großer Homologien deutliche Unterschiede aufweisen. Apparent wurden diese Divergenzen nicht zuletzt durch die Untersuchung von Mäusen, denen ein oder zwei α_2 -Rezeptoren durch homologe Rekombination aus dem Genom entfernt wurden. Bislang sind drei Einzel-KOs für α_2 -Rezeptoren und der Doppel-KO von α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptor bekannt (Altman *et al.*, 1999; Hein *et al.*, 1999; Link *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1996). Im Zuge dieser Arbeit wurden die verbleibenden möglichen KO-Mäuse durch Kreuzung generiert. Dabei zeigte sich, dass zwar α_{2AB} -Rezeptor-KO-Mäuse ebenso wie die bereits vorhandenen α_{2AC} -Rezeptor-KO-Mäuse ungefähr zu dem nach Mendel vorhergesagten Prozentsatz geboren wurden (Hein *et al.*, 1999), es jedoch schwer fiel, die Zucht von α_{2BC} -Rezeptor-defizienten Mäusen aufzubauen, da nur 22 % der erwarteten Mäuse mit einer Deletion für α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptoren geboren wurden. Auch die α_{2B} -KO-Tiere wurden bei heterozygoter Verpaarung nur zu einem deutlich verringerten Prozentsatz geboren (Link *et al.*, 1996), weshalb bereits von anderen Wissenschaftlern ein Zusammenhang der α_{2B} -Deletion mit embryonaler Letalität diskutiert wurde (Cussac *et al.*, 2001). Darüber

hinaus gelang die Rückkreuzung der vorhandenen α_{2B} -KO-Mäuse (C57BL/6J, DBA/2J) auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund (C57BL/6J) nicht zufriedenstellend. Nach den erforderlichen 10 Rückkreuzungsschritten wurde aus mehr als 180 Nachkommen nur eine Maus erhalten, die ein homozygoter α_{2B} -KO auf kongenem Hintergrund war. Eine weitere Verpaarung dieses Männchens brachte α_{2B} -KO-Nachkommen nur mit einem Weibchen, in dessen Genom noch eine Kopie für den α_{2B} -Rezeptor intakt war (persönliche Mitteilung von Marc Brede, Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg). Diese Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch den α_{2B} -Rezeptor wird in einem späteren Abschnitt bei der Besprechung der Dreifach-KOs näher beleuchtet. Neben der verminderten Zahl wiesen die beiden neu generierten Doppel-KO-Linien keine dramatischen Auffälligkeiten auf, weshalb die α_{2AB} -KOs auch bedenkenlos für weitere Studien mit dem Anästheticum Etomidate eingesetzt wurden. Dies soll innerhalb dieser Arbeit aber nicht besprochen werden. Allerdings erkrankten Mäuse bei gleichzeitigem Fehlen von α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptoren an einer fortschreitenden Herzhypertrophie, die schlußendlich zu einer tödlichen Herzinsuffizienz führt (Hein *et al.*, 1999). α_{2AB} -KO-Mäuse zeigten keinerlei Anzeichen von kardiovaskulären Erkrankungen. Eine mögliche Auswirkung des α_{2AB} -KOs auf metabolische oder andere physiologische Parameter wurde nicht untersucht, so dass pathologische Veränderungen in diesen Bereichen nicht ausgeschlossen werden konnten. α_{2BC} -Rezeptor-KO-Mäuse hingegen wiesen ähnlich wie α_{2C} -KO-Mäuse nicht nur einen erstaunlich schnellen Zuwachs an Körpermasse, sondern auch eine erhöhte Angriffsbereitschaft auf (Sallinen *et al.*, 1998). Jedoch blieb auch dieser Befund ohne weitere Hinterfragung. Die Untersuchung des Herzens von α_{2AB} -KOs und α_{2BC} -KOs brachte keine verlässlichen Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Herzens. Allerdings zeigte die Sirius Rot-Färbung des α_{2BC} -KO-Herzens möglicherweise eine beginnende Fibrosierung des Herzens, die häufig mit einer Kardiomyopathie einhergeht. Prinzipiell scheint eine Beeinträchtigung der Herz-physiologie bei α_{2BC} -KOs nicht gegeben. α_{2B} -KO-Mäuse unterliegen bis auf die fehlende Gefäßdilatation nach α_2 -Stimulation keinerlei Einschränkungen von kardiovaskulären Funktionen (Link *et al.*, 1996), doch scheint dieser Rezeptor trotzdem eine relevante Rolle im Herz-Kreislaufsystems zu spielen. Untersuchungen am Menschen zeigten, dass es für den α_{2B} -Rezeptor einen Polymorphismus gibt, der bei Finnen mit einer Häufigkeit von 17% auftritt (Snapir *et al.*, 2001) und zu einer erhöhten Inzidenz für Myokardinfarkte führt. Dieser Polymorphismus ist durch eine Deletion von drei Glutamatresten in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors charakterisiert (α_{2B} 301-303Del) (Heinonen *et al.*, 1999), wo die Phosphorylierung des Rezeptors nach Agoniststimulation und die darauf folgenden Arrestinbindung stattfindet (Eason *et al.*, 1996). Durch die Deletion kann der Rezeptor weniger leicht desensibilisieren (Small *et al.*, 2001). Damit stellt ein

solcher mutierter Rezeptor allerdings das genaue Gegenteil eines KOs dar, da er nicht mehr „abgeschaltet“ werden kann. Dem gegenüber steht der Polymorphismus des α_{2C} -Rezeptors, der ebenfalls innerhalb der dritten intra-zellulären Schleife liegt, in einem funktionsdefizienten Rezeptor mündet (Small *et al.*, 2000) und ebenfalls das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse erhöht (Brede *et al.*, 2002; Liggett *et al.*, 2002). Dieser funktionelle „KO“ des α_{2C} -Rezeptors ist vergleichbar mit der α_{2C} -KO-Maus, die nach Aortenstenose schlechtere Überlebenschancen besitzt als eine vergleichbare WT-Maus (Brede *et al.*, 2002). Inwieweit aber das gleichzeitige Fehlen von α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptor eine wirkliche Beeinträchtigung der kardiovaskulären Funktionen unter basalen Bedingungen bewirkt, kann anhand der Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, nicht beantwortet werden.

2 Embryonale Letalität von α_{2ABC} -KO-Mäusen

Weit drastischer äußerte sich die Tragweite einer Deletion aller drei α_2 -Rezeptoren. Bei dem Versuch, eine solche Mauslinie durch Kreuzen zu erhalten, zeigte sich, dass das Fehlen von allen drei α_2 -Subtypen zum intrauterinen Tod führt: Von mehr als 200 Mäusen wurde nur eine Maus geboren, die keinerlei α_2 -Rezeptoren mehr exprimierte. Die Rolle, die α_2 -Rezeptoren in diesem Zusammenhang spielen, sollte nun untersucht werden. In veröffentlichten Arbeiten wurde bereits auf eine mögliche Involvierung von α_2 -Rezeptoren in die Embryonalentwicklung der Maus hingewiesen.

Der Embryonalentwicklung liegen weit verzweigte Mechanismen zugrunde. Kritisch für die embryonale Entwicklung der Maus sind mehrere Zeitpunkte: So können Fehler in der Entwicklung während der Implantation auftreten, die noch im Blastozystenstadium zum Tod führen, wie es beispielsweise beim KO für Grb2 der Fall ist (Cheng *et al.*, 1998). Es gibt auch letale Entwicklungsdefekte nach erfolgter Implantation (Ohba *et al.*, 2001), solche, die während der Plazentogenese auftreten (Giroux *et al.*, 1999; Mikula *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Regan *et al.*, 2002; Saxton *et al.*, 2001; Voss *et al.*, 2000; Wojnowski *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000) und Störungen der eigentlichen Organogenese, die zum Tod führen (Johnson *et al.*, 1997; Leveen *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1997; Montuenga *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 1994). Durch kontrollierte Verpaarung konnten Embryonen gezielt zu bestimmten Zeitpunkten der 21 Tage dauernden Embryonalentwicklung entnommen werden und somit das Zeitfenster festgelegt werden, wann α_{2ABC} -KO-Embryonen sterben, nämlich um Tag E10,5 herum. In dieser Phase der murinen Embryonalentwicklung sind in der Literatur im großen und ganzen drei Ursachen beschrieben, die zum Absterben des Embryos führen. Zum einen schwerwiegende neurologische Defekte, wie eine Exencephalie bei Jnk1/2-KO-Mäusen

(Kuan *et al.*, 1999), außerdem die unzureichende Entwicklung innerhalb des Herzkreislauf-Systems, an denen unter anderem p38 MAPK-KO-Mäuse und ERK5-KO-Mäuse leiden (Mudgett *et al.*, 2000; Regan *et al.*, 2002), aber es sind schließlich auch letale Phänotypen beschrieben, die in Defekten extraembryonaler Organe begründet liegen (Tanaka *et al.*, 1997). Der Vergleich von α_{2ABC} -KO-Embryonen mit WT- oder α_{2AC} -KO-Embryonen machte deutlich, dass an Tag E10,5, wenn ein Großteil der α_{2ABC} -KO-Embryonen noch am Leben ist, keine gravierenden Entwicklungsdefekte am Embryo selbst zu finden sind, die als Todesursache gelten könnten. Am meisten ausgeprägt scheint eine Verzögerung im Schluß des Neuralrohrs zu sein, dessen Ränder nicht glatt, sondern gewellt waren. Auffällige Unterschiede tun sich aber erst ab Tag E11,5 auf, wenn die α_{2ABC} -KO-Embryonen bereits tot sind, da sie dann aufgrund des fehlenden Wachstums drastisch kleiner sind als WT- und α_{2AC} -KO-Embryonen und häufig schon nekrotischen Prozessen unterworfen sind. Daher konnten neurologische Entwicklungsdefekte als Grund für die Letalität ausgeschlossen werden. Die histologische Untersuchung des Herzens an Tag E10,5 ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine irreguläre Entwicklung. Die zu diesem Zeitpunkt erforderliche Trabekulation im Herzen konnte gezeigt werden. Damit grenzen sich α_{2ABC} -KO-Embryonen von anderen KOs innerhalb des adrenergen Systems ab. Sowohl β_1 -KO-Embryonen, als auch solche für TH, DBH oder für den Transkriptionsfaktor GATA3 erfahren eine Unterentwicklung des Herzens (Lim *et al.*, 2000; Rohrer *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995). Allerdings sterben alle diese auch später in der Embryonalentwicklung als α_{2ABC} -KO-Embryonen. Um abzuklären, ob nicht vielleicht ein funktioneller Defekt trotz der richtigen Herzmorphologie zum Tode führt, wurden die Herzfrequenzen der einzelnen Genotypen verglichen. TH-KO-Embryonen wiesen Bradykardien auf (Zhou *et al.*, 1995). Die Herzfrequenz von α_{2ABC} -KO-Embryonen unterschied sich aber bis Tag E9,5, wenn alle α_{2ABC} -KO-Embryonen noch leben, nicht von der von WT- oder α_{2AC} -KO-Embryonen. Bradykarde Veränderungen traten erst mit Tag E10,5 auf, wenn der Sterbeprozess bereits angelaufen war. Allerdings muß angemerkt werden, dass die Herzen von α_{2AC} -KO-Embryonen an Tag E10,5 ebenfalls deutlich langsamer schlugen, was jedoch nicht näher untersucht wurde. Deshalb kann man davon ausgehen, daß die in α_{2ABC} -KO-Embryonen auftretende Bradykardie konsekutiver Natur ist und nicht ursächlicher. Um α_{2ABC} -KO-Embryonen zusätzlich von TH- und DBH-KO-Embryos abzugrenzen, wurden Catecholaminbestimmungen durchgeführt. Diese zeigten, dass bei α_{2ABC} -KO-Embryonen keine Veränderung von L-DOPA-Spiegeln vorlag, was auf eine unveränderte Catecholaminsynthese schließen ließ. Schließlich ist in der Literatur beschrieben, dass die Stimulation von α_2 -Rezeptoren mit Clonidin zu einer verminderten L-DOPA-Konzentration führt, die Hemmung mit Idazoxan von cerebralen α_2 -Rezeptoren zu einer Erhöhung (Pi *et al.*, 1992), begründet

dadurch, dass α_2 -Rezeptoren, vor allem wohl der α_{2B} - und der α_{2C} -Subtyp, das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym der Catecholaminsynthese, die Tyrosinhydroxylase hemmen (Esteban *et al.*, 1996). Das Fehlen von α_2 -Rezeptoren sollte somit eher zu einer Erhöhung von L-DOPA führen, was jedoch in α_{2ABC} -KO-Embryonen nicht der Fall war. Der Grund hierfür könnte in einer nicht näher untersuchten Gegenregulation liegen. Insofern konnte die Letalität in einem verminderten Angebot von Noradrenalin, wie bei TH- und DBH-KOs, nicht begründet sein. Übrig blieb als eine der Hauptursachen für embryonale Letalität eine Fehlentwicklung der extraembryonalen Organe Plazenta und Dottersack. Die Expression von α_2 -Rezeptoren in diesen Organen war bislang nicht bekannt. Mithilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Embryo selbst an Tag E10,5, sondern auch Plazenta und Dottersack α_2 -Rezeptoren exprimieren. Nach den von Wang *et al.* erhobenen Daten sollte es zumindest im Embryo einen zeitlichen Verlauf der α_2 -Rezeptorexpression während der Embryonalentwicklung geben, bei dem die Zeitfenster für die subtypspezifische Expression jeweils kaum überlappten und α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptor erst lange nach dem α_{2A} -Rezeptor gebildet werden (Wang *et al.*, 1997). Dies sind allerdings Daten, die per *in situ*-Hybridisierung erhoben wurden, die verglichen mit der RT-PCR zwar eine zellspezifische Lokalisation erlaubt, aber auch eine höhere Detektionsgrenze hat. In Anbetracht der Tatsache, dass von den gleichen Autoren erklärt wird, dass die Catecholaminsynthese bis zur Stufe des Noradrenalins an Tag E9,5 bereits voll funktionsfähig ist, erscheint es nur logisch, dass auch schon α_2 -Rezeptoren existieren, die die Freisetzung von Noradrenalin regulieren könnten. Die viel früher einsetzende Bildung von α_2 -Rezeptoren ist deswegen schlüssiger, da α_{2ABC} -KO-Embryonen erst um Tag E14,5 sterben sollten, wenn die Vorhersage von Wang *et al.* zuträfe, weil erst dann alle α_2 -Rezeptoren exprimiert sind bzw. waren. Außerdem wurde von Wang *et al.* nicht untersucht, ob auch Plazenta und Dottersack α_2 -Rezeptoren bilden, was mit dieser Arbeit nun nachgewiesen wurde. Die vollständige Deletion von α_2 -Rezeptoren schien in der Tat zu letalen Defekten in der Entwicklung der beiden extraembryonalen Organen, nämlich Dottersack und Plazenta zu führen.

Der Dottersack ist die erste Stelle der Blutgefäßbildung im Zuge der Embryonalentwicklung (Palis *et al.*, 1995). Um Tag E7 formen sich aus dem Mesoderm, das über dem viszeralem Endoderm liegt, Blutinseln, die eine gemeinsame Vorstufe für die primitiven Erythrozyten und Gefäß bildende Endothelzellen darstellen (Choi *et al.*, 1998). Dadurch ist der Dottersack sehr schnell in der Lage, ein feines Netz von großen und kleinen Gefäßen zu bilden, über das der Embryo mit Nährstoffen und Gasen versorgt wird, wenn die Resorption von deciduaem Gewebe für die Ernährung des Embryos einerseits nicht mehr ausreicht, die Plazenta andererseits noch nicht so weit ausgebildet ist, als dass sie diese Aufgabe übernehmen könnte (Jollie *et al.*, 1990).

Ein zu kleiner Dottersack mit einem unterentwickelten Gefäßsystem führt daher meist zum Tod des Embryos, wie auch die KOs für den angiogenen Faktor VEGF und seine Rezeptoren zeigen (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995). Beim Menschen wird der Dottersackdiameter sogar genutzt, um Rückschlüsse über den zukünftigen Schwangerschaftsverlauf zu ziehen (Stampone *et al.*, 1996). Der Dottersack von α_{2ABC} -KO-Embryonen wies an Tag E10,5 einen Mangel an kleinen Gefäßen auf, es waren fast nur große erkennbar, so dass trotz uneingeschränktem Größenwachstums verglichen mit WT- und α_{2AC} -KO-Embryos eine ausreichende Versorgung des Embryos nicht mehr gewährleistet werden konnte. Dieser Phänotyp entsprach unter anderem dem KO für Mekk3, einer MAPKKK innerhalb des MAPK-Signalwegs (Yang *et al.*, 2000). Darüber hinaus war eine Ablösung des Endothels vom Endoderm zu sehen, die vergleichbar mit der im Ephrin B2-KO war und zu einem Zusammenbruch der Gefäße führte (Wang *et al.*, 1998). In diesem Abschnitt der Embryonalentwicklung entwickelt sich aber auch die Plazenta, die vom Dottersack die Aufgabe der embryonalen Versorgung übernimmt und darüber hinaus den mütterlichen Stoffwechsel und Blutfluß auf die Schwangerschaft abstimmt (Cross *et al.*, 2000). Die Bedeutung der Plazenta wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass beim Fehlen einer Plazenta der Embryo auch ohne offensichtliche Defekte stirbt (Rinkenberge *et al.*, 1997). α_{2ABC} -KO-Embryonen entwickelten zwar eine Plazenta, doch fehlte dieser, ebenso wie vorher dem Dottersack, eine ausreichende Vaskularisierung innerhalb des Labyrinths, das normalerweise durch eine feine Verästelung von embryonalen Blutgefäßen gebildet wird, deren Gerüst, die Trophoblastzellen, von mütterlichem Blut umflossen werden. Auf diese Art wird der Austausch zwischen Embryo und Mutter gewährleistet. Ist dies nicht möglich, wie es in vielen KOs für Proteine aus dem ERK1/2-Signalweg gezeigt ist, kommt es zum Absterben des Embryos (Giroux *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2000; Saxton *et al.*, 2001; Wojnowski *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Dass TH- oder DBH-KO-Embryonen nicht auch einem Plazentadefekt unterliegen, kann damit erklärt werden, dass die Stimulation von α_2 -Rezeptoren mit Catecholaminen durchaus noch möglich ist, da die Mutter aufgrund ihres heterozygoten Genotyps noch immer genug Catecholamine bilden kann. Im Falle der α_{2ABC} -KO-Embryonen kam es zu einer deutlichen Vergrößerung der Labyrinthstruktur mit einer signifikant verringerten Fläche von embryonalen Blutgefäßen. Dabei blieb die Anzahl der Gefäße und auch die darin enthaltenen Erythrozyten unverändert, was darauf hindeutete, dass der Fehler in der Verzweigung und in der Verteilung der Blutgefäße bestand und nicht in einem Ausbleiben der Vaskularisierung. Bedingt schien dies durch eine falsche Anordnung der Trophoblastzellen, in deren Astwerk die embryonalen Gefäße hineinwachsen. Die Trophoblastzellen der Plazenten von α_{2ABC} -KOs waren clusterartig innerhalb des Labyrinths verteilt und vergrößerten dadurch den

Diffusionsweg zwischen dem mütterlichem und dem embryonalen Blutkreislauf. Die „Verklumpung“ von Trophoblastzellen kam dabei nicht dadurch zustande, dass durch einen möglicherweise erhöhten mütterlichen Blutdruck innerhalb der Plazenta die mütterlichen Gefäße aufgeweitet wurden und embryonales Gewebe komprimierten. Ein abnormer maternaler Blutfluß innerhalb der Plazenta führt nämlich beim Menschen meist zwischen der 7. und 12. Schwangerschaftswoche zu einer Fehlgeburt (Jaffe *et al.*, 1995). Da jedoch weder die Anzahl noch die Fläche, die von mütterlichen Lakunen eingenommen wurde, im Vergleich zu WT- oder α_{2AC} -KO-Plazenten verändert war, konnte dies bei den α_{2ABC} -KOs ausgeschlossen werden. Der Defekt lag somit eindeutig auf der embryonalen Seite der Plazenta. Um dies näher zu charakterisieren, wurde im nächsten Schritt untersucht, wo und in welcher Menge α_2 -Rezeptoren in der Plazenta exprimiert werden. Für die menschliche Plazenta ist bekannt, dass sie mindestens 2 Subtypen an α_2 -Rezeptoren enthält, von denen etwa 60 % α_{2A} -Rezeptoren und 40 % α_{2B} -Rezeptoren sind (Falkay *et al.*, 1994). Die höchste Dichte von α_2 -Rezeptoren wird gegen Ende des ersten Trimesters erreicht, ein Entwicklungsstand, der in ungefähr dem entspricht, in dem die α_{2ABC} -KO-Embryonen sterben. Von da ab nimmt die Dichte zum Ende der Schwangerschaft hin ab, wobei dann vermehrt β -Rezeptoren exprimiert werden (Falkay *et al.*, 1985; Falkay *et al.*, 1994). Auch in Rattenplazenta scheinen α_2 -Rezeptoren gebildet zu werden, es ist aber nichts bekannt über die wirkliche Menge und Lokalisation. Zu diesem Zweck wurden Radioligandenbindungsstudien durchgeführt, die aufzeigten, dass die murine WT-Plazenta an Tag E10,5 etwa 200 fmol/mg α_2 -Rezeptoren enthielt, wovon sich α_{2AC} -KO-Plazenten, bei denen noch eine Kopie des Gens für den α_{2B} -Rezeptors auf der mütterlichen Seite vorhanden war, nicht unterschied. Dadurch war offensichtlich, dass die Plazenta der Maus in der Hauptsache nur α_{2B} -Rezeptoren besitzt. Durch Bindungsstudien mit α_{2ABC} -KO-Plazenten, die nur noch eine geringe Restbindung aufwiesen, wurde klar, dass praktisch alle diese Rezeptoren im embryonalen Teil der Plazenta lokalisiert sein mußten. Autoradiographieexperimente mit Plazenten brachten zum Vorschein, dass α_2 -Rezeptoren vornehmlich in Riesenzellen und dem darunter liegenden Spongiotrophoblasten exprimiert waren, also an einer Stelle, die ein direktes Bindeglied zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe darstellt. Die Riesenzellen spielen eine große Rolle während der Schwangerschaft. Sie verankern den embryonalen Teil der Plazenta im Uterus und drängen das mütterliche Gewebe durch die Sekretion von Proteasen zum kontrollierten Rückzug. Des weiteren stellen diese endoreduplizierenden Zellen (Nakayama *et al.*, 1998), an deren Ausdifferenzierung der Transkriptionsfaktor Mash-2 maßgeblich beteiligt ist (Tanaka *et al.*, 1997), die Quelle von vielen Wachstumsfaktoren und angiogenen Faktoren dar: Durch VEGF, welches in den Riesenzellen gebildet wird, und auch durch Proliferin wird die Vaskulogenese im Labyrinthsystem vorangetrieben

(Voss *et al.*, 2000), wohingegen vom Spongiotrophoblasten ausgeschüttetes Proliferin-verwandtes Protein (Prlr) und der lösliche VEGF-Rezeptor Flt die Einwanderung von mütterlichen Gefäßen regulieren (He *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1994; Linzer *et al.*, 1985). Auf diese Art befinden sich im embryonalen Teil der Plazenta nur Lakunen mütterlichen Blutes und keine vollwertigen Gefäße, aus denen die Diffusion schwieriger wäre. Darüber hinaus bewirken Adrenomedullin und NO, dass sich die mütterlichen Gefäße weiten, und setzen damit den Strömungswiderstand in der Plazenta herab (Gagioti *et al.*, 2000; Montuenga *et al.*, 1997). Möglich wird dies durch die Invasivität der Riesenzellen, die am Rande des embryonalen Teils der Plazenta die Endothelzellen der maternalen Gefäße ersetzen. Die *in situ*-Hybridisierung gegen die mRNA vom murinen plazentaren Lactogen 1 (mPL1), das von den Riesenzellen gebildet wird (Hall *et al.*, 1984; Nieder *et al.*, 1990) und im Organismus der Mutter einen Anstieg des Glucosestoffwechsels an die Schwangerschaft auslöst, ließ deutlich erkennen, dass diese in α_{2BAC} -KO-Plazenten ebenso wie WT- oder α_{2AC} -KO-Plazenten vorhanden waren. Desgleichen die Spongiotrophoblastschicht, die mithilfe des für diese spezifischen Trophoblastmarkers 4311 nachgewiesen wurde (Lescisin *et al.*, 1988). Das machte deutlich, dass nicht ganze Zelltypen aufgrund einer mangelhaften Entwicklung fehlen, sondern dass sie möglicherweise in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

3. Signaltransduktion in WT- und α_2 -KO-Geweben

α_2 -Rezeptoren vermögen eine Palette von Signalwegen zu beeinflussen: die cAMP-Bildung über eine Hemmung der Adenylatcyclase, die Aktivierung von ERK1/2, den Calciumeinstrom durch eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit spannungsgesteuerter Kanäle und die Öffnung von Kaliumkanälen. Die letzteren beiden Signalwege ließen sich nur äußerst schwierig untersuchen, weil dafür die Kultur von Zellen aus Dottersack und Plazenta hätte etabliert werden müssen. Das gelang leider nicht. Daher wurden nur Experimente mit ganzen Organen durchgeführt und diese nur bezüglich der anderen beiden Signalwege. Außerdem wurde von der Untersuchung der Embryonen weitgehend abgesehen, weil diese keine offensichtlichen Schäden aufwiesen und bereits die Catecholaminbestimmung zeigte, dass die Signaltransduktion in α_{2BAC} -KOs nur unwesentlich beeinträchtigt sein konnte. Die nähere Analyse der ERK1/2-Signalkaskade schien insofern nahe zu liegen, da der beobachtete plazentare Phänotyp der α_{2BAC} -KO-Embryonen dem von einigen KOs für Proteine aus dieser Kaskade entsprach, nämlich c-Raf, Sos und Mek1 und einer Punktmutante von Grb2 (Giroux *et al.*, 1999; Mikula *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Saxton *et al.*, 2001; Wojnowski *et al.*, 1998). Western Blots mit stimulierten WT-Dottersäcken zeigten, dass α_2 -

Rezeptoren sehr wohl die Phosphorylierung von ERK1/2 initiieren können. Ein Effekt, der in α_{2BAC} -KO-Dottersäcken nicht mehr nachweisbar war. Das gleiche war auch in kultivierten Plazentaschnitten möglich, nachdem diese stimuliert wurden. Obgleich ERK1/2 in der Plazenta ubiquitär exprimiert wird, ließ es sich doch nur in Riesenzellen und Spongiotrophoblastzellen in seiner phosphorylierten Form nach α_2 -Stimulation nachweisen. Dass ERK1/2 dort nicht nur phosphoryliert, sondern auch aktiviert wurde, konnte damit belegt werden, dass es in den Zellkern transloziert wurde, wo es Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. Diese Translokation von Phospho-ERK1/2 wurde für α_2 -Rezeptoren bisher nur in Zellen gezeigt (Cussac *et al.*, 2002). Dies hier ist (neben der generellen Lokalisation von ERK1/2) der erste Beweis für Gewebe. Wenn nun α_2 -Rezeptoren ERK1/2 in Dottersack und Plazenta spezifisch aktivieren können, sollte Phospho-ERK1/2 in α_{2ABC} -KO-Gewebe herunterreguliert sein. Dies war auch der Fall. Verglichen mit α_{2AC} -KO-Gewebe war in der Plazenta von α_{2ABC} -KO-Embryonen ERK1/2 um mehr als 30% weniger phosphoryliert und im Dottersack war praktisch kein Phospho-ERK1/2 mehr vorhanden. Der große Unterschied zwischen Dottersack und Plazenta läßt sich wohl damit erklären, dass die Plazenta höchstens zur Hälfte aus embryonalem und damit aus α_{2ABC} -KO-Gewebe besteht, so dass im mütterlichen Teil noch immer die Signalkaskade bis zur Phosphorylierung uneingeschränkt stattfinden kann. Andere MAP-Kinasen schienen unbeeinträchtigt zu sein, da Western Blots für die phosphorylierte Form von p38 MAPK keinen Unterschied zwischen α_{2AC} -KO- und α_{2ABC} -KO-Gewebe zeigten. Dies ist auch konsistent mit dem Phänotyp der KOs der anderen MAP-Kinasen, die sich entweder in einem schweren Herzfehler bzw. in neurologischen Defekten äußerten (Kuan *et al.*, 1999; Mudgett *et al.*, 2000; Regan *et al.*, 2002). Es bleibt aber die phänotypische Übereinstimmung mit den KOs für Proteine aus dem ERK1/2-Signalweg. Auch bei diesen ist die ERK-Aktivierung basal verringert und bleibt es nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren, wenn auch diese in der Literatur beschriebenen Versuche in der Regel mit Zellen nachgewiesen wurden und nicht, wie im Fall der α_{2ABC} -KOs mit den entsprechenden, geschädigten Organen (Mikula *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Saxton *et al.*, 2001). Dass bei diesen KOs häufig noch ERK1/2-Phosphorylierung gesehen werden konnte, liegt daran, dass meist ein anderer Baustein der Kaskade das Fehlen eines anderen bis zu einem gewissen Grade kompensieren kann, wie zum Beispiel A- und B-raf im Falle des C-raf-KOs. Die ERK1-KO-Maus selbst besitzt zwar einen Phänotyp (Mazzucchelli *et al.*, 2002), es ist jedoch nichts über einen ERK2-KO oder gar einen Doppel-KO und eine mögliche embryonale Letalität bekannt. Um deshalb zu verdeutlichen, dass die ERK1/2-Phosphorylierung den einzig relevanten Signalweg im Zusammenhang mit der α_{2ABC} -KO-Letalität darstellt, wurden Messungen der basalen cAMP-Konzentration durchgeführt. An sich war eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu erwarten,

da der Grad der Hemmung der Adenylatcyclase durch das Fehlen aller drei α_2 -Rezeptoren drastisch gesunken sein müsste. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen in Plazenta und Dottersack und ebenso wenig in Embryos beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Homöostase der cAMP-Konzentration in den beiden extraembryonalen Organen ist also nicht zwingend durch α_2 -Rezeptoren bedingt. Damit bleibt die α_2 -vermittelte ERK-Aktivierung der molekularbiologisch wichtigste Signalweg, der über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in den Riesenzellen möglicherweise die Bildung von Wachstums- und Angiogenesefaktoren initiiert und damit die Ausbildung des lebenswichtigen Labyrinthsystems. Nicht zuletzt wegen ihrer Lokalisation an der Schnittstelle zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe stellen α_2 -Rezeptoren somit eine Brückenfunktion zwischen Mutter und Embryo während der Entwicklung dar.

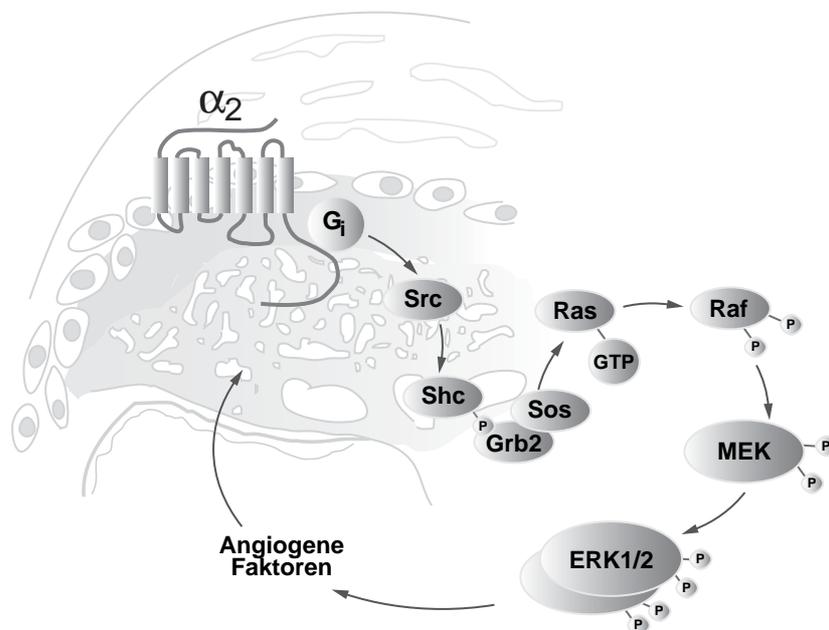


Abb. 39: α_2 -Rezeptoren sind essentiell für die ERK1/2-Aktivierung an der Bindestelle zwischen Mutter und Embryo und kontrollieren so die Entwicklung eines suffizienten Gefäßsystems.

Der wichtigste α_2 -Rezeptor in diesem Fall ist wohl der α_{2B} -Rezeptor, da sich dieser nicht nur durch seine subzelluläre Lokalisation von den anderen beiden abgrenzt, sondern auch der Rezeptorsubtyp ist, der hauptsächlich in der murinen Plazenta exprimiert wird. Dies wirft jedoch die Frage auf, ob die verminderte Zahl der Nachkommen bei α_{2B} -KO-Mäusen ebenfalls durch einen extraembryonalen Entwicklungsdefekt begründet liegt. So lange die α_{2B} -Deletion in einen gemischten genetischen Hintergrund eingebettet ist, ist sie nur partiell vorhanden. Jedoch nimmt sie mit steigender Zahl der

Rückkreuzungen auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu. Die histologische Untersuchung von Plazentaschnitten eines α_{2B} -KO-Embryos (Tag E10,5), der aus einer doppelt heterozygoten Verpaarung aus der sechsten Rückkreuzungsgeneration auf C57BL76J hervorging, legte den Verdacht nahe, dass der α_{2B} -KO kongen bedingt durch einen plazentaren Phänotyp embryonal stirbt (nicht gezeigt). Damit würde die Deletion eines α_2 -Rezeptors, nämlich des wichtigsten α_2 -Rezeptors in der Plazenta ausreichen, um eine embryonale Letalität hervorzurufen. Im Falle der α_{2ABC} -KOs scheinen jedoch drei α_2 -Rezeptoren für die embryonale Letalität verantwortlich zu sein, da sowohl α_{2AB} -KOs als auch α_{2BC} -KOs generiert werden konnten. Man kann aber mutmaßen, dass wohl α_{2B} -Rezeptoren einen embryonalen Mangel bei α_{2AC} -KOs kompensieren können und α_{2C} -Rezeptoren den von α_{2AB} -KOs, nicht jedoch α_{2A} -Rezeptoren zuverlässig den von α_{2BC} -KOs, da diese ebenfalls nur in einer stark verminderten Anzahl geboren werden. Das würde bedeuten, dass nicht nur der α_{2B} -Rezeptor maßgeblich an der Embryonalentwicklung beteiligt ist, sondern auch der α_{2C} -Rezeptor. Dies gilt aber nur auf einem gemischten genetischen Hintergrund. In der Literatur existieren mehrere Beispiele dafür, dass der genetische Hintergrund eine wichtige Rolle für den Phänotyp spielt. So ist der Zeitpunkt der embryonalen Letalität der C-Raf-KOs stark abhängig vom Mausinzuchtstamm (Wojnowski *et al.*, 1998). Bei TGF β 1-KOs tritt sogar ein ähnliches Phänomen wie bei den nicht zurückgekreuzten α_{2B} -KOs auf: Hier variiert das Ausmaß der genetischen Letalität in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund und nimmt mit zunehmendem Anteil von C57BL/6-Genen zu, was auf das Vorhandensein von sogenannten modifizierenden Genen zurückgeführt wurde (Kallapur *et al.*, 1999). Dieses hohe Maß an phänotypischer Variation führte dazu, dass Richtlinien für das Arbeiten mit genetisch manipulierten Mäusen festgelegt wurden: Demnach sind Mauslinien vorzuziehen, die auf einen Mausinzuchtstamm zurückgekreuzt wurden, der in den Laboratorien allgemein verbreitet ist (Banbury Conference on Genetic Background in Mice, 1997). Jedoch darf nicht außer acht gelassen werden, dass selbst nach 12 Generationen Rückkreuzung noch immer 1 % des ursprünglichen ES-Zell-Genoms in den genetisch manipulierten Mäusen vorhanden sein kann, was immerhin einer Anzahl von ungefähr 300 Genen entspricht (Gerlai, 1996). Damit können trotzdem modifizierende Gene übrig bleiben, die das mutierte Gen flankieren und auf diese Art beträchtlich den Phänotyp beeinflussen können. Die Versuche in dieser Arbeit wurden nur mit KO-Mäusen durchgeführt, die einen gemischten genetischen Hintergrund ihr eigen nennen. Die Tatsache, dass die α_2 -Rezeptor-bedingte embryonale Letalität auf gemischtem genetischem Hintergrund bei α_{2B} -KOs nur partiell und nur bei vollständiger α_2 -Deletion zu einer kompletten Penetranz führt, kongen jedoch wieder fast vollständig zu sein scheint, stellt keineswegs die vorher getroffenen Ergebnisse und Aussagen in Frage, sondern zeigt nur, dass mögliche modifizierenden Gene aus dem Inzuchtstamm

der ES-Zelle auch im Falle von bei α_2 -KO-Mäusen modulierend wirken und die Funktion der verbliebenen α_2 -Rezeptoren beeinflussen können. Unabhängig vom genetischen Hintergrund bleibt aber der Befund, dass der α_{2B} -Rezeptor der wichtigste α_2 -Rezeptor in der murinen Plazenta ist und die α_2 -Rezeptor-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung wohl eine hohe Relevanz für die normale Embryonalentwicklung aufweist.

4 Wechselwirkung von α_2 -Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen

Viele Wissenschaftler auf dem Gebiet der MAP-Kinasen postulieren eine Wechselwirkung zwischen RTKs und GPCRs. Dafür gibt es im großen und ganzen drei Modelle: 1. Nach Aktivierung bilden die zur Dimerisierung neigenden RTKs Heterodimere mit den GPCRS (Alderton *et al.*, 2001). Diese Heterodimerisierung wird als Voraussetzung für eine Signalweiterleitung in Richtung MAP-Kinase angesehen. Ein zweites Modell erklärt die G-Proteine als essentiell (Luttrell *et al.*, 1990), die vom aktiven GPCR in Richtung Effektor entlassen werden. Dem gegenüber stehen die Verteidiger der Transaktivierungstheorie (Prenzel *et al.*, 1999), die der Meinung sind, dass die Interaktion nicht direkt ist, sondern vom GPCR eine Signalkaskade aktiviert wird, die zur Sekretion eines Botenstoffs in den Extrazellularraum führt. Dadurch löst eine Matrixmetalloproteinase einen membrangebundenen Wachstumsfaktor von der Zelloberfläche, der den Wachstumsfaktorrezeptor stimuliert. Das Signal geht also über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor erst in die Zelle, dann wieder hinaus, um schließlich über den klassischen Weg wieder in die Zelle hineingeleitet die MAP-Kinase zu aktivieren (siehe Abbildung 39). Welcher Weg nun der einzig richtige ist oder ob es den einen wahren Weg gibt, ist noch nicht vollends geklärt. Möglicherweise variiert je nach Zelltyp und Rezeptor die Art der Interaktion. Es gibt aber zumindest für α_2 -Rezeptoren Hinweise, dass die MAP-Kinase-Phosphorylierung über eine Transaktivierung vonstatten geht (Cussac *et al.*, 2002).

Für die Untersuchungen der Wechselwirkung RTK- α_2 -Rezeptor wurde zum einen der α_{2B} -Rezeptor gewählt, da er der dominante α_2 -Subtyp in der Plazenta zu sein scheint und das zusätzliche Fehlen von diesem zur embryonalen Letalität führte. Zum anderen wurde der PDGF-Rezeptor β ausgesucht, da dieser und auch PDGF in der Plazenta gebildet werden und eine Rolle in der Vaskularisierung spielen. PDGF stellt einen mitogenen Faktor für Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Gliazellen dar und wird unter anderem in Endothelzellen und in Trophoblastzellen der Plazenta produziert (Ohlsson *et al.*, 1999). Es bildet einen Homo- oder Heterodimer aus A- und B-Kette, der die Dimerisierung des Rezeptor bewirkt. Die PDGF-B-KO-Maus weist Labyrinth-schäden mit dilatierten embryonalen Gefäßen und einer verminderten Anzahl von

Trophoblastzellen auf (Leveen *et al.*, 1994; Soriano *et al.*, 1994). Dies entspricht dem Defekt der α_{2ABC} -KO-Embryos, jedoch wird er erst ab Tag E13,5 offensichtlich. Unter der Voraussetzung, dass diese RTK möglicherweise einen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor für die Signalweiterleitung benötigt, erscheint es nicht weiter erstaunlich, dass beim Fehlen des Liganden schwerwiegende Entwicklungsschäden erst so spät aufkommen, denn bis dahin können ja noch immer die unbeeinflussten GPCRs MAP-Kinasen aktivieren und das Fehlen kompensieren bzw. andere G_i -gekoppelte Rezeptoren mit dem PDGF-Rezeptor interagieren.

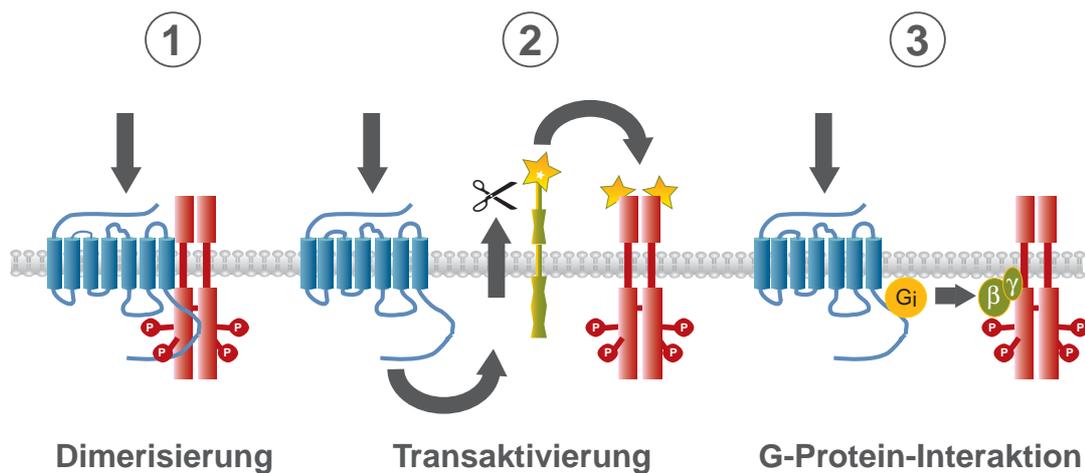


Abb. 40: Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen von GPCRs und RTKs. (1) Modell der Dimerisierung, (2) Transaktivierungsschema, (3) Wechselwirkung, bei der der GPCR sein G-Protein als Interaktionspartner bereitstellt.

PDGF-Rezeptoren können über eine Transaktivierung von Dopamin-Rezeptoren die ERK1/2-Phosphorylierung initiieren (Oak *et al.*, 2001). Der α_{2B} -Rezeptor vermag diese Aktivierung über EGF-Rezeptoren zu bewirken (Cussac *et al.*, 2002). Um nun eine mögliche Beeinflussung des PDGF-Rezeptors durch α_2 -Rezeptoren zu eruieren, wurden zu Beginn Zellkulturversuche mit transient transfizierten Zellen durchgeführt. Sowohl durch Agonist-vermittelte Stimulation des PDGF β -Rezeptors als auch des α_{2B} -Rezeptors konnten innerhalb von 5 bis 10 Minuten gut detektierbare ERK1/2-Phosphorylierungen erreicht werden. Die Stimulation von cotransfizierten Zellen zeigte einen überadditiven Effekt bei gleichzeitiger Stimulation mit dem α_2 -Agonisten UK14304 und PDGF-BB, der auf eine Interaktion der beiden Rezeptoren hinwies. Dies konnte auch mit kultivierten WT-Dottersäcken gezeigt werden, womit eine physiologische Relevanz dieser Wechselwirkung belegt wurde. Auch für die Riesenzellen der Plazenta scheinen solche Interaktionen von Bedeutung zu sein, da berichtet wurde, dass IGF II, ein RTK-Ligand, G_i -abhängig die Migration der Riesenzellen bedingt (McKinnon *et*

al., 2001). Der Befund, dass die gleichzeitige Stimulation von endogenen α_{2B} - und PDGF-Rezeptoren in WT-Dottersäcken zu einer ERK-Phosphorylierung führt, die die Summe der Phosphorylierung bedingt durch Einzelstimulation übersteigt, bedeutet zusammen mit dem kompletten Fehlen der ERK-Phosphorylierung in α_{2ABC} -KO-Dottersäcken den Beweis für die lebenswichtige Wechselwirkung zwischen GPCR und RTK. Der Mechanismus konnte mithilfe von Dottersäcken der α_{2ABC} -KO-Embryos teilweise aufgeklärt werden und stellt wohl eine Transaktivierung von RTKs durch α_2 -Rezeptoren dar. Diese Versuche sind der wohl erste Beleg für die physiologische Bedeutung der Transaktivierung von RTKs durch GPCRs im Rahmen der Embryonalentwicklung. Bisherige Transaktivierungsexperimente wurden allenfalls mit Zellen aus Tumoren oder der Niere durchgeführt (Cussac *et al.*, 2002; Prenzel *et al.*, 1999), aber nie mit ganzen Organen, die darüber hinaus noch im Fall der Dottersäcke einen wichtigen Beitrag zum Überleben während der Embryonalphase leisten.

5 Relevanz der erbrachten Befunde für die menschliche Embryonalentwicklung

Zwischen der Plazenta der Maus und der des Menschen gibt es einige Unterschiede, wobei der größte Unterschied in ihrem Aufbau besteht. Während die Maus-Plazenta sandwichartig strukturiert erscheint, wirkt die humane bedingt durch die größere Invasivität der den Riesenzellen analogen extravillösen Trophoblastzellen als seien mütterlicher und embryonaler Part enger und über eine weitere Strecke miteinander verflochten (Duc-Goiran *et al.*, 1999). Dem Spongiotrophoblast, wie er in der murinen Plazenta vorkommt, entspricht der Säulencytotrophoblast im Menschen. Außerdem sind die embryonalen Gefäße beim Menschen nicht wie bei der Maus von drei Trophoblastzellschichten umgeben, sondern nur von zweien. Daneben weichen die Paletten sezernierter Substanzen ein wenig voneinander ab. Aber nichtsdestotrotz gehören beide Plazenten zum hämochorialen Typ, bei dem Trophoblastzellen direkten Kontakt zum mütterlichen Blut haben. Somit bleiben Befunde, die mithilfe von Mäusen erstellt wurden, durchaus auf den Menschen übertragbar, zumal die menschliche Plazenta ebenfalls α_2 -Rezeptoren exprimiert. Die Plazentaentwicklung stellt einen essentiellen Schritt im Laufe der menschlichen Embryonalentwicklung dar, der bei fehlerhaftem Ablauf zu einem plötzlichen Abort führen kann. Allerdings gibt es (außer im Tierversuch) nur wenige Erkenntnisse über die Auswirkungen von Arzneimitteln auf die Entwicklung während der ersten drei Schwangerschaftsmonate. Viele Pharmaka werden daher aus Scheu, sie könnten sich nachteilig auf den Verlauf der Schwangerschaft auswirken, nicht während dieser eingesetzt. Nur bei wenigen wurde bislang der Schaden durch die Verabreichung so deutlich wie beim Thalidomid infolge des

Conterganskandals (Newman, 1977). Da es jedoch überaus unethisch ist, Versuche dahingehend am Menschen durchzuführen, bleiben als einzige Alternative Beobachtungen am Tier. Mithilfe der Tierversuche hat sich herausgestellt, dass Pharmaka, deren Zielstruktur α_2 -Rezeptoren sind, zu späteren Stadien der Embryonalentwicklung keine Gefahr darstellen. Die in dieser Arbeit erbrachten Befunde legen jedoch den Verdacht nahe, dass eine solche Medikation im ersten Trimenon der Schwangerschaft zu ernsthaften Beeinträchtigungen führen könnte. Ebenso birgt die Behandlung mit RTK-Hemmern große Gefahren. Im Tierversuch wurde eine teratogene Wirkung des Tyrosinkinasehemmers Imatinib aufgedeckt (Produktinformation der Firma Novartis zu Glivec[®], 2002), der EGF- und PDGF-Rezeptoren in ihrer Funktion inhibiert (Buchdunger, 2000). Damit bleibt abschließend zu sagen, dass α_2 -Rezeptoren, nicht zuletzt wegen einer wahrscheinlichen Interaktion mit Rezeptortyrosinkinasen, eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung spielen. Aufgrund ihrer Lokalisation zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe in der murinen Plazenta muß ihnen eine Brückenfunktion während der Embryonalentwicklung zugesprochen werden.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen aller α_2 -Rezeptoren zum intrauterinen Tod von Mäusen mit gemischtem genetischem Hintergrund führt. Diese embryonale Letalität ist bedingt durch eine unzureichende Vaskularisierung im Dottersack und innerhalb des Labyrinthsystems der Plazenta. Eben diese beiden extraembryonalen Organe sichern die Versorgung des Embryos mit Gasen und Nährstoffen, die aus dem mütterlichen Blut in das embryonale gelangen. Dabei ist der α_{2B} -Rezeptor derjenige von den drei α_2 -Rezeptoren, der in der größten Menge in der Plazenta exprimiert wird. Der Entwicklungsdefekt im Rahmen der Vaskularisierung scheint durch einen Ausfall der Signaltransduktion in Richtung der MAP-Kinasen zu entstehen und daraus folgend dem Verlust der Produktion wichtiger Faktoren für die Angio- und Vaskulogenese. Diese Faktoren wurden nicht näher untersucht. Um dem nachzugehen, wären halbquantitative RT-PCR-Experimente denkbar, die VEGF, Proliferin und andere Stoffe in der Art erfassen oder *in situ*-Hybridisierungen bzw. Western Blot-Analysen, sofern geeignete Antikörper erhältlich sind. Ein Ansatz, um den Befund zu stützen, dass α_2 -Rezeptoren dies durch den MAP-Kinase-Weg in den Riesenzellen bedingen, wären transgene Mäuse, die zelltypspezifisch eine konstitutiv aktive Mutante von Mek1 exprimieren. Durch Einkreuzen dieser Mäuse in die α_{2ABC} -KO-Mäuse sollten diese wieder lebensfähig sein. Noch schöner wäre in diesem Zusammenhang, wenn diese Mek1-Mutante zelltypspezifisch überexprimiert wäre oder zu bestimmten Zeitpunkten der Expression „angeschaltet“ werden könnte. Um der Interaktion zwischen α_{2B} - und PDGF-Rezeptoren während der Embryonalentwicklung

weiter auf den Grund zu gehen, wären Experimente denkbar, in denen Pertussistoxin als Inhibitor von G_i-Proteinen eingesetzt wird. Wenn neben der Transaktivierung wirklich eine Bereitstellung des G-Proteins vonnöten ist, sollte eine nachfolgende Stimulation von PDGF-Rezeptoren nur noch zu einer stark abgeschwächten Phosphorylierung von ERK1/2 führen. Außerdem könnte möglicherweise ein Komplex aus RTK und G-Protein nachweisbar sein. Um dem Mechanismus der Transaktivierung weiter nachzugehen, sollten ebenfalls Kontrollexperimente mit Pertussistoxin und mit Inhibitoren für verschiedene RTKs durchgeführt werden, um auf diese Art den angiogenen Faktor zu isolieren. Darüber hinaus wäre eine Übertragung auf die humane Plazentaentwicklung wünschenswert, so weit dies mit Gewebeproben von Abtreibungen und von plötzlichen Aborten möglich wäre. Dies könnte möglicherweise Hilfestellung leisten bei der Beantwortung der Frage, welche Rolle α_2 -Rezeptoren vor allem in Plazenta und Dottersack während der Schwangerschaft spielen und inwiefern die Behandlung von Schwangeren mit Medikamenten, die α_2 -Rezeptoren als Angriffsorte benutzen, eine Gefahr für das ungeborene Kind darstellen.

VI. Literaturverzeichnis

- Adachi M, Fukuda M und Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J*, 18, 5347-5358.
- Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 153, 586-600.
- Alderton F, Rakhit S, Kong KC, Palmer T, Sambhi B, Pyne S und Pyne NJ (2001) Tethering of the platelet-derived growth factor β receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J Biol Chem*, 276, 28578-28585.
- 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 α_{2A} -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, 56, 154-161.
- Banbury Conference on Genetic Background in Mice (1997) Mutant Mice and Neuroscience: Recommendations concerning genetic background. *Neuron*, 19, 755-759
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG und Lefkowitz RJ (1986) β -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2797-2801.
- Black JW und Stephenson JS (1962) Pharmacology of a new adrenergic β -receptor blocking compound. *Lancet*, 2, 311-314.
- Blaxall HS, Murphy TJ, Baker JC, Ray C und Bylund DB (1991) Characterization of the α_{2C} -adrenergic receptor subtype in the opossum kidney and in the OK cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, 259, 323-329.
- Boucher DM und Pedersen RA (1996) Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reprod Fertil Dev*, 8, 765-777.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- 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 α_2 -adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*, 106, 2491-2496.

- Buchdunger E, Ciotti CL, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ und Lydon NB (2000) Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 139-145.
- Bücheler MM, Hadamek K und Hein L (2002) Two α_2 -adrenergic receptor subtypes, α_{2A} and α_{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 α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K^+ channel currents. *J Biol Chem*, 276, 47512-47517.
- Bylund DB (1985) Heterogeneity of α_2 -adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 22, 835-843.
- Bylund DB (1988) Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci*, 9, 356-361.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr. und Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 46, 121-136.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W und Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-439.
- Chen C und Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 7, 2745-2752.
- Cheng AM, Saxton TM, Sakai R, Kulkarni S, Mbamalu G, Vogel W, Tortorice CG, Cardiff RD, Cross JC, Muller WJ und Pawson T (1998) Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell*, 95, 793-803.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC und Keller G (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125, 725-732.
- Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D und Flavahan NA (2000) Silent α_{2C} -adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H1075-1083.
- Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK und Hein L (2001) Differential distribution of β -adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking β_1 - or β_2 -adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, 60, 955-962.

- Collins S, Lohse MJ, O'Dowd B, Caron MG und Lefkowitz RJ (1991) Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the β_2 -adrenergic receptor as a model. *Vitam Horm*, 46, 1-39.
- Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ und Regan JW (1990) Multiple second messenger pathways of α -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 265, 63-69.
- Cross JC (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 105-113.
- Cross JC (2001) Genes regulating embryonic and fetal survival. *Theriogenology*, 55, 193-207.
- Cussac D, Schaak S, Denis C, Flordellis C, Calise D und Paris H (2001) High level of α_2 -adrenoceptor in rat foetal liver and placenta is due to α_{2B} -subtype expression in haematopoietic cells of the erythrocyte lineage. *Br J Pharmacol*, 133, 1387-1395.
- Cussac D, Schaak S, Denis C und Paris H (2002) α_{2B} -Adrenergic receptor activates MAPK via a pathway involving arachidonic acid metabolism, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem*, 277, 19882-19888.
- Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol (Lond)*, 34, 163-206.
- Daunt DA, Hurt C, Hein L, Kallio J, Feng F und Kobilka BK (1997) Subtype-specific intracellular trafficking of α_2 -adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, 51, 711-720.
- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM und Lefkowitz RJ (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of G_i - and G_q -mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem*, 272, 19125-19132.
- Dieckmann-Schuppert A und Schnittler HJ (1997) A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res*, 288, 119-126.
- Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C und Ferre F (1999) Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 83, 85-100.
- Eason MG und Liggett SB (1993) Human α_2 -adrenergic receptor subtype distribution: widespread and subtype-selective expression of α_2C10 , α_2C4 , and α_2C2 mRNA in multiple tissues. *Mol Pharmacol*, 44, 70-75.
- Eason MG und Liggett SB (1996) Chimeric mutagenesis of putative G-protein coupling domains of the α_{2A} -adrenergic receptor. Localization of two redundant and fully competent G_i coupling domains. *J Biol Chem*, 271, 12826-12832.

- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F und Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in β_1 -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7059-7064.
- Esteban S, Llado J und Garcia-Sevilla JA (1996) α_2 -Autoreceptors and α_2 -heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: an investigation into the α_2 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 353, 391-399.
- Fairbanks CA, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Posthumus IJ und Wilcox GL (2002) α_{2C} -Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 282-290.
- Fairbanks CA und Wilcox GL (1999) Moxonidine, a selective α_2 -adrenergic and imidazoline receptor agonist, produces spinal antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 290, 403-412.
- Falkay G und Kovacs L (1985) Characterization of β -adrenergic receptors in human myometrium and placenta. *Acta Physiol Hung*, 65, 491-495.
- Falkay G und Kovacs L (1994) Expression of two α_2 -adrenergic receptor subtypes in human placenta: evidence from direct binding studies. *Placenta*, 15, 661-668.
- Falkay G, Melis Kund Kovacs L (1994) Correlation between β - and α -adrenergic receptor concentrations in human placenta. *J Recept Res*, 14, 187-195.
- Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L und Caron MG (1996) Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, 271, 363-366.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ und Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439-442.
- Fong H, Rossant J, Gertsenstein M und Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66-70.
- Freedman RR, Baer RP und Mayes MD (1995) Blockade of vasospastic attacks by α_2 -adrenergic but not α_1 -adrenergic antagonists in idiopathic Raynaud's disease. *Circulation*, 92, 1448-1451.
- Frishman WH und Chesner M (1988) β -Adrenergic blockers in pregnancy. *Am Heart J*, 115: 147-152
- Gagioti S, Scavone C und Bevilacqua E (2000) Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod*, 62, 260-268.

- Gardner AM, Vaillancourt RR, Lange-Carter CA und Johnson GL (1994) MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell*, 5, 193-201.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background phenotype? *Trends Neurosc*, 19, 177-181
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21, 90-113.
- Ghosh S, Xie WQ, Quest AF, Mabrouk GM, Strum JC und Bell RM (1994) The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *J Biol Chem*, 269, 10000-10007.
- Giacomucci E, Bulletti C, Polli V, Prefetto RA und Flamigni C (1994) Immunologically mediated abortion (IMA). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 49, 107-121.
- Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeannotte L und Charron J (1999) Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*, 9, 369-372.
- Greenfield DS, Liebmann JM und Ritch R (1997) Brimonidine: a new α_2 -adrenoreceptor agonist for glaucoma treatment. *J Glaucoma*, 6, 250-258.
- Guimaraes S und Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*, 53, 319-356.
- Guo TZ, Davies MF, Kingery WS, Patterson AJ, Limbird LE und Maze M (1999) Nitrous oxide produces antinociceptive response via α_{2B} and/or α_{2C} -adrenoceptor subtypes in mice. *Anesthesiology*, 90, 470-476.
- Gutkind JS (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*, 2000, RE1.
- Hall J und Talamantes F (1984) Immunocytochemical localization of mouse placental lactogen in the mouse placenta. *J Histochem Cytochem*, 32, 379-382.
- Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM und Lefkowitz RJ (1995) Distinct pathways of G_i - and G_q -mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 270, 17148-17153.
- He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR und Charnock-Jones DS (1999) Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol*, 13, 537-545.
- Hein L, Altman JD und Kobilka BK (1999) Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors

regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, 402, 181-184.

Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M und Scheinin M (1999) Identification of a three-amino acid deletion in the α_{2B} -adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 2429-2433.

Himmelweit F, Marquardt M und Dale H, *The Collected Papers of Paul Ehrlich*. Vol. 3. 1908, Oxford, England: Pergamon Press.

Jackson D, Volpert OV, Bouck N und Linzer DI (1994) Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science*, 266, 1581-1584.

Jaffe R, Dorgan A und Abramowicz JS (1995) Color Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the first trimester: value in predicting pregnancy failure or complication. *AJR Am J Roentgenol*, 164, 1255-1258.

Jeyaraj SC, Chotani MA, Mitra S, Gregg HE, Flavahan NA und Morrison KJ (2001) Cooling evokes redistribution of α_{2C} -adrenoceptors from Golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol*, 60, 1195-1200.

Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelman W, Kucherlapati R und Jacks T (1997) K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*, 11, 2468-2481.

Jollie WP (1990) Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology*, 41, 361-381.

Kallapur S, Ormsby I und Doetschman T (1999) Strain dependency of TGF β 1 function during embryogenesis. *Mol Reprod Dev*, 52, 341-349.

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 α_2 -adrenergic receptor. *Science*, 238, 650-656.

Koch WJ, Hawes BE, Allen LF und Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that Gi-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.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P und Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*, 22, 667-676.

Lakhlani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M und Limbird LE (1997) Substitution of a mutant α_{2A} -adrenergic receptor via „hit and run“ gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9950-9955.

- 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, 311-319.
- Langley JN (1901) Observations on the physiological actions of extracts of the supra-renal bodies. *J Physiol (Lond)*, 27.
- Langley JN (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly regards the reaction of striated muscle to nicotine and curari. *J Physiol (London)*, 33, 374.
- Langley JN (1909) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of „receptive“ substances. *J Physiol (London)*, 39, 235-239.
- Latifpour J, Jones SB und Bylund DB (1982) Characterization of [³H]yohimbine binding to putative α_2 -adrenergic receptors in neonatal rat lung. *J Pharmacol Exp Ther*, 223, 606-611.
- Lefkowitz RJ (2000) The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol*, 2, E133-136.
- Legrand C, Mhaouty S, Rigolot C und Maltier JP (1993) Heterogeneity of α_2 -adrenoceptors in pregnant rat uterus: identification of subtypes and autoradiographic distribution. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 439-449.
- Leimeister C, Bach A und Gessler M (1998) Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family. *Mech Dev*, 75, 29-42.
- Lescisin KR, Varmuza S und Rossant J (1988) Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes Dev*, 2, 1639-1646.
- Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E und Betsholtz C (1994) Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*, 8, 1875-1887.
- Li YW, Guyenet PG und Bayliss DA (1998) Voltage-dependent calcium currents in bulbospinal neurons of neonatal rat rostral ventrolateral medulla: modulation by α_2 -adrenergic receptors. *J Neurophysiol*, 79, 583-594.
- Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F und Engel JD (2000) Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet*, 25, 209-212.
- Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A und Kobilka B (1992) Cloning of two mouse genes encoding α_2 -adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse α_2 -C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Mol Pharmacol*, 42, 16-27.

- Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS und Kobilka BK (1996) Cardiovascular regulation in mice lacking α_2 -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*, 273, 803-805.
- Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS und Kobilka BK (1995) Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α_{2C} -adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol*, 48, 48-55.
- Linzer DI und Nathans D (1985) A new member of the prolactin-growth hormone gene family expressed in mouse placenta. *Embo J*, 4, 1419-1423.
- Liu W, Yasui K, Arai A, Kamiya K, Cheng J, Kodama I und Toyama J (1999) β -Adrenergic modulation of L-type Ca^{2+} -channel currents in early-stage embryonic mouse heart. *Am J Physiol*, 276, H608-613.
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta*, 1179, 171-188.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990) β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science*, 248, 1547-1550.
- Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990) Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5094-5098.
- Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G und Zhou J (1997) Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat Genet*, 17, 179-181.
- Luttrell L, Kilgour E, Lerner J und Romero G (1990) A pertussis toxin-sensitive G-protein mediates some aspects of insulin action in BC3H-1 murine myocytes. *J Biol Chem*, 265, 16873-16879.
- MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT und Limbird LE (1996) Central hypotensive effects of the α_{2A} -adrenergic receptor subtype. *Science*, 273, 801-803.
- Maze M, Scarfini C und Cavaliere F (2001) New agents for sedation in the intensive care unit. *Crit Care Clin*, 17, 881-897.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J und Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, 34, 807-820.
- McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P und Lala PK (2001) Stimulation of hu-

man extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 3665-3674.

McLeod RL, Erickson CH, Mingo GG und Hey JA (2001) Intranasal application of the α_2 -adrenoceptor agonist BHT-920 produces decongestion in the cat. *Am J Rhinol*, 15, 407-415.

Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF und Baccharini M (2001) Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J*, 20, 1952-1962.

Montuenga LM, Martinez A, Miller MJ, Unsworth EJ und Cuttitta F (1997) Expression of adrenomedullin and its receptor during embryogenesis suggests autocrine or paracrine modes of action. *Endocrinology*, 138, 440-451.

Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S und Shen MM (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10454-10459.

Nakayama H, Scott IC und Cross JC (1998) The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol*, 199, 150-163.

Naor Z, Benard O und Seger R (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 91-99.

Newman CG (1977) Clinical observations on the thalidomide syndrome. *Proc R Soc Med*, 70, 225-227.

Nieder GL und Jennes L (1990) Production of mouse placental lactogen-I by trophoblast giant cells in utero and in vivo. *Endocrinology*, 126, 2809-2814.

Oak JN, Lavine N und Van Tol HH (2001) Dopamine D₄ and D_{2L} receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway is dependent on trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Pharmacol*, 60, 92-103.

Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J und Matsuda M (2001) Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *Embo J*, 20, 3333-3341.

Ohlsson R, Falck P, Hellström M, Lindahl P, Boström H, Franklin G, Ährlund-Richter L, Pollard J, Soriano P und Betsholtz C (1999) PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol*, 212, 124-136.

Olli-Lahdesmaki T, Kallio J und Scheinin M (1999) Receptor subtype-induced targeting and

subtype-specific internalization of human α_2 -adrenoceptors in PC12 cells. *J Neurosci*, 19, 9281-9288.

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P und Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286, 1374-1377.

Palis J, McGrath KE und Kingsley PD (1995) Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood*, 86, 156-163.

Peng M, Li Y, Luo Z, Liu C, Laties AM und Wen R (1998) α_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 und Hein L (2002) Physiological significance of α_2 -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283, R287-295.

Pi F und Garcia-Sevilla JA (1992) α_2 -Autoreceptor-mediated modulation of tyrosine-hydroxylase activity in noradrenergic regions of the rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 345, 653-660.

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

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C und Ullrich A (1999) EGF-receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402, 884-888.

Qian X, Esteban L, Vass WC, Upadhyaya C, Papageorge AG, Yienger K, Ward JM, Lowy DR und Santos E (2000) The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *Embo J*, 19, 642-654.

Rao VN und Reddy ES (1994) Elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene*, 9, 1855-1860.

Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS und Kuida K (2002) Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9248-9253.

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 α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6301-6305.

Regan JW, Nakata H, DeMarinis RM, Caron MG und Lefkowitz RJ (1986) Purification and

characterization of the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 261, 3894-3900.

Rinkenberger J und Werb Z (2000) The labyrinthine placenta. *Nat Genet*, 25, 248-250.

Rinkenberger JL, Cross JC und Werb Z (1997) Molecular genetics of implantation in the mouse. *Dev Genet*, 21, 6-20.

Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D und Kobilka BK (1996) Targeted disruption of the mouse β_1 -adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7375-7380.

Ross R, Bowen-Pope DF und Raines EW (1990) Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 327, 155-169.

Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ und Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of β -adrenergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6201-6204.

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.

Sallinen J, Haapalinna A, MacDonald E, Viitamaa T, Lahdesmaki J, Rybnikova E, Peltto-Huikko M, Kobilka BK und Scheinin M (1999) Genetic alteration of the α_2 -adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. *Mol Psychiatry*, 4, 443-452.

Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK und Scheinin M (1998) Adrenergic α_{2C} -receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci*, 18, 3035-3042.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W und Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376, 70-74.

Saxton TM, Cheng AM, Ong SH, Lu Y, Sakai R, Cross JC und Pawson T (2001) Gene dosage-dependent functions for phosphotyrosine-Grb2 signaling during mammalian tissue morphogenesis. *Curr Biol*, 11, 662-670.

Schaeffer HJ und Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 19, 2435-2444.

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 α_2 -adrenoceptor antagonist atipamezole: a pharmacodynamic and kinetic study in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 89, 574-584.

- Schlessinger J (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci*, 18, 273-275.
- Schramm NL und Limbird LE (1999) Stimulation of mitogen-activated protein kinase by G protein-coupled α_2 -adrenergic receptors does not require agonist-elicited endocytosis. *J Biol Chem*, 274, 24935-24940.
- Shalaby F, Rossant J, Yamagouchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML und Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-66.
- Simm A, Munch G, Seif F, Schenk O, Heidland A, Richter H, Vamvakas S und Schinzel R (1997) Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Lett*, 410, 481-484.
- Small KM, Brown KM, Forbes SL und Liggett SB (2001) Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the α_{2B} -adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. *J Biol Chem*, 276, 4917-4922.
- Small KM, Forbes SL, Rahman FF, Bridges KM und Liggett SB (2000) A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human α_{2C} -adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *J Biol Chem*, 275, 23059-23064.
- Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR und Liggett SB (2002) Synergistic polymorphisms of β_1 - and α_{2C} -adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *NEJM*, 347, 1135-1142.
- Snapir A, Heinonen P, Tuomainen TP, Alhopuro P, Karvonen MK, Lakka TA, Nyyssonen K, Salonen R, Kauhanen J, Valkonen VP, Pesonen U, Koulu M, Scheinin M und Salonen JT (2001) An insertion/deletion polymorphism in the α_{2B} -adrenergic receptor gene is a novel genetic risk factor for acute coronary events. *J Am Coll Cardiol*, 37, 1516-1522.
- Soriano P (1994) Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes Dev*, 8, 1888-1896.
- Stampone C, Nicotra M, Muttinelli C und Cosmi EV (1996) Transvaginal sonography of the yolk sac in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound*, 24, 3-9.
- Starke K und Montel H (1973) α -Receptors regulate transmitter release from central monoamine neurones. *Naturwissenschaften*, 60, 354.
- Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H und Limbird LE (1992) A point mutation of the α_2 -adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science*, 257, 977-980.
- Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J und Nagy A (1997) Mash2 acts cell autonomously in

mouse spongiotrophoblast development. *Dev Biol*, 190, 55-65.

Theiler K, *The House Mouse. Atlas of Embryonic Development*. 1989, New York: Springer-Verlag.

Thomas SA, Matsumoto AM und Palmiter RD (1995) Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*, 374, 643-646.

Ullrich A and Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-212.

von Zastrow M und Kobilka BK (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human β_2 -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*, 267, 3530-3538.

Voss AK, Thomas T und Gruss P (2000) Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 127, 1-11.

Wang HU, Chen ZF und Anderson DJ (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93, 741-753.

Wang RX und Limbird LE (1997) Distribution of mRNA encoding three α_2 -adrenergic receptor subtypes in the developing mouse embryo suggests a role for the α_{2A} -subtype in apoptosis. *Mol Pharmacol*, 52, 1071-1080.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG und Nisula BC (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 319, 189-194.

Wojnowski L, Stancato LF, Zimmer AM, Hahn H, Beck TW, Lerner AC, Rapp UR und Zimmer A (1998) Crf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev*, 76, 141-149.

Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y und Su B (2000) Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet*, 24, 309-313.

Yang-Feng TL, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ und Francke U (1987) Chromosomal assignment of genes for an α -adrenergic receptor (ADRAR) and for another member of this receptor family coupled to guanine nucleotide regulatory proteins (RG21). *Cytogenet. Cell Genet*, 46, 722-723.

Yotsumoto S, Shimada T, Cui CY, Nakashima H, Fujiwara H und Ko MS (1998) Expression of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse. *Dev Biol*, 203, 264-275.

Zhou QY, Quaife CJ und Palmiter RD (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase

gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*, 374, 640-643.

Zimmer A (1992) Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 15, 115-137.

VII. Abkürzungsverzeichnis

A	1) Ampere 2) Adenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotinylierte Meerrettich-Peroxidase-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bp	Basenpaar
BES	<i>N,N'</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BM-Purple	chromogenes alkalisches Phosphatase-Substrat
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosintriphosphat
C57BL/6J	Mausinzuchtstamm mit schwarzem Fell
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Calciumphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNS	codierende DNS
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCl ₃	Chloroform
(CH ₃ COO)Na	Natriumacetat
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DBA/2J	Mausinzuchtstamm mit weißem Fell
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBA	4,6-Dihydroxybenzylamin-Hydrobromid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure Eagle's Medium
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
E10,5	Tag 10,5 der Embryonalentwicklung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminomethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
ERK	Endogen reguliertes Signal-Kinase
EtOH abs.	absolutes Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
G	Guanosintriphosphat
g	1) Erdbeschleunigung 2) Gramm
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HClO ₄	Perchlorsäure
HEK	„Human Embryonic Kidney“ (Menschliche, embryonale Niere)
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Kaliumhexacyanoferrat(III)
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Kaliumhexacyanoferrat(II)
Kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	KiloDalton
KO	„Knock-Out“
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB-Medium	Medium zur Kultur von Bakterien nach Luria und Bertani
M	mol/Liter
μg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MOPS	3-(Morpholino)propansulfonsäure
M/V	Masse pro Volumen
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaN ₃	Natriumazid

Na ₂ P ₄ O ₇	Natriumpyrophosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NP-40	Nonidet-P40, Detergens
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDGF-BB	„Platelet Derived Growth Factor“ (von Blutplättchen gebildeter Wachstumsfaktor)
PEG	Polyethylenglykol
phosphoERK	phosphorylierte Form der Endogen reguliertes Signal-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Medium zur Primärkultur von Zellen und Geweben
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	mittlere Standardabweichung
SPF	„specific pathogen free“, Pathogen-freie Maushaltung
T	Thymidintriphosphat
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
T _m	Hybridisierungstemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transferribonukleinsäure
Tween 20	Polyethylen-sorbitan-monolaureat
U	Unit, Einheit
UK14304	Brimonidin, α ₂ -Rezeptoragonist
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Melanie Karin Philipp
Geburtsdatum	30.12.1974
Geburtsort	Coburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1981-1985	Volksschule Grub am Forst
1985-1994	Gymnasium Albertinum, Coburg Abschluß: Abitur
1994-1998	Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg Abschluß: 2. Staatsexamen
1998-1999	Praktisches Jahr, davon: 6 Monate bei Heumann Pharma GmbH, Nürnberg 6 Monate in Apotheke Scheuerfeld, Coburg Abschluß: 3. Staatsexamen
Dez. 1999	Approbation zum Apotheker
seit Jan. 2000	Promotion im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. med. Martin J. Lohse) Fachgebiet:Rezeptorpharmakologie

Bisherige Publikationen und Kongreßbeiträge

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht.

Originalarbeiten:

Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ und Hein L (2001) Activation and deactivation kinetics of α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *J Biol Chem*, 276: 47512-47517

Philipp M, Brede ME, Hadamek K, Gessler M, Lohse MJ und Hein L (2002) Placental α_2 -adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nat Genet*, 31: 311-315

Übersichtsarbeit:

Philipp M, Brede ME and Hein L (2002) Physiological significance of α_2 -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: R287-95

Kongreßbeiträge:

Vortrag bei der 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz 2002:

Philipp M, Hadamek K, Brede ME, Lohse MJ und Hein L (2002) Mitogen-activated protein kinase activation by α_2 -adrenergic receptors is essential for mouse placental development. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365, R26.

Posterpräsentation während des Symposiums „Transgenic Mouse Models in Pharmacology: Advances in Generation and Phenotyping“ auf Schloß Rauischholzhausen, Marburg 2002:

Philipp M, Brede M, Hadamek K, Gessler M, Lohse MJ und Hein L (2002) Embryonic lethality of knock out mice: Insights into signalling of α_2 -adrenergic receptors.

Posterpräsentation bei „Pharmacology of Adrenoceptors/The 2nd Annual ASPET G-Protein-Coupled Receptor Symposium“ im Rahmen des IUPHAR XIVth World Congress of Pharmacology, Kalifornien 2002:

Philipp M, Hadamek K, Brede ME, Gessler M, Lohse MJ und Hein L (2002) α_2 -Adrenergic receptors are essential for extracellular-signal-regulated kinase activation during murine placentogenesis. *Recept. Channels*, 8,129.