

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

**Regulation der Neurotransmission
im zentralen Nervensystem
durch α_2 -adrenerge Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Markus Bücheler

aus

Langenargen

Würzburg, Februar 2003

Referent: Prof. Dr. med. M.J. Lohse

Korreferent: Prof. Dr. techn. Dipl.-Ing. P. Riederer

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2004

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Einteilung der α_2 -adrenergen Rezeptoren | 1 |
| 1.2 | α_2 -adrenerge Rezeptoren und G-Proteine | 3 |
| 1.3 | Mechanismus der Transmitterfreisetzung | 5 |
| 1.4 | α_2 -adrenerge Rezeptoren modulieren die Transmitterfreisetzung . . . | 6 |
| 1.5 | Aktivierung von Kaliumkanälen durch G-Proteine | 7 |
| 1.6 | Physiologische Bedeutung α_2 -adrenerger Rezeptoren | 8 |
| 1.6.1 | Herz-Kreislaufsystem | 8 |
| 1.6.2 | Zentrales Nervensystem | 9 |
| 1.6.3 | Embryonale Entwicklung | 9 |
| 1.7 | Transgene Mäuse | 10 |
| 1.7.1 | Methoden zur Generierung transgener Mäuse | 10 |
| 1.7.2 | Transgene Mauslinien der α_2 -adrenergen Rezeptoren | 12 |
| 1.8 | Zielsetzung | 12 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1 | Material | 14 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.1.2 | Enzyme | 15 |
| 2.1.3 | Biologisches Material | 15 |
| 2.1.4 | Medien und Puffer | 16 |
| 2.1.5 | Zubehör für elektrophysiologische Experimente | 17 |
| 2.2 | Methoden | 17 |
| 2.2.1 | Transmitterfreisetzung | 17 |
| 2.2.2 | Kultur von Zellen | 20 |
| 2.2.3 | Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 2.2.4 | Messung von Membranströmen | 25 |
| 2.2.5 | Statistik | 26 |
| 3 | Ergebnisse | 27 |
| 3.1 | α_2 -adrenerge Rezeptoren als Autorezeptoren | 27 |
| 3.1.1 | Aktivierung durch exogene Agonisten | 28 |
| 3.1.2 | Aktivierung durch gewebeeigenes Noradrenalin | 30 |
| 3.2 | α_2 -adrenerge Rezeptoren als Heterorezeptoren | 31 |
| 3.2.1 | Aktivierung durch UK 14,304 | 33 |
| 3.2.2 | Aktivierung durch gewebeeigenen Transmitter | 33 |
| 3.3 | Zeitverlauf der K^+ -Kanal-Aktivierung durch α_2 -adrenerge Rezeptoren | 35 |
| 3.3.1 | GIRK-Ströme sind abhängig von der NoradrenalinKonzentration | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.2 | Aktivierungskinetik von GIRK-Strömen | 37 |
| 3.3.3 | Deaktivierungskinetik von GIRK-Strömen | 39 |
| 4 | Diskussion | 42 |
| 4.1 | α_{2A} - und α_{2C} -adrenerge Rezeptoren als Autorezeptoren | 42 |
| 4.2 | Regulation der Dopaminfreisetzung in den Basalganglien durch α_2 -adrenerge Rezeptoren | 44 |
| 4.3 | Zwei α_2 -adrenerge Rezeptoren zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung – ein generelles Prinzip? | 46 |
| 4.4 | Vergleich mit anderen Transmittersystemen | 46 |
| 4.5 | Unterschiede zwischen α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren | 47 |
| 4.6 | Schlußfolgerungen | 48 |
| 5 | Zusammenfassung | 50 |
| | Literaturverzeichnis | 52 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 63 |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Einteilung der α_2 -adrenergen Rezeptoren

α_2 -Rezeptoren gehören zur Gruppe der adrenergen Rezeptoren (AR). Diese werden von den physiologischen Liganden Adrenalin und Noradrenalin aktiviert. Eine erste Unterscheidung der AR in α - und β -AR erfolgte bereits 1948 durch Ahlquist [1], dessen Einteilung auf einer unterschiedlichen Affinität einer Reihe von Liganden sowie dem unterschiedlichen Effekt auf glatte Muskulatur (α -AR: Konstriktion, β -AR: Relaxation) beruhte. Langer erkannte 1974, daß sich präsynaptische und postsynaptische α -AR in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Er nannte die postsynaptischen Rezeptoren α_1 -AR, die präsynaptischen α_2 -AR [39]. Als sich herausstellte, daß α_2 -AR nicht nur präsynaptisch, sondern auch postsynaptisch lokalisiert sein können, wurde die rein anatomische Definition der α -Rezeptorsubtypen zugunsten einer pharmakologischen Klassifikation aufgegeben [6]. Später wurden die α_2 -AR pharmakologisch noch weiter in α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} - und α_{2D} -AR unterteilt. Zwischen 1987 und 1990 wurden beim Menschen drei Gene gefunden, die für α_2 -AR kodieren [36, 46, 58]. Die Nomenklatur richtete sich dabei nach dem Chromosom, auf dem das jeweilige Gen lokalisiert war (α_2 -C10, α_2 -C2, α_2 -C4).

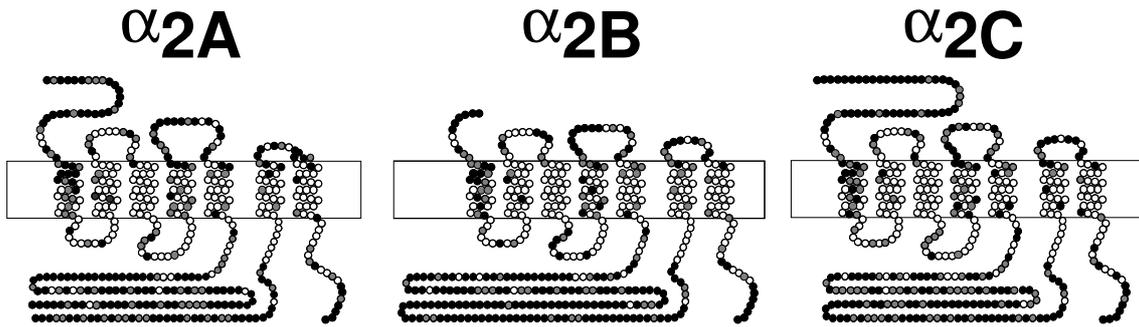


Abbildung 1.1: Die drei α_2 -adrenergen Rezeptoren der Maus. Weiße Kreise bezeichnen Aminosäuren, die bei allen drei Subtypen konserviert sind; graue Kreise symbolisieren Aminosäuren, die bei zwei Subtypen identisch sind, und schwarze Kreise stellen nichtkonservierte Aminosäuren dar.

Bei der Maus wurden auch drei α_2 -AR kloniert (Abb. 1.1), die in hohem Maß mit der Aminosäuresequenz der menschlichen α_2 -C10- (92 % Homologie), α_2 -C2- (84 % Homologie) und α_2 -C4-AR (89 % Homologie) übereinstimmen.

Die Maushomologe des α_2 -C2- und α_2 -C4-AR zeigten ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie die menschlichen Rezeptoren. Der α_2 -C10-homologe Rezeptor auf Chromosom 19 der Maus unterschied sich jedoch deutlich vom menschlichen α_2 -C10-AR, weil er eine niedrigere Affinität für Yohimbin und Rauwolscin hatte. Link et al. zeigten, daß die Ursache dieses Affinitätsunterschieds im wesentlichen auf einen Unterschied an Stelle 201 der Aminosäuresequenz zurückzuführen ist: Serin beim α_2 -C19-AR der Maus – Cystein beim α_2 -C10-AR des Menschen [43]. Zur Vereinheitlichung der pharmakologischen und genetischen Einteilungen wurden rekombinante Rezeptorproteine in Zelllinien exprimiert und deren pharmakologischen Eigenschaften verglichen. Dabei entsprachen die genetisch definierten α_2 -C10-, α_2 -C2- und α_2 -C4-AR den pharmakologisch definierten α_{2A} -, α_{2B} - [46, 83] bzw. α_{2C} -AR [12, 48]. Der bei Nagern gefundene α_2 -C19-AR entsprach dem pharmakologischen α_{2D} -AR. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von α_2 -C10-AR des Menschen und α_2 -C19-AR der Maus, ist es wahrscheinlich, daß es sich beim α_{2D} -Rezeptor um eine Variation desselben Gens zwischen verschiedenen Spezies handelt, und dieser Variation *in vivo* keine funktionelle Bedeutung zukommt. Folglich ist eine

| Nomenklatur | α_2 -adrenerge Rezeptoren | | | |
|-----------------|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| genetisch | α_{2A} | | α_{2B} | α_{2C} |
| pharmakologisch | α_{2A} | α_{2D} | α_{2B} | α_{2C} |
| Spezies | Chromosom | | | |
| Maus | – | 19 | 2 | 5 |
| Mensch | 10 | – | 2 | 4 |
| Ligand | Ligandenaffinität (nM) | | | |
| Noradrenalin | 2470 | 5760 | 470 | 650 |
| Adrenalin | 1170 | 2510 | 780 | 490 |
| Oxymetazolin | 13 | 33 | 1200 | 110 |
| Prazosin | 2030 | 2160 | 60 | 100 |
| Yohimbin | 3,4 | 54 | 12 | 4 |
| Rauwolscin | 3,7 | 33 | 1,2 | 0,18 |
| Atipamezol | 3 | 0,9 | 5 | 1,6 |

Tabelle 1.1: Übersicht über Nomenklatur und chromosomale Lokalisation α_2 -adrenerger Rezeptoren, sowie die Affinitäten zu verschiedenen Liganden [13, 26, 43].

Klassifikation als zusätzlicher Subtyp nicht gerechtfertigt [43].

In dieser Arbeit wird deshalb fortan von α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -AR die Rede sein. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Einteilungsprinzipien der α_2 -AR gibt Tab. 1.1.

Auch die α_1 - und β -AR konnten noch weiter unterteilt werden, so daß die Gruppe der AR momentan drei α_1 - (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), drei α_2 - (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}), und drei β -AR (β_1 , β_2 , β_3) umfasst [13].

1.2 α_2 -adrenerge Rezeptoren und G-Proteine

Wie alle AR durchspannen α_2 -AR mit sieben α -Helices die Plasmamembran [36, 46, 58] und sind an heterotrimere, GTP-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt. Diese werden nach der Aktivität der α -Untereinheit in vier Familien eingeteilt (Tab.1.2).

| G-Protein Familie | Funktion |
|-------------------|--|
| G_s | Stimulation der Adenylatcyclase Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen |
| G_i | G_i, G_z : Hemmung der Adenylatcyclase Öffnung von K^+ -Kanälen am Herzen G_o : Schließung neuronaler Ca^{2+} -Kanäle G_t : aktiviert retinale cGMP-abhängige Phosphodiesterase |
| G_q | Stimulation der Phospholipase $C\beta$ |
| $G_{12/13}$ | Stimulation von Rho durch Rho-GEF |

Tabelle 1.2: Übersicht über G-Protein-Familien

α_2 -AR vermitteln ihre Effekte über $G_{i/o}$ -Proteine. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß α_2 -AR auch an G_s -Proteine koppeln können [19]. Jedes G-Protein – unabhängig von der Familie – besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, bezeichnet als α , β und γ . β und γ liegen als funktioneller, schwer dissoziierbarer Komplex vor und werden deshalb zum $\beta\gamma$ -Komplex zusammengefaßt. Die α -Untereinheit kann sowohl GDP als auch GTP binden. Im GDP-bindenden Zustand hat G_α eine hohe Affinität zum $\beta\gamma$ -Komplex. Die Stimulation des Rezeptors führt zur Interaktion mit dem G-Protein und ändert die Konformation von G_α , was zu einem Austausch von GDP gegen GTP führt. Dadurch vermindert sich die Affinität von G_α zu Rezeptor und $\beta\gamma$ -Komplex – es kommt zur Dissoziation des G-Proteins. Die α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex können jetzt mit verschiedenen Effektormolekülen reagieren [62]. $G_{\alpha i}$ hemmt die Adenylatzyklase und aktiviert Phospholipase D. $\beta\gamma$ -Komplexe vermitteln die Öffnung von K^+ -Kanälen, die Hemmung von Kalziumströmen, sowie eine Aktivierung des ERK/MAP-Kinase-Signalwegs [27]. Nach der Stimulation müssen aktivierte Rezeptoren auch wieder abgeschaltet werden, da es sonst zur Daueraktivierung der Rezeptoren käme. Das Abschalten der Rezeptoren wird Desensibilisierung genannt. Für die Desensibilisierung der α_2 -AR sind vier Mechanismen

bekannt (Übersicht bei [24]). Erstens, die Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), was einer schnellen Desensibilierung entspricht. Zweitens, die Sequestrierung der Rezeptoren in ein intrazelluläres Kompartiment, was dazu dienen könnte, die Rezeptoren zu dephosphorylieren. Drittens, die Down-Regulation der Rezeptoren, d.h. die Abnahme ihrer Anzahl durch Verminderung der Transkriptionsrate und den verstärkten Rezeptorabbau. Dies erfolgt erst nach langer Agoniststimulation, da es sich hierbei um einen vergleichsweise langsamen Mechanismus handelt. Viertens, die Abnahme von G_i -Proteinen durch Reduktion ihrer Transkriptionsrate was ebenfalls eine lange Agoniststimulation voraussetzt [7]. Für α_{2A} - und α_{2B} -AR konnte gezeigt werden, daß sie an ihren intrazellulären Domänen phosphoryliert werden. Die daran beteiligten Enzyme sind die GRK2 (β ARK1) und die GRK3 (β ARK2)[37]. Bisher blieb unklar, ob auch α_{2C} -AR phosphoryliert werden.

1.3 Mechanismus der Transmitterfreisetzung

Chemische Synapsen stellen die Schnittstellen zwischen zwei Nervenzellen oder zwischen einer Nervenzelle und einer Effektorzelle dar. Sie dienen der Übertragung von Informationen von einer Nervenzelle auf die andere. Dazu wird ein elektrisches Signal, welches in Form eines Aktionspotentials von der Nervenzelle fortgeleitet wird, auf der präsynaptischen Seite der Synapse in ein chemisches Signal umgewandelt. Das chemische Signal entspricht einer Freisetzung von gespeicherten Molekülen, den Neurotransmittern, die den synaptischen Spalt durch Diffusion durchqueren und so an der postsynaptischen Seite der Synapse wieder zu einer Depolarisation der Membran führen. Wichtiger Faktor bei der Umwandlung des elektrischen in ein chemisches Signal ist Kalzium. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration ist im Ruhezustand der Synapse um den Faktor 10^4 niedriger als die extrazelluläre. Ein ankommendes Aktionspotential führt zu einer Depolarisation der präsynaptischen Membran, was zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen

führt. Durch diese Kanäle strömt Kalzium in die aktive Zone der präsynaptischen Seite ein, welche besonders dicht mit Kalziumkanälen besetzt ist. Dies führt zu einer Konzentrationserhöhung des intrazellulären Kalziums auf bis zu $100 \mu\text{M}$ [35]. In weniger als $0,5 \text{ ms}$ nach dem Kalziumeinstrom erfolgt dann die Transmitterfreisetzung. Eine wichtige Rolle bei diesem Vorgang spielt der SNARE-Komplex. Dieser besteht aus den SNARE-Proteinen Synaptobrevin/VAMP, Syntaxin1 und SNAP25. Er zieht das synaptische Vesikel dicht an die Plasmamembran, wodurch es zu einer Verschmelzung von synaptischem Vesikel und Plasmamembran kommen kann. Die Verschmelzung mit der Plasmamembran führt zur Entleerung des Inhalts (Neurotransmitter) des synaptischen Vesikels. Nach der Entleerung bindet der NSF über SNAPs an den SNARE-Komplex. Durch die ATPase Aktivität des NSF kommt es dann zur Auflösung des SNARE-Komplexes. Danach wird das entleerte Vesikel durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen und steht nach einer Beladung mit Neurotransmitter für einen weiteren Freisetzyklus zur Verfügung (Abb. 1.2, Übersichten bei [8, 33, 60]).

1.4 α_2 -adrenerge Rezeptoren modulieren die Transmitterfreisetzung

Eine wichtige Funktion der α_2 -AR ist die präsynaptische Inhibition der Transmitterfreisetzung im Sinne eines negativen Regelkreises. In den synaptischen Spalt freigesetztes Noradrenalin bindet nicht nur an postsynaptische Rezeptoren, sondern auch an Rezeptoren auf der präsynaptischen Seite der Synapse, die im Fall der α_2 -AR zur Reduktion der weiteren Transmitterfreisetzung führen [39, 69]. Präsynaptische α_2 -AR können die Transmitterfreisetzung grundsätzlich auf drei Ebenen modulieren. Erstens durch Inhibition von Kalziumkanälen, zweitens durch Aktivierung von Kaliumkanälen und drittens durch direkte Beeinflussung des Proteinkomplexes, der synaptisches Vesikel und Plasmamembran miteinander verbindet [54].

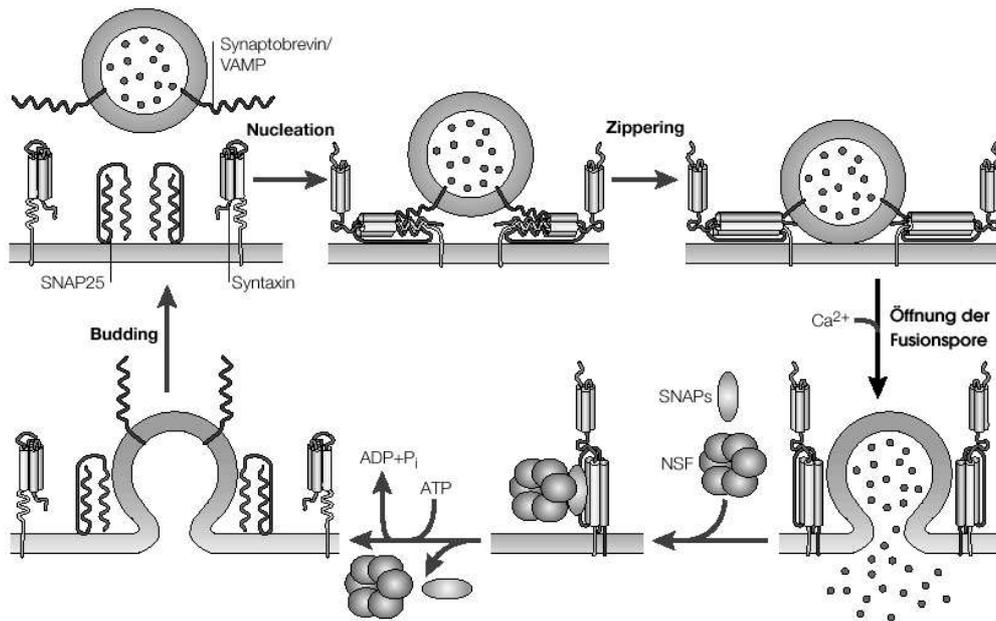


Abbildung 1.2: Zyklus der Bildung und Auflösung des SNARE-Komplexes (aus Synaptobrevin/VAMP, SNAP25 und Syntaxin) während der Exozytose eines synaptischen Vesikels. Syntaxin liegt zunächst in einer geschlossenen Konformation vor, die geöffnet werden muß, um die Bildung des SNARE-Komplexes („nucleation“) einzuleiten. Der SNARE-Komplex zieht das synaptische Vesikel zur Plasmamembran („zippering“), was zur Membranverschmelzung führen könnte. Nach der Fusion - und Transmitterfreisetzung - wird der SNARE-Komplex durch Bindung von NSF und SNAPs aufgelöst, was die Aufnahme des Vesikels ins Zellinnere nach sich zieht („budding“). Damit stehen die beteiligten Komponenten für einen neuen Zyklus zur Verfügung. Geringfügig veränderte Abbildung aus Rizo und Südhof [60].

1.5 Aktivierung von Kaliumkanälen durch G-Proteine

Auf die Aktivierung von Kaliumkanälen durch α_2 -AR soll an dieser Stelle näher eingegangen werden, weil in einigen Versuchen dieser Arbeit GIRK-Kanäle verwendet wurden. GIRK steht für „G-protein regulated inward rectifying K⁺“ – GIRK-Kanäle sind demnach G-Protein-regulierte einwärtsgerichtete Kaliumkanäle. Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines solchen Kanals wird durch Bindung von $G_{\beta\gamma}$ -Komplexen erhöht. Bei geöffnetem Kanal hängt die Flußrichtung der Kaliumionen vom elektrochemischen Gradienten (definiert als Differenz zwischen Membranpo-

tential und Kaliumgleichgewichtspotential) ab. Ist das Membranpotential kleiner als das Kaliumgleichgewichtspotential fließt ein starker Strom in die Zelle, ist es größer, kann nur ein schwacher Kaliumstrom nach außen fließen, weil intrazelluläre Mg^{2+} -Ionen den Kanal unter diesen Bedingungen blockieren. Diese Eigenschaft, nur Ströme ins Zellinnere zu ermöglichen, wird als einwärtsgleichrichtend bezeichnet. GIRK-Kanäle sind Heterotetramere, aufgebaut aus zwei mal zwei Untereinheiten. Bei Mäusen sind bisher 4 GIRK-Kanal-Untereinheiten kloniert (GIRK1–GIRK4). Die Zusammensetzung der GIRK-Kanäle variiert je nach Gewebe. In Neuronen finden sich vor allem GIRK-Kanäle aus GIRK1/GIRK2-Untereinheiten (Übersicht bei [81]).

1.6 Physiologische Bedeutung α_2 -adrenerger Rezeptoren

1.6.1 Herz-Kreislaufsystem

α_2 -AR in der Medulla oblongata des Gehirns nehmen Einfluß auf Sympathikotonus, Blutdruck und Herzfrequenz, wenn sie von Noradrenalin oder Adrenalin stimuliert werden. Dabei kommt es zur Reduktion aller drei Parameter. Therapeutisch wird aus diesem Grund der α_2 -Agonist Clonidin zur Behandlung von hypertensiven Krisen bzw. der vegetativen Symptome des deliranten Syndroms verwendet [63]. Allerdings kommt es, insbesondere bei intravenöser Verabreichung von Clonidin initial zu einer vorübergehenden Blutdrucksteigerung durch Vasokonstriktion. Mit Hilfe von Mäusen, bei denen jeweils ein Gen für einen α_2 -AR-Subtyp deletiert war – sogenannte „knockout“ (KO) Mäuse, konnte eine Zuordnung dieser Effekte zu den α_2 -Rezeptorsubtypen erfolgen (Übersicht bei [27]). Bei Wildtypmäusen verursachten die α_2 -Agonisten UK 14,304 bzw. Dexmedetomidin eine vorübergehende Blutdruckerhöhung und eine anschließende Blutdrucksenkung, wenn sie in die

Arteria carotis injiziert wurden. Die blutdrucksenkende Wirkung der α_2 -Agonisten fehlte völlig bei α_{2A} -KO und bei α_{2A} -D79N Mäusen [2, 50]. Die blutdrucksteigernde Wirkung fehlte hingegen in α_{2B} -KO-Mäusen [45]. Somit konnte die blutdrucksenkende Wirkung der α_2 -Agonisten einem zentralen α_{2A} -AR, die blutdrucksteigernde Wirkung einem peripheren α_{2B} -AR zugeordnet werden.

1.6.2 Zentrales Nervensystem

Bei chirurgischen Eingriffen können α_2 -AR-Agonisten aufgrund ihrer sedierenden und analgesierenden Eigenschaften genutzt werden, um andere Anästhetika einzusparen. Versuche an transgenen Mäusen zeigten, daß der sedierende Effekt von α_2 -AR-Agonisten durch α_{2A} -AR im Locus coeruleus vermittelt wird [30, 38, 65]. Zusätzlich greifen α_2 -AR auf verschiedenen Ebenen in die Schmerzwahrnehmung ein. Auf Höhe des Rückenmarks hemmen präsynaptische α_{2A} - und α_{2C} -AR nozizeptive Signale [52, 53, 56, 72]. Supraspinal spielen α_{2B} - und α_{2C} -AR eine Rolle in der von N_2O verursachten Analgesie [22]. Noradrenalin kann durch Erhöhung der Krampfschwelle über α_{2A} -AR epileptische Anfälle verhindern [34]. Weiterhin ist bekannt, daß α_{2A} - und α_{2C} -AR für die temperatursenkende Wirkung von α_2 -Agonisten verantwortlich sind [30, 65]. α_2 -AR verändern auch kognitive Funktionen wie Aufmerksamkeit, Planung, und Vigilanz [3, 4, 5, 17, 59].

1.6.3 Embryonale Entwicklung

Bisher ist die Bedeutung der α_2 -AR für die embryonale Entwicklung noch weitgehend unklar. Mäuse, bei denen jeweils das Gen für einen α_2 -Rezeptorsubtyp deletiert ist sind alle lebensfähig [2, 44, 45]. Damit kann ausgeschlossen werden, daß ein bestimmter α_2 -AR in der embryonalen Entwicklung lebensnotwendig ist. α_{2B} -KO Mäuse verpaaren sich schlechter und bei der Kreuzung von heterozygoten α_{2B} -KO Mäusen sind in den Würfen weniger homozygote Mäuse, als nach den Mendelschen

Gesetzen erwartet [45]. Mäuse mit einer Deletion der drei α_2 -Rezeptorgene starben während der Embryonalentwicklung an einer Störung der Angiogenese in der Placenta [57]. Eine ungestörte embryonale Entwicklung ist also ohne α_2 -AR bei Mäusen nicht möglich.

1.7 Transgene Mäuse

Klassische pharmakologische Techniken sind geeignet zur Klassifikation von Rezeptoren, solange zu deren Unterscheidung ausreichend selektive Liganden zur Verfügung stehen. Wie in Tab. 1.1 deutlich wird, ist dies bei α_2 -AR nicht der Fall. Prazosin und Oxymetazolin wären von den aufgeführten Pharmaka noch am ehesten geeignet α_{2A} - und α_{2B} -AR voneinander zu unterscheiden. Dennoch läßt deren 40-facher Affinitätsunterschied eine sichere Unterscheidung nicht zu, zumal beide Liganden auch an α_{2C} - und α_1 -AR binden. Seit der Einführung transgener Techniken ist es möglich das Genom von Mäusen so zu verändern, daß der gewünschte Rezeptorsubtyp entweder in größerer Dichte oder überhaupt nicht mehr exprimiert wird (transgene Versuchstiere). Durch die Kombination dieser molekularbiologischen mit klassischen pharmakologischen Methoden wird es möglich – trotz des Mangels selektiver Liganden – einzelnen Rezeptorsubtypen spezifische Funktionen zuzuordnen.

1.7.1 Methoden zur Generierung transgener Mäuse

Zur Veränderung von Genen sind verschiedene Techniken bekannt (Übersicht bei [61]). Hier seien die Prinzipien der pronukleären Injektion und des „gene-targeting“ kurz erläutert. Diese beiden Techniken sind für unterschiedliche Ziele geeignet: Die pronukleäre Injektion von DNA-Konstrukten eignet sich zur zellspezifischen Überexpression von Proteinen, während die Methode des „gene-targeting“ in der Regel zur gezielten Gendeletion eingesetzt wird. Bei der pronukleären Injektion wird gereinigte DNA in eine befruchtete Eizelle der Maus injiziert. Der Ort, an dem der

injizierte DNA-Vektor ins Mausgenom eingebaut wird, bleibt dem Zufall überlassen. Die so präparierten Eizellen werden dann in scheinträchtige Weibchen eingepflanzt. Nach der Geburt werden die Nachkommen darauf untersucht, ob und in welcher Kopienzahl sie das Transgen enthalten. Die Dosis des Gens ist bei dieser Technik nicht zu regulieren und es müssen viele unabhängige Mauslinien untersucht werden, um die Mäuse mit der gewünschten Kopienanzahl und dem gewünschten Integrationsort herauszufinden [80]. Die Stärke dieser Methode liegt darin, daß die injizierte DNA manipuliert werden kann. So können kodierende Sequenzen für Rezeptoren mit regulatorischen Genelementen fusioniert werden, um ein spezifisches Expressionsmuster zu erreichen.

Beim „gene-targeting“ wird es möglich, gezielt einen spezifischen Ort im Genom zu verändern. Entweder wird dabei das entsprechende Gen deletiert oder durch ein verändertes anderes Gen ersetzt. Häufig wird das gewünschte Gen inaktiviert, indem in embryonalen Stammzellen (ES) durch homologe Rekombination ein Resistenzgen an dem gewünschten Genort eingebracht und gleichzeitig ein oder mehrere Exons entfernt werden. Die so veränderten ES-Zellen werden dann in Blastozysten injiziert oder mit Morulae aggregiert. Die auf diese Weise modifizierten Embryonen werden dann in scheinträchtige Weibchen implantiert. Chimäre Nachkommen können leicht anhand der Fellfarbe identifiziert werden, wenn sich die austragenden Mausstämme und die ES-Zell-Mausstämme in der Fellfarbe unterscheiden. Ist das veränderte Gen in die Keimbahn gelangt, kann es an die Nachkommen weitergegeben werden. Obwohl diese Technik aufwendiger ist als die pronukleäre Injektion, bietet sie den Vorteil, daß die Ergebnisse leichter zu interpretieren sind, da die Anzahl der eingebauten Gene nicht zur Debatte steht und der Genort bekannt ist. Bei allen Vorteilen, die transgene Techniken bieten, haben sie auch Nachteile. Zum Beispiel werden die meisten endogenen AR nur sehr niedrig exprimiert, während transgene Expressionssysteme (Pronukleus-Transgene) bis zu 100-fach erhöhte Expressionslevel haben können. Es besteht also die Möglichkeit, daß die vorhandenen G-Proteine gesättigt werden und andere Signaltransduktionswege an Bedeutung gewinnen. Ein

anderes Problem ist die zellspezifische Expression: bei der niedrigen physiologischen Expressionsdichte der AR ist die Bestimmung, ob die Expression des veränderten Gens tatsächlich gewebespezifisch ist, äußerst schwer. Bei KO-Tieren fällt die Unterscheidung oft schwer, ob ein Phänotyp durch KO-bedingte Entwicklungsdefekte oder durch ein Fehlen eines Proteins zum Zeitpunkt des Experiments bedingt ist.

1.7.2 Transgene Mauslinien der α_2 -adrenergen Rezeptoren

Es gibt inzwischen sechs Mauslinien mit veränderter α_2 -Rezeptorexpression. Dazu gehören Mäuse mit einer Deletion des α_{2A} - (α_{2A} -KO), α_{2B} - (α_{2B} -KO), und α_{2C} -Gens (α_{2C} -KO) [2, 44, 45]. Auch eine Mauslinie, bei der das α_{2A} - und das α_{2C} -Gen deletiert wurden, ist bekannt [25]. Eine weitere transgene Maus trägt eine Punktmutation an Stelle 79 der Aminosäuresequenz des α_{2A} -AR. Dort wurde ein Asparat zu Asparagin mutiert (D79N). Diese Mutation führt zu einer selektiven Entkopplung der Aktivierung von K^+ -Kanälen, bei erhaltener Kopplung an Ca^{2+} -Kanäle und Adenylylcyclase in der Zellkultur [71]. Die Expression dieser Mutation bei der Maus führte zu einer 80%igen Reduktion der α_{2A} -Rezeptorexpression trotz normaler mRNA-Konzentration [50]. Die α_{2A} -D79N-Rezeptoren zeigten die erwarteten pharmakologischen Eigenschaften, verloren aber *in vivo* die Fähigkeit an K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle zu koppeln [50] und entsprachen damit einem funktionellen „knock-out“. Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Mauslinien wurde bei der sechsten Mauslinie nicht ein Gen deletiert, sondern das α_{2C} -Gen unter der Kontrolle seines homologen Promotors 3-fach überexprimiert (α_{2C} -OE) [65].

1.8 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß der α_{2A} -Rezeptorsubtyp in mehreren Spezies der Hauptrezeptor für die präsynaptische Inhibition ist [42, 75, 76]. Es gab jedoch auch Hinweise für die Beteiligung mindestens eines weiteren α_2 -Rezeptorsubtyps an

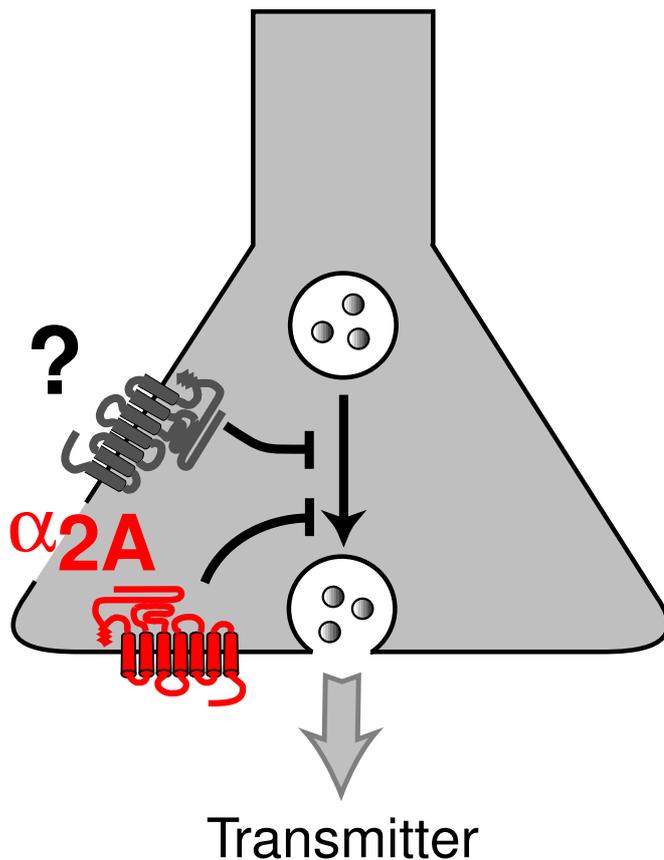


Abbildung 1.3: Ausgangssituation zu Beginn der Arbeit: Die Präsynaptische Inhibition der Noradrenalinfreisetzung durch α_2 -AR wird in erster Linie durch den Subtyp α_{2A} vermittelt. Es gab Hinweise für die Beteiligung mindestens eines weiteren α_2 -Rezeptorsubtyps an der präsynaptischen Inhibition. Eine eindeutige Subtypzuordnung zu α_{2B} oder α_{2C} war jedoch nicht möglich.

der präsynaptischen Regulation der Transmitterfreisetzung (Abb. 1.3 [28, 41, 64, 78]).

Deshalb sollten für das zentrale Nervensystem folgende Fragen geklärt werden: Gibt es neben dem α_{2A} -AR noch weitere α_2 -Rezeptorsubtypen, die an der präsynaptischen Regulation der Transmitterfreisetzung beteiligt sind? Welche Rezeptorsubtypen sind dies? Können α_2 -AR auch die Transmitterfreisetzung anderer Transmitter, z.B. Dopamin, regulieren? Welche α_2 -Rezeptorsubtypen sind daran beteiligt? Sollten mehrere Rezeptoren an der präsynaptischen Regulation beteiligt sein - wie unterscheiden sie sich? Zur Beantwortung dieser Fragen sollte die Freisetzung von Noradrenalin bzw. Dopamin an Gewebeschnitten von Mäusen mit α_2 -AR-Deletionen untersucht werden. Zusätzlich sollte in einem Zellkultursystem überprüft werden, inwieweit sich die Signaltransduktion der α_2 -AR kinetisch voneinander unterscheidet.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---------------------|
| Ampicillin | Sigma |
| Bactoagar, -hefeextrakt, -pepton; Agarose | Gibco BRL |
| DNA-Längenstandards | Boehringer Mannheim |
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) | Gibco BRL |
| Effectine Transfektionsreagenz | QIAGEN |
| Fetales Kälberserum | PAN Systems |
| Geneticin (G418) | Gibco BRL |
| L-Glutamin; Penicillin/Streptomycin für die Zellkultur | Gibco BRL |
| Rauwolscin | RBI/Sigma |
| Säulen und Filter für die Plasmidisolierung | QIAGEN |
| Trypsin-Versene | PAN Systems |
| UK 14,304 | RBI/Sigma |

2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Boehringer Mannheim,
New England Biolabs

2.1.3 Biologisches Material

E. coli XL1

Stratagene

HEK293-Zellen

[21]

pcDNA3- α_{2A}

[18]

pcDNA3- α_{2C}

[18]

Bicistronischer Expressionsvektor

für GIRK1 und GIRK4

Dr. Jan, Howard Hughes Medical Institute,
University of California

π H3-CD8

Dr. Yellen, Harvard University, Cambridge

Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J x 129/Sv)

Eigenzucht

α_{2A} -KO-Mäuse

[2]

α_{2B} -KO-Mäuse

[45]

α_{2C} -KO-Mäuse

[44]

α_{2AC} -KO-Mäuse

[25]

2.1.4 Medien und Puffer

2.1.4.1 Medien für die Kultur von *E. coli*

LB-Medium: 1 % Pepton Agarplatten:
 0,5 % Hefeextrakt Zusatz von 1,2 % (w/v) Agar
 1 % NaCl

Die Selektion von Transformanten erfolgte durch Zugabe von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin.

2.1.4.2 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen

Kulturmedium: Dulbecco's modified Eagle's Medium (4,5 g/L Glucose)
 10 % (v/v) Fetales Kälberserum
 2 mM L-Glutamin
 100 U/mL Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin

Zur Selektion stabil transfizierter Klone wurden 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Geneticin (G418) zugesetzt.

2.1.4.3 Allgemeine Puffer

Superfusionsmedium: 118 mM NaCl
 4,7 mM KCl
 1,3 mM CaCl_2
 1,2 mM MgSO_4
 25 mM NaHCO_3
 1,2 mM KH_2PO_4
 11 mM Glucose
 0,57 mM Ascorbinsäure
 30 μM EDTA

10 x DNA-Probenpuffer: 50 % (v/v) Glycerin
 20 mM Tris/HCl; pH 7,5
 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
 0,1 % (w/v) Xylencyanol

10 x TBE: 890 mM Tris-Base
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA; pH 8,0

10 x PBS: 1,4 M NaCl
 300 mM KCl
 65 mM Na₂HPO₄
 15 mM KH₂PO₄; pH 7,3

2.1.5 Zubehör für elektrophysiologische Experimente

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| Gerät zum Kapillarenziehen | Sutter Instruments |
| Borsilikat-Kapillaren GF-150-10 | Warner Instrument Corp. |
| Verstärker Axopatch 200 | Axon Instruments |

2.2 Methoden

2.2.1 Transmitterfreisetzung

Die Präparation der Mäuse folgte mit geringen Abweichungen der Beschreibung von Limberger [42]. Zur Bestimmung der [³H]-Noradrenalinfreisetzung bzw. der [³H]-Dopaminfreisetzung wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet, der Kopf vom

Körper abgetrennt und das Fell von der Schädelkalotte abpräpariert. Danach wurde die Schädelkalotte vom Foramen magnum aus keilförmig eingeschnitten und der entstehende Keil nach vorne geklappt. Nun wurden die Hirnnerven mit einer gebogenen Pinzette stumpf durchtrennt und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel gelöst. Das Gehirn wurde auf einem, in Eis stehenden, Metallblock abgelegt und mit kaltem Superfusionsmedium übergossen. Von diesem Zeitpunkt an unterschied sich die Präparation für die gemessenen Gewebe.

2.2.1.1 [³H]-Noradrenalinfreisetzung aus Kortex

Von der Kortexoberfläche wurden mit Hilfe einer Rasierklinge und zwei Objektträgern, die je mit zwei Drähten bespannt waren (0,1 mm bzw. 0,3 mm dick), horizontale Schnitte angefertigt und daraus runde Scheiben (Durchmesser 2 mm) herausgestanzt. Diese Scheiben wurden 30 min in Superfusionsmedium inkubiert, das 0,1 μ M [³H]-Noradrenalin enthielt. Anschließend wurden die Scheiben in Mikroperfusionskammern gelegt und 60 min lang mit 1,8 mL Superfusionsmedium pro Minute überspült (ohne [³H]-Noradrenalin). Das Superfusionsmedium enthielt zur Hemmung der Noradrenalinwiederaufnahme 1 μ M Desipramin. Die Flußrate betrug 1,8 mL/min. Nun folgte das eigentliche Experiment, das aus 5–6 Abschnitten bestand. Jeder Abschnitt dauerte 20 min, davon 12 min Sammelzeit. Die restlichen 8 min dienten dazu mit Pharmaka für die nächste Sammelperiode zu inkubieren. Um eine möglichst hohe zeitliche Auflösung des gesammelten Superfusats zu erreichen wurde alle 3 min der 12-minütigen Sammelperiode ein neues Meßröhrchen verwendet. Die ersten 3 min dienten der Bestimmung des Basalwertes. Danach erfolgte ein elektrischer Reiz, der zur Noradrenalinfreisetzung führte. Nun wurde 3 \times 3 Minuten die durch den elektrischen Reiz zusätzlich freigesetzte Noradrenalinmenge gesammelt. Der elektrische Reiz zur Transmitterfreisetzung war rechteckig und dauerte 2 ms. Ein Spannungsabfall von 20 V/cm zwischen den Platinelektroden erzeugte einen 60 mA starken Strom. Die von einem Einzelreiz freigesetzte Transmittermenge war nicht sicher

meßbar. Deshalb wurden Reizfolgen aus vier Einzelreizen mit einer Frequenz von 100 Hz verwendet. Bei den Experimenten mit exogenem Agonist (UK 14,304) wurde mit nur einer Reizfolge stimuliert. Für die endogene Transmitterfreisetzung wurden 1, 2, und 64 Reizfolgen appliziert, um Autoinhibitionsbedingungen nachzuahmen.

2.2.1.2 [³H]-Dopaminfreisetzung aus Basalganglien

Das freiliegende Gehirn wurde in etwa 0,5 mm dicke, frontale Schnitte zerteilt. Aus den Schnitten, die die Basalganglien enthielten, wurden Scheiben mit 1-2 mm Durchmesser aus den Basalganglien herausgestanzt und 30 min lang in Superfusionsmedium inkubiert, welches 0,3 μ M [³H]-Dopamin enthielt. Die Gewebescheiben wurden dann 60 min in Mikrosuperfusionskammern mit Superfusionsmedium bei einer Flußrate von 1 mL/min inkubiert. Zur Hemmung der Dopaminwiederaufnahme enthielt das Superfusionsmedium 1 μ M Nomifensin (aber kein [³H]-Dopamin). Ein Einzelpuls war rechteckig, dauerte 2 ms, und hatte einen Spannungsabfall von 30 V/cm zwischen den Platinelektroden der Kammer. Eine Reizfolge bestand aus 20 Einzelreizen bei einer Frequenz von 10 Hz. Die ersten zwei Reizfolgen wurden schon während der 60-minütigen Vorinkubationsphase appliziert (nach 20 und 40 min). Das Superfusat dieser Reizfolgen wurde verworfen. Die Experimente mit dem exogen zugegebenen α_2 -Agonisten UK 14,304 bestanden aus 8 Abschnitten. Jeder Abschnitt dauerte 30 min. Das Superfusat wurde die ersten 12 min gesammelt. Dann wurden Pharmaka zugeführt. Diese hatten insgesamt 21 min Zeit, um in die Gewebestücke zu diffundieren. Dann erfolgte die nächste elektrische Stimulation. Die Autoinhibition durch endogen freigesetzten Transmitter wurde bestimmt, indem das Gewebe mit 5, 10 und 50 Reizen bei einer Frequenz von je 20 Hz gereizt wurde. Da theoretisch die Möglichkeit besteht, daß radioaktiv markiertes Dopamin in noradrenerge Neurone aufgenommen wird, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen während der Inkubation mit [³H]-Dopamin die Noradrenalintransporter durch 1 μ M Desipramin blockiert waren. Die Anwesenheit von Desipramin während der Inkubationszeit

hatte keinen Einfluß auf die Höhe der Transmitterfreisetzung und wurde deshalb weggelassen.

2.2.1.3 Berechnungen

Am Ende der Experimente wurden die Gewebe in 1 N NaOH aufgelöst, die 0,5 % Natriumdodecylsulfat enthielt und die Menge des in der Lösung enthaltenen Tritiums mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Nun konnte auf die zu Beginn des Experiments vorliegende tritiierte Transmittermenge zurückgeschlossen werden. Dazu wurden die Transmittermengen, die in jedem Abschnitt freigesetzt wurden, zu der am Schluß vorhandenen Transmittermenge addiert. Die pro elektrische Stimulation freigesetzte Transmittermenge wurde wie folgt berechnet. Zunächst wurde das Superfusat für drei Minuten gesammelt, um den Basalwert zu bestimmen. Dann erfolgte die elektrische Stimulation. Die in den folgenden 9 min freigesetzte Transmittermenge entspricht dem Basalwert plus der durch den elektrischen Reiz freigesetzten zusätzlichen Transmittermenge. Deshalb wurde davon der Basalwert subtrahiert. Die so erhaltene freigesetzte Transmittermenge wurde durch die Gewebetransmittermenge am Anfang des Abschnittes dividiert, um den Anteil des freigesetzten Tritiums am im Gewebe enthaltenen Tritium zu berechnen.

2.2.2 Kultur von Zellen

2.2.2.1 Kultur und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden stets mit einer Einzelkolonie angeimpft und in 400 mL LB-Medium bei 37° C auf einem Rotationsschüttler mit 150–220 rpm angezogen. Agarplatten wurden im Brutschrank ebenfalls bei 37° C inkubiert. Die Stammhaltung erfolgte als 20% (v/v) Glycerinkulturen bei -80° C.

2.2.2.2 Kultur eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden als Monolayerkulturen in DMEM-Medium bei 5% CO₂ und 37° C gezogen und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin-Versene von den Kulturschalen abgelöst, bei 180 xg abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:3 wieder ausgesät. Vor elektrophysiologischen Messungen wurden die Zellen so vereinzelt, daß sie keine elektrische Verbindung mehr miteinander hatten.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Angabe des Herstellers präpariert. Die Plasmidminipräparation erfolgte nach einem modifizierten QIAGEN-Protokoll. Dazu wurden 1500 µL einer *E. coli*-Übernachtskultur abzentrifugiert und die Bakterien in 100 µL Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 200 µL Puffer P2 zugefügt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lysate durch Zugabe von 150 µL P3 neutralisiert und mehrere Minuten auf Eis stehen gelassen. Dann wurden die neutralisierten Lysate 5 min bei 4° C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals 5 min bei 4° C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 500 µL 96 % Ethanol zugegeben, um die DNA zu fällen. Dieses Gemisch wurde bei Raumtemperatur 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 100–200 µL 70 % Ethanol auf das Pellet gegeben. Es wurde darauf ein letztes Mal 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Schließlich wurden 25 µL Aqua bidest. mit 0,1 µg/µL RNase zugefügt und bei 37° C inkubiert.

2.2.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Pro 1 μg DNA wurden 2–5 U Enzym eingesetzt.

2.2.3.3 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1–2 %ige Flachbett-Agarosegele mit TBE als Laufpuffer benutzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit mindestens $\frac{1}{10}$ Volumen 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Längensstandards dienen die DNA-Marker II, VII und eine 100 bp-Leiter von Boehringer Mannheim. Die angelegte Spannung betrug 5–12 V/cm Teststrecke. Anschließend wurden die Gele in Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/L) gefärbt und die DNA durch Fluoreszenzanregung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch durch Aufnahme eines Spektrums zwischen 260 nm und 340 nm. In weitgehend proteinfreien Proben sollte dabei das Verhältnis der Extinktionen E_{260}/E_{280} bei 1,8–2,0 liegen. Die DNA-Konzentration der Ausgangslösung läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$c_{\text{DNA}} = 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} [\text{ng}/\mu\text{L}] \quad (2.1)$$

c_{DNA} : Konzentration der DNA

E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

2.2.3.5 Transformation von *E. coli*

100–200 μL kompetente *E. coli* XL-1 Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 5–10 μL der gewünschten DNA zugefügt. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Transformationsansatz einem Wärmeschock ausgesetzt, indem er

für 2 min bei 42° C ins Wasserbad gestellt wurde. Gleich im Anschluß wurden die so erwärmten Proben für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 0,9 ml LB-Medium zugefügt und bei 37° C für eine Stunde im Rotationsschüttler mit 150–220 rpm kultiviert. Schließlich wurden diese Ansätze auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.3.6 Transfektion eukaryontischer Zellen

Transiente Transfektion: Die transiente Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte nach der Kalziumphosphat-Methode [14]. 3–4 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:4 neu ausgesät. Der Transfektionsansatz bestand aus 10 µg DNA in 250 µL 0,1 x TE8 (DNA-Konzentration 40 µg/mL), 284 µL 2 x HBS und 35 µL 2 M CaCl₂-Lösung. Vor der Transfektion wurden die Einzelsubstanzen zusammengefügt, gründlich gemischt und dann 30 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen pipettiert und diese über Nacht bei 37° C und 3 % CO₂ inkubiert. Tags darauf erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden von nun an bei 5 % CO₂ weitergezüchtet. Die transiente Transfektion vor „patch-clamp“-Experimenten wurde mit dem Effective Transfektionsreagenz von QIAGEN durchgeführt, da auf den Zellen liegende Kalziumphosphat-Niederschläge eine Sondierung der Zellen mit der Pipette verhindern hätten.

| | | |
|----------------|--------|--|
| 2 x HBS-Puffer | 280 mM | NaCl |
| | 10 mM | KCl |
| | 1,5 mM | Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O |
| | 12 mM | Dextrose |
| | 50 mM | HEPES |
| 0,1 x TE8 | 1 mM | Tris-HCl(pH 8,0) |
| | 0,1 mM | EDTA (pH 8,0) |

Herstellung stabil exprimierender HEK293-Zellen: Die stabile Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte nach demselben Protokoll wie die transiente Transfektion mit Kalziumphosphat. Ab dem ersten Mediumwechsel wurde jedoch Geneticin (G418) in einer Konzentration von 0,2 mg/mL zum Medium zugefügt, um transfizierte Zellen zu selektionieren. Die Zellen wurden nach mehreren Passagen vereinzelt und auf separaten Schalen herangezüchtet, so daß jede Kulturschale Zellen aus einem Zellklon enthielt. Vor der weiteren Züchtung wurden die Zellklone durch Immunfluoreszenz-Färbung [18] angefärbt, um die Homogenität der Rezeptorexpression zu beurteilen. Inhomogen exprimierende Zellklone wurden daraufhin verworfen. Melanie Philipp bestimmte die Rezeptordichte durch Radioligandbindung mit dem α_2 -Antagonisten [^3H]-RX821002.

2.2.3.7 Immunfluoreszenz-Färbung

Am Vortag der Färbung wurden die Zellen einer 12-Kammer-Schale in 200 μL Medium suspendiert und auf einen Objektträger aufgebracht. Nachdem sich die Zellen angeheftet hatten, wurde der Objektträger mit Medium überschichtet. Am Tag der Färbung wurde das Medium abgesaugt und der Objektträger für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS überschichtet. Danach wurde der Objektträger 3 x 5 min mit PBS inkubiert, um das PFA abzuspielen. In einer feuchten Kammer wurde nun für 20–30 min Präinkubationslösung auf den Objektträger geschichtet. Danach wurde mit der Inkubationslösung für 90 min bei RT inkubiert und schließlich 3 x 5 min mit PBS gespült, das 0,5 mM CaCl_2 enthielt. Schließlich erfolgte eine Überschichtung mit n-Propylgallat.

| | |
|-----------------------|--|
| Präinkubationslösung: | PBS |
| | 0,05 % (v/v) Triton X100 |
| | 1 Spatelspitze BSA |
| Inkubationslösung: | Präinkubationslösung + 1:500 M1-Antikörper |
| | 0,5 mM Kalziumchlorid |

2.2.4 Messung von Membranströmen

Membranströme wurden bei konstant gehaltener Spannung („voltage clamp“) mit der „whole cell patch-clamp“-Technik gemessen [23]. Pipetten wurden mit einem Kapillarziehgerät aus Borsilikatglas-Kapillaren hergestellt. Der Gleichstromwiderstand der gefüllten Pipetten lag im Bereich von 3–6 M Ω . Die Membranströme wurden mit einem „patch-clamp“-Verstärker aufgenommen, mit einem Niederfrequenz-Bessel-Filter (1–3 kHz Eckfrequenz) analog gefiltert und in einem IBM-kompatiblen PC gespeichert. Der GIRK-Strom wurde als Einwärtsstrom bei einer konstant gehaltenen Spannung von -90 mV gemessen [10]. Spannungsrampen (von -120 mV bis +60 mV in 500 ms, alle 10 s) wurden benutzt, um Strom-Spannungsbeziehungen zu bestimmen.

Extrazelluläre Lösung: 120 mM NaCl
20 mM KCl
2 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES-NaOH

Pipettenlösung: 100 mM Kaliumaspartat
40 mM KCl
5 mM MgATP
10 mM HEPES-KOH
5 mM NaCl
2 mM EGTA
2 mM MgCl₂
0,01 mM GTP

2.2.5 Statistik

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden als arithmetische Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler in den einzelnen Abbildungen dargestellt. Signifikanzangaben beziehen sich auf Unterschiede zwischen „knockout“-Tieren und den dazugehörigen WT-Kontrollen. Unterschiede eines Einzelparameters zwischen einer „knockout“-Linie und den entsprechenden WT-Kontrolltieren wurden mit einem zweiseitigen Student-t-Test verglichen. Zum statistischen Vergleich von mehr als zwei Untersuchungskollektiven wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse („one-way ANOVA“) mit anschließendem Dunnett-Test durchgeführt. Für alle statistischen Tests wurde als statistisch relevantes Signifikanzniveau ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

Kapitel 3

Ergebnisse

Vor Beginn dieser Arbeit war durch pharmakologische Experimente bei mehreren Spezies gezeigt worden, daß der wichtigste α_2 -Rezeptorsubtyp für die präsynaptische Funktion der α_{2A} -AR ist [42]. Es gab auch Hinweise darauf, daß noch ein weiterer Rezeptorsubtyp an der präsynaptischen Inhibition beteiligt ist [28, 41, 64, 78]. Mangels subtypselektiver Liganden konnte jedoch nicht geklärt werden, welchem Subtyp bzw. welchen Subtypen dieser Rezeptor zuzuordnen ist. Diesem Problem, sowie der Frage wie sich ggf. die beteiligten Rezeptorsubtypen unterscheiden, sollte im zentralen Nervensystem für die Neurotransmitter Noradrenalin (α_2 -AR als Autorezeptoren) und Dopamin (α_2 -AR als Heterorezeptoren) nachgegangen werden.

3.1 α_2 -adrenerge Rezeptoren als Autorezeptoren

Die Autorezeptorfunktion wurde an Schnitten aus dem Kortex von Mausgehirnen untersucht. Die Schnitte wurden mit [^3H]-Noradrenalin beladen und die Veränderung der – mittels elektrischer Reize verursachten – Transmitterfreisetzung durch verschiedene Liganden bzw. endogen freigesetztes Noradrenalin beobachtet (Abb. 3.1).

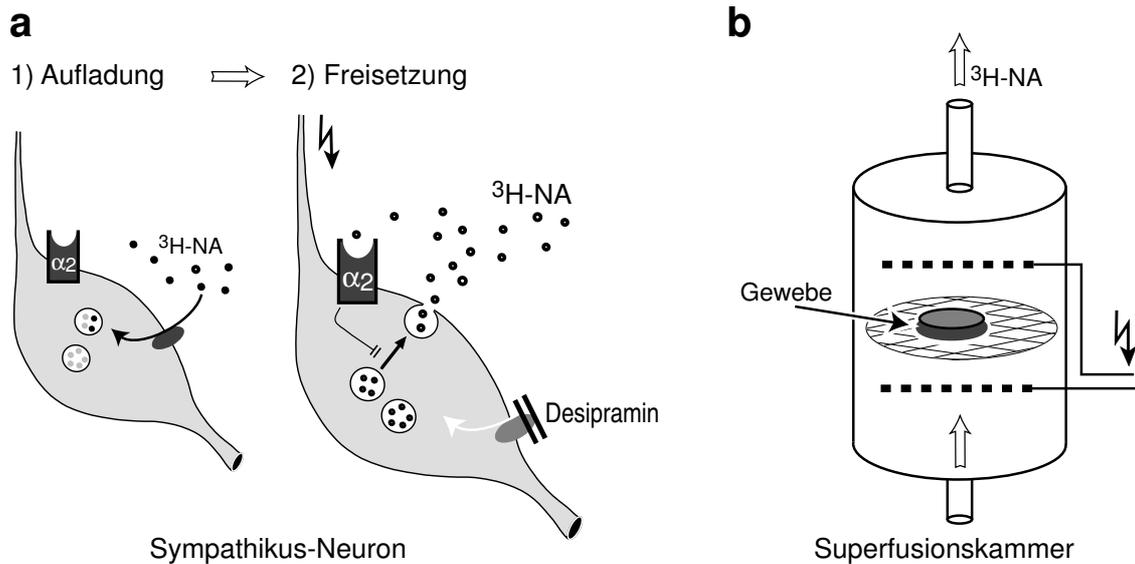


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Experiments: **a)** 1. Aufladung. Durch Inkubation mit [^3H]-Noradrenalin wurde dieses über präsynaptische Noradrenalintransporter in die synaptischen Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. 2. Transmitterfreisetzung. Durch elektrische Stimulierung der Gewebeschnitte kam es zur Freisetzung des radioaktiv markierten Noradrenalins. Eine Wiederaufnahme des freigesetzten Transmitters wurde durch Blockierung des Noradrenalintransporters mit Desipramin verhindert. **b)** Das freigesetzte [^3H]-Noradrenalin wurde durch den kontinuierlichen Fluß des Superfusionspuffers abtransportiert. Die Radioaktivität im Superfusat – und damit das freigesetzte Noradrenalin – wurde dann durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

3.1.1 Aktivierung durch exogene Agonisten

Die Experimente bestanden aus fünf oder sechs Abschnitten, in denen jeweils mit vier Reizen bei einer Frequenz von 100 Hz stimuliert wurde. Die Anwesenheit des α_2 -Antagonisten Rauwolscin führte unter diesen Reizbedingungen nicht zu einer Steigerung der Noradrenalinfreisetzung – es konnte also noch keine Autoinhibition vorliegen [51, 67]. Abb. 3.2 zeigt Konzentrations-Wirkungskurven für die α_2 -Agonisten UK 14,304 und Noradrenalin.

Wie im oberen Teil der Abb.3.2a gezeigt, blieb die stimulierte [^3H]-Noradrenalinfreisetzung, ausgedrückt als Anteil des Gewebetritiums, ohne Anwesenheit eines Agonisten konstant bei 0,8%. Der untere Teil der Abb.3.2a stellt im Gegensatz dazu ein Experiment mit dem α_2 -Agonisten UK 14,304 in ansteigenden Konzentrationen dar. Im Verlauf der fünf Stimulationsperioden wurde die Transmitterfrei-

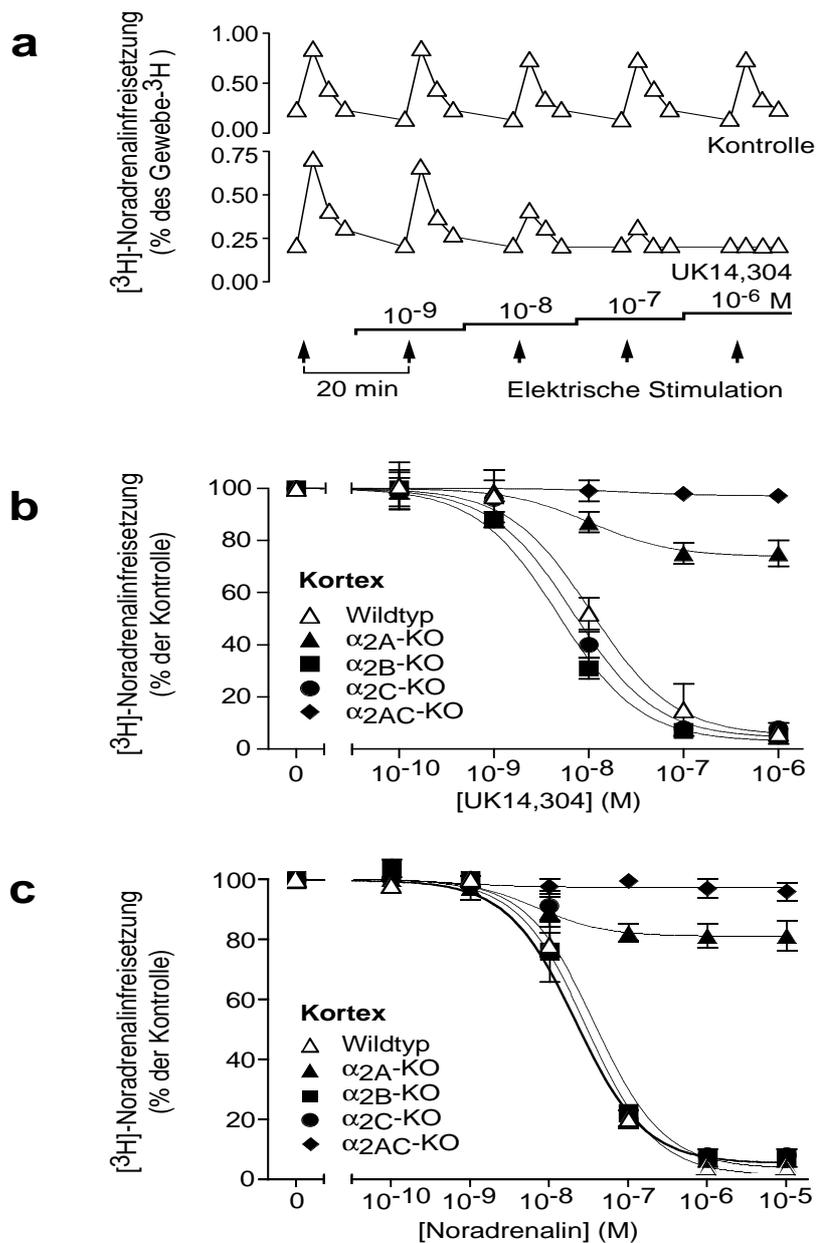


Abbildung 3.2: Hemmung der [³H]-Noradrenalinfreisetzung aus Kortexgewebeschnitten des Mausgehirns von WT- und α₂-KO-Mäusen durch den α₂-Agonisten UK 14,304. **a**) Beispiel eines Einzelexperimentes. Die Kortexgewebeschnitte wurden mit 4 Reizen bei 100Hz in 20minütigem Abstand gereizt. Ohne Agonist war die [³H]-Noradrenalinfreisetzung während 5 Stimulationen konstant (oberer Graph). Durch den α₂-Agonisten UK14,304 konnte die Transmitterfreisetzung vollständig unterdrückt werden (unterer Graph). **b**) Konzentrations-Wirkungskurven für UK 14,304. Bei WT-Mäusen, α_{2A}-, α_{2B}-, und α_{2C}-KO-Mäusen konnte die [³H]-Noradrenalinfreisetzung durch UK 14,304 gehemmt werden, während sie bei α_{2AC}-KO-Mäusen unbeeinflusst blieb. **c**) Hemmung der [³H]-Noradrenalinfreisetzung durch exogenes Noradrenalin. Die Hemmung der Transmitterfreisetzung unterschied sich nicht zwischen α_{2B}- und α_{2C}-KO-Mäusen. Bei α_{2A}-KO-Mäusen war die hemmende Wirkung von Noradrenalin deutlich eingeschränkt und sie fehlte völlig in α_{2AC}-KO-Mäusen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler von 8–16 Gewebestücken.

setzung durch den Agonisten zunehmend gehemmt, bis zur vollständigen Inhibition bei $1 \mu\text{M}$ UK 14,304. Die untersuchten Mauslinien unterschieden sich deutlich bezüglich der Transmitterinhibition durch UK 14,304 (Abb.3.2b). Bei WT-Mäusen konnte die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung in Abhängigkeit von der Agonistkonzentration um maximal 96 % gehemmt werden. Mäuse, bei denen α_{2B} - oder α_{2C} -AR deletiert waren, unterschieden sich im Verlauf der UK 14,304 Konzentrations-Wirkungskurven nicht von Wildtypmäusen. Bei Geweben aus α_{2A} -KO-Mäusen konnte die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung nur um 24 % gehemmt werden. Die verbleibende Hemmung mußte durch mindestens einen weiteren α_2 -Rezeptorsubtyp bedingt sein. Durch Kreuzung von Mäusen, bei denen nur ein α_2 -Rezeptorsubtyp deletiert war, entstanden Mäuse, denen zwei α_2 -Rezeptorsubtypen fehlten, die also nur noch einen α_2 -Rezeptorsubtyp exprimierten. Lebensfähig waren bisher nur Mäuse, die noch α_{2B} -AR exprimierten (α_{2AC} -KO) [25]. In Kortexgewebestücken dieser α_{2AC} -KO-Mäuse wurde die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung auch durch $1 \mu\text{M}$ UK 14,304 nicht gehemmt (Abb. 3.2b). Die gesuchten Rezeptoren, die zusammen mit α_{2A} -AR die Noradrenalinfreisetzung im Kortex hemmen, sind demnach vom Subtyp α_{2C} .

Auch der physiologische Agonist Noradrenalin hemmte die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung konzentrationsabhängig (Abb. 3.2c). Ähnlich wie UK 14,304 hemmte Noradrenalin die Transmitterfreisetzung bei WT- und α_{2C} -KO-Mäusen in stärkerem Ausmaß als bei α_{2A} -KO-Mäusen. Auch Noradrenalin konnte die Transmitterfreisetzung in Kortexgewebestücken von α_{2AC} -KO-Mäusen nicht beeinflussen. Außerdem unterschied sich der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven bei α_{2B} -KO- und WT-Mäusen nicht. Auch dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung der α_{2B} -Rezeptoren an der präsynaptischen Regulation der Noradrenalinfreisetzung.

3.1.2 Aktivierung durch gewebeeigenes Noradrenalin

Die Experimente mit α_2 -Agonisten, die von außen in definierter Konzentration appliziert wurden, legten den Schluß nahe, daß α_{2A} - und α_{2C} -AR als Autorezeptoren

die Noradrenalinfreisetzung im Kortex regeln. Es stellte sich nun die Frage, ob gewebeeigenes Noradrenalin auch beide α_2 -Rezeptorsubtypen aktiviert. Zur Beleuchtung dieser Frage wurden Gewebeschnitte mit 1, 2 und 64 Reizfolgen (eine Reizfolge bestand aus 4 Reizen bei 100 Hz) stimuliert. Die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung war bei 2 und 64 Reizfolgen deutlich größer als bei einer einzelnen Reizfolge (Abb. 3.3a).

Der α_2 -Antagonist Rauwolscin ($1\ \mu\text{M}$) steigerte die Transmitterfreisetzung bei 64 Reizfolgen, was die unter diesen Stimulationsbedingungen vorhandene Autoinhibition sichtbar werden ließ (Abb. 3.3a). Aus Geweben von α_{2A} - und α_{2AC} -KO-Mäusen ließ sich mit zunehmender Reizfolgenzahl signifikant mehr Transmitter freisetzen als bei WT-, α_{2B} -KO- oder α_{2C} -KO-Mäusen. Die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung bei α_{2AC} -KO-Mäusen entsprach der freigesetzten Transmittermenge der anderen Mauslinien, wenn deren α_2 -AR durch $1\ \mu\text{M}$ Rauwolscin blockiert waren. Rauwolscin konnte die Transmitterfreisetzung bei α_{2AC} -KO-Mäusen nicht mehr steigern (Abb. 3.3b). Diese Resultate belegen, daß α_{2A} - und α_{2C} -AR auch von gewebeeigenem Noradrenalin aktiviert werden können.

3.2 α_2 -adrenerge Rezeptoren als Heterorezeptoren

Physiologische und pharmakologische Experimente belegen, daß α_2 -AR präsynaptisch nicht nur die Freisetzung von Noradrenalin (Autorezeptorfunktion), sondern auch anderer Neurotransmitter (Heterorezeptorfunktion) wie Dopamin, Serotonin oder Acetylcholin beeinflussen [70]. Sind an der Regulation der Freisetzung dieser Neurotransmitter auch mehrere α_2 -Rezeptorsubtypen beteiligt? Sind dies die gleichen wie bei der Autoinhibition? Diese Fragen sollten für den Neurotransmitter Dopamin beantwortet werden, indem Gewebeschnitte aus den Basalganglien von Wildtyp- und transgenen Mauslinien verwendet wurden. Inkubiert wurde bei diesen Experimenten statt mit [^3H]-Noradrenalin mit [^3H]-Dopamin. Die Dopamintransporter wurden während der Experimente mit Nomifensin blockiert, um eine Wiederaufnahme von [^3H]-Dopamin in die Neurone zu verhindern.

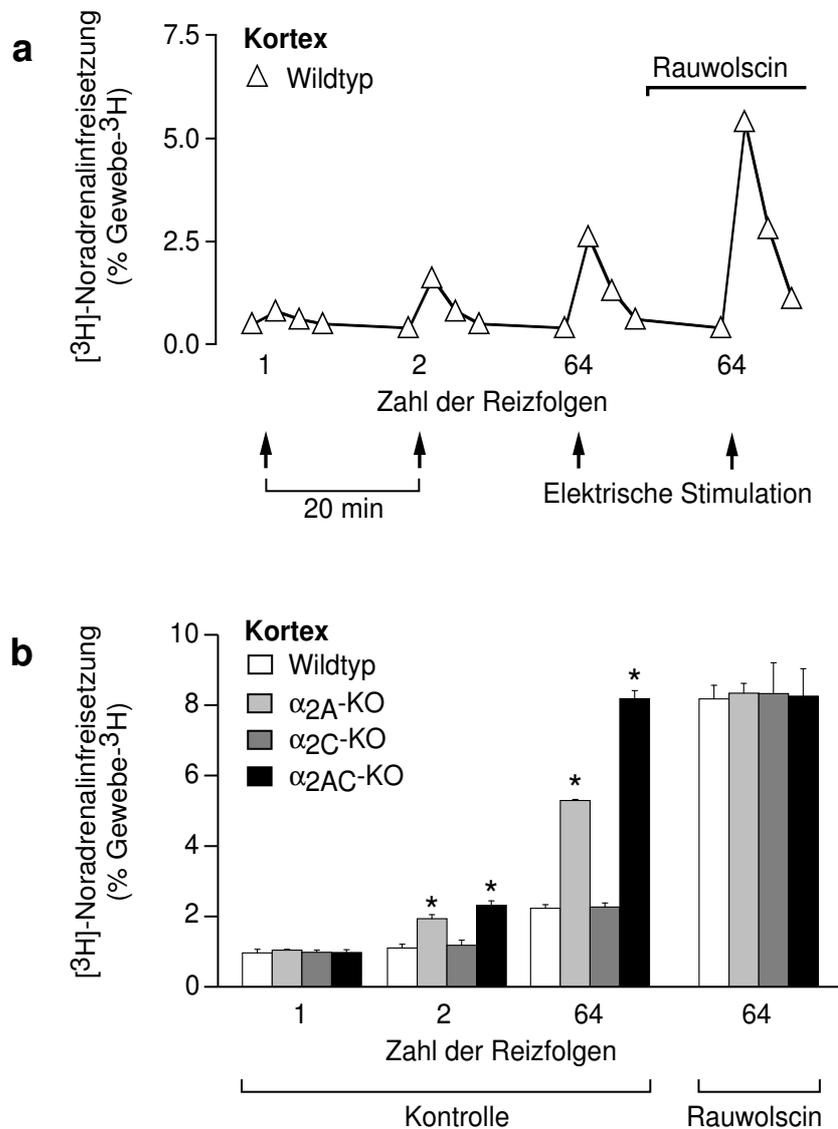


Abbildung 3.3: Autoinhibition der $[^3\text{H}]$ -Noradrenalinfreisetzung durch gewebeeigenes Noradrenalin in Gewebestücken aus dem Kortex des Gehirns. **a**) Repräsentatives Einzelexperiment mit Wildtypgewebe. Die Stimulation bestand aus 1, 2 und 64 Reizfolgen mit einer Frequenz von 1 Hz (eine Reizfolge bestand aus 4 Reizen bei 100 Hz). Durch Blockade der α_2 -AR mit dem nicht subtypselektiven α_2 -Antagonisten Rauwolscin ($1 \mu\text{M}$) wurde die durch 64 Reizfolgen freigesetzte Transmittermenge signifikant gesteigert. **b**) $[^3\text{H}]$ -Noradrenalinfreisetzung in Gewebestücken aus dem Kortex des Gehirns von WT-Mäusen, α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} - und α_{2AC} -KO-Mäusen ($n=8-16$ Gewebestücke). Im Vergleich zu WT-Mäusen war die freigesetzte Transmittermenge bei α_{2A} - und α_{2AC} -KO-Mäusen signifikant ($p < 0,05$) höher, was für eine verminderte präsynaptische Autoinhibition bei diesen Mäusen spricht. Rauwolscin steigerte die freigesetzte Transmittermenge aller Mauslinien auf das Niveau der α_{2AC} -KO-Tiere.

3.2.1 Aktivierung durch UK 14,304

Zunächst wurden mit dem α_2 -Agonist UK 14,304 Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Die maximale [^3H]-Dopaminfreisetzung wurde durch eine Reizfolge von 20 Einzelreizen bei 10 Hz erreicht.

Die freigesetzte Transmittermenge blieb während eines Experimentes konstant und konnte durch UK 14,304 konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abb.3.4a). Bei WT-, α_{2B} - und α_{2C} -KO-Mäusen kam es zu einer maximalen Inhibition der [^3H]-Dopaminfreisetzung von 79 %. Dieser Effekt war bei α_{2A} -KO-Mäusen deutlich verringert und fehlte in Basalganglien von Mäusen, die weder α_{2A} - noch α_{2C} -AR exprimierten (α_{2AC} -KO) (Abb.3.4b). Somit wird die Dopaminfreisetzung in den Basalganglien von den gleichen Rezeptorsubtypen (α_{2A} und α_{2C}) wie die Noradrenalinfreisetzung im Kortex gehemmt.

3.2.2 Aktivierung durch gewebeeigenen Transmitter

In den Basalganglien konnten nur sehr wenige noradrenerge Neurone nachgewiesen werden [55]. Es stellte sich also die Frage, ob die noradrenerge Innervation der Basalganglien ausreicht, um die Dopaminfreisetzung über α_2 -AR zu hemmen. Dieser Frage wurde nachgegangen, indem die Gewebestücke mit 5, 10 und 50 Reizen bei einer Frequenz von 20 Hz stimuliert wurden. Eine höhere Reizzahl führte dabei zu einer höheren Transmitterfreisetzung (Abb. 3.5a). Mit zunehmender Reizzahl setzten α_{2A} - und α_{2AC} -KO-Mäuse signifikant mehr [^3H]-Dopamin frei als WT- oder α_{2C} -KO-Mäuse. Da bei α_{2A} - im Vergleich zu α_{2AC} -KO-Mäusen die Transmitterfreisetzung noch durch α_2 -Agonisten inhibiert wurde, müssen zusätzlich α_{2C} -AR an der präsynaptischen Inhibition beteiligt sein. Die aus dem Gewebe von α_{2AC} -KO-Mäusen freigesetzte Transmittermenge entsprach jener der anderen Genotypen, wenn deren α_2 -AR durch 1 μM Rauwolscin blockiert waren (Abb.3.5). Rauwolscin konnte die Transmitterfreisetzung aus dem Gewebe von α_{2AC} -KO-Tieren nicht mehr steigern.

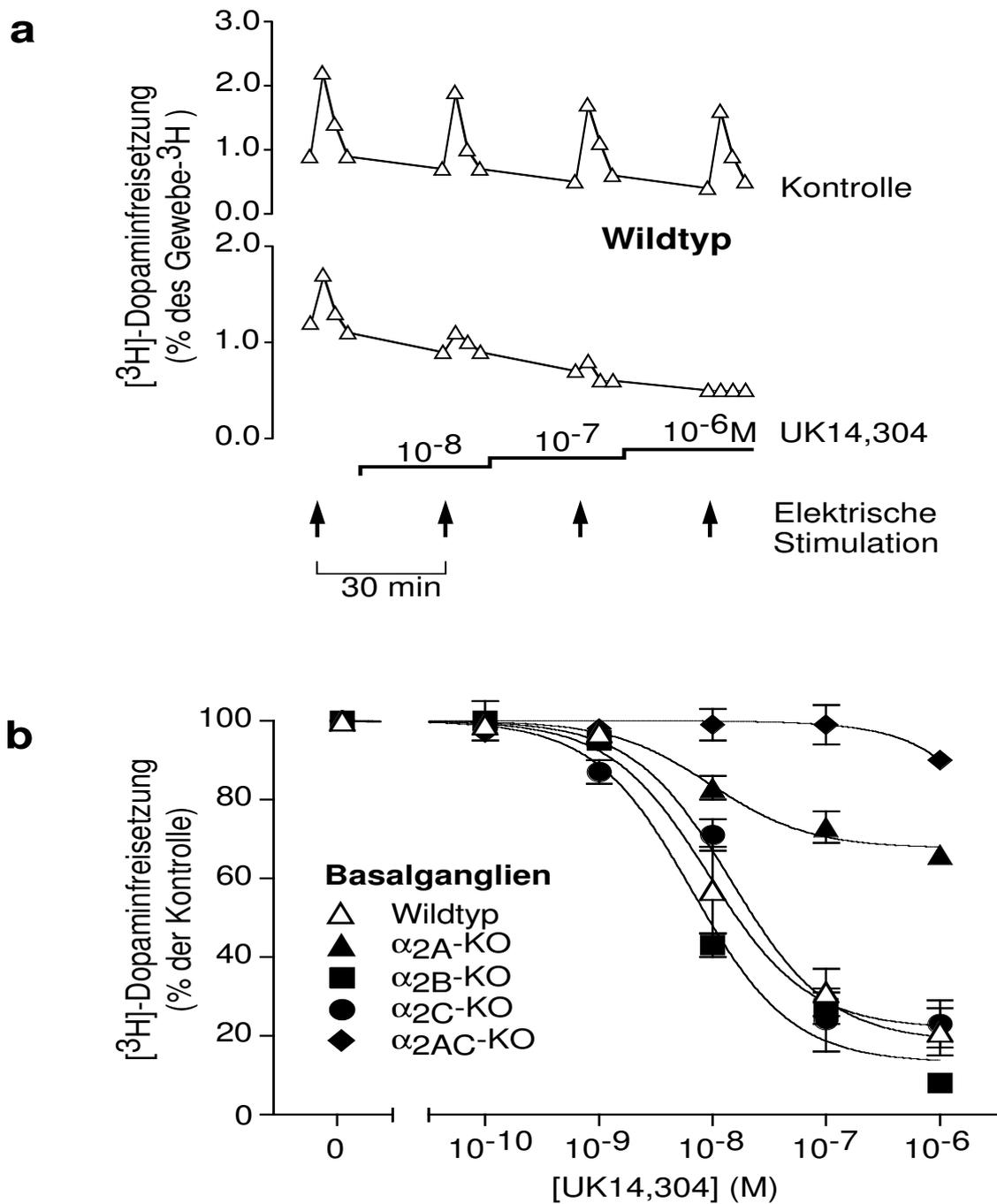


Abbildung 3.4: Hemmung der [^3H]-Dopaminfreisetzung aus Basalganglien von WT- und KO-Mäusen. Gewebestücke aus Basalganglien wurden mit [^3H]-Dopamin inkubiert und mit 20 Einzelreizen bei 10 Hz stimuliert. **a)** Repräsentative Einzelerperimente an Gewebe aus WT-Mäusen. Ohne Agonist blieb die Freisetzung während der Stimulationsperioden konstant (oberer Teil), der α_2 -Agonist UK 14,304 unterdrückte die Transmitterfreisetzung hingegen vollständig (unterer Teil) **b)** Der α_2 -Agonist UK 14,304 hemmte die Dopaminfreisetzung in den Basalganglien von WT-Mäusen und Mäusen, denen nur ein α_2 -Rezeptorsubtyp fehlte. Die inhibitorische Wirkung des Agonisten war bei α_{2A} -KO-Mäusen erheblich reduziert und fehlte völlig in α_{2AC} -KO-Mäusen. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von 9–12 Gewebestücken je Genotyp.

Somit können α_{2B} -AR nicht an der präsynaptischen Inhibition der Dopaminfreisetzung beteiligt sein. Die Dopaminfreisetzung wird folglich auch durch α_2 -Rezeptoren der Subtypen α_{2A} und α_{2C} gehemmt.

3.3 Zeitverlauf der K^+ -Kanal-Aktivierung durch α_2 -adrenerge Rezeptoren

Zwei α_2 -Rezeptorsubtypen, α_{2A} und α_{2C} , inhibieren präsynaptisch die Transmitterfreisetzung. Unterscheiden sich diese Rezeptoren in irgendeiner Weise? An Mausvorhöfen wurde bereits gezeigt, daß beide Rezeptoren je nach Stimulationsfrequenz unterschiedlich aktiv sind [25]. Hemmen α_{2A} - und α_{2C} -AR die Neurotransmitterfreisetzung unterschiedlich schnell? Eine Methode, die eine ausreichend hohe zeitliche Auflösung erreicht, um diese Frage zu beantworten, ist die „patch-clamp“-Technik. Um sie anwenden zu können, wurden HEK293-Zellen stabil mit α_{2A} - bzw. α_{2C} -AR transfiziert. Aus 48 Zelllinien wurden zwei mit mittlerer (2 pmol/mg Membranprotein) und hoher (15–24 pmol/mg Membranprotein) Rezeptorkonzentration für die Experimente ausgewählt. Diese wurden vor den Messungen transient mit GIRK-Kanälen transfiziert. Während eines Experiments wurden die α_2 -Rezeptoren durch Noradrenalin (0,1 nM – 1 μ M) stimuliert, und der Kaliumstrom mittels „whole cell patch-clamp“-Technik gemessen (Abb.3.6). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Moritz Bünemann im Labor von Marlene Hosey (Northwestern University, Chicago) im Rahmen eines vom Boehringer-Ingelheim-Fonds geförderten Forschungsaufenthaltes durchgeführt.

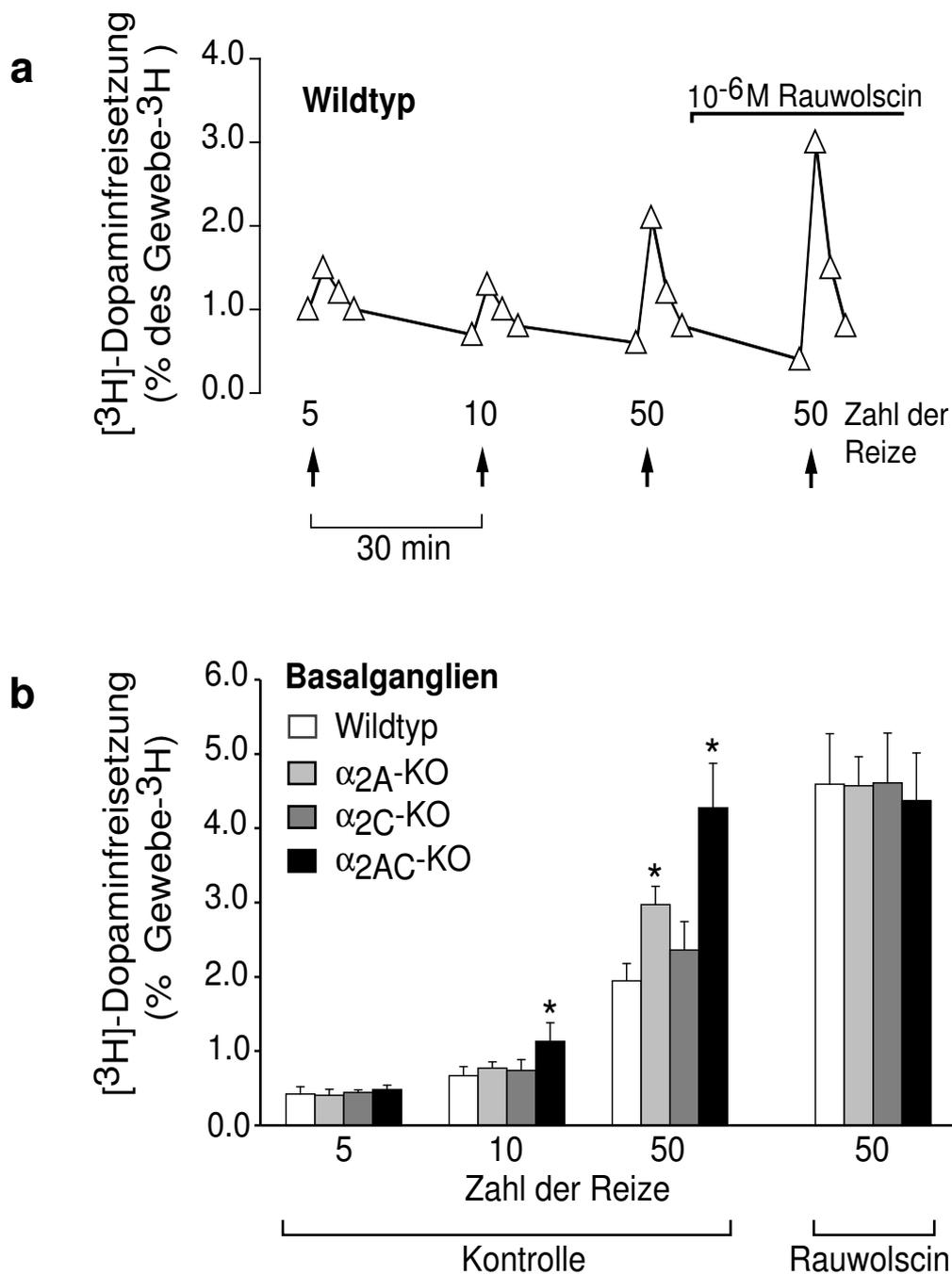


Abbildung 3.5: Heteroinhibition der [^3H]-Dopaminfreisetzung in den Basalganglien. **a)** Repräsentative Darstellung eines Einzelexperimentes in WT-Gewebe. Nach Inkubation mit [^3H]-Dopamin wurden die Gewebestücke aus Basalganglien mit 5, 10 oder 50 Reizen bei 20 Hz stimuliert. Durch Blockade der α_2 -Rezeptoren mit $1\ \mu\text{M}$ Rauwolscin konnte die Transmitterfreisetzung signifikant gesteigert werden. **b)** [^3H]-Dopaminfreisetzung aus Basalganglien von WT-Mäusen, α_{2A} -, α_{2C} -, und α_{2AC} -KO-Mäusen. Die Transmitterfreisetzung war in Gewebestücken aus α_{2A} - bzw. α_{2AC} -KO-Mäusen signifikant höher als in Gewebestücken aus WT-Mäusen ($p < 0,05$). Rauwolscin hatte bei α_{2AC} -KO-Mäusen keinen weiteren steigernden Effekt auf die Dopaminfreisetzung.

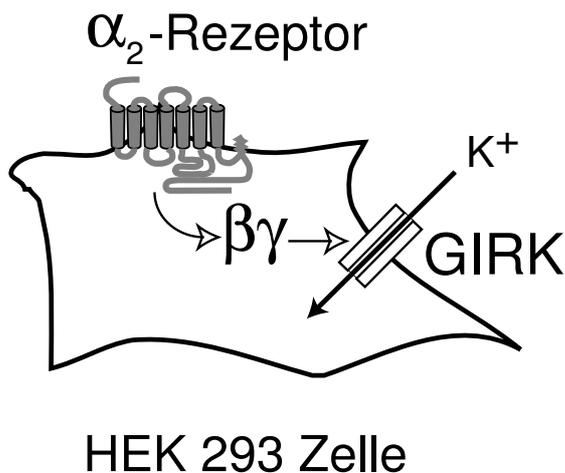


Abbildung 3.6: Schema einer HEK293-Zelle, die α_2 -Rezeptoren stabil exprimiert und transient mit GIRK-Kanälen transfiziert wurde. Durch Aktivierung von α_2 -Rezeptoren kommt es zur Freisetzung von $G_{\beta\gamma}$ -Komplexen, die GIRK-Kanäle aktivieren und zum K^+ -Einstrom führen.

3.3.1 GIRK-Ströme sind abhängig von der Noradrenalin-konzentration

Eine Aktivierung der α_2 -AR durch Noradrenalin führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der GIRK-Ströme (Abb. 3.7). Eine Unterscheidung zwischen den α_2 -Rezeptorsubtypen war anhand der Konzentrations-Wirkungskurven von Zellen mit vergleichbarer Rezeptordichte nicht möglich. Der EC_{50} -Wert der Konzentrations-Wirkungskurven zeigte eine negative Korrelation mit der Rezeptordichte, denn eine 10-fach höhere Rezeptorexpression führte zu einer Linksverschiebung des EC_{50} -Wertes um eine Einheit auf der logarithmischen Konzentrationskala. Diese Beobachtungen belegen, daß die Kopplung der α_2 -Rezeptoren an GIRK-Kanäle über G-Proteine in den transfizierten HEK293-Zellen funktioniert.

3.3.2 Aktivierungskinetik von GIRK-Strömen

Die Aktivierungskinetik der GIRK-Ströme wurde für drei Noradrenalin-konzentrationen (10 nM bis 10 μ M) gemessen. Mit zunehmenden Noradrenalin-konzentrationen nahmen die Zeiten bis zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude der GIRK-Ströme immer mehr ab. Bei einer Rezeptordichte von 2 pmol/mg gab es bei allen

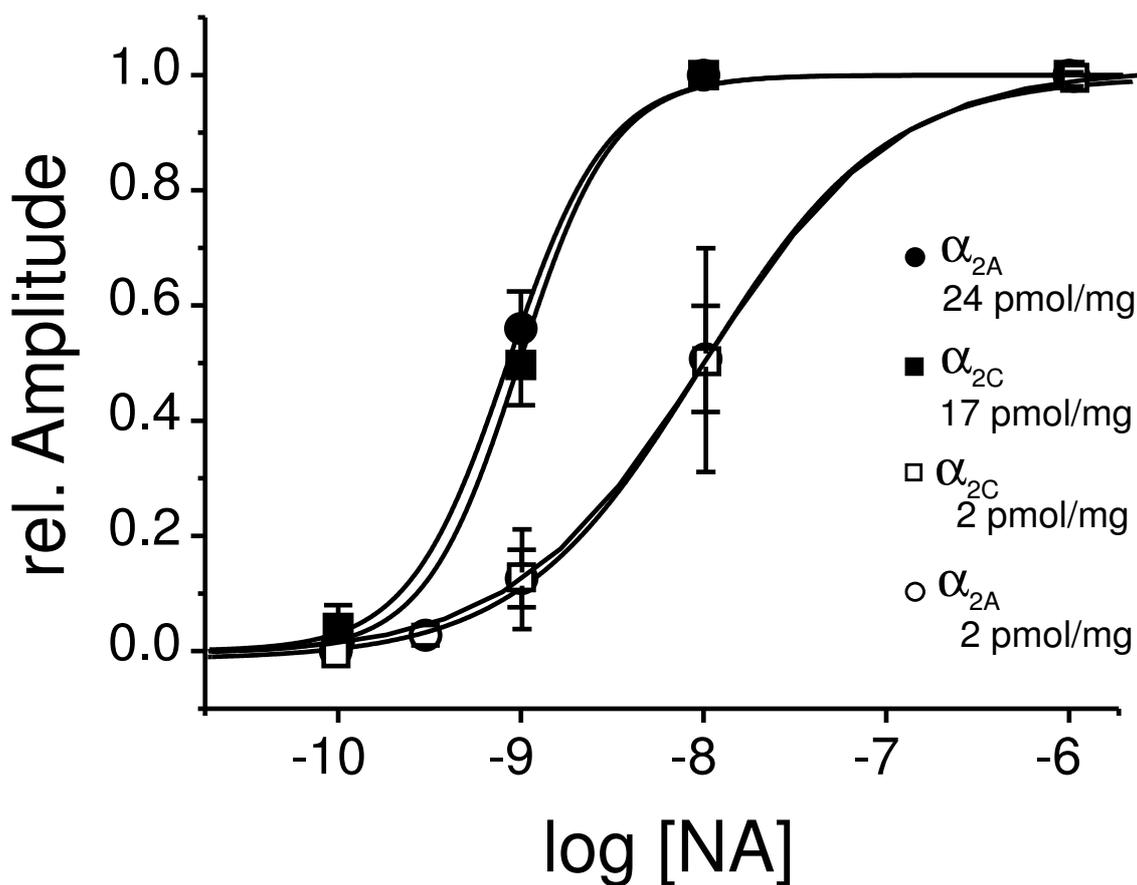


Abbildung 3.7: Konzentrations-Wirkungskurven des Agonisten Noradrenalin an HEK293-Zellen. Gemessen wurden die Amplituden der GIRK-Ströme, die von Noradrenalin verursacht wurden, an Zelllinien mit hoher (α_{2A} , 24 pmol/mg; α_{2C} , 17 pmol/mg) und mittlerer (α_{2A} und α_{2C} , 2 pmol/mg) Rezeptordichte. Bei vergleichbarer Rezeptordichte unterschieden sich die Kurven der α_2 -Rezeptorsubtypen nicht. Eine 10-fach höhere Rezeptordichte führte bei beiden α_2 -Rezeptorsubtypen zu einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 7–10 Experimenten dar.

drei getesteten Noradrenalin-Konzentrationen keinen Unterschied zwischen α_{2A} - und α_{2C} -AR (Abb. 3.8). Bei hoher Rezeptordichte und einer $10 \mu\text{M}$ Noradrenalin-Konzentration ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen α_{2A} -AR ($218 \pm 13 \text{ ms}$) und α_{2C} -AR ($503 \pm 29 \text{ ms}$, $p < 0,05$).

Die noradrenalininduzierte Aktivierungskinetik der GIRK-Ströme war, unabhängig vom Rezeptorsubtyp nicht nur zur Agonistkonzentration, sondern auch zur Rezeptordichte proportional. So verkürzte sich die Zeit bis zur halbmaximalen Amplitude des GIRK-Stroms bei 10 nM Noradrenalin von $5,3 \pm 1,1 \text{ s}$ auf $2,1 \pm 0,3 \text{ s}$, wenn die α_{2A} -Rezeptordichte von 2 pmol/mg auf 15 pmol/mg zunahm (Abb. 3.8). Es konnte also, mit Ausnahme von hohen Noradrenalin-Konzentrationen kombiniert mit hoher Rezeptordichte, kein subtypspezifischer Unterschied bezüglich der Aktivierungskinetik der GIRK-Ströme nachgewiesen werden. Die Aktivierungskinetik korrelierte jedoch gut mit der Rezeptordichte der Rezeptorsubtypen.

3.3.3 Deaktivierungskinetik von GIRK-Strömen

Schließlich wurde der Zeitverlauf der Deaktivierung des GIRK-Stromes nach schneller Entfernung des Agonisten Noradrenalin untersucht (Abb. 3.9). Binnen 60 s nach Wechsel zu freiem Medium kehrten die GIRK-Ströme zu ihrem Ausgangsniveau zurück, unabhängig davon, ob die Ströme von α_{2A} - oder α_{2C} -AR induziert worden waren. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied im Zeitverlauf der Deaktivierung beider Rezeptorsubtypen. Von α_{2A} -AR induzierte GIRK-Ströme kehrten $2\text{--}3,5$ mal schneller zu ihrem Ausgangsniveau zurück als von α_{2C} -AR induzierte Ströme. Dieser Unterschied war sowohl bei hoher also auch bei mittlerer Rezeptordichte beobachtbar (Abb. 3.9, Balkendiagramm).

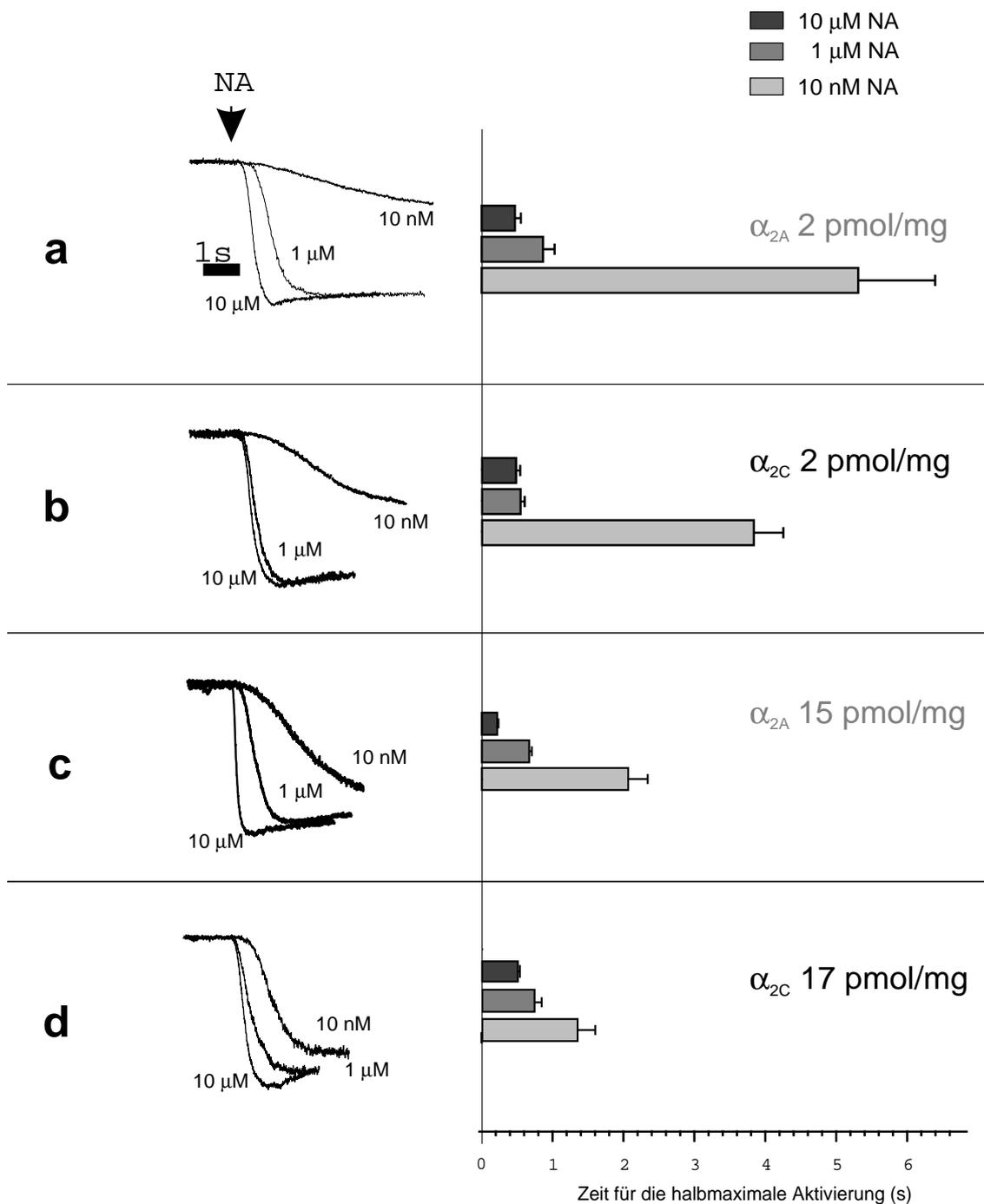


Abbildung 3.8: Aktivierungskinetik der GIRK-Ströme mit dem Agonisten Noradrenalin. Gemessen wurden ins Zellinnere gerichtete GIRK-Ströme als Antwort auf eine schnelle Superfusion mit Noradrenalin in unterschiedlichen Konzentrationen. Links ist jeweils ein repräsentatives Einzelexperiment, rechts sind die zusammengefassten Daten für die Zeit bis zur halbmaximalen Aktivierung dargestellt. Es wurden Zelllinien mit mittlerer (a und b) und hoher (c und d) α_{2A} - bzw. α_{2C} -Rezeptordichte verwendet. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 5–10 verschiedenen Zellen aus 2–3 Transfektionen dar.

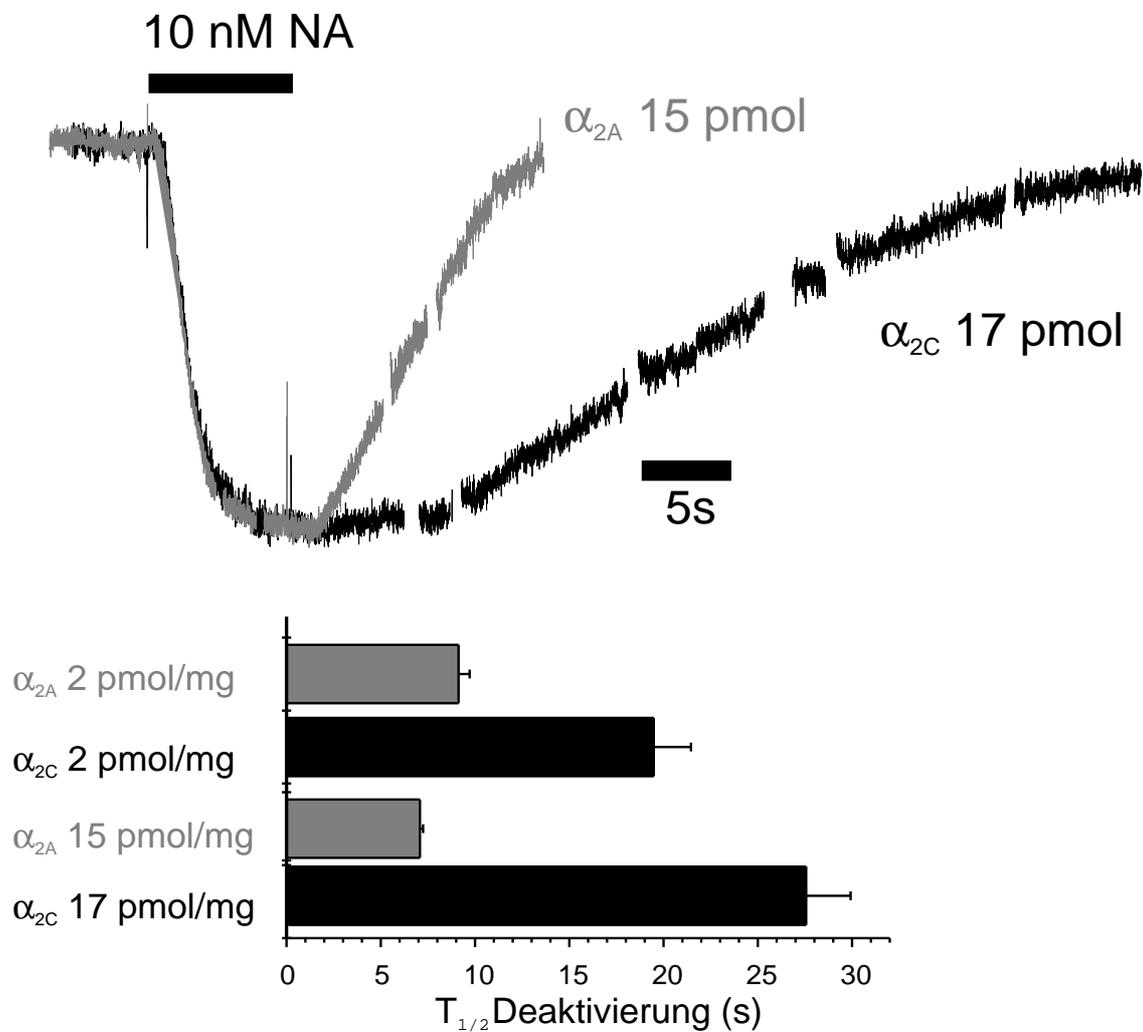


Abbildung 3.9: Zeitverlauf der Deaktivierung der GIRK-Ströme nach schneller Entfernung von Noradrenalin aus dem Superfusionsmedium. Zunächst wurden α_{2A} - oder α_{2C} -AR mit 10 nM Noradrenalin aktiviert bis sich die GIRK-Ströme auf einem stabilen Niveau eingependelt hatten. Dann wurde der Zeitverlauf nach schnellem Entfernen von Noradrenalin bestimmt. Die obere Kurve zeigt ein repräsentatives Einzelexperiment. Im Balkendiagramm sind die Zeiten bis zur halbmaximalen Deaktivierung zusammengefasst und als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5-8$) ausgedrückt.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 α_{2A} - und α_{2C} -adrenerge Rezeptoren als Autorezeptoren

Vor dieser Arbeit konnte mittels pharmakologischer Experimente gezeigt werden, daß der wichtigste präsynaptische α_2 -Rezeptorsubtyp α_{2A} ist [42, 75, 76]. Mangels subtypselektiver Liganden wurden bei diesen Experimenten zur Subtypbestimmung Konzentrations-Wirkungskurven für eine ganze Serie von Liganden erstellt und diese mit Konzentrations-Wirkungskurven aus Geweben korreliert, die nur einen Rezeptorsubtyp exprimierten. Damit gelang zwar eine grobe Abgrenzung des α_{2A} -Rezeptorsubtyps gegenüber α_{2B} - bzw. α_{2C} -AR – eine sichere Unterscheidung zwischen α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptoren konnte mit dieser Methode jedoch nicht erreicht werden. Bei solchen Experimenten ergaben sich Hinweise für eine Beteiligung weiterer α_2 -Rezeptorsubtypen an der präsynaptischen Regulation der Noradrenalinfreisetzung [28, 41, 78]. Diesen Hinweisen sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden mit dem Ziel, die α_2 -Rezeptorsubtypen eindeutig zu identifizieren, die im ZNS die Neurotransmitterfreisetzung inhibieren. Methodisch neu war dabei die Verwendung von Mäusen, deren Gen für je einen α_2 -Rezeptorsubtyp deletiert war [2, 25, 44, 45].

Die Gewebe dieser Mäuse wurden in Experimenten verwendet, bei denen radioaktiv markiertes Noradrenalin durch ein elektrisches Feld aus dem Gewebe freigesetzt wurde. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die Radioaktivität als Maß für endogen freigesetzten Neurotransmitter verwendet wird. Ohne Korrelation mit aufwendigen direkten Messungen des endogen freigesetzten Neurotransmitters müssen die Ergebnisse deshalb vorsichtig interpretiert werden [67]. So wäre es z. B. denkbar, daß ein kleiner Teil des radioaktiven Tritiums nicht mit Noradrenalin verbunden ist, sondern mit seinen Metaboliten.

Die α_2 -Agonisten UK 14,304 und Noradrenalin hemmten die [^3H]-Noradrenalinfreisetzung in Kortexgewebe von WT-, α_{2B} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen um maximal 96 %. In α_{2A} -KO-Mäusen war noch eine Hemmung um 24 % möglich. Dies bestätigte einerseits bisherige Befunde, die α_{2A} -AR als wichtigsten präsynaptischen α_2 -AR identifizierten [42]. Andererseits zeigte die verbliebene Hemmung, daß noch mindestens ein weiterer α_2 -Rezeptorsubtyp beteiligt sein mußte. Auf Gewebe von α_{2AC} -KO-Mäusen hatten die Agonisten keinen Effekt. Da bei diesem Genotyp nur α_{2B} -AR exprimiert sind, kann dieser Rezeptorsubtyp an der präsynaptischen Inhibition nicht beteiligt sein. Folglich muß der zweite präsynaptische α_2 -AR dem Subtyp α_{2C} angehören. α_{2C} -KO-Mäuse zeigten jedoch keine verminderte Hemmung der Transmitterfreisetzung im Vergleich zu WT-Mäusen. Mögliche Erklärungen dafür sind eine große α_{2A} -Rezeptorreserve, oder eine kompensatorische Überexpression von α_{2A} -AR bei α_{2C} -KO-Mäusen. Bindungsdaten an Synaptosomen aus dem Gehirn von WT-, α_{2A} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen zeigten, daß sich die Rezeptormenge der WT-Mäuse durch Addition der Rezeptormengen bei α_{2A} - und α_{2C} -KO-Mäusen ergibt. Dies wurde durch Autoradiographien von Gehirnschnitten bestätigt. Das Verhältnis von α_{2A} - zu α_{2C} -AR bei WT-Mäusen beträgt nach diesen Daten 10:1 [9]. Diese Befunde sprechen für eine große Rezeptorreserve der α_{2A} -AR und gegen eine kompensatorische Überexpression von α_{2A} -AR bei α_{2C} -KO-Mäusen. Damit konnten die präsynaptischen α_2 -AR im Kortex der Maus erstmalig den Subtypen α_{2A} und α_{2C} zugeordnet werden.

4.2 Regulation der Dopaminfreisetzung in den Basalganglien durch α_2 -adrenerge Rezeptoren

α_2 -Rezeptoren regulieren nicht nur die Freisetzung ihres eigenen Transmitters (Noradrenalin und Adrenalin), sondern auch die Freisetzung anderer Transmitter wie z.B. Dopamin oder Serotonin [20, 31, 76, 77, 82]. In dieser Arbeit wurde exemplarisch der Einfluß der α_2 -Rezeptoren auf die Dopaminfreisetzung in den Basalganglien untersucht. Die Untersuchung der Basalganglien war deshalb interessant, weil aus immunhistochemischen Untersuchungen bekannt war, daß α_{2C} -AR in Basalganglien, Tuberculus olfactorius und Hypothalamus besonders konzentriert sind [49, 56, 66, 73]. Auch die α_{2C} -mRNA Konzentration war in diesen Lokalisationen sehr hoch [44]. Handelt es sich also bei den Basalganglien um ein Gewebe, bei dem nicht α_{2A} - sondern α_{2C} -Rezeptoren die Hauptrolle spielen? Bei α_{2A} -KO-Mäusen konnte die Dopaminfreisetzung um maximal 32 % gehemmt werden, während sich die Dopaminfreisetzung bei α_{2C} -KO-Mäusen um 75-80 % reduzieren ließ. Auf funktioneller Ebene stehen demnach – trotz der hohen α_{2C} -Rezeptordichte – auch in den Basalganglien α_{2A} -AR im Vordergrund, wenngleich α_{2C} -AR mit beteiligt sind. Dieser Befund steht im Einklang mit Voltametrie-Experimenten am Nucleus caudatus des Kaninchens, die den α_{2A} -Rezeptorsubtyp als wichtigste Komponente bei der Heteroinhibition der Dopaminfreisetzung identifizierten [76]. Wie läßt sich dies angesichts der hohen α_{2C} -Rezeptordichte erklären? Eine naheliegende Erklärung für diese überraschenden Befunde wäre, daß [3 H]-Dopamin während der Inkubationsphase der Experimente über den Noradrenalintransporter in noradrenerge Nervenenden aufgenommen und in synaptischen Vesikeln gespeichert wird. Somit wäre es möglich, daß die gemessene Radioaktivität nicht aus dopaminergen sondern aus noradrenergen Neuronen stammt. Für diese These spricht auch die höhere Affinität des Noradrenalintransporters zu Dopamin im Vergleich zu Noradrenalin [47], was eine Aufnahme von [3 H]-Dopamin in noradrenerge Neurone begünstigen würde. In Kontrollexperimenten wurde der Noradrenalintransporter während der Inkubation

mit radioaktivem Dopamin deshalb mit $1\ \mu\text{M}$ Desipramin blockiert. Desipramin hat eine $3800\times$ höhere Affinität zum Noradrenalintransporter als zum Dopamintransporter und blockiert ersteren deshalb selektiv [74]. Eine Beeinträchtigung der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Dopamin in dopaminerge Neurone war nicht zu befürchten, weil Noradrenalintransporter ausschließlich auf noradrenergen und Dopamintransporter nur auf dopaminergen Neuronen vorkommen [47]. Da die Ergebnisse dieser Kontrollexperimente sich nicht von den Experimenten ohne Desipramin während der Inkubationsphase unterschieden, mußte diese Erklärungsmöglichkeit verworfen werden. Zudem sind die Basalganglien nur schwach von noradrenergen Neuronen innerviert [32, 40, 55, 79], was die Frage aufwirft, wie α_2 -Rezeptoren in dieser Region *in vivo* überhaupt aktiviert werden können. Zhang et al. schlugen vor, daß nicht Noradrenalin sondern Dopamin die α_2 -AR in den Basalganglien stimuliert. Sie konnten zeigen, daß Dopamin im Vergleich zu Noradrenalin eine etwa gleich hohe Affinität zum α_{2C} -AR und sogar eine 3-8x höhere Affinität zum α_{2A} -AR der Maus hat [84]. Diese These würde erklären warum α_2 -Rezeptoren – trotz der geringen noradrenergen Innervation – die Dopaminfreisetzung in den Basalganglien hemmen können. Eine Erklärung für den geringen funktionellen Anteil der α_{2C} -AR an der präsynaptischen Inhibition bietet diese These jedoch nicht. Holmberg et al. untersuchten die Lokalisation der α_{2C} -AR in den Basalganglien genauer und fanden, daß ein Großteil der α_{2C} -AR auf GABA-haltigen Neuronen oder Gliazellen lokalisiert sind [29]. Diese Befunde erklären die funktionelle Hauptrolle der α_{2A} -AR bei der Hemmung der Dopaminfreisetzung trotz höherer Dichte der α_{2C} -AR.

4.3 Zwei α_2 -adrenerge Rezeptoren zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung – ein generelles Prinzip?

In den zwei Gehirnregionen, die untersucht wurden, zeigte sich, daß zwei α_2 -Rezeptorsubtypen die präsynaptische Regulation der Transmitterfreisetzung regulieren - im Neokortex als Autorezeptoren, in den Basalganglien als Heterorezeptoren. Beidesmal wurde durch α_{2A} -AR eine stärkere Hemmung der Transmitterfreisetzung erreicht, als durch α_{2C} -AR. In Herzvorhöfen der Maus [25] wird die Noradrenalinfreisetzung auch von α_{2A} - und α_{2C} -AR gehemmt. Im Unterschied zum Gehirn hatten α_{2C} -AR jedoch einen stärkeren Anteil an der präsynaptischen Inhibition [25]. Auch die Inhibition der Kontraktionen des Vas deferens bei der Maus wird nicht ausschließlich von α_{2A} -AR vermittelt [2]. Bei all diesen Beispielen vermitteln jeweils zwei α_2 -Rezeptoren, α_{2A} und α_{2C} , die präsynaptische Funktion, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Es zeichnet sich also ab, daß es sich dabei um ein generelles Prinzip handelt.

4.4 Vergleich mit anderen Transmittersystemen

Gibt es noch weitere Transmitter, deren Freisetzung präsynaptisch von mehr als einem Autorezeptor moduliert wird? Die Freisetzung des wichtigsten exzitatorischen Transmitters Glutamat wird präsynaptisch durch mindestens vier metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu) geregelt (Übersicht bei [15]). Die präsynaptischen mGlu-Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Affinität zu Glutamat als auch in der subzellulären Lokalisation auf dem Neuron. Funktionell zeigt sich dies darin, daß mGlu2-Rezeptoren, die von der aktiven Zone der Synapse weiter entfernt sind, erst bei höheren Stimulationsfrequenzen aktiviert werden, weil erst bei hohen Stimulationsfrequenzen die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt auf Werte

steigt, die ausreichend hoch sind, um auch den entfernt liegenden Rezeptor zu aktivieren. Bei serotonergen Neuronen der dorsalen Raphe übernehmen drei Rezeptoren, 5-HT_{1A} , 5-HT_{1B} und 5-HT_{1D} , die Autorezeptorfunktion (Übersicht bei [68]). Diese Rezeptoren unterscheiden sich wahrscheinlich in der Entfernung zur aktiven Zone der Synapse. Die Affinität zu Serotonin hingegen ist bei allen drei Rezeptorsubtypen ungefähr gleich. Es gibt also neben Noradrenalin noch weitere Transmitter, die mehr als einen präsynaptischen Autorezeptor benutzen.

4.5 Unterschiede zwischen α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren

Der Vergleich mit anderen Neurotransmittern zeigt nicht nur, daß diese auch mehrere Autorezeptoren benutzen. Er zeigt ferner, daß sich Autorezeptorsubtypen z.B. hinsichtlich der Affinität zu ihrem physiologischen Liganden oder der subzellulären Lokalisation unterscheiden können. Wie unterscheiden sich α_{2A} - und α_{2C} -Rezeptoren? Zunächst ist bekannt, daß Noradrenalin eine höhere Affinität zu α_{2C} - als zu α_{2A} -AR besitzt [11, 16]. Weiterhin sind 90% der α_2 -AR im ZNS vom Typ α_{2A} und nur etwa 10% α_{2C} [50]. Hein et al. konnten auch bei α_2 -AR – ähnlich wie bei metabotropen Glutamaterezeptoren – eine Abhängigkeit der Aktivierung von der Frequenz feststellen. Sie zeigten an Herzvorhofgewebestücken, daß bei niedrigen Stimulationsfrequenzen die Noradrenalinausschüttung durch α_{2C} -AR stärker inhibiert wurde als durch α_{2A} -AR. Bei hohen Stimulationsfrequenzen hemmten α_{2A} -AR die Transmitterfreisetzung in größerem Ausmaß als α_{2C} -AR [25]. Eine Erklärung für die Frequenzabhängigkeit wäre eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation, wie dies bei Glutamaterezeptoren der Fall ist. Dann müßten α_{2A} -AR weiter von der aktiven Zone entfernt sein, weil sie erst bei höheren Frequenzen aktiviert werden. Das Verhalten der α_{2C} -AR passt jedoch nicht zu dieser These, weil sie zwar bei niedrigen Stimulationsfrequenzen schon aktiv sind, bei hohen Frequenzen die Transmitter-

freisetzung aber weniger stark hemmen [25]. Deshalb wurde die Frage gestellt, ob sich α_{2A} - und α_{2C} -AR in der Kinetik der Inhibition unterscheiden. Dazu wurde die Aktivierungs- und die Deaktivierungskinetik von GIRK-Strömen nach Stimulation der α_2 -Rezeptoren mit Noradrenalin an stabil exprimierenden Zelllinien untersucht. Anhand der Aktivierungskinetik der GIRK-Ströme ließen sich α_{2A} - und α_{2C} -AR bei gleicher Rezeptordichte nicht unterscheiden. Für beide Rezeptorsubtypen galt, daß eine 10-fach höhere Rezeptorkonzentration zu einer $2,5\text{-}3 \times$ schnelleren Aktivierung der GIRK-Ströme führte. Bezüglich der Deaktivierungskinetik unterschieden sich α_{2A} - und α_{2C} -AR jedoch signifikant, denn α_{2A} -AR deaktivierten schneller als α_{2C} -AR. Die Ursache für die unterschiedliche Deaktivierungskinetik liegt wahrscheinlich in der höheren Affinität (und damit langsameren Dissoziationskinetik) von Noradrenalin zu α_{2C} -AR [11, 16]. Dafür spricht auch die schnellere Deaktivierung von α_{2C} -AR wenn Phenylephrin anstatt Noradrenalin als Agonist benutzt wird, weil Phenylephrin eine niedrigere Affinität zu α_2 -Rezeptoren hat als Noradrenalin [11]. Somit ist die Dissoziation des Noradrenalin vom α_2 -AR der limitierende Schritt für die Kinetik α_2 -AR. Wie bei anderen Transmittersystemen unterscheiden sich präsynaptische α_2 -Rezeptoren in ihrer Affinität zu ihrem physiologischen Liganden. Ob sich die α_2 -Rezeptorsubtypen auch bezüglich ihrer Position zur aktiven Zone der Synapse unterscheiden, ist bisher ungeklärt.

4.6 Schlußfolgerungen

Zwei α_2 -AR, α_{2A} und α_{2C} , dienen als präsynaptische Regulatoren der Transmitterfreisetzung. Sie unterscheiden sich bezüglich der Affinität zu Noradrenalin, was in einer unterschiedlichen Deaktivierungskinetik von GIRK-Strömen zum Ausdruck kommt. Die Aktivierungskinetik zeigt keine subtypspezifischen Unterschiede – korreliert jedoch gut mit der Rezeptordichte (Abb. 4.1).

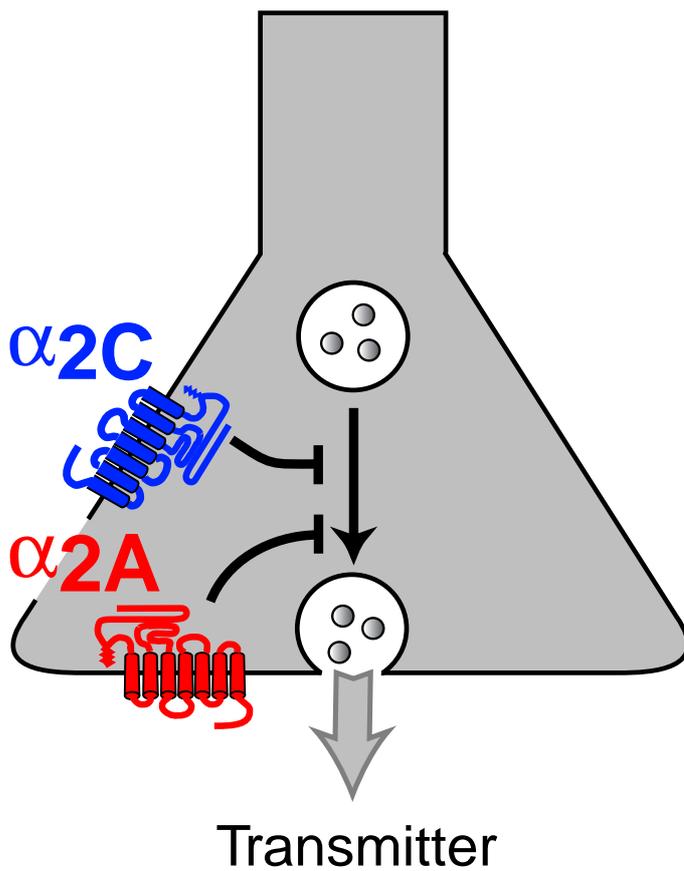


Abbildung 4.1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit: Zwei α_2 -Rezeptorsubtypen, α_{2A} und α_{2C} , regeln die präsynaptische Inhibition der Transmitterfreisetzung als Auto- und Heterorezeptoren im ZNS. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Affinität zu Noradrenalin, was als unterschiedliche Deaktivierungskinetik von GIRK-Strömen zum Ausdruck kam.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Gruppe der adrenergen Rezeptoren (AR) umfasst neun Rezeptoren (3 α_1 -, 3 α_2 -, 3 β -AR), die alle durch die physiologischen Liganden Adrenalin und Noradrenalin aktiviert werden können. Eine Subgruppe der AR bilden die drei α_2 -AR α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} . Sie können prä- oder postsynaptisch lokalisiert sein. Präsynaptisch lokalisierte α_2 -AR hemmen die Transmitterfreisetzung im Sinne einer negativen Rückkopplung. Die Hauptrolle bei der präsynaptischen Hemmung der Transmitterfreisetzung spielen α_2 -AR vom Subtyp α_{2A} . Es lagen zu Beginn dieser Arbeit auch Hinweise vor, daß noch weitere α_2 -Rezeptorsubtypen an dieser Funktion beteiligt sind. Eine eindeutige Zuordnung dieser α_2 -AR zu den Subtypen α_{2B} oder α_{2C} gelang aber bisher nicht. In dieser Arbeit sollte deshalb die Frage beantwortet werden, welche α_2 -AR neben dem α_{2A} -AR an der präsynaptischen Hemmung der Transmitterfreisetzung im zentralen Nervensystem beteiligt sind. Zur Subtypunterscheidung wurden „knockout“-Mäuse verwendet, die nur einen oder zwei α_2 -Rezeptorsubtypen exprimierten. Gehirnschnitte aus dem Neokortex und den Basalganglien dieser Mauslinien wurden mit radioaktiv markiertem Noradrenalin bzw. Dopamin inkubiert. Anschließend wurde in Transmitterfreisetzungsexperimenten mit den so behandelten Gehirnschnitten Konzentrations-Wirkungskurven mit verschiedenen Liganden erstellt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß neben den α_{2A} -AR auch α_{2C} -AR präsynap-

tisch die Transmitterfreisetzung von Noradrenalin und Dopamin hemmen. α_{2A} -AR hemmten die Transmitterfreisetzung mit einer schnelleren Kinetik als α_{2C} -AR. Deshalb wurden in einem weiteren Schritt die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der α_{2A} - und α_{2C} -AR im heterologen Expressionssystem untersucht. Hierzu wurden stabile HEK293-Zelllinien generiert, die entweder α_{2A} - oder α_{2C} -AR unterschiedlich stark exprimierten. Diese Zelllinien wurden transient mit GIRK-Kanälen transfiziert, um die durch Stimulation mit Noradrenalin resultierenden Kaliumströme mit der „patch-clamp“-Technik zu messen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen α_{2A} - und α_{2C} -AR bezüglich der Aktivierungskinetik. α_{2C} -AR deaktivierten jedoch deutlich langsamer als α_{2A} -AR. Diese Befunde belegen, daß zwei der drei α_2 -AR-Subtypen, α_{2A} und α_{2C} , als präsynaptische Autorezeptoren (Noradrenalin) bzw. Heterorezeptoren (Dopamin) die Neurotransmission modulieren. Dies könnte in der Zukunft für die Entwicklung neuer, subtypspezifischer Pharmaka von großer Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

- [1] Ahlquist R.P. (1948) A study of the adrenotropic receptors.
Am. J. Physiol. **153**, 586–600
- [2] Altman J.D., Trendelenburg AU, MacMillan L., Bernstein D., Limbird L., Starke K., Kobilka B.K., Hein L. (1999) Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in α_{2A} -adrenergic receptor knockout mice.
Mol. Pharmacol. **56**, 154–161
- [3] Arnsten A.F.T., Goldman-Rakic P.S. (1985) α_2 -adrenergic mechanism in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates.
Science **230**, 1273–1276
- [4] Arnsten A.F.T., Leslie F.M. (1991) Behavioural and receptor binding analysis of the α_2 -agonist, UK-14,304 (5 bromo-6(2-imidazoline-2-yl amino) quinoxaline): evidence for cognitive enhancement at an α_2 -adrenoceptor subtype.
Neuropharmacology **30**, 1279–1289
- [5] Arnsten A.F.T., Steere J.C., Hunt R.D. (1996) The contribution of α_2 -noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function.
Arch. Gen. Psychiatry **53**, 448–455
- [6] Berthelsen S., Pettinger W.A. (1977) A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci.* **21**, 595–606

- [7] Böhm S.K., Grady E.F., Bunnett N.W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **322**, 1–18
- [8] Bruns D., Jahn R. (2002) Molecular determinants of exocytosis. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **443**, 333–338
- [9] Bücheler M.M., Hadamek K., 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
- [10] Bünemann M., Brandts B., zu Heringdorf D.M., van Koppen C.J., Jakobs K.H., Pott L. (1995) Activation of muscarinic K^+ current in guinea-pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate. *J. Physiol. (Lond.)* **489**, 701–707
- [11] Bünemann M., Bücheler M.M., Philipp M., Lohse M.J., 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
- [12] Bylund D.B., Blaxall H.S., Iversen L.J. Caron M.G., Lefkowitz R.J., Lomasney J.W. (1992) Pharmacological characteristics of α_2 -adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning. *Mol. Pharmacol.* **42**, 1–5
- [13] Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R., Trendelenburg U. (1994) IV. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 121–136
- [14] Chen C., Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745–2752
- [15] Cartmell J., Schoepp D.D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* **75**, 889–907

- [16] Chruscinski A.J., Link R.E., Daunt D.A., Barsh G.S., Kobilka B.K. (1992) Cloning and expression of the mouse homolog of the human α_2 -C2 adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1280–1287
- [17] Coull J.T., Sahakian B.J., Hodges J.R. (1996) The α_2 antagonist idazoxan remedies certain attentional and executive dysfunction in patients with dementia of frontal type. *Psychopharmacology* **123**, 239–249
- [18] Daunt D.A., Hurt C., Hein L., Kallio J., Feng F., Kobilka B.K. (1997) Subtype-specific intracellular Trafficking of α_2 -adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* **51**, 711–720
- [19] Eason M.G., Kurose H., Holt B.D., Raymond J.R., Liggett S.B. (1992) Simultaneous coupling of α_2 -adrenergic receptors to two G proteins with opposing effects: subtype-selective coupling of α_2 -C10, α_2 -C4, and α_2 -C2 adrenergic receptors to G_i and G_s . *J. Biol. Chem.* **267**, 159–161
- [20] Esteban S., Llado J., Sastre-Coll A., Garcia-Sevilla J.A. (1999) Activation and desensitization by cyclic antidepressant drugs of α_2 -autoreceptors, α_2 -heteroreceptors and 5-HT_{1A}-autoreceptors regulating monoamine synthesis in the rat brain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **360**, 135–143
- [21] Graham F.L., Smiley J., Russell, W.C., Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74
- [22] Guo T.Z., Davies M.F., Kingery W.F., Patterson A.J., Limbird L.E., Maze M. (1999) Nitrous oxide produces antinociceptive response via α_{2B} and/or α_{2C} adrenoceptor subtypes in mice. *Anesthesiology* **90**, 470–476
- [23] Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100

- [24] Hein L., Kobilka B.K. (1995) Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* **34**, 357-366
- [25] Hein L., Altman J.D., Kobilka B.K. (1999) Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* **402**, 181-184
- [26] Hein L. (1999) Transgene Modelle zur Untersuchung der Funktion G-Proteingekoppelter Rezeptoren. *Habilitationsschrift, Fachbereich Medizin, Universität Würzburg*
- [27] Hein L. (2001) Transgenic Models of α_2 -adrenergic receptor subtype function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**, 161-185
- [28] Ho S.L., Honner V., Docherty J.R. (1998) Investigation of the subtypes of α_2 -adrenoceptor mediating prejunctional inhibition in rat atrium and cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**, 634-639
- [29] Holmberg M., Scheinin M., Kurose H., Miettinen R. (1999) Adrenergic α_2C -receptors reside in rat striatal GABAergic projection neurons: comparison of radioligand binding and immunohistochemistry. *Neuroscience* **93**, 1323-1333
- [30] Hunter J.C., Fontana D.J., Hedley L.R., Jasper J.R., Lewis R., Link R.E., Secchi R., Sutton J., Eglen R.M. (1997) Assessment of the role of α_2 -adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1339-1344
- [31] Jackisch R., Haaf A., Jeltsch H., Lazarus C., Kelche C., Cassel J.C. (1999) Modulation of 5-hydroxytryptamine release in hippocampal slices of rats: effects of fimbria-fornix lesions on 5-HT_{1B}-autoreceptor and α_2 -heteroreceptor function. *Brain Res. Bull.* **48**, 49-59

- [32] Jacobowitz D.M., Richardson J.S. (1978) Methods for the rapid determination of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the same brain region. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **8**, 515-519
- [33] Jahn R., Südhof T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 863–911
- [34] Janumpalli S., Butler L.S., MacMillan L.B., Limbird L.E., McNamara J.O. (1998) A point mutation (D79N) of the α_{2A} adrenergic receptor abolishes the antiepileptogenic action of endogenous norepinephrine. *J. Neurosci.* **18**, 2004-2008
- [35] Kandel E.R., Siegelbaum S.A. (2000) Transmitter release in: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M (Hrsg.) *Principles of Neural Science* 4. Auflage, 253-279, McGraw-Hill
- [36] Kobilka B.K., Matsui H., Kobilka S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Regan J.W. (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* **238**, 650-656
- [37] Kurose H., Lefkowitz R.J. (1994) Differential desensitization and phosphorylation of three cloned and transfected α_2 -adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10093-10099
- [38] Lakhani P.P., MacMillan L.B., Guo T.Z., McCool B.A., Lovinger D.M., Maze M., Limbird L.E. (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.* **94**, 9950-9955
- [39] Langer S.Z. (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1793-1800

- [40] Laurent J.S., Roizen M.F., Miliaressis E., Jacobowitz D.M. (1975) The effects of self-stimulation on the catecholamine concentration of discrete areas of the rat brain. *Brain Res.* **99**, 194-200
- [41] Limberger N., Trendelenburg A.U., Starke K. (1992) Pharmacological characterisation of presynaptic α_2 -autoreceptors in rat submaxillary gland and heart atrium. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 246–255
- [42] Limberger N., Trendelenburg AU., Starke K. (1995) Subclassification of presynaptic α_2 -adrenoceptors: α_{2D} -autoreceptors in mouse brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **352**, 43–48
- [43] Link R., Daunt D., Barsh G., Chruscinski A., 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
- [44] Link R.E., Stevens M.S., Kulatunga M., Scheinin M., Barsh G.S., Kobilka B.K. (1995) Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α_{2C} -adrenoceptor homolog. *Mol. Pharmacol.* **48**, 48–55
- [45] Link R.E., Desai K., Hein L., Stevens M.E., Chruscinski A., Bernstein D., Barsh G.S., Kobilka B.K. (1996) Cardiovascular regulation in mice lacking α_2 -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* **273**, 803–805
- [46] Lomasney J.W., Lorenz W., Allen L.F., King K. Regan J.W., Yang-Feng T.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and expression of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5094–5098
- [47] Lorang D., Amara S.G., Simerly R.B. (1994) Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J. Neuroscience* **14**, 4903–4914

- [48] Lorenz W., Lomasney J.W., Collins S., Regan J.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) Expression of three α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implications for α_2 -receptor classification. *Mol. Pharmacol.* **38**, 599–603
- [49] MacDonald E., Scheinin M. (1995) Distribution and pharmacology of α_2 -adrenoceptors in the central nervous system. *J. Physiol. Pharmacol.* **46**, 241–258
- [50] MacMillan L.B., Hein L., Smith M.S., Piascik M.T., Limbird L.E. (1996) Central hypotensive effects of the α_{2A} -adrenergic receptor subtype. *Science* **273**, 801–805
- [51] Marshall I. (1983) Stimulation-evoked release of ^3H -noradrenaline by 1, 10 or 100 pulses and its modification through presynaptic α_2 -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **78**, 221–231
- [52] Millan M.J. (1992) Evidence that an α_{2A} -adrenoceptor subtype mediates antinociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **215**, 355–356
- [53] Millan M.J., Bervoets K., Rivet J.M., Widdowson P., Renourd A., LeMarouille-Girardon S., Gobert A. (1994) Multiple α_2 -adrenergic receptor subtypes. II. Evidence for a role of rat α_{2A} -adrenergic receptors in the control of nociception: motor behaviour and hippocampal synthesis of noradrenaline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 958–972
- [54] Miller R.J. (1998) Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 201–227
- [55] Moore R.Y., Card P. (1984) Noradrenaline-containing neuron systems, in: Handbook of chemical neuroanatomy, A. Bjorklund and T. Hokfelt (Hrsg.) Elsevier: Amsterdam., 123–156
- [56] Nicholas A.P., Pieribone V., Höfke T. (1993) Distributions of mRNAs for α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **328**, 575–594

- [57] Philipp M., Brede M.E., Hadamek K., Gessler M., Lohse M.J., Hein L. (2002) Placental α_2 -adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nat. Genet.*, **31**, 311–315
- [58] Regan J.W., Kobilka T.S., Yang-Feng T.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Kobilka B.K. (1988) Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6301–6305
- [59] Riekkinen P.J., Sirviö J., Riekkinen M., Lammintausta R., Riekkinen P. (1992) Atipamezole, an α_2 antagonist, stabilizes age-related high-voltage spindle and passive avoidance defects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **41**, 611–614
- [60] Rizo J., Südhof T. C. (2002) SNAREs and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Rev. Neurosci.* **3**, 641–653
- [61] Rohrer D.K., Kobilka B.K. (1998) Insights from in vivo modification of adrenergic receptor gene expression. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 351–371
- [62] Ross E.M. (1996) G protein-coupled receptors in: Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W. (Hrsg.) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. Auflage, McGraw-Hill, p33
- [63] Ruffolo R.R.Jr., Nichols A.J., Stadel J.M., Hieble J.P. (1993) Pharmacologic and therapeutic applications of α_2 -adrenoceptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 243–279
- [64] Rump L.C., Bohmann C., Schaible U., Schollhor J., Limberger N. (1995) α_{2C} -adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 2617–2624
- [65] Sallinen J., Link R.E., Haapalinna A., Vitamaa T., Kulatunga M., Sjöholm B., MacDonald E., Pelto-Huikko M., Leino T., Barsh G.S., Kobilka B.K. Scheinin M. (1997) Genetic alteration of α_{2C} -adrenoceptor expression in mice: Influence

- on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonspecific α_2 -adrenoceptor agonist. *Mol. Pharmacol.* **51**, 36–46
- [66] Scheinin M., Lomasney J.W., Hayden-Hixson D.M., Schambra U.B., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Fremeau R.T. Jr. (1994) Distribution of α_2 -adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **21**, 133–149
- [67] Singer E.A. (1988) Transmitter release from brain slices elicited by single pulses: a powerful method to study presynaptic mechanisms. *TIPS* **9**, 274–276
- [68] Stamford J.A., Davidson C., McLaughlin D.P., Hopwood S.E. (2000) Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT₁ autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? *Trends Neurosci.* **23**, 459–465
- [69] Starke K., Endo T., Taube H.D. (1975) Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with α adrenoceptor affinity. *Nature* **254**, p440
- [70] Starke K., Göthert M., Kilbinger H. (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* **69**, 864–989
- [71] Surprenant A., Horstman D.A., Akbarali H., Limbird L.E. (1992) A point mutation of the α_2 -adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science* **257**, 977–980
- [72] Takano Y., Yaksh T.L. (1992) Characterization of the pharmacology of intrathecally administered α_2 -agonists and antagonists in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 764–772
- [73] Talley E.M., Rosin D.L., Lee A., Guyenet P.G., Lynch K.R. (1996) Distribution of α_{2A} -adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **372**, 111–134

- [74] Tatsumi M., Groshan K., Blakely R.D., Richelson E. (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **340**, 249–258
- [75] Trendelenburg AU., Limberger N., Starke K. (1993) Presynaptic α_2 -autoreceptors in brain cortex: α_{2D} in the rat and α_{2A} in the rabbit. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **348**, 35–45
- [76] Trendelenburg AU., Starke K., Limberger N. (1994) Presynaptic α_{2A} -adrenoceptors inhibit the release of endogenous dopamine in rabbit caudate nucleus slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 473–481
- [77] Trendelenburg AU., Trendelenburg M., Starke K., Limberger N. (1994) Release-inhibiting α_2 -adrenoceptors at serotonergic axons in rat and rabbit brain cortex: evidence for pharmacological identity with α_2 -autoreceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **349**, 25–33
- [78] Trendelenburg AU., Sutej I., Wahl C.A., Molderings G.J., Rump L.C., Starke K. (1997) A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic α_2 -autoreceptors: Rat vena cava, rat atria, human kidney and guinea-pig urethra. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **356**, 721–737
- [79] Versteeg D.H.G., Gugten J.V.D., DeJong W., Polkovits M. (1976) Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat brain. *Brain Res.* **113**, 563–574
- [80] Wei L.N. (1997) Transgenic animals as new approaches in pharmacological studies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 119–141
- [81] Yamada M., Inanobe A., Kurachi Y. (1998) G-Protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol. Rev.* **50**, 723–757

- [82] Yavich L., Lappalainen R., Sirviö J., Haapalinna A., MacDonald E. (1997) α_2 -adrenergic control of dopamine overflow and metabolism in mouse striatum. *Eur. J. Pharmacol.* **339**, 113–119
- [83] Zeng D., Harrison J.K., D'Angelo D.D., Barber C.M., Tucker A.L., Lu Z., Lynch K.R. (1990) Molecular characterization of a rat α_{2B} -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3102–3106
- [84] Zhang W., Klimek V., Farley J.T., Zhu M., Ordway G.A. (1999) α_{2C} -adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: potential activation by dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1286–1292

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| α_1 -AR | α_1 -adrenerger Rezeptor |
| α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , α_{2D} | α_2 -adrenerge Rezeptorsubtypen A, B, C, D |
| Abb. | Abbildung |
| ANOVA | „analysis of variance“ |
| β -AR | β -adrenerger Rezeptor |
| β ARK | β -adrenerge Rezeptorkinase |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E_x | Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| g | (1)Gramm; (2)Erdbeschleunigung |
| GDP/GTP | Guanosindiphosphat/-triphosphat |
| G_s , G_i , G_o | stimulatorisches, inhibitorisches, „other“ G-Protein |
| $G_\alpha/G_{\beta\gamma}$ | G-Protein α -/ $\beta\gamma$ -Untereinheiten |
| GIRK | G-Protein-regulierter einwärtsgerichteter Kaliumkanal |
| G-Protein | GTP-bindendes Protein |
| GRK | G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |

| | |
|-----------|---|
| KO | „knockout“ |
| L | Liter |
| min | Minute |
| M | molar(mol/l) |
| mRNA | messenger RNA |
| NSF | N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor |
| PBS | phosphatgepufferte Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| RGS | „regulator of G-protein signaling“ |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardabweichung des Mittelwerts |
| SNAP | „soluble NSF attachment protein“ |
| SNARE | „soluble NSF attachment protein receptor“ |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminoethan |
| U | „unit“ als Einheit der Enzymaktivität |
| UK 14,304 | 5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ylamino)-quinoxalin |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| VAMP | „vesicle-associated membrane protein“ |
| WT | Wildtyp |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Prof. Lohse für die Möglichkeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu promovieren.

Prof. Hein für die Vergabe des Themas und die mustergültige Begleitung während aller Phasen dieser Arbeit.

Kerstin Hadamek für die geduldige Einführung in unterschiedliche Methoden.

Dr. Bünemann für die fruchtbare Zusammenarbeit in Chicago.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Markus Maria Bücheler
geboren am: 04.02.1975 in Tettngang
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981–1985 Franz-Anton-Maulbertsch-Grundschule Langenargen
1985–1994 Karl-Maybach-Gymnasium Friedrichshafen

Zivildienst

1994–1995 Zivildienst in Ravensburg

Studium

1995–2002 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Ärztliche Weiterbildung

seit 01.07.2002 Arzt im Praktikum am Max-Planck-Institut
für neuropsychologische Forschung Leipzig