

**Heiko Meyer**

**Klonierung und Untersuchung der zentralnervösen Genexpression  
 $\alpha_2$  - adrenerger Rezeptoren  
und ihre Regulation durch chronischen psychosozialen Streß  
bei *Tupaia belangeri***



**Cuvillier Verlag Göttingen**

Umschlaggestaltung:

Das Hintergrundbild zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnittes durch das Kleinhirn von *Tupaia belangeri*. Zu sehen sind Neuronen aus der Kernregion des Locus coeruleus, welche RNA ausprägen (kleine schwarze Punkte), die für den alpha2A-adrenergen Rezeptor codieren. Das Präparat wurde mit radioaktiv markierten alpha2A-spezifischen RNA-Sonden hybridisiert, mit einer Fotoemulsion beschichtet und mit Toluidinblau angefärbt.

Das kleine Foto zeigt zwei männliche Tupaias beim Austragen eines Kampfes zur Festlegung der sozialen Hierarchie.

**Klonierung und Untersuchung der zentralnervösen Genexpression  
 $\alpha_2$  - adrenerger Rezeptoren  
und ihre Regulation durch chronischen psychosozialen Streß  
bei *Tupaia belangeri***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Agrarwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
Heiko Meyer  
aus Wittingen / Ohrdorf

Göttingen, im November 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

**Meyer, Heiko:**

Klonierung und Untersuchung der zentralnervösen Genexpression  
 $\alpha_2$  - adrenerger Rezeptoren und ihre Regulation durch chronischen  
psychosozialen Streß bei *Tupaia belangeri* / vorgelegt von Heiko Meyer. -  
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2000  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2000  
ISBN 3-89873-415-3

D 7

|                             |                         |
|-----------------------------|-------------------------|
| 1. Referent:                | Prof. Dr. Dr. B. Brenig |
| 2. Korreferent:             | Prof. Dr. E. Fuchs      |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 23.11.2000              |

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung  
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile  
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)  
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2000  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-415-3

für  
Arne und Sören



| INHALTSVERZEICHNIS                                                                                                         | SEITE     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b>                                                                                                       | <b>1</b>  |
| 1. 1. Funktion des zentralen noradrenergen Systems                                                                         | 3         |
| 1. 2. $\alpha_2$ -Adrenerge Rezeptoren und ihre Rolle im monoaminergen System                                              | 5         |
| 1. 2. 1. Pharmakologische, physiologische und molekularbiologische Klassifizierung $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorsubtypen | 5         |
| 1. 2. 2. Molekulare Struktur und Wirkungsweise $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren                                           | 8         |
| 1. 3. Auswirkungen von chronischem Streß auf das periphere und zentrale noradrenerge System                                | 12        |
| 1. 4. Verwendung von <i>Tupaia belangeri</i> (Spitzhörnchen) in der Streßforschung                                         | 13        |
| 1. 5. Fragestellung und Ziel der Arbeit                                                                                    | 14        |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>                                                                                            | <b>16</b> |
| 2. 1. Tiere und Tierhaltung                                                                                                | 16        |
| 2. 2. Psychosoziale Konfrontation                                                                                          | 16        |
| 2. 3. Bestimmung des Cortisolgehaltes im Urin                                                                              | 17        |
| 2. 4. Bestimmung des Kreatiningehaltes im Urin                                                                             | 18        |
| 2. 5. Allgemeine molekularbiologische Methoden                                                                             | 18        |
| 2. 5. 1. Horizontale Agarosegel - Elektrophorese                                                                           | 19        |
| 2. 5. 2. Vertikale Polyacrylamidgel - Elektrophorese (PAGE)                                                                | 19        |
| 2. 5. 3. Restriktionsenzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA                                                                | 20        |
| 2. 5. 4. Extraktion und Fällung von Plasmid-DNA aus Restriktionsansätzen                                                   | 20        |
| 2. 6. Klonierung der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ - adrenergen Rezeptorgene                          | 21        |
| 2. 6. 1. Extraktion von genomischer DNA                                                                                    | 21        |
| 2. 6. 2. Extraktion von poly(A) <sup>+</sup> RNA                                                                           | 21        |
| 2. 6. 3. Reverse Transkription der poly(A) <sup>+</sup> RNA                                                                | 22        |
| 2. 6. 4. Amplifizierung spezifischer Nucleinsäure-Sequenzen mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)                   | 23        |
| 2. 6. 5. Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmenten aus Agarosegelen                                                   | 25        |
| 2. 6. 6. Ligierung des PCR-Produktes in Plasmidvektoren                                                                    | 26        |
| 2. 6. 7. Transformation der Plasmide in <i>E.coli</i>                                                                      | 26        |
| 2. 6. 8. Plasmidpräparation                                                                                                | 27        |
| 2. 6. 9. Sequenzanalyse der rekombinanten Plasmid-DNA                                                                      | 27        |
| 2. 7. Proteinsequenz-Vergleiche                                                                                            | 28        |

|           |                                                                                                                                                         |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2. 8.     | In situ - Hybridisierung - Histochemie                                                                                                                  | 28        |
| 2. 8. 1.  | Gewebepräparation und Erzeugung von Gefrierschnitten                                                                                                    | 29        |
| 2. 8. 2.  | In vitro -Transkription der cDNA und radioaktive Markierung der Ribosonden                                                                              | 29        |
| 2. 8. 3.  | Hybridisierung der Gewebeschnitte mit den Ribosonden                                                                                                    | 31        |
| 2. 8. 4.  | Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte                                                                                                               | 31        |
| 2. 8. 5.  | Autoradiographie der hybridisierten Gewebeschnitte                                                                                                      | 32        |
| 2. 8. 6.  | Densitometrische Auswertung der Hybridisierungssignale                                                                                                  | 32        |
| 2. 8. 7.  | Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale                                                                                | 33        |
| 2. 9.     | Statistik                                                                                                                                               | 34        |
| <b>3.</b> | <b>ERGEBNISSE</b>                                                                                                                                       | <b>35</b> |
| 3. 1.     | Klonierung der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ - adrenergen Rezeptorgene                                                             | 35        |
| 3. 1. 1.  | Isolierung von Rezeptor-Partialsequenzen mit der PCR-Technik                                                                                            | 35        |
| 3. 1. 2.  | Klonierung der Rezeptorgen-Fragmente in Plasmidvektoren                                                                                                 | 36        |
| 3. 1. 3.  | DNA-Sequenzen der klonierten Rezeptorgene                                                                                                               | 38        |
| 3. 1. 4.  | Aminosäuresequenz-Vergleiche der $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren                                                                                      | 41        |
| 3. 2.     | Regionale Verteilung der mRNA der $\alpha_{2A}$ , $\alpha_{2B}$ und $\alpha_{2C}$ -adrenerger Rezeptoren im Gehirn von <i>Tupaia belangeri</i>          | 45        |
| 3. 3.     | Auswirkung der psychosozialen Belastung auf physiologische Merkmale männlicher <i>Tupaia belangeri</i>                                                  | 57        |
| 3. 3. 1.  | Veränderung des Körpergewichts                                                                                                                          | 58        |
| 3. 3. 2.  | Veränderung des Cortisolgehaltes im Urin                                                                                                                | 59        |
| 3. 4.     | Zelluläre Verteilung der Rezeptor-mRNA                                                                                                                  | 60        |
| 3. 5.     | Quantifizierung der zellulären Genexpression $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren bei chronisch gestreßten Tupaia und bei Kontrolltieren                   | 61        |
| 3. 5. 1.  | Quantifizierung der $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA                                                                                             | 66        |
| 3. 5. 2.  | Quantifizierung der $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA                                                                                             | 68        |
| 3. 5. 3.  | Quantifizierung der $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA                                                                                             | 69        |
| <b>4.</b> | <b>DISKUSSION</b>                                                                                                                                       | <b>71</b> |
| 4. 1.     | Sequenzanalyse der klonierten $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C                                                                        | 71        |
| 4. 2.     | Charakterisierung der Genexpression der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptoren im Gehirn von <i>Tupaia belangeri</i> | 73        |
| 4. 2. 1.  | Alpha <sub>2</sub> -adrenerge mRNA-Expression in noradrenergen Nuclei im Gehirn                                                                         | 76        |
| 4. 3.     | Zelluläre Quantifizierung der in situ-Hybridisierungssignale                                                                                            | 78        |
| 4. 3. 1.  | Identifizierung der Zellen                                                                                                                              | 78        |

---

|           |                                                                                                                 |            |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4. 3. 2.  | Zelluläre Verteilung der Hybridisierungssignale                                                                 | 80         |
| 4. 3. 3.  | Vergleich der Ergebnisse aus quantitativer in situ-Hybridisierung und<br>quantitativer Rezeptorautoradiographie | 81         |
| 4. 4. 1.  | Mögliche physiologische Bedeutung der streßinduzierten<br>mRNA-Regulation $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren  | 84         |
| 4. 4. 2.  | Mögliche Auswirkungen auf das periphere Hormonsystem                                                            | 86         |
| 4. 5.     | Mögliche Ursachen für die streßinduzierten Regulierung<br>$\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren                     | 88         |
| <b>5.</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>                                                                                          | <b>91</b>  |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>                                                                                     | <b>93</b>  |
| <b>7.</b> | <b>METHODISCHER ANHANG</b>                                                                                      | <b>106</b> |
| 7.1.      | Verbrauchsmaterial und Geräte                                                                                   | 106        |
| 7. 2.     | Puffer, Medien und Lösungen                                                                                     | 108        |
| <b>8.</b> | <b>ABKÜRZUNGEN</b>                                                                                              | <b>110</b> |



## 1. EINLEITUNG

Alpha<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptoren ( $\alpha_2$ -AR) sind transversal in die Zellmembrane eingebettete Proteine, die die körpereigenen Botenstoffe Noradrenalin und Adrenalin binden. Durch eine Signalübertragung in das Zellinnere vermitteln sie die Auslösung einer Kette von biochemischen Prozessen, die eine Zellantwort hervorrufen. Mit molekularbiologischen Methoden sind bis heute vier verschiedene  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgene von unterschiedlichen Spezies kloniert und pharmakologisch charakterisiert worden (MACDONALD et al., 1997).  $\alpha_2$ -AR sind in vielen peripheren Organen wie der Niere, den glatten Muskelfasern der Gefäßwände, des Magen-Darm-Traktes und des Uterus und auf den Blutplättchen lokalisiert (RUFFOLO et al., 1993).  $\alpha_2$ -AR treten im gesamten Zentralnervensystem (ZNS) sowohl postsynaptisch in Hirnregionen auf, die Signale aus noradrenergen Zentren des Hirnstammes und der Brücke empfangen, als auch präsynaptisch auf den Endigungen der Fortsätze dieser noradrenergen Neuronen selbst. In den noradrenergen Neuronen regulieren  $\alpha_2$ -AR die Ausschüttung von Noradrenalin, indem sie bei einer Stimulation eine Hyperpolarisierung des Zellmembranpotentials herbeiführen und damit die Aktivität der Nervenzelle herabsetzen. Dieser Mechanismus wird als Autoregulation bezeichnet (STARKE et al., 1989).

In der Humanmedizin werden  $\alpha_2$ -adrenerge Agonisten zur therapeutischen Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt und finden weitere Verwendung als Analgetika und Sedativa. Die Einsatzbereiche  $\alpha_2$ -adrenerger Antagonisten liegen teilweise in der Behandlung von psychosomatischen Erkrankungen. Allerdings konnten auf diesem Anwendungsgebiet aufgrund einer unzureichenden Subtypspezifität  $\alpha_2$ -adrenerger Liganden noch keine hochwirksamen Präparate entwickelt werden (RUFFOLO, 1993).

Das noradrenerge System und mit ihm das  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorsystem ist an der Antwort des Organismus auf umweltbedingte Stressoren maßgeblich beteiligt. Streß führt zu einer Aktivierung der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse), welche unter Belastung eine erhöhte Ausschüttung der Streßhormone Cortisol und Corticosteron aus der Nebennierenrinde und Adrenalin aus dem Nebennierenmark hervorruft und zu einer Aktivierung des peripheren Nervensystems über den Sympathikus beiträgt (DUNN, 1987). Im Gehirn regt Streß das noradrenerge System zu einer erhöhten Aktivität an. Die größte Bedeutung für die Versorgung des Gehirns mit Noradrenalin hat der Locus coeruleus (LC), eine in der Brücke des Rautenhirns gelegene Neuronengruppe. In ihr sind

mehr als die Hälfte aller im ZNS gelegenen noradrenergen Zellen lokalisiert, deren weitverzweigte Efferenzen alle wichtigen Hirnregionen mit Noradrenalin versorgen (FOOTE et al., 1983). Die autoregulative Funktion präsynaptisch in der Membran noradrenerger Zellen verankerter  $\alpha_2$ -AR trägt dazu bei, daß das noradrenerge System in einem homöostatischen Zustand aus Transmittersynthese und -ausschüttung gehalten wird (STARKE et al., 1989). Es ist jedoch mehrfach gezeigt worden, daß eine chronische Aktivierung noradrenerger Neurone zu einer permanent erhöhten Ausschüttung des Neurotransmitters führen kann, den der Syntheseapparat der Zellen auf Dauer nicht mehr ausgleichen kann (KUCHEL, 1991; REDMOND und LEONARD, 1997).

Zur Untersuchung der Auswirkungen chronischen Stresses auf das ZNS hat sich *Tupaia belangeri* als ein geeignetes Tiermodell erwiesen. Männliche Tupaias besitzen ein ausgeprägtes territoriales Verhalten, welches auf die Laborumgebung, in der der Käfig das Revier eines Tieres darstellt, übertragbar ist. Wiederholte Konfrontationen und eine permanente Gegenwart des dominanten Artgenossen führen im unterlegenen Tier zu chronischen Streßsymptomen, die in Veränderungen der Stoffwechsel-Physiologie und des Verhaltens resultieren (VON HOLST et al., 1983; FUCHS et al., 1993; FUCHS et al., 1996). Im Gehirn dieser Tiere verursacht chronischer Streß in bestimmten Regionen morphologische Veränderungen der Nervenzellen (FUCHS et al., 1995; MAGARIÑOS et al. 1996). In Rezeptorautoradiographie-Studien konnte demonstriert werden, daß Streß in einigen Regionen des Zentralnervensystems subordinater Tupaias zu einer zeitabhängigen Reduktion  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren ( $\alpha_2$ -AR) führt (FLÜGGE et al., 1992; FLÜGGE, 1996).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob diese streßinduzierte Herunterregulation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorproteine bei *Tupaia belangeri* auf eine reduzierte Genexpression zurückzuführen ist. Weiterhin soll geklärt werden, ob in den noradrenergen Neuronen lokalisierte präsynaptische Rezeptoren und / oder postsynaptische Rezeptoren betroffen sind.

Zur Untersuchung der Genexpression der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen sollen ihre codierenden DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mit rekombinanter Technik kloniert werden. Aus diesen Klonen sollen radioaktiv markierte Ribosonden entwickelt werden, welche in *in situ*-Hybridisierungsexperimenten zur Markierung der Rezeptorprotein-codierenden Boten-RNA (mRNA) eingesetzt werden. Durch eine makroskopische Auswertung hybridisierter Hirnschnitte soll Aufschluß über die zentralnervöse Verteilung der subtypspezifischen mRNA-Moleküle  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren erlangt werden. Eine zelluläre, semiquantitative Analyse der Rezeptor-mRNA auf

Hirnschnitten subordinator und nicht-gestresster Tupaia soll zeigen, ob Streß zu einer Regulation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorgene führt.

### 1. 1. Funktion des zentralen noradrenergen Systems

Für das Zentralnervensystem der Ratte beschrieben HÖKFELT et al. (1984) 18 verschiedene Neuronengruppen des catecholaminergen Transmittersystems, aufgeteilt in noradrenerge, dopaminerge und adrenerge Nuclei und bezeichneten sie nach einer von DAHLSTRÖM und FUXE (1964) vorgeschlagenen Nomenklatur. Die im Mittelhirn und Vorderhirn lokalisierten dopaminergen Zellgruppen wurden mit A8 - A16 bezeichnet, die im Bereich des Hirnstammes und der Brücke lokalisierten noradrenergen Nuclei erhielten die Bezeichnung A1 - A7 und die rostral von A1 und A2 in der Medulla oblongata gelegenen adrenergen Zellen C1 und C2.

Im Hirnstamm von *Tupaia belangeri* wurde mit immunocytochemischen Methoden die Anatomie des adrenergen (MITTENDORF et al., 1988) und des noradrenergen Systems (FLÜGGE et al., 1990) unter Verwendung von Antikörpern gegen Phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT) und Tyrosinhydroxylase (TH) untersucht. PNMT und TH sind Enzyme der Biosynthese von Adrenalin und Noradrenalin (siehe hierzu auch Abb. 2).

Die zentrale Neuronenpopulation des noradrenergen Systems ist der LC, welcher die Zellgruppen A4 und A6 umfaßt (DAHLSTRÖM und FUXE, 1964). Innerhalb seiner Grenzen befindet sich über die Hälfte aller noradrenergen Zellen des ZNS, was beim Menschen in jeder Hemisphere etwa 12.000 und bei der Ratte 1.600 Neuronen je Nucleus entspricht (FOOTE, 1987). Efferenzen dieses Kerns projizieren in fast alle Regionen des Gehirns und versorgen sie mit Noradrenalin. So projizieren sie in das Kleinhirn, die Amygdala, den Bulbus olfactorius, den Thalamus, den Hypothalamus, das Mesencephalon, den Hippocampus, die Großhirnrinde, das laterale Tegmentum, verschiedene Regionen der Medulla oblongata und in das Rückenmark. Kein anderer Nucleus des ZNS besitzt derart weit verbreitete Projektionen (FOOTE et al., 1983; HOTELS, 1990; JONES, 1991). Neuronale Eingänge erhält der Locus coeruleus hauptsächlich aus dem N. paragigantocellularis, dem N. präpositus hypoglossii im Hirnstamm, in geringerem Maße aus dem zentralen Höhlengrau, dem paraventriculären Hypothalamus und dem Rückenmark (RASMUSSEN und AGHAJANIAN, 1987; ASTON-JONES et al., 1992; VAN BOCKSTAELE und ASTON-JONES, 1992).

Die elektrophysiologische Aktivität der LC-Neuronen kann im wesentlichen als eine Funktion der physiologischen Aktivität des Organismus betrachtet werden. Ist während des REM (Rapid Eye Movement)-Schlafes kaum Entladungsaktivität meßbar, feuern LC-Neuronen während der Wachphasen auf höherem Niveau und können unter extremer Belastung außerordentlich hohe Aktionspotentiale erreichen (ASTON-JONES und BLOOM; 1981; CIRELLI et al., 1996). Somit spielt der LC bei der Antwort des Organismus auf streßbedingte Reize eine bedeutende Rolle (STONE, 1975; MELIA et al., 1992; WATANABE et al., 1995) und beeinflusst die Signalverarbeitung (KAYAMA et al., 1982; WATERHOUSE et al., 1988) und die synaptischen Plastizität (NEUMAN und HARLEY, 1983; CIRELLI et al. 1996) in den noradrenergen Zielgebieten. Dem LC wird eine Beeinflussung des Wach-Schlaf-Rhythmus, der Aufmerksamkeit und der Reaktionsbereitschaft (*Arousal*-Funktionen) und von Lern- und Gedächtnisleistungen zugesprochen (ASTON-JONES, 1985).

Ein hoher Noradrenalingehalt im Gehirn infolge erhöhter neuronaler Aktivität, besonders des LC, ist mit der Ausprägung von Panik- und Angstzuständen korreliert. Psychopharmaka, welche die Feuerungsrate zentraler noradrenerger Neuronen herabsetzen, die Aufnahme von Noradrenalin blockieren, oder den Noradrenalin-Metabolismus inhibieren, wie Benzodiazepine, Trizyklische Antidepressiva und Monoaminoxidase-Inhibitoren wurden in Tierversuchen getestet und finden ihre Verwendung zum Teil als Anxiolytika in der klinischen Behandlung mentaler Störungen (JOHNSTON, 1991). Ein Verlust von LC-Neuronen wird unter anderem für die Ausprägung von Alterssenilität und der Alzheimer-Krankheit, (MANN et al., 1980; MANN et al., 1984; CHAN-PALAY und ASAN, 1989 a), der Parkinson-Krankheit (CHAN-PALAY und ASAN, 1989 a), Depression (CHAN-PALAY und ASAN, 1989 b; ARANGO et al., 1996) verantwortlich gemacht. Drogenmißbrauch und Alkoholismus können den Verlust von LC-Neuronen verursachen (ARANGO et al., 1993).

Die noradrenergen Nuclei im Hirnstamm, N. tractus solitarii (A2) und A1 in der ventrolateralen Medulla oblongata sind an der zentralnervösen Regulation des autonomen Nervensystems und damit an einer Antwort des Organismus auf externe Stimuli beteiligt (REIS et al., 1984; UNNERSTALL et al., 1984; KUBO et al., 1990). Über efferente Verbindungen zu den adrenergen Neuronen der C1-Gruppe regulieren die noradrenergen Zellen der ventrolateralen Medulla indirekt den Sympathikus und somit das kardiovaskuläre System. Eine Stimulation der A1-Neuronen führt zu einer Reduktion der Adrenalinausschüttung der C1-Gruppe, was eine Inhibierung des Sympathikus und eine Aktivierung des Parasympathikus bewirkt und eine Senkung des arteriellen Blutdruckes nach

sich zieht (GRANATA et al., 1985). Der N. tractus solitarius empfängt über den IX. (N. glossopharyngeus) und den X. Hirnnerven (N. vagus) sensorische Eingänge von Barorezeptoren des Atriums, des Verdauungstraktes und anderer innerer Organe, wie der Niere und der Leber (PALKOVITS und ZABORSKY, 1977; BRODY, 1987; SHEPHERD, 1994). Im Zentralnervensystem ist der N. tractus solitarius durch afferente und efferente Fasern mit Hirnregionen verschaltet, die an der Regulation des Blutdruckes und der kardiovaskulären Modulation beteiligt sind. So ist der N. tractus solitarius durch afferente Bahnen mit dem Hypothalamus, der Inselrinde und dem Locus coeruleus verbunden und projiziert wiederum in den Hypothalamus, die Amygdala und mehrere Hirnstammregionen, wie dem dorsalen motorischen Vaguskern (PALKOVITS und ZABORSZKY, 1977; PALKOVITS et al., 1980). Als ein Endigungsort gustatorischer Afferenzen des VII., IX. und X. Hirnnerven ist der N. tractus solitarius zudem eine wichtige Relaisstation in einer Geschmacksbahn, die in Geschmacksarealen des Vorderhirns mündet und somit an der Steuerung des Nahrungsaufnahmeverhaltens beteiligt (BEIDLER, 1987; SHEPHERD, 1994).

## 1. 2. $\alpha_2$ -Adrenerge Rezeptoren und ihre Rolle im monoaminergen System

### 1. 2. 1. Pharmakologische, physiologische und molekularbiologische Klassifizierung $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorsubtypen

Basierend auf pharmakologischen Kriterien wurden adrenerge Rezeptoren (AR) zunächst in zwei Hauptgruppen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR, unterteilt (AHLQUIST, 1948). Es zeigte sich, daß  $\alpha$ -AR-Antagonisten in niedrigen Konzentrationen die Wirkung einer Stimulation des Sympathikus verstärken können (JANG, 1940). In späteren Arbeiten wurde gezeigt, daß  $\alpha$ -AR eine Reduzierung der neuronalen Noradrenalinausschüttung nach der Gabe exogener Agonisten verursachen (WERNER et al., 1970; STARKE, 1971; STARKE, 1972). Man vermutete, daß beide Effekte durch präsynaptisch in catecholaminergen Zellen lokalisierte  $\alpha$ -Rezeptoren ausgelöst wurden. Aus *in vivo*-Studien an Milzgewebe der Katze und der Lungenarterie des Kaninchens schloß man, daß bestimmte Pharmaka, wie die  $\alpha$ -Blocker Phenoxybenzamin (DUBOCOVICH und LANGER, 1974) und Prazosin (DOXEY et al., 1977) vorwiegend an postsynaptische  $\alpha$ -Rezeptoren binden und Antagonisten wie Yohimbin

und Rauwolscin eine stärkere Bindungsaffinität zu präsynaptischen Rezeptoren besitzen mußten (STARKE et al., 1975; WEITZELL, et al. 1979). So wurde zunächst eine Einteilung in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -AR für jeweils post- und präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren vorgenommen (LANGER, 1974). Da man jedoch bald über eine große Bandbreite an Agonisten und Antagonisten für  $\alpha$ -AR verfügte, ersetzte eine pharmakologische Klassifizierung die Einteilung nach anatomischen Gesichtspunkten und es stellte sich heraus, daß  $\alpha_2$ -AR sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sind (BENTLEY et al., 1977).

Aufgrund von Bindungsaffinitäten für unterschiedliche Radioliganden konnten  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorsubtypen in unterschiedlichen Gewebehomogenaten diverser Spezies charakterisiert werden (BERTHELSEN und PETTINGER, 1977). Eine Unterscheidung zwischen  $\alpha_{2A}$ -AR und  $\alpha_{2B}$ -AR wurde hinsichtlich ihrer divergierenden Sensitivität für Prazosin getroffen. Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor, welcher erstmals in der Lunge und Niere der Ratte identifiziert wurde, zeigte eine um mehr als das zehnfache erhöhte Affinität zu Prazosin als der in Blutplättchen identifizierte  $\alpha_2$ -AR. Somit wurde der prazosin-unempfindliche Rezeptor als Subtyp A und der prazosinsensitive Rezeptor als Subtyp B bezeichnet (BYLUND 1985, NAGORSKY et al, 1985). Der  $\alpha_{2C}$ -AR wurde erstmals in Nierengewebekultur des Opossums beschrieben (MURPHY und BYLUND, 1988). Sein hauptsächliches Unterscheidungskriterium zum  $\alpha_{2B}$ -AR ist eine höhere Affinität zu Rauwolscin und ein etwas höheres Oxymetazolin/Prazosin-Affinitätsverhältnis. Ein vierter Subtyp,  $\alpha_{2D}$ -AR, wurde in der bovinen Zirbeldrüse und der Speicheldrüse der Ratte gefunden (SIMMONEAUX et al., 1991). Dieser Rezeptor weist ähnliche Bindungs-charakteristika auf wie der  $\alpha_{2A}$ -AR, besitzt jedoch eine wesentlich geringere Affinität zu Rauwolscin und Yohimbin (MICHEL et al., 1989; BYLUND, 1992) und wird als speziesspezifisches Homolog zum Subtyp  $\alpha_{2A}$  eingestuft (BYLUND, 1992).

Bis heute sind vier verschiedene  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren diverser Spezies kloniert und in verschiedenen Zellsystemen charakterisiert worden,  $\alpha_{2A}/\alpha_{2D}$ -AR,  $\alpha_{2B}$ -AR und  $\alpha_{2C}$ -AR. Zunächst wurde ein  $\alpha_2$ -adrenerges Rezeptorprotein aus humanen Blutplättchen aufgereinigt. Eine auf der Aminosäuresequenz basierende Oligonucleotidsonde wurde verwendet, um aus einer humanen Genbank das codierende Gen zu isolieren (KOBILKA et al., 1987). Zwei weitere  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgene des Menschen konnten aus einer cDNA-Bank der Niere (REGAN et al., 1988) bzw. mithilfe der PCR-Technik (LOMASNEY et al., 1990) kloniert werden. Sequenzanalysen der aus genomischer DNA isolierten Rezeptorgene zeigten, daß die codierenden Sequenzen nicht durch Introns unterbrochen sind. Durch Hybridisierung mit

somatischen Zellen konnten die klonierten Rezeptoren jeweils unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet werden (C10, C4 und C2). Die Klone wurden in Zellkultur exprimiert und pharmakologisch charakterisiert. Gemäß der von BYLUND (1985, 1988) vorgeschlagenen Nomenklatur  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren wurden die Klone  $\alpha_2$ -C10 als Subtyp A,  $\alpha_2$ -C2 als Subtyp B und  $\alpha_2$ -C4 als Subtyp C klassifiziert. Bis heute sind außer den humanen  $\alpha_2$ -AR drei  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgene der Ratte (ZENG et al., 1990; LANIER et al., 1991), der Maus (CHRUSCINSKI et al., 1992; LINK et al., 1992) und des Meerschweinchens (SVENSSON et al., 1995) sowie der  $\alpha_{2A}$ -AR des Schweines (GUYER et al., 1990), der  $\alpha_{2C}$ -AR des Opossums (BLAXALL et al., 1994) und ein  $\alpha_2$ -AR eines Fisches (*Labrus ossifagus*) (SVENSSON et al., 1993) kloniert worden. Die annähernd sequenzhomologen Speziesvarianten des  $\alpha_{2A}$ -AR weisen bei der Ratte, der Maus und dem Meerschweinchen pharmakologisch die Eigenschaften des  $\alpha_{2D}$ -AR auf (LANIER et al., 1991). Für die reduzierte Rauwolscin- und Yohimbinaffinität des  $\alpha_{2D}$ -AR wird ein Aminosäureaustausch in der 5. transmembranen Region in Position 201 des Rezeptorproteins verantwortlich gemacht (LINK et al., 1992). Der  $\alpha_{2D}$ -Subtyp trägt an dieser Stelle einen Serinrest, während das  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptorgen für Cystein codiert.

Hybridisierungen mit  $\alpha_2$ -adrenergen Ribosonden in Hirnschnitten der Ratte (NICHOLAS et al., 1993; SCHEININ et al., 1994; WINZER-SERHAN et al., 1997 a, b; WINZER-SERHAN und BRODIE, 1997) und der Maus (WANG et al., 1996) konnten eine subtypspezifische Verteilung der mRNA  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren aufzeigen, was auf eine unterschiedliche Funktion der Rezeptorsubtypen *in vivo* hinweist. Aufgrund der Lokalisierung der mRNA  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren in noradrenergen Nuclei wurde dieser Subtyp als der präsynaptische  $\alpha_2$ -adrenerge Autorezeptor beschrieben (SCHEININ et al., 1994). Die autoinhibitorische Wirkung des A-Subtypen konnte kürzlich durch pharmakologische Studien bestätigt werden. In Slice-Präparaten der Ratte wurde gezeigt, daß der  $\alpha_{2A}$ -AR die Ausschüttung von *in vitro*-perfundiertem [ $^3$ H]Noradrenalin aus noradrenergen Kerngebieten des Hirnstammes steuert (UMEDA et al., 1997). Die Präsenz des  $\alpha_{2A}$ -AR und des  $\alpha_{2C}$ -AR in noradrenergen Nuclei konnte unter Verwendung spezifischer Antikörper (TALLEY et al., 1996; ROSIN et al., 1996) und im Locus coeruleus elektronenmikroskopisch (LEE et al. 1998 a, b) nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß der C-Subtyp möglicherweise ebenfalls eine autoregulatorische Funktion besitzt.

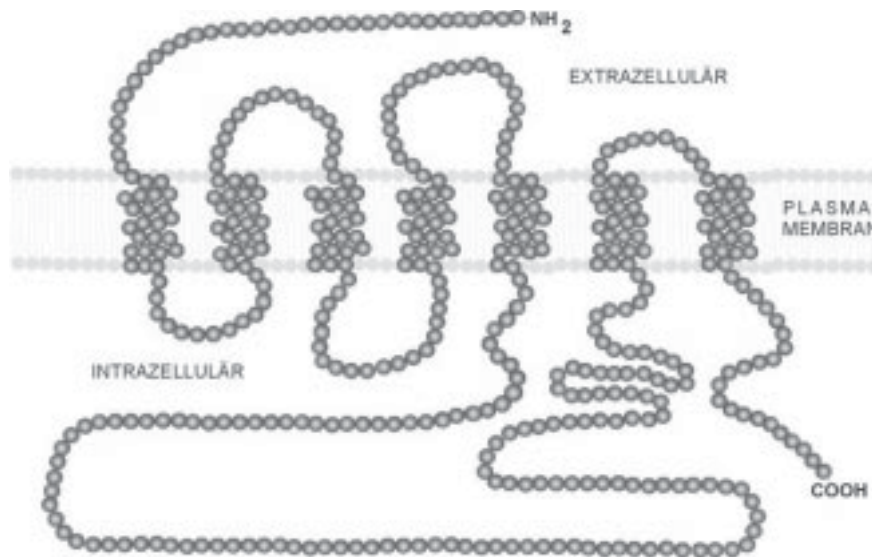
Durch die Etablierung homozygoter Mäusestämme, bei denen die Expression oder die Funktion bestimmter Rezeptorsubtypen ausgeschaltet ist, konnten neue Erkenntnisse über die

physiologische Bedeutung der  $\alpha_2$ -AR erlangt werden. (LINK et al., 1995; LINK et al., 1996; McMILLAN et al., 1996; MACDONALD et al., 1997; SALLINEN et al., 1996). Demnach werden die meisten durch  $\alpha_2$ -AR Agonisten ausgelösten kardiovaskulären hypotensiven Effekte durch den A-Subtypen vermittelt; dem  $\alpha_{2C}$ -AR werden eher feinmodulatorische oder den  $\alpha_{2A}$ -AR unterstützende Wirkungen zugeschrieben. Durch die Stimulation des  $\alpha_{2B}$ -AR in der glatten Gefäßmuskulatur wird ein vorübergehender Blutdruckanstieg erzielt (LINK et al., 1996), ein Effekt also, welcher der Stimulation zentralnervöser  $\alpha_{2A}$ -AR entgegenwirkt. Über die Funktionen postsynaptischer  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren im ZNS, besonders der Subtypen B und C, herrscht noch weitestgehend Unklarheit.

#### 1. 2. 2. Molekulare Struktur und Wirkungsweise $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren sind in Zellmembranen eingebettete Proteine, die durch die Bindung von Catecholaminen oder catecholaminähnlichen Substanzen eine physiologische Zellantwort hervorrufen (DICKINSON und LEFKOWITZ, 1987).

Aufgrund von Analysen translatierter  $\alpha_2$ -AR-Klone konnte auf die Primärstruktur der Rezeptorproteine geschlossen werden. Hydrophobizitätsuntersuchungen zeigten, daß die Rezeptoren aus sieben hydrophoben, 20-25 Aminosäureresten langen Domänen bestehen, die durch hydrophile Aminosäureketten verbunden sind (Abb. 1). Daraus wurde ein Proteinmodell mit sieben transmembranen Regionen konstruiert, die durch jeweils drei in den intra- und drei in den extrazellulären Raum ragende hydrophile Schleifen verbunden sind (KOBILKA et al., 1987; REGAN et al., 1988).



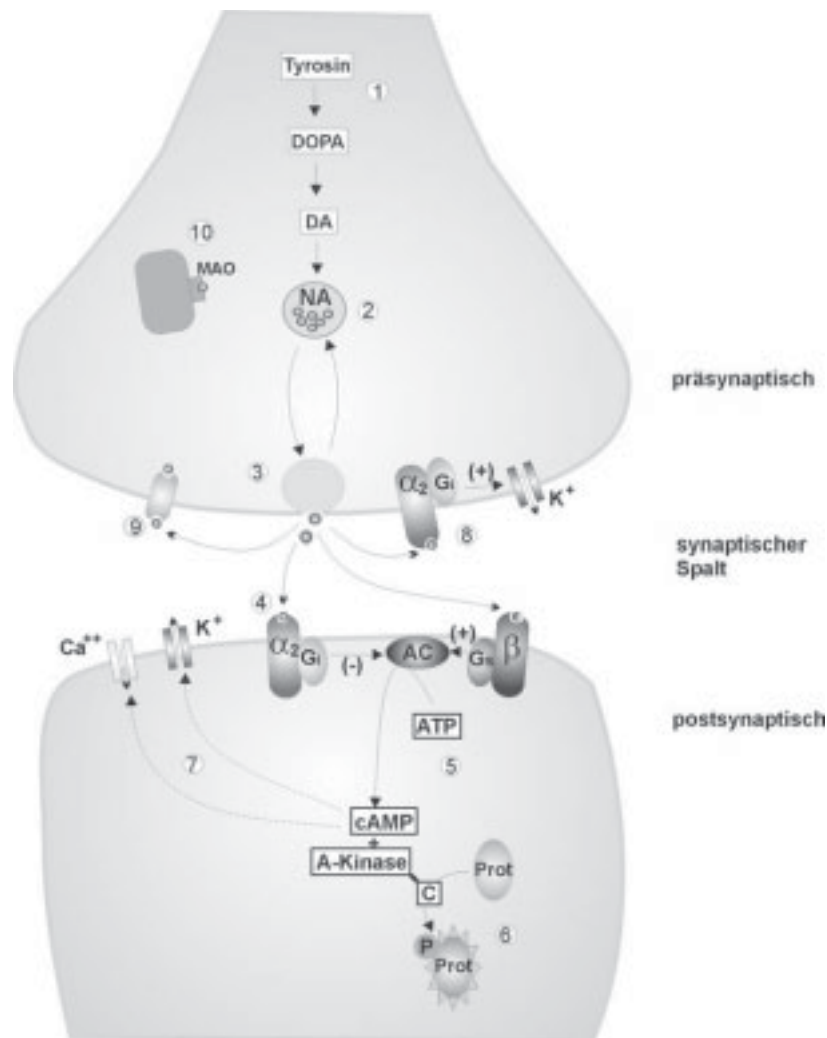
**Abb. 1:** Zweidimensionale Molekularstruktur des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors. Das Rezeptormolekül ist durch sieben transmembrane Regionen in der Plasmamembran verankert. Der Aminoterminus des Proteins (NH<sub>2</sub>) befindet sich außerhalb, der Carboxyterminus (COOH) innerhalb der Zelle (modifiziert nach MACDONALD et al., 1996).

Diese Proteinstruktur ist das molekulare Charakteristikum für die Familie von Rezeptoren, die ein externes Signal durch Bindung an membranständige GTP-bindende Proteine (G-Proteine) und über eine nachgeschaltete Second Messenger-Kaskade in das Zellinnere weiterleiten (SCHRAMM und SELINGER, 1984). Außer den  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gehören der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie die muscarinischen, die dopaminergen, die serotonergen Rezeptoren sowie einige hormonrezeptive (Angiotensin, Endothelin, FSH, LH) Proteine an (KOBILKA, 1995). Das spezifische Charakteristikum  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren ist ihre dritte intrazelluläre Schleife, die mit etwa 150 Aminosäureresten zwei- bis dreimal so lang ist wie die entsprechende Region der anderen G-Protein-bindenden Rezeptoren (RUFFOLO et al., 1993); der muscarinische cholinerge Rezeptor weist eine vergleichbare Aminosäurestruktur in dieser Domäne auf (PERALTA, et al. 1987). Die Rolle der einzelnen Rezeptordomänen bei der Signaltransduktion ist noch nicht völlig geklärt, doch wird der dritten intrazellulären Schleife zusammen mit dem proximalen Teil des Carboxyterminus eine entscheidende Bedeutung für die Rezeptor-G-Protein-Kopplung zugesprochen, und einige Aminosäurereste in der 3., 5. und 7. transmembranen Region werden für die Bindung des Liganden an den Rezeptor verantwortlich gemacht (RAYMOND et al., 1990; REGAN und COTECCIA, 1992). Der Serinrest in Position 201 in der 5. transmembranen Region des  $\alpha_{2D}$ -AR ist offenbar die Ursache für dessen im Vergleich zum  $\alpha_{2A}$ -AR verminderte Bindungsaffinität für Rauwolscin und Yohimbin. Letzterer trägt an

dieser Stelle einen Cysteinrest (KOBILKA et al., 1987; LANIER et al., 1991; LINK et al., 1992).

Die molekularen Mechanismen einer Signalübertragung an der  $\alpha_2$ -adrenergen Synapse werden wie folgt beschrieben (s. Abb. 2): Der Neurotransmitter Noradrenalin wird über den catecholaminergen Syntheseweg aus der Aminosäure Tyrosin über die Zwischenprodukte L-DOPA und Dopamin gebildet. Dazu wird Tyrosin in die neuronale Zelle aufgenommen und durch die Tyrosinhydroxylase zu L-DOPA hydroxyliert. L-DOPA wird mittels DOPA-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert, welches in die aminergen Speichervesikel eindringt und dort durch das Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zu Noradrenalin umgewandelt wird. Diese Vesikel wurden in präsynaptischen Nerven-endigungen gefunden (DAHLSTRÖM, 1987). Bei Depolarisation der Nervenzelle und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird NA durch Exocytose in den synaptischen Spalt freigesetzt und von  $\alpha_2$ -AR gebunden, die sowohl in der postsynaptischen Zellmembran der Effektorzelle, als auch präsynaptisch im NA-synthetisierenden Neuron selbst lokalisiert sein können. Die Aktivierung des Rezeptors führt dazu, daß das an die  $\alpha$ -Untereinheit eines rezeptorassoziierten inhibitorischen G-Proteins ( $G_i$ ) gebundene GDP abgespalten wird und das  $G_i$ -Protein durch Bindung von GTP in die aktive Form übergeht. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivierter  $G_i$ -Proteine induzieren eine Inhibierung der ebenfalls membrangebundenen Adenylatcyclase (AC). Da dieses Enzym den Umbau von ATP zum intrazellulären Botenstoff (second messenger) cAMP bewirkt, wird infolge einer  $G_i$ -Aktivierung der intrazelluläre cAMP-Spiegel gesenkt. Eine mit der Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren gekoppelte Aktivierung von  $G_s$ -Proteinen führt zu einer Stimulation der AC und schließlich zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Durch freies cAMP werden Proteinkinasen aktiviert, die durch Phosphorylierung intrazellulärer Proteine und von Ionenkanälen letztlich die Antwort der Zelle auf extrazelluläre Reize hervorrufen (LEFKOWITZ und CARON, 1988). Eines der aktivierten Proteine ist ein im Zellkern lokalisiertes *cAMP response element-binding protein* (CREB), welches an *cAMP response elements* (CRE) in DNA-Promotorregionen bindet und somit die Transkription bestimmter Gene moduliert (YAMAMOTO et al., 1988; NICHOLS et al., 1992). Alpha $_2$ -AR induzierte Synthesewege bewirken die Aktivierung von  $G_i$ -gekoppelten  $\text{K}^{+}$ -Kanäle, was zu einer Hemmung der Zelle durch Hyperpolarisation führt (AGHAJANIAN und VAN DER MAELEN, 1982) sowie eine Inhibition von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, wodurch die Neurotransmitter-Ausschüttung reduziert wird (HOLZ et al., 1986). Die Kopplung einer  $\alpha_2$ -adrenergen

Rezeptoraktivierung mit der Inhibierung von AC und einer damit verbundenen Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels ist der am besten untersuchte  $\alpha_2$ -adrenerge Signaltransduktions-Mechanismus und konnte in fast allen bisher beschriebenen Systemen nachgewiesen werden (ÅKERMAN et al., 1995).



**Abb. 2:** Molekulare Mechanismen an einer ( $\alpha_2$ -)adrenergen Synapse. (1) Syntheseweg von Tyrosin über 3, 4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), katalysiert durch Tyrosinhydroxylase zu Dopamin (DA; katalysiert durch DOPA-Decarboxylase) und Noradrenalin (NA; katalysiert durch Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase). (2) Transport und Speicherung in Vesikeln. (3) Freisetzung von NA durch Exocytose. (4) Bindung von NA an postsynaptische Rezeptoren.  $\alpha_2$ -AR aktivieren inhibitorische G-Proteine ( $G_i$ ), welche die Adenylatcyclase (AC) hemmen. Stimulierende G-Proteine ( $G_s$ ) aktivieren AC. (5) Das durch die AC aus ATP katalysierte cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A und setzt dessen katalytische Untereinheit C frei, (6) die bestimmte Zielproteine phosphoryliert und somit die Zellantwort auslöst. (7) cAMP moduliert  $K^+$ - und  $Ca^{++}$ -Kanäle. (8) Bindung von NA an präsynaptische  $\alpha_2$ -AR aktivieren inhibitorische G-Proteine, welche die Leitfähigkeit von  $K^+$ -Kanälen erhöhen. Dieses bewirkt eine Erhöhung des Membranpotentials und damit die Hemmung der NA-Ausschüttung. (9) Einwirkung von NA wird durch aktive Wiederaufnahme in die präsynaptische Nervenendigung beendet. (10) Abbau von NA durch mitochondriale Monoaminoxidase (MAO) (nach STRYER, 1988; SHEPHERD, 1994).

### 1. 3. Auswirkungen von chronischem Streß auf das periphere und zentrale noradrenerge System

Der Organismus reagiert auf Streß mit der Aktivierung unterschiedlicher neuronaler und hormonaler Regelkreise. Die Anpassung des Organismus auf eine physische Belastung wurde erstmals von SELYE (1936) als *Allgemeines Adaptationssyndrom* beschrieben. Spätere Untersuchungen machten deutlich, daß die gleichen Abwehrmechanismen auch durch psychische Konfliktsituationen ausgelöst werden können (MASON, 1959; LAZARUS, 1966). Sind infolge einer dauerhaften Belastung bestimmte Stoffwechselvorgänge permanent aktiviert, kann häufig das Gleichgewicht der Körperfunktionen nicht oder nur schwer wiederhergestellt werden. Beim Menschen kann ein streßinduzierter Zusammenbruch der physiologischen Homöostasis psychische Erkrankungen wie Depression (GOLD et al., 1988; BRADY, 1994), Angstzustände (BERNSTEIN, 1987; JOHNSTON, 1991) oder Schizophrenie (STRÖMGREN, 1987) sowie Beeinträchtigungen von Lern- und Gedächtnisleistungen, des Immunsystems und der Fertilität hervorrufen (MCEWEN und SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 1998; SANDERS und BRUCE, 1997). Bei der Reaktion des Organismus auf externe Stressoren wird zwischen einer hormonellen und einer neuronalen Streßantwort, die beide durch das übergeordnete Zentralnervensystem gesteuert werden, unterschieden. Die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA-Achse) resultiert in der vermehrten Ausschüttung der Steroidhormone Cortisol und Corticosteron aus der Nebennierenrinde (SELYE, 1942; AXELROD and REISINE, 1984). Neben ihrer Wirkung in peripheren Organen beeinflussen die Glucocorticosteroide auch wichtige zentralnervöse Vorgänge, da sie die Blut/Hirnschranke passieren können (SELYE, 1942). Eine weitere hormonelle Wirkung entfaltet Streß durch die vom zentralen und vom sympathischen Nervensystem gesteuerte Aktivierung des Nebennierenmarks, die mit der Ausschüttung von Adrenalin in den peripheren Blutkreislauf verbunden ist (KUCHEL, 1992).

In einer Reihe wissenschaftlicher Arbeiten ist die Auswirkung von Dauerstreß auf das zentrale noradrenerge System untersucht worden. Durch die Schlüsselposition, die der LC bei der Streßantwort und der Versorgung des Gehirns mit Noradrenalin innehat, wurden streßbedingte biochemische und morphologische Veränderungen dieser Hirnregion besonders ausführlich erforscht (Übersicht s. BRADY, 1994). Versuche mit Ratten haben gezeigt, daß akuter Streß zu Spontanentladungen noradrenerger Neuronen führt, was den Noradrenalingehalt im LC kurzfristig herabsetzt (CORRODI et al., 1968), während die NA-

Konzentration in seinen efferenten Zielgebieten vorübergehend zunimmt (KALEN et al., 1989; ROSSETTI et al. 1990). Zur Kompensation des NA-Defizits ruft Streß in noradrenergen Neuronen eine verstärkte Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) hervor, dem limitierenden Enzym bei der NA-Synthese (SMITH et al., 1991). Chronischer Streß führt zu einer Störung der autoregulativen Funktionen noradrenerger Neuronen im Hirnstamm. Infolge einer durch Dauerstreß ausgelösten chronischen Aktivierung des LC ist die TH-Synthese kontinuierlich erhöht (MELIA et al., 1992; WATANABE et al., 1995), womit eine dauerhafte Erhöhung der NA-Konzentration im LC und eine Verstärkung der reizinduzierten Feuerungsrate der Neuronen verbunden sind (BRADY, 1994). In diesem Zusammenhang sei auf eine Studie verwiesen, in der in den LC von Suizidopfern ein erhöhter TH-Gehalt festgestellt wurde (ORDWAY et al., 1994).

Durch *in vitro*-Rezeptorautoradiographiestudien mit dem für  $\alpha_2$ -AR spezifischen  $\alpha_2$ -AR-spezifischen Liganden [ $^3$ H]Rauwolscin konnten FLÜGGE et al. (1992) zeigen, daß dauerhafter psychosozialer Streß bei *Tupaia belangeri* in einigen Hirnregionen eine reduzierte  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorbindung zur Folge hat. In einer weiteren, ebenfalls auf Rezeptorautoradiographie basierenden Arbeit konnte im Gehirn männlicher Tupaia gezeigt werden, daß chronischer psychosozialer Streß zu einer Abnahme von Bindungsstellen des  $\alpha_2$ -Antagonisten [ $^3$ H]RX821002 im dorsalen motorischen Vaguskern und in den noradrenergen Zellgebieten des Nucleus Tractus Solitarius und des Locus Coeruleus führt (FLÜGGE, 1996). Das bedeutet, daß chronischer psychosozialer Streß eine Herunterregulierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren im Gehirn von *Tupaia belangeri* hervorruft.

#### 1. 4. Verwendung von *Tupaia belangeri* (Spitzhörnchen) in der Streßforschung

Das Spitzhörnchen, *Tupaia belangeri*, hat sich als ein geeignetes Tiermodell erwiesen, um die Auswirkungen von psychosozialem Streß auf das Verhalten, den Hormonhaushalt und das zentrale Nervensystem experimentell zu untersuchen. Die phylogenetische Eingliederung dieser tagaktiven, in Südostasien beheimateten Allesfresser war über lange Zeit unklar und wechselte zwischen den Ordnungen der Insectivora und der Prosimiae (Halbaffen). Heute werden die Tupaia in einer eigenen Ordnung, den Scandentia, geführt (MARTIN, 1990; v. HOLST, 1988, LUCKETT, 1980). Ihr zentrales Nervensystem ist stärker differenziert als das der Insektenfresser und besitzt viele Gemeinsamkeiten mit dem der Primaten (HAINES und SWINDLER, 1972).

In freier Wildbahn besitzen männliche Tupaia ein ausgeprägtes Revierverhalten (v. HOLST, 1988). Dieses Verhalten läßt sich auf die Laborumgebung, in welcher der Käfig das zu verteidigende Territorium darstellt, übertragen. Werden zwei in benachbarten Käfigen untergebrachte Tiere durch Herausnehmen der Trennwand miteinander konfrontiert, kommt es zu kurzen, heftigen Rankämpfen, aus denen ein Männchen als dominant, das andere als subordinat hervorgeht. Werden die Tiere durch eine Gitterwand wieder voneinander getrennt, reicht der dauerhafte visuelle, olfaktorische und akustische Kontakt zusammen mit einer täglich wiederholten physischen Konfrontation durch das Entfernen der Trennwand aus, um den Status der beiden Kontrahenten aufrecht zu erhalten. Dieses Streßparadigma ist für eine Reihe von Untersuchungen herangezogen worden, die die Auswirkung von psychosozialen Streß auf das Verhalten (FUCHS et al., 1996), auf Körpergewicht und Fortpflanzung (AUTRUM und v. HOLST, 1968), das sympathoadrenale und das kardiovaskuläre System (v. HOLST, 1972; STÖHR, 1986; FUCHS et al., 1993), die neuronale Morphologie (FUCHS et al., 1995; MAGARIÑOS et al., 1996) und auf zentrale monoaminerge Transmittersysteme (FLÜGGE et al., 1992; FLÜGGE et al., 1996; FLÜGGE et al., 1997) von *Tupaia* zu untersuchen.

### 1. 5. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Über die Funktion und Bedeutung der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren im neuronalen Zellverband und ihre durch Streß ausgelöste Modulation herrscht noch weitestgehend Unklarheit. Aus der von FLÜGGE et al. (1992) und FLÜGGE (1996) beschriebenen streßregulierten Reduktion  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in einigen Hirnstammzentren von *Tupaia belangeri* (s. Kap. 2. 3.) ergeben sich verschiedene Fragestellungen.

1. Der streßinduzierten Modulation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorproteine können unterschiedliche zellbiochemische Mechanismen zugrunde liegen. In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob Streß zu Veränderungen der zellulären mRNA-Expression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren führt.

2. Der  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorantagonist [ $^3$ H]RX821002 besitzt keine und [ $^3$ H]Rauwolschin eine schwache  $\alpha_2$ -subtypspezifische Bindungsaffinität. Da bei der Ratte in

den meisten Hirnstammzentren der  $\alpha_{2A}$ -AR und der  $\alpha_{2C}$ -AR immunocytochemisch nachgewiesen werden konnte (ROSIN et al., 1996; TALLEY et al., 1996), sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welcher oder welche Rezeptorsubtypen bei *Tupaia* durch Streß reguliert werden.

3. Durch die weitreichenden Efferenzen noradrenerger Neurone sind  $\alpha_2$ -AR in den meisten Hirngebieten sowohl in den Membranen catecholaminerger Nervenendigungen als auch in den Zellmembranen postsynaptischer Neuronen lokalisiert. Es ist bisher nicht bekannt, ob prä- und postsynaptisch wirkende Rezeptoren durch Streß unterschiedlich reguliert werden.

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten zunächst die  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene von *Tupaia belangeri* kloniert und sequenzanalytisch charakterisiert werden. Da für diese Spezies keine cDNA- oder genomische DNA-Bibliothek vorliegt, sollte die cDNA-Isolation und -Klonierung mithilfe der PCR erfolgen.

Aus den cDNA-Klonen sollten radioaktive Ribosonden erzeugt werden, welche in *in situ*-Hybridisierungsverfahren an Gefrierschnitten Aufschluß über die regionale und zelluläre Genexpression der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen im ZNS von *Tupaia* geben sollten.

Mit der zellulären Quantifizierung der *in situ*-Hybridisierungssignale  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptor-mRNA auf Hirnschnitten von psychosozial gestreßten und nicht-gestreßten *Tupaia*s sollte schließlich Aufschluß darüber erlangt werden, ob Streß eine regionen- und subtypspezifische Regulation der Genexpression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren verursacht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2. 1. Tiere und Tierhaltung

Die für die Versuche verwendeten männlichen adulten *Tupaia belangeri* stammen aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums in Göttingen. Die Tiere waren einzeln in Stahlgitterkäfigen mit den Ausmaßen 50 × 80 × 130 cm untergebracht, benachbarte Käfige wurden durch mit Sichtblenden versehene Gitterwände voneinander getrennt. An den Außenwänden der Käfige waren transportable Holzkästen angebracht, die den Tieren als Schlaf- und Ruhestätte dienten und die bei Bedarf verschlossen werden konnten. Zusätzlich waren die Käfige mit in unterschiedlicher Höhe angebrachten Kletterstangen versehen. Die Raumtemperatur betrug konstant 26 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %. Über die Klimaanlage wurde die Raumluft mindestens zehnmal stündlich ausgetauscht. Die Räume wurden zwischen 8 und 20 Uhr künstlich mit dem Tageslicht entsprechender Lichtintensität beleuchtet. Die Ernährung der Tupaias erfolgte mit pelletiertem Standard-Diätfütter (Atromin, Lage) und Trinkwasser, das täglich erneuert wurde und ihnen *ad libitum* zur Verfügung stand. In regelmäßigen Abständen, etwa einmal pro Woche, wurde die Ernährung durch frisches Obst, Trockenobst oder Quark ergänzt.

### 2. 2. Psychosoziale Konfrontation

Für die Experimente wurden männlichen Tupaias aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums verwendet. Während einer zehntägigen Kontrollphase und über die gesamte Dauer der Konfrontation wurden alle Tiere zwischen 7 und 8 Uhr gewogen. Darüber hinaus wurden von den Tieren durch Massage des Harnblasenbereiches Urinproben genommen, aus denen später die Katecholamine zur quantitativen Analyse extrahiert wurden. Zur Bestimmung des Kreatiningehaltes wurden 10 µl Urin mit 190 µl physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Jeweils zwei für die Konfrontation bestimmte Tiere waren in benachbarten Käfigen untergebracht. Während der Kontrollphase wurden die Käfige durch Sichtblenden voneinander abgetrennt. Während der 28tägigen Konfrontation wurden die Sichtblenden herausgenommen, und die Käfige waren lediglich durch Drahtgitterwände voneinander getrennt, was eine dauerhafte visuelle, olfaktorische und akustische Wahrnehmung zwischen

den benachbarten Tieren ermöglichte. Die Trenngitter der Käfige wurden ein bis zweimal täglich für jeweils eine Stunde zum Zwecke einer physischen Interaktion entfernt. Im Laufe der Konfrontation bildete sich so eine stabile Rangordnung (dominant / subordinat) unter den Tieren heraus.

Die Kontrolltiere wurden einzeln in einem vom Experiment abgetrennten Raum gehalten. Die Gewichtsdaten, die Cortisolwerte sowie *in situ*-Hybridisierungsergebnisse dieser Tiere wurden als Referenz für die von den subordinaten Tieren erhaltenen Daten herangezogen. Am Versuchsende wurden die subordinaten Tupaia (n = 4) und die Kontrolltiere (n = 4) zwischen 7 und 8 Uhr decapitiert. Nach sofortiger Entnahme der Gehirne wurden diese über flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2. 3. Bestimmung des Cortisolgehaltes im Urin

Der Gehalt an Cortisol im Morgenurin männlicher Spitzhörnchen wurde mittels Radioimmuno-Assay (RIA) bestimmt. Zur Isolation der Glucocorticoide durch Festphasen-Chromatographie wurden 500 µl Urin in eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette pipettiert und mit 4 ml Dichlormethan extrahiert (SCHÖNESHOFER und FENNER, 1981). Die Proben wurden unter Stickstoff eingeengt und bei -20 °C gelagert.

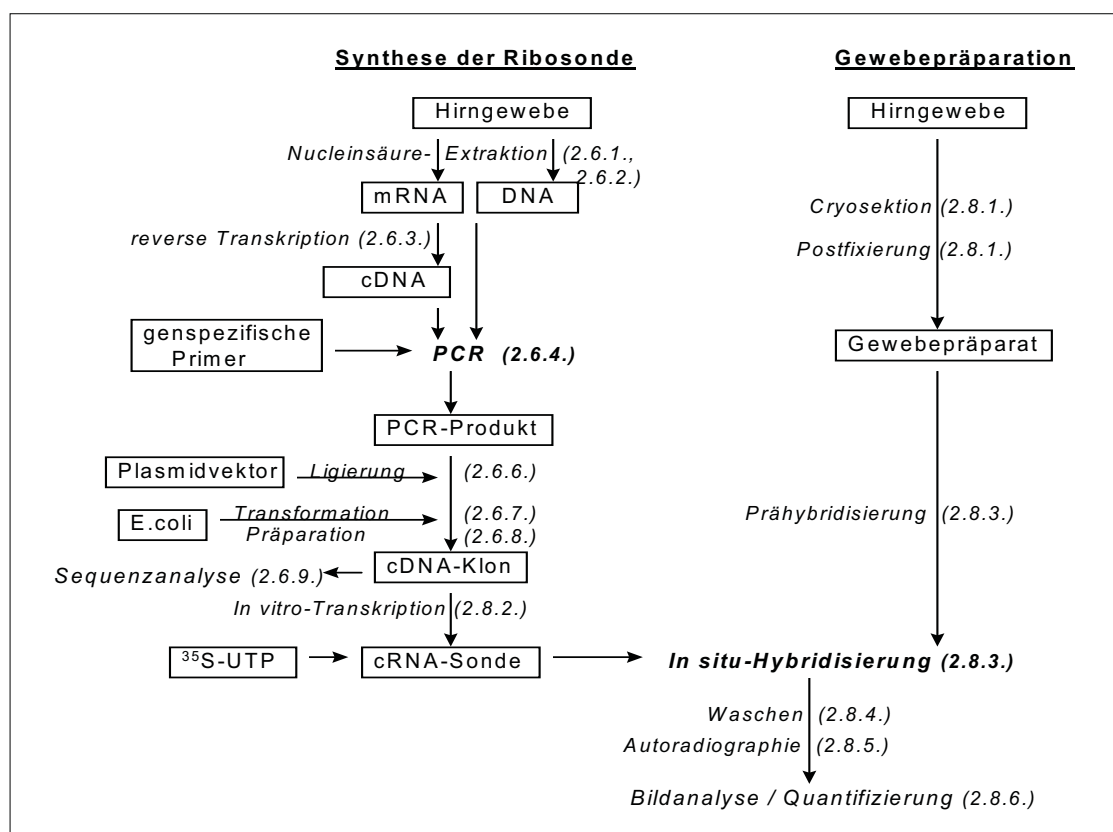
Der Cortisolgehalt wurde durch einen Scintillation Proximity Radioimmuno-Assay quantifiziert (UDENFRIED et al., 1985). Die extrahierten Proben wurden dafür in 1000 µl RIA-Puffer mit 5% Ethanol aufgenommen. Aliquots von 100 µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 100 µl [<sup>3</sup>H]Cortisol (5000 cpm / 100 µl), 100 µl Cortisol-Antikörper und 100 µl Fluomikrosphären (Scintillation Proximity Assay Anti-Rabbit Reagent, 1:800 in RIA-Puffer gelöst) in ein Scintillationsgefäß pipettiert und für 20 h bei 4 °C sowie für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Fluoreszenz der Proben wurde zusammen mit standardisierten Cortisolansätzen in einem β- Counter gemessen und somit der Cortisolgehalt quantifiziert.

## 2. 4. Bestimmung des Kreatiningehaltes im Urin

Zur Korrektur des Cortisolgehaltes in unterschiedlichen physiologischen Verdünnungen der Urinproben wurde er auf die ausgeschiedene Menge an Kreatinin, die auch unter Belastung konstant ist, korrigiert (FOLIN, 1905; BANDA et al., 1980). Die Urinproben wurden mit 0.9 % Kochsalzlösung verdünnt und in einem Kreatinin - Analysator (Beckman, USA) untersucht.

## 2. 5. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle allgemeinen und speziellen molekularbiologischen Methoden, die nicht mit einer Literaturangabe versehen sind, wurden nach den Laboranleitungen von AUSUBEL et al. (1988) bzw. SAMBROOK et al. (1989) vorgenommen.



**Abb. 3:** Schematische Übersicht über die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen und histochemischen Methoden. Die Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte sind eingerahmt und die Methoden kursiv gedruckt. Die Zahlen in den Klammern verweisen auf die entsprechenden Kapitel im Text.

### 2. 5. 1. Horizontale Agarosegel - Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Nucleinsäurefragmenten wurden ein bis zweiprozentige horizontale Agarosegele mit einer Stärke von 4 mm gegossen. Die Konzentration der Gele richtete sich nach den erwarteten Fragmentlängen. In einem Erlenmeyerkolben wurde die Agarose mit 1×TBE-Puffer gemischt und in einem Mikrowellengerät bis zum vollständigen Lösen gekocht. Das flüssige Gel wurde nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit 0.6 µg / ml Ethidiumbromid versetzt und zum Erstarren in eine Gelkammer gegossen. Zur Erzeugung von Pipettiertaschen war die Kammer mit einem Kamm versehen, welcher nach Erstarren des Gels entfernt wurde. Die Gelkammer wurde in eine Gelelektrophoreseapparatur gesetzt und mit 1×TBE-Puffer überdeckt. Die aufzutrennenden Nucleinsäureproben wurden mit 1×Ladepuffer (Promega, USA) versetzt und in die Geltaschen einpipettiert. Zum Größenvergleich der Nucleinsäurefragmente wurde zusätzlich eine mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Hind* III geschnittene DNA des Phagen λ (Promega, USA) als Längenmarker aufgetragen. Nach Anlegen der Spannung wurden die Nucleinsäureproben bei 10 - 12 V / cm Elektrodenabstand aufgetrennt.

### 2. 5. 2. Vertikale Polyacrylamidgel - Elektrophorese (PAGE)

Zur radioaktiven Sequenzierung rekombinanter Plasmid-DNA sowie der qualitativen Kontrolle *in vitro*-transkribierter cRNA-Sonden wurden denaturierende 7 %ige PAGE eingesetzt. Für ein Volumen von 100 ml wurden 42 g Harnstoff, 17.5 ml 40 %ige Acrylamid- / Bisacrylamidlösung (Gel 40, Roth, Karlsruhe) und 10 ml 10×TBE in Wasser gelöst, vakuumfiltriert und -entgast. Zur schnellen Polymerisierung wurden der Lösung 100 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) und 800 µl Ammoniumpersulfat (Sigma) zugesetzt. Die PAGE-Lösung wurde mit einer Spritze in den Zwischenraum eines "Gelsandwiches", das aus zwei Glasplatten und 0.8 mm dicken Abstandshaltern bestand, luftblasenfrei eingefüllt. Beide Glasplatten waren mit 100 % EtOH staub- und fettfrei gereinigt und eine der Platten mit 3 ml Repel-Silan (Sigma, USA) beschichtet. Nach horizontaler Polymerisation über Nacht wurde das "Gelsandwich" in vertikaler Position in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und bei 70 Watt eine Stunde lang vorgewärmt. Nach Einsetzen eines "Haifischzahn"-Kammes wurden die Nucleinsäureproben in die Kammzwischenräume gefüllt und bei 65 Watt aufgetrennt. Nach Beendigung der

Elektrophorese wurde das Gel mit 15 % MeOH, 5 % Essigsäure fixiert, auf Chromatographiepapier geblottet und in einem Vakuum-Geltrockner bei 80 °C getrocknet. Danach wurde das Gel mit einem Autoradiographiefilm (*Biomax*, Kodak, USA) 24 bis 36 Stunden exponiert.

#### 2. 5. 3. Restriktionsenzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA

Zwecks enzymatischer Spaltung ringförmiger Plasmid-DNA wurde in einem Reaktionsansatz von 20 µl jeweils 1 µg DNA mit 1 × Restriktionspuffer und 4 bis 5 Units Restriktionsenzym gemischt und im Wasserbad bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Bei Verwendung des Enzyms *Bst* XI inkubierten die Verdauungsreaktionen bei 55 °C.

Erfolgte die Hydrolyse zum Zwecke einer Kontrolle der Restriktionsfragments-Längen (Kap. 2. 6. 8.), wurde sie durch Zugabe von 4 µl eines 6fach konzentrierten Gel-Ladepuffers (Promega) abgestoppt und auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap. 2. 3. 1.). Wurde die Plasmid-DNA durch enzymatische Hydrolyse für eine anschließende *in vitro*-Transkription (Kap. 2. 8. 2.) linearisiert, wurde sie zunächst mit Phenol / Chloroform extrahiert, mit EtOH gefällt (Kap. 2. 5. 4.) und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2. 5. 4. Extraktion und Fällung von Plasmid-DNA aus Restriktionsansätzen

Nach einer enzymatischen Hydrolyse wurden die Restriktionsansätze mit Wasser auf 150 µl aufgefüllt und mit 150 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (24:24:1) auf einem Vortex-Schüttler vermischt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14.000×g wurde die obere, wässrige Phase mit der gelösten DNA zu gleichen Teilen mit Chloroform versetzt, geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Daraufhin wurde die wässrige Phase mit 0.1 Vol. 3 M NaAc, pH 5.5 und 2.5 Vol. kaltem EtOH versetzt, geschwenkt und über Nacht zum Ausfällen der DNA bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde bei 14.000×g und 4 °C für 30 Min. pelletiert und mit 0.5 ml 70 % EtOH gewaschen, abzentrifugiert, getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

## 2. 6. Klonierung der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ - adrenergen Rezeptorgene

### 2. 6. 1. Extraktion von genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus Lebergewebe von *Tupaia belangeri* isoliert. Jeweils 100 mg tiefgefrorenes, zertrümmertes Gewebe wurden mit 1.2 ml Verdauungspuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl, pH8; 25 mM EDTA, pH 8; 0.5 % SDS) und 0.12 mg Proteinase K in einem Ultra-Tyrrax Homogenisator zerkleinert und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 50 °C inkubiert. Das Homogenat wurde zweimal 1:1 mit Phenol / Chloroform und zweimal 1:1 mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde aus dem wässrigen Überstand mit 0.5 Vol. 7.5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. EtOH durch Schwenken ausgefällt, für 15 Min. bei 12.000×g abzentrifugiert, mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 1×TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 0.1 % SDS wurde die in der Lösung enthaltene RNA mit 4 µg RNase A für 1 h bei 37 °C verdaut. Schließlich wurde die Phenol / Chloroform-Extraktion und die Ethanolfällung wiederholt und das erneut gewaschene und getrocknete DNA-Pellet in TE-Puffer gelöst.

### 2. 6. 2. Extraktion von poly(A)<sup>+</sup> RNA

Aus jeweils 100 bis 200 g Nieren- und Hirngewebe wurden mRNA-Präparationen unter Verwendung des *Micro-Fast Tract Kits* (Invitrogen, USA) nach Herstellerangaben vorgenommen. In einem Mörser wurde das Gewebe auf Trockeneis zerstoßen in Plastikreaktionsgefäßen überführt, mit 45 °C warmem Lysepuffer versetzt und bei 45 °C im Schüttelwasserbad für 20 Min. inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4.000×g wurde der Überstand mit 63 µl 5 M NaCl vermischt. Zum physikalischen Scheren der DNA wurde die Lösung viermal durch eine 20 G Kanüle in eine Spritze aufgezogen. Danach wurde eine Oligo-d (T) / Zellulose-Tablette dazugegeben, zur Lyse gebracht und die Emulsion bei RT für 20 Min. geschwenkt. Die Zellulose mit der gebundenen poly(A)<sup>+</sup> RNA wurde dann bei 4000×g pelletiert und nach Abnahme des Überstandes mit 1.3 ml Bindepuffer resuspendiert und erneut pelletiert. Nach viermaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde die Zellulose in 300 µl Bindepuffer aufgenommen und zur Aufreinigung in eine Mikro-Säule pipettiert, die in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt wurde. Dieser Komplex wurde bei 4000×g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Nach dreimaliger Waschung mit jeweils

300 µl Bindepuffer wurde die Non-poly(A)<sup>+</sup>RNA aus dem Zellulosebett zweimal mit 200 µl eines Niedrig-Salz Waschpuffers bei 4000×g ausgewaschen. Zum Herauslösen der poly(A)<sup>+</sup>RNA wurden zweimal 100 µl Elutionspuffer in die Zellulose eingemischt und bei 4000 × g abzentrifugiert. Die poly(A)<sup>+</sup>RNA wurde mit 10 µl Glycogen, 30 µl 2M NaAc und 600 µl EtOH gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2. 6. 3. Reverse Transkription der poly(A)<sup>+</sup> RNA

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde aus der extrahierten mRNA unter Zuhilfenahme des *cDNA-Cycle Kits* (Invitrogen, USA) durchgeführt: Die präzipitierte poly(A)<sup>+</sup>RNA wurde bei 14.000×g bei 4 °C für 15 Min. abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 8 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Auftrennung von ribonucleären Sekundärstrukturen wurde die RNA zusammen mit 3.5 µl H<sub>2</sub>O und 1µl eines *random* Primers für 10 Min. auf 65 °C erhitzt. Bei RT wurde der Transkriptionsansatz, bestehend aus 20 U RNasin (RNase-Inhibitor), 1 × RT-Puffer, 100 mM dNTP-Gemisch, 80 µl Natrium-Pyrophosphat und 5 U AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase gemischt und für 60 Min. im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Die Transkripte wurden durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert, erneut mit 5 U AMV Reverse Transkriptase versetzt und abermals 60 Min. bei 42 °C inkubiert. Nach einer abschließenden Hitzedenaturierung wurden die Enzyme unter Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA inhibiert, das Gemisch mit 20 µl Phenol / Chloroform versetzt und abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit 22 µl 5 M Ammoniumacetat und 88 µl EtOH vermischt und bei -20 °C gelagert. Sollte die cDNA direkt im Anschluß in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden, erfolgte die Fällung für 30 Min. auf Trockeneis. Der Ansatz wurde für 30 Min. bei 4 °C abzentrifugiert, das cDNA-Pellet mit 80 % EtOH gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der cDNA-Lösung wurde nach photometrischer Kontrolle auf 100 ng / µl eingestellt.

#### 2. 6. 4. Amplifizierung spezifischer Nucleinsäure-Sequenzen mithilfe der *Polymerase Kettenreaktion* (PCR)

Zur Klonierung der drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene wurden zunächst überlappende Bereiche durch die *Polymerase-Kettenreaktion* (*Polymerase Chain Reaction*, PCR, SAIKI et al., 1988) amplifiziert. Subtypspezifische Oligonucleotide (Primer) wurden unter Zuhilfenahme von rechnergestützten Sequenzanalyse-Programmen konstruiert. Die im Netz der *EMBL*-Genbank (European Molecular Biological Laboratories, Heidelberg) veröffentlichten cDNA-Sequenzen der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C des Menschen, der Ratte und der Maus wurden mithilfe von *GCG* Software (Genetic Computer Group, USA) auf Homologie untersucht. Mit dem Unterprogramm *pileup* wurden die cDNA-Sequenzen miteinander verglichen und homologe Regionen für die PCR ausgewählt (Tab. 1). In den Fällen, wo Primersequenzen der verschiedenen Spezies Unterschiede auf einzelnen Nucleotidpositionen aufwiesen, wurden degenerierte Primer konstruiert. Die Primerpaare und die amplifizierten Bereiche, aus denen anschließend die cRNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung transkribiert wurden, sind fett gedruckt. Die von den Nucleotidsequenzen eingeschlossenen Bereiche beziehen sich auf die veröffentlichten cDNA-Sequenzen der humanen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene  $\alpha_2$ -C10 ( $\cong \alpha_{2A}$ ) (KOBILKA et al., 1987),  $\alpha_2$ -C2 ( $\cong \alpha_{2B}$ ) (LOMASNEY et al., 1990) und  $\alpha_2$ -C4 ( $\cong \alpha_{2C}$ ) (REGAN et al., 1988). Die Oligonucleotidprimer wurden kommerziell von den Firmen KEBO, Schweden und BIOMETRA, Göttingen synthetisiert.

**Tab. 1:** Verwendete Oligonucleotidpaare zur PCR-Amplifizierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorgen-sequenzen von *Tupaia belangeri*.

| Rezeptor-<br>gen  | PCR-<br>Fragment | Oligonucleotidsequenz <sup>1</sup><br>S= <i>sense</i> -Primer, AS= <i>antisense</i> -Primer | amplifizierter<br>Bereich <sup>2</sup> | Länge<br>(bp) |
|-------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------|
| $\alpha_{2A}$ -AR | A I              | S: 5'CCGCSTTCATSTTCCGCCAGGA 3'<br>AS: 5'CGATGGCCTGTGTGATGGACCA 3'                           | (-57) - 418 <sup>3</sup>               | 475           |
|                   | A II             | S: 5' <b>CTGCAGGTGACGCTGACGCTGGTGT</b> 3'<br>AS: 5' <b>CGCGGCGGAAATCGTGGTTGAAGAT</b> 3'     | <b>88 - 1306<sup>3</sup></b>           | <b>1218</b>   |
|                   | A III            | S: 5'GTTCTGTGCTGGCCGTGGTCATC 3'<br>AS: 5'CTCACACGATSCGYTTYCTGTCC 3'                         | 1119 - 1354 <sup>3</sup>               | 235           |
| $\alpha_{2B}$ -AR | B I              | S: 5' <b>CATGGWCCAYCAGGASCCCTACTC</b> 3'<br>AS: 5' <b>CTCACCAGGCAGTCTGGGTCCAC T</b> 3'      | <b>1 - 1356<sup>4</sup></b>            | <b>1356</b>   |
| $\alpha_{2C}$ -AR | C I              | S: 5' <b>GGCWGCCGTGGTGGGYTTCCTCAT</b> 3'<br>AS: 5' <b>CCTCCKWCGGAAGAGGATGTGCTT</b> 3'       | <b>162 - 1362<sup>5</sup></b>          | <b>1200</b>   |
|                   | C II             | S: 5'CGCGCTCCGTCGAGTTCTTCCTGC 3'<br>AS: 5'TCACTGCCTGAAGCCCCTTCTCCTCC 3'                     | 1046 - 1386 <sup>5</sup>               | 340           |

<sup>1</sup>Aufgrund von Speziesunterschieden auf einzelnen Basensequenz-Positionen wurden zum Teil degenerierte Oligonucleotidprimer verwendet. Code: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, S = Guanin oder Cytosin, W = Adenin oder Thymin, Y = Cytosin oder Thymin.

<sup>2</sup>Positionsangaben gemäß der gencodierenden cDNA-Sequenzen aus folgenden Referenzen:

<sup>3</sup>KOBILKA et al., 1987; <sup>4</sup>LOMASNEY et al., 1990; <sup>5</sup>REGAN et al., 1988. Die PCR-Fragmente, aus denen die Ribosonden für die *in situ*-Hybridisierungsexperimente transkribiert wurden, sind fett gedruckt.

In sterilen 0.5 ml Plastikgefäßen wurden auf Eis 1×PCR-Puffer, 10 mM dNTP-Gemisch (Boehringer, Mannheim), 50 pmol *sense* - Primer, 50 pmol *antisense* - Primer mit H<sub>2</sub>O auf 48.5 µl aufgefüllt, gemischt, abzentrifugiert und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsgemische wurden mit jeweils 1 µl Template - DNA (100 ng cDNA, bzw. 500 ng genomische DNA) versetzt und bei 96°C für 3 Min. im Thermocycler denaturiert. 0.5 µl thermostabile Polymerase (*Expand High Fidelity* Polymerase, Boehringer, Mannheim) je PCR-Ansatz wurde im manuellen *Hot Start*-Verfahren direkt vor dem ersten Primer-Extensionsschritt des PCR - Zyklus unter die Ölschicht zum Gemisch pipettiert. Der PCR-Ansatz zur Amplifizierung des Produktes C I enthielt 1 µl DMSO. Die Amplifizierung der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte unter der Tabelle 2 zu entnehmenden Zyklusbedingungen. Zur vollständigen Absättigung der amplifizierten DNA-Stränge erfolgte im Anschluß an den PCR-Zyklus ein siebenminütiger Extensionsschritt bei 72 °C.

**Tab. 2:** Bedingungen für die PCR-Amplifizierung genomischer DNA und von cDNA

| Rezeptorgen       | PCR-Fragment | Denaturierung |          | Primer-Anlagerung |          | Primer-Extension |          | $\Sigma$ Zyklen (n) |
|-------------------|--------------|---------------|----------|-------------------|----------|------------------|----------|---------------------|
|                   |              | T (°C)        | t (min.) | T (°C)            | t (min.) | T (°C)           | t (min.) |                     |
| $\alpha_{2A}$ -AR | A I          | 95            | 1        | 65                | 1        | 72               | 1        | 35                  |
|                   | A II         | 96            | 0.5      | 67                | 1        | 72               | 2        | 35                  |
|                   | A III        | 96            | 0.5      | 60                | 1        | 72               | 1        | 40                  |
| $\alpha_{2B}$ -AR | B I          | 96            | 0.5      | 65                | 1        | 72               | 2        | 40                  |
| $\alpha_{2C}$ -AR | C I          | 96            | 1        | 60                | 1        | 72               | 3        | 40                  |
|                   | C II         | 96            | 0.5      | 65                | 1        | 72               | 1        | 40                  |

#### 2. 6. 5. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der PCR-Amplifikation wurde das Produkt zusammen mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 10 V / cm elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2. 5. 1.). Die Aufreinigung des PCR-Fragments aus dem Gel erfolgte mithilfe des *QIAEX II Gel Extraktion Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben: Die DNA-Bande mit der erwarteten Fragmentlänge wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und auf einer Feinwaage gewogen. Das Agarosepolymer wurde zu gleichen Teilen (w/v) mit QX-Puffer bei 50 °C aufgelöst und zur Isolierung der DNA-Moleküle mit 10  $\mu$ l Silica-Gel Partikel versetzt. Anschließend wurden die Partikel mit den gebundenen DNA-Molekülen für 1 Min. abzentrifugiert und mit 500  $\mu$ l QX-Puffer gewaschen. Nach erneuter Abnahme des flüssigen Überstandes und Zentrifugation wurden die Partikel anschließend zur Herauslösung der Salze zweimal mit ethanolhaltigem PE-Puffer gewaschen. Schließlich wurde der Überstand abermals abgenommen und das Pellet mit der an die Partikel gebundenen DNA für 15 Min. luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA mit 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aus den Säulen eluiert und in Zentrifugenröhrchen gesammelt.

#### 2. 6. 6. Ligierung des PCR-Produktes in Plasmidvektoren

Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die PCR-Produkte in einen pGEM-T Plasmidvektor (Promega, USA) ligiert. Dieser Vektor wurde vom Hersteller aus einem pGEM-5Zf(+)-Vektor durch Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *EcoR* V (Promega, USA) und Anfügen zweier 3' Thymidin-Überhänge hergestellt. Die über Adenosin-Überhänge verfügenden PCR-Produkte konnten so ohne vorherige Phosphorylierung direkt in den Vektor ligiert werden. Der Ligierungsansatz bestand aus 1×T4 DNA-Ligasepuffer (Promega, USA), 50 ng Vektor-DNA, 20-75 ng PCR-Produkt (das molare Verhältnis aus Vektor-DNA und Insert-DNA entsprach jeweils 1 : 3) und 1 Weiss-Unit T 4 DNA Ligase (Promega, USA). Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 15 °C inkubiert, 10 Min. bei 72 °C inaktiviert und bei -20 °C gelagert.

#### 2. 6. 7. Transformation der Plasmide in E.coli

Die rekombinanten Plasmide wurden in superkompetenten XL1-Blue Epicurian coli-Zellen (Stratagene, USA) nach modifizierten Herstellerangaben vermehrt: Die Zellen wurden auf Eis getaut und zu jeweils 50 µl in 12 ml-Polypropylenröhrchen aliquotiert. Nach Zugabe von 0.85 µl β-Mercaptoethanol wurden die Zellen für 10 Min. auf Eis gelagert, mit 2 µl des Ligierungsansatzes versetzt und für weitere 30 Min. auf Eis gestellt. Die Insertion der rekombinanten Plasmide in das Wirtsbakterium erfolgte für 50 Sek. in einem 42 °C temperierten Wasserbad. Nach zweiminütiger Lagerung auf Eis wurden die Zellen mit 450 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C und 225 U/Min. geschüttelt. Jeweils 50 µl und 200 µl der Kultur wurden auf LB / Ampicillin-Kulturplatten ausgestrichen und diese bei 37 °C für 20 Std. inkubiert. Zum sogenannten Blue / White-Screening positiver Kolonien wurden die Platten zuvor mit 10 µl 1M IPTG (Isopropyl-β-galactopyranosid) und 50 µl 20 mg / ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranosid) beschichtet.

10 bis 20 weiße Bakterienkolonien, die somit ein ampicillinresistentes, rekombinantes Plasmid enthielten, wurden mit sterilen Zahnstochern von der Agarplatte gehoben und in jeweils 5 ml LB / Ampicillin-Medium geimpft. Diese Minikulturen wurden für 16 Stunden bei 37 °C und 225 U/Min. geschüttelt.

### 2. 6. 8. Plasmidpräparation

Aus den Bakterienkulturen wurden jeweils 2 ml Medium in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen in einer Zentrifuge bei 14.000×g sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Plasmidisolierung im Säulen - Aufreinigungsverfahren mithilfe des *Wizard* Minipräparations-Systems (Promega, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und ihre Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt. Zur ersten Überprüfung des klonierten PCR-Produktes wurde jeweils 1 µg der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen gespalten, deren Schnittstellen in den entsprechenden Sequenzen des Menschen, der Ratte und der Maus konserviert sind. Klone, die die erwarteten Fragmentlängen aufwiesen, wurden daraufhin in größerem Maßstab präpariert. Dazu wurden 500 µl der Minikulturen in 50 ml LB / Ampicillin-Medium pipettiert und für 16 Stunden bei 37 °C und 225 U/Min. geschüttelt. Den Suspensionen wurden mehrere 500 µl - Aliquots entnommen, die mit 250 µl Glycerin vermischt und bei -80 °C als Dauerkulturen eingefroren wurden. Die restliche Suspension wurde auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt und bei 4000×g und 4 °C für 20 Min. sedimentiert. Die anschließende Plasmidaufreinigung wurde mithilfe von *Qiagen-100* Midipräparations-Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2. 6. 9. Sequenzanalyse der rekombinanten Plasmid-DNA

Nach der Überprüfung der Plasmid-DNA aus der Minipräparation durch Restriktionshydrolyse wurden Klone, die die erwarteten Fragmentlängen aufwiesen, einer DNA-Sequenzierung unterzogen. Die Sequenzanalyse wurde zunächst mit der radioaktiven Dideoxynucleotid-Methode durchgeführt (SANGER et al., 1977) unter Verwendung von T7 DNA Polymerase (Sequenase Version 2.0, Pharmacia, Schweden). Durch die Sequenzierung wurde Aufschluß darüber erzielt, ob es sich bei den klonierten PCR-Produkten um  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgenfragmente handelte.

In einem Volumen von 20 µl wurden 3 µg der doppelsträngigen Plasmid-DNA für 30 Min. bei 37 °C in 2.5 N NaOH denaturiert. Nach Neutralisation der alkalischen Reaktion durch 6 µl 3M Natriumacetat, pH 5.5, wurde die DNA unter Zugabe von 120 µl Ethanol für 30 Min. auf Trockeneis ausgefällt, in einer Tischzentrifuge bei 4 °C präzipitiert und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde es in 7 µl H<sub>2</sub>O

gelöst und mit 7 µl Sequenasepuffer (Pharmacia, Schweden) und 1 pmol des Sequenzierungsprimers versetzt. Als Sequenzierungsprimer wurden T7- und SP6-promotor-spezifische Primer (Promega, USA) sowie die PCR-Primer eingesetzt. Zur Primeranlagerung wurde das Gemisch in einem Heizblock für 2 Min. auf 65 °C erhitzt und innerhalb von 30 Min. auf RT abgekühlt. Auf Eis wurden zu dem Primer-DNA-Komplex nacheinander 1 µl DTT, 2 µl Labelling Mix (Pharmacia, 1:5 verdünnt), 0.5 µl [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP und 2 µl Sequenase II (Pharmacia, 1:8 in Sequenase Dilution Buffer verdünnt) hinzupipettiert und ca. 3 Min. bei RT inkubiert. Zur Strangterminierung wurden jeweils 3.5 µl der Labelling-Reaktion zu je 2.5 µl ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP (Pharmacia) pipettiert und für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden unter Zugabe von 4 µl Stop-Lösung (Pharmacia) abgebrochen und bei -20 °C gelagert. Jeweils 2.5 µl der Reaktionen wurden in die Taschen eines 7 % PAGE pipettiert und bei 65 W für 2 h aufgetrennt. Die weitere Behandlung des Gels erfolgte wie in Kap. 2. 5. 2. beschrieben. Die Ergebnisse aus den manuellen Sequenzanalysen wurden durch eine automatische Sequenzierung mit einem ABI 373-Sequencer (Perkin Elmer, USA) überprüft. Diese automatischen Sequenzierungen wurden von Dr. G. Dowe, MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen, durchgeführt.

## 2. 7. Proteinsequenz-Vergleiche

Unter Verwendung des Computerprogrammes *SeqApp*, Version 1.9 wurden aus den  $\alpha_2$ -adrenergen cDNA-Sequenzen die offenen Leseraster konstruiert und diese in Aminosäuresequenzen übersetzt. Mit dem Programm *Clustal W* (HIGGINS und SHARP, 1989) wurden die hergeleiteten Aminosäuresequenzen mit den in der *GenBank*-Datenbank veröffentlichten Sequenzen anderer Spezies aligniert.

## 2. 8. *In situ* - Hybridisierung - Histochemie

Zur Inaktivierung von RNasen wurde sämtliches bei der Vorbehandlung der Schnitte und bei der *in situ*-Hybridisierung verwendete Glasmaterial für 8 h bei 180 °C sterilisiert. Das Wasser wurde mit DEPC behandelt und autoklaviert, und die Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Alle die Vorbereitung der Ribosonde und des Gewebes

betreffenden Methoden sowie die Hybridisierungsreaktion wurden unter RNase freien Bedingungen durchgeführt.

#### 2. 8. 1. Gewebepräparation und Erzeugung von Gefrierschnitten

Die Tiere wurden zwischen 8 und 9 Uhr decapitiert. Die Gehirne wurden sofort entnommen, in Tissue-Tek eingebettet und über flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Hirngewebe wurde bis zur weiteren Behandlung bei -80 °C gelagert.

Das Schneiden der Gehirne in 10 µm-Schnitte erfolgte im Kryostaten bei -24 °C. Die Hirnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit einer 0.5 % Gelatine / 1 mM Chrom (III)-Kaliumsulfat-Lösung beschichtet waren. Zur Gewährleistung einer identischen experimentellen Behandlung der Präparate subordinater Tiere und der Kontrollen wurden Hirnschnitte aus gleichen anatomischen Ebenen je eines Tieres beider Gruppen nebeneinander auf einem Objektträger aufgezogen. Nach dem Schneiden wurden die Hirnpräparate für 20 Min. auf RT erwärmt und für 20 Min. in 4 % PFA fixiert. Danach wurden sie für 5 Min. in 3×PBS und zweimal für 5 Min. in 1×PBS gespült und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 % EtOH) dehydriert. Nach einer einstündigen Lufttrocknung wurden die Präparate in mit Kieselgel versehenen Objektträgerkästen sortiert, eingeschweißt und bei -80 °C gelagert.

#### 2. 8. 2. *In vitro* -Transkription der cDNA und radioaktive Markierung der Ribosonden

Vor der *in vitro*-Transkription mußten die Plasmidklone mit Restriktionsendonucleasen linearisiert werden. In der Tabelle 3 sind die für die *sense*- und *antisense*-gerichteten Transkriptionen verwendeten Enzyme aufgeführt. Die enzymatischen Hydrolysen zur Linearisierung der Plasmide wurden wie in Kapitel 2. 5. 3. beschrieben durchgeführt.

**Tab. 3:** Verwendete Restriktionsenzyme zur Linearisierung der Plasmidklone

| Plasmid - DNA        | Orientierung     | Restriktionsenzym |
|----------------------|------------------|-------------------|
| pGEM / $\alpha_{2A}$ | <i>sense</i>     | <i>Not</i> I      |
|                      | <i>antisense</i> | <i>Bgl</i> II     |
| pGEM / $\alpha_{2B}$ | <i>sense</i>     | <i>Bam</i> H I    |
|                      | <i>antisense</i> | <i>Xho</i> I      |
| pGEM / $\alpha_{2C}$ | <i>sense</i>     | <i>Stu</i> I      |
|                      | <i>antisense</i> | <i>Bpu</i> 1102 I |

Die *in vitro*-Transkription der linearisierten Plasmid-DNA in radioaktiv markierte cRNA erfolgte unter Verwendung des TransProbe T-Kits (Promega, USA) und [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP (ICN Biochemicals, USA): In einem 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden in einer Vakuumzentrifuge 250  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP (1000 Ci / mmol) eingetrocknet. Bei RT wurden 4  $\mu$ l 5  $\times$  Transkriptionspuffer, 2  $\mu$ l 1M DTT, 0.5  $\mu$ l 20 U /  $\mu$ l RNasin (RNase-Inhibitor), 4  $\mu$ l ATP/ GTP / CTP -Mix (jew. 250  $\mu$ M), 1  $\mu$ g lineare Plasmid -DNA, 1  $\mu$ l SP6 RNA-Polymerase für die Antisense-Probe, bzw. 1  $\mu$ l T7 RNA-Polymerase für die Sense-Probe hinzupipettiert, mit H<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l aufgefüllt, gemischt und bei 39 °C im Schüttelwasserbad für 1 h inkubiert. Zur Verdauung nicht-translatierter DNA wurde das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 1 Unit DNase I für weitere 15 Min. bei 37 °C inkubiert.

Zur Aufreinigung und Entfernung von kurzen Abbruchfragmenten (<200 Basen) wurden die Reaktionsgemische mit H<sub>2</sub>O auf 50  $\mu$ l aufgefüllt, in *MicroSpin S 200* - Säulen (Pharmacia, Schweden) pipettiert und für 2 Min. bei 2.000 $\times$ g in neue Reaktionsgefäße abzentrifugiert. Zur Überprüfung der Transkriptionsausbeute wurde 1  $\mu$ l des Reaktionsansatzes zur Messung der Radioaktivität in 1.5 ml Scintillationsflüssigkeit pipettiert und im  $\beta$ -Counter ausgezählt. Die Qualität der Transkription wurde ermittelt, indem 1  $\mu$ l des Transkriptionsansatzes auf einer denaturierenden PAGE aufgetrennt und über Nacht auf einen *Biomax*-Autoradiographiefilm (Kodak, USA) exponiert wurde. Der restliche Ansatz wurde bis zur Hybridisierung bei -80 °C eingefroren.

### 2. 8. 3. Hybridisierung der Gewebeschnitte mit den Ribosonden

Zur Vorbehandlung wurden die tiefgefrorenen Objektträger mit den Hirnschnitten in den verschlossenen Kästen auf RT erwärmt und in Glashalter sortiert. Die Schnitte wurden für jeweils 2 Min. in einer absteigenden Ethanolreihe hydriert und in 0.86 % NaCl und 1×PBS für jeweils 5 Min. gespült. Nach einer 20minütigen Nachfixierung in 4 % PFA und einem erneuten Spülen in 1 × PBS wurden die Schnitte für 10 Min. in frisch angesetzter 0.1 M Triethanolamin / 0.25% Essigsäureanhydrid-Lösung acetyliert, wiederum in 1×PBS und 0.86% NaCl gespült und in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert. Die Schnitte wurden für 1 h auf einer sterilen Werkbank getrocknet.

Die [<sup>35</sup>S]UTP-markierten Ribosonden wurden mit dem Hybridisierungspuffer auf eine spezifische Aktivität von  $5 \times 10^4$  cpm /  $\mu$ l verdünnt, für 10 Min. auf 80 °C erhitzt und auf die Schnitte getropft. Die Schnitte wurden mit Dimethylchlorsilan-beschichteten Deckgläschen überdeckt. Das Aufträufelvolumen der Hybridisierungslösung richtete sich nach der Größe der Deckgläschen und betrug etwa 8  $\mu$ l / cm<sup>2</sup>. Die Schnitte wurden mit der Hybridisierungslösung für 19 h bei 56 - 60 °C in feuchten Kammern (luftdicht abschließende Kästen, mit 1×SSC und 50 % Formamid getränktem Chromatographiepapier ausgelegt) hybridisiert.

### 2. 8. 4. Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte unter hochstringenten Bedingungen gewaschen. Zum Entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger zunächst für 10 Min. in 4 × SSC, 2 mM DTT und für 10 Min. in 2 × SSC, 2 mM DTT bei 37 °C gespült. Die folgenden Waschpuffer enthielten jeweils 1 mM DTT. Nachdem die Schnitte für 15 Min. in 0.5 × SSC bei 37 °C gewaschen wurden, wurden sie in 0.1 × SSC von 37 °C auf 60 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für 30 Min. gespült. Danach wurden die Schnitte erneut bei 37 °C in 0.5 × SSC für 30 Min. und in NTE - Puffer für 15 Min. gespült. Zur Hydrolyse nicht-hybridisierter RNA-Moleküle wurden die Schnitte für 30 Min. bei 37 °C in NTE-Puffer, der 20  $\mu$ g / ml RNase A enthielt, inkubiert. Nach einer 15minütigen Waschung in NTE und einer 30-minütigen Waschung in 0.5 × SSC bei 37 °C schlossen sich zwei 15-minütige Waschschrte bei RT in 0.5×und 0.1×SSC an, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden

Ethanolreihe mit 0.25 M Ammoniumacetat für jeweils 2 Min. entwässert und für 1 h luftgetrocknet wurden.

#### 2. 8. 5. Autoradiographie der hybridisierten Gewebeschnitte

Zur makroskopischen Untersuchung der Verteilung der mRNA  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorsubtypen im Gehirn von *Tupaia belangeri* wurden die trockenen Gewebeschnitte in Bleikassetten auf *Biomax*-Autoradiographiefilme (Kodak, USA) für 8 Tage exponiert. Anschließend wurden die Filme für etwa 4 Min. in 5 % LX 24 (Kodak, USA) entwickelt. Die Filmentwicklung wurde in 0.6 % Eisessig abgestoppt. Nachdem die Filme für 20 Min. in 1:5 verdünntem Kodak-Unifix fixiert worden waren, wurden sie für abermals 20 Min. unter fließendem Leitungswasser gespült und luftgetrocknet.

Zwecks mikroskopischer Auswertung der Hybridisierungssignale wurden die mit den hybridisierten Schnitten versehenen Objektträger in der Dunkelkammer in eine auf 42 °C erwärmte Photoemulsion gedippt (*NTB 2*, Kodak, USA), für eine Stunde über feuchten Papiertüchern langsam luftgetrocknet, in lichtdichte Kästen sortiert und für 25 Tage exponiert. Die gedippten Objektträger wurden für 3 - 4 Min. in 16 % Kodak-D 19 entwickelt, kurz in Wasser abgestoppt, für 5 Min. in 1:5 verdünntem Kodak-Unifix fixiert und für 5 Min. in Wasser gespült. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für etwa 1 Min. in 0.05 % Toluidinblau, 0.1 % di-Natriumtetraborat getaucht und in einer aufsteigenden Ethanolreihe differenziert. Die Schnitte wurden in der Xylolreihe entwässert, mit Eukitt überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

#### 2. 8. 6. Densitometrische Auswertung der Hybridisierungssignale

Zur Untersuchung des regionalen Expressionsniveaus  $\alpha_2$ -AR mRNA wurden die Autoradiographiefilme einer Analyse durch ein digitales Bildauswertungssystem (MCID, Imaging Inc., Kanada) unterzogen. Das Bild wurde hierzu mit einem Photocamera-Objektiv über die CCD-Camera auf den Computermonitor übertragen. Die Grauwerte der einzelnen Hirnregionen und Nuclei wurden nach Abzug des Hintergrundgrauwertes (Nullwert) zu der mittleren Signalstärke der  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA Hybridisierung über dem Locus coeruleus (100 %) in Relation gesetzt. Die Expressionsniveaus wurden je nach Grauwert als schwach (<25 %),

mittel (26-70 %) und stark (71-100 %) eingestuft. Um die Hybridisierungssignale auf den Autoradiographiefilmen einzelnen Hirnregionen zuzuordnen, wurden sie mit angrenzenden Nissl-gegengefärbten Schnitten verglichen. Zur Identifizierung der Hirnregionen wurden die stereotaxischen Hirnatlanten von *Tupaia glis* (TIGGES und SHANTA, 1969) und der Ratte (PAXINOS und WATSON, 1986) herangezogen.

#### 2. 8. 7. Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Zur subzellulären Auswertung wurden die hybridisierten Hirnpräparate mit einem Mikroskop (Zeiss, Axiophot) um das 370fache vergrößert, mit einer CCD-Camera digitalisiert und auf ein computergestütztes Bildauswertungssystem übertragen (MCID, Imaging Research Inc., Kanada). Die in der Photoemulsion enthaltenen Silberbromidmoleküle werden von der Radioaktivität der mit der zellulären  $\alpha_2$ -AR mRNA hybridisierten cRNA-Sonden zu atomarem Silber reduziert. Die dadurch entstehenden Silberkörner werden vom Computer als schwarz erscheinende Partikel detektiert. Da der Rechner zwei unmittelbar benachbart liegende Silberkörner nicht differenzieren kann, wurden die digitalen Bildpunkte (Pixel) ausgezählt und damit die von Silberkörnern bedeckte Fläche über der Zelle quantifiziert. Ein Silberkörnchen setzt sich im digitalisierten Computerbild durchschnittlich aus 20 Pixeln zusammen. Eine Zelle wurde als markiert angesehen und ausgewertet, wenn die von Silberkörnern bedeckte Fläche über der Zelle mindestens um ein fünffaches größer war als eine entsprechende Fläche im umgebenden Gewebe. Die Hybridisierungssignale über den Zellen wurden von der durchschnittlichen Hintergrund-hybridisierung über dem umgebenden Gewebe bereinigt. Die zu vergleichenden Hirnschnitte der Tiergruppen SUB und CON wurden bezüglich ihrer anatomischen Übereinstimmung anhand der Nissl-Gegenfärbung überprüft und mithilfe des *Tupaia*-Hirnatlas (TIGGES und SHANTA, 1969) ausgewählt.

## 2. 9. Statistik

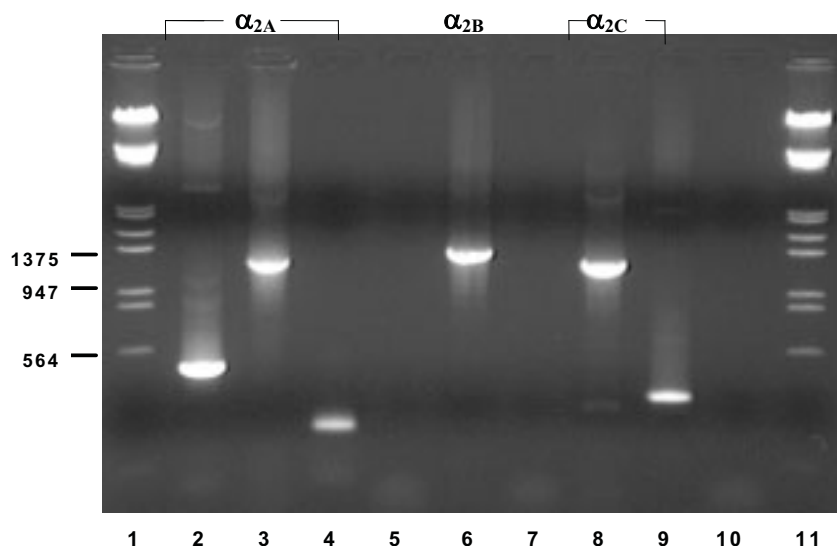
Die Meßwerte aus den quantitativen *in situ* - Hybridisierungen wurden mit MS Excel 7.0 (Microsoft, USA) bearbeitet und mit dem Programm Prism 2.0 (Graph Pad Software, USA) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Bei der Auswertung der durch die *in situ*-Hybridisierung erzeugten Signale handelt es sich um eine semiquantitative Analyse, da die Stärke des radioaktiven Signals von verschiedenen Faktoren, wie der Länge der Filmexpositionszeit oder der Entwicklungszeit, beeinflußt wird. Je Tier und Region wurden jeweils 50 Zellen quantifiziert und auf Normalverteilung überprüft. Die Meßwerte aller ausgewerteten Zellgruppen waren normalverteilt. Aus den Einzelmeßwerten wurden die Mittelwerte gebildet, welche die Basis für die Gruppenmittelwerte bildeten. Die Gruppenmittelwerte der Subordinaten und der Kontrolltiere wurden miteinander verglichen und mit dem zweiseitigen t-Test für paarige Stichproben auf Signifikanz überprüft. Die Daten aus den Gewichtsmessungen und der Bestimmung des Cortisolgehaltes wurden mit MS Excel 7.0 bearbeitet und graphisch dargestellt. Die Gruppenmittelwerte aus den Kontroll- und Konfrontationsphasen wurden miteinander verglichen und mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben auf Signifikanz überprüft.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3. 1. Klonierung der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgene

##### 3. 1. 1. Isolierung von Rezeptor-Partialsequenzen mit der PCR-Technik

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden unter Verwendung genspezifischer Oligonucleotid-Primer die codierenden DNA-Sequenzen der drei adrenergen Rezeptorgene  $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2B}$ -AR und  $\alpha_{2C}$ -AR kloniert. Die Primersequenzen wurden aufgrund speziesübergreifender  $\alpha_2$ -subtypspezifischer DNA-Sequenzen konstruiert (s. Kap. 2.6.4., Tab. 1). Als Matrize für die Amplifizierung der Rezeptorgenfragmente diente poly(A)<sup>+</sup>RNA aus Tupaia-Hirn und -Niere und genomische DNA, die aus Lebergewebe isoliert wurde.



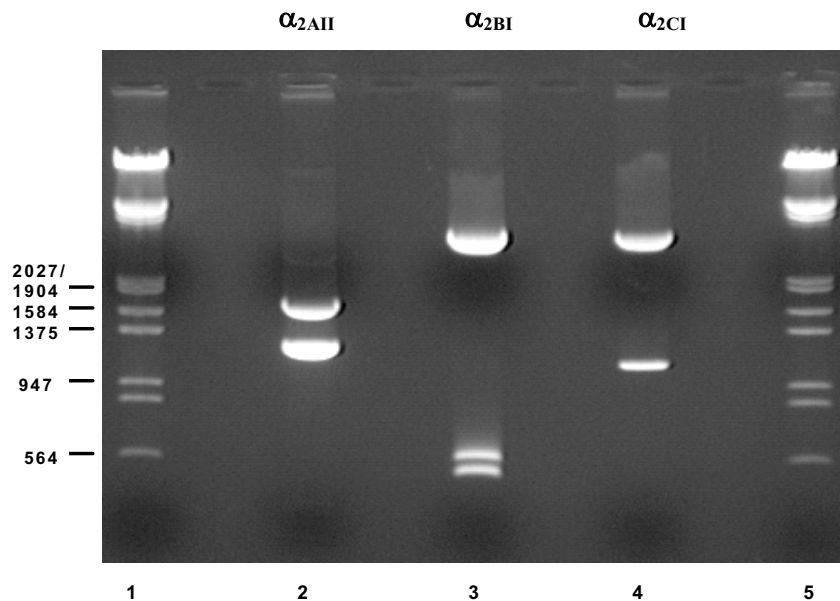
**Abbildung 4:** PCR-Amplifikationsprodukte unter Verwendung  $\alpha_2$ -subtypspezifischer Primer. Jeweils 5  $\mu$ l der 50  $\mu$ l-PCR-Ansätze wurden im 1.2 % Agarosegel / 0.5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Bahn 1:  $\lambda$ /*Eco*RI/*Hind*III-Molekulargewichtsstandard; 2:  $\alpha_{2A}$ -Fragment A I, 475 bp; 3:  $\alpha_{2A}$ -Fragment A II, 1218 bp; 4:  $\alpha_{2A}$ -Fragment A III, 235 bp; 5: Negativkontrolle A II (PCR ohne DNA-Schablone); 6:  $\alpha_{2B}$ -Fragment B I, 1356 bp; 7: Negativkontrolle B I (ohne DNA-Schablone); 8:  $\alpha_{2C}$ -Fragment C I, 1200 bp; 9:  $\alpha_{2C}$ -Fragment C II, 340 bp; 10: Negativkontrolle C I (PCR ohne cDNA-Schablone). 11:  $\lambda$ /*Eco*RI/*Hind*III- Molekulargewichtsstandard.

Da  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgene keine Introns besitzen (Introns sind nicht-proteincodierende Bereiche eukaryontischer Gene, die vor der Translation aus der mRNA herausgespleißt werden), entsprechen die aus genomischer DNA amplifizierten Produkte den entsprechenden RT-PCR-Amplifikaten aus RNA-Lösungen. Die in Abbildung 4 dargestellten PCR-Produkte wurden aus genomischer Leber-DNA ( $\alpha_{2A}$ -Fragment AII), poly(A)<sup>+</sup>RNA aus

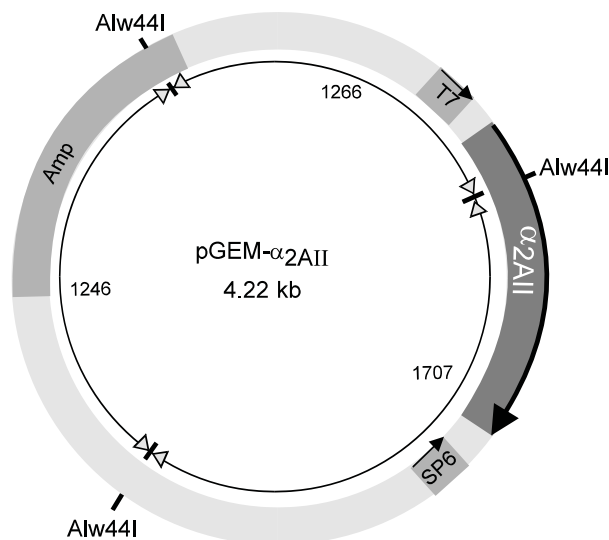
der Niere ( $\alpha_{2B}$ -Fragment) und aus hippocampaler poly(A)<sup>+</sup>RNA (alle übrigen Fragmente) amplifiziert.

### 3. 1. 2. Klonierung der Rezeptorgen-Fragmente in Plasmidvektoren

Nach der Gelaufreinigung der PCR-Fragmente wurden diese in pGem-Plasmidvektoren ligiert, in *E. coli*-Zellen transformiert und in Kulturen vermehrt. Nach der Präparation wurden die rekombinanten Plasmide zunächst durch eine Restriktionshydrolyse charakterisiert. Dafür wurden Enzyme verwendet, die gemäß der DNA-Sequenzvergleiche der jeweiligen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren der Maus, der Ratte und des Menschen subtypspezifisch konservierte Schnittstellen aufweisen. So gaben nach elektrophoretischer Auftrennung der Verdauungsansätze die Restriktionsfragmentlängen auf dem Agarosegel Aufschluß über eine erfolgreiche Klonierung der gewünschten DNA-Fragmente und über ihre Orientierung (*sense* oder *antisense*) im Plasmid. Um endgültige Sicherheit über die klonierten Rezeptorgenfragmente zu erlangen, wurden die Plasmidklone mit den erwarteten Fragmentlängen einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen (Kap. 3.1.3.). Es stellte sich heraus, daß es sich bei allen Klonen, welche die aus den Sequenzvergleichen geschlußfolgerten Restriktionsfragmente aufwiesen, um die erwarteten cDNA-Fragmente der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen handelte. Zudem waren alle klonierten PCR-Produkte bis auf den separat klonierten 5'-Terminus des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptorgens (Fragment AI) in *sense*-Richtung in die Plasmidvektoren inseriert. Abbildungen 5. 2. bis 5. 4. zeigen die Karten der rekombinanten Plasmide, aus denen die cRNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung transkribiert wurden (PCR-Fragmente A II, B I und C I, vgl. Abb. 3 und Tab. 1). Es sind die speziessübergreifend konservierten Schnittstellen eingezeichnet und die daraus resultierenden Restriktionsfragmentlängen. Abbildung 5. 1. dokumentiert die nach Restriktionshydrolyse und anschließender Gelelektrophorese entstandenen Fragmentlängen im Agarosegel.

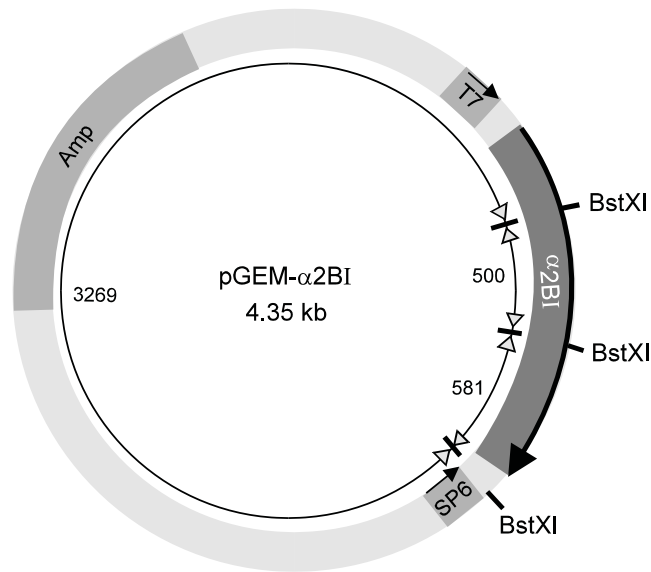


**Abb. 5. 1.:** Kontrollverdau der in der *in situ*-Hybridisierung als Ribosonden verwendeten Plasmidklone. Jeweils 1 µg der klonierten PCR-Produkte wurde restriktionsenzymatisch verdaut und in einem 1.2 % Agarosegel / 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, aufgetragen. Bahn 1: λ/EcoRI/HindIII-Molekulargewichtsstandard; 2: pGem-α<sub>2AII</sub> gespalten mit Alw44I, Fragmentlängen: 1707 bp, 1266 bp, 1246 bp (die 1266 bp- und 1246 bp-Fragmente sind als einander überlagernde Doppelbande erkennbar); 3: pGem-α<sub>2BI</sub> gespalten mit BstXI, Fragmentlängen: 3269 bp, 581 bp, 500 bp; 4: pGem-α<sub>2CI</sub> gespalten mit SacI, Fragmentlängen: 3132, 1078; 5: λ/EcoRI/HindIII-Molekulargewichtsstandard.

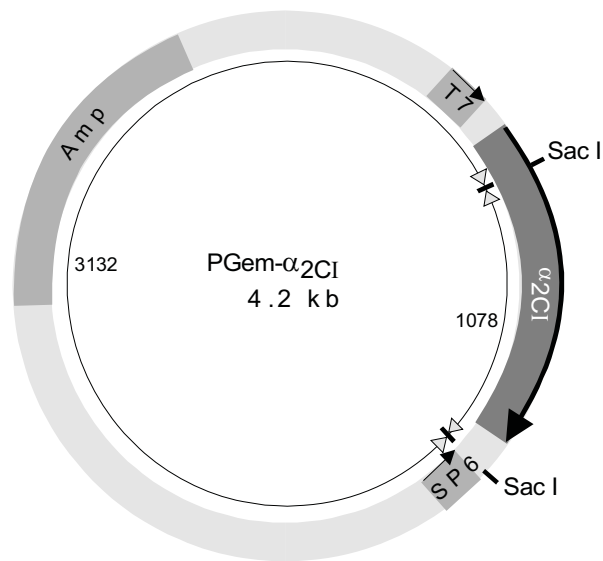


**Abb. 5. 2.:** Plasmidkarte des klonierten α<sub>2A</sub>-adrenergen PCR-Fragments AII (1218 bp).

**Abb. 5. 2. - 5. 4.:** Die Plasmidkarten dokumentieren die Position und Ausrichtung (5' - 3'-Terminus) der PCR-Produkte AII, BI und CI im pGEM®-Klonierungsvektor. Infolge der A/T-Klonierungsstrategie der PCR-Produkte (s. Kap. 2.4.4.) wurden alle inserierten Fragmente an die gleiche Position des Klonierungsvektors ligiert. Es sind die speziehomologen Restriktionsenzym-Schnittstellen und die daraus resultierenden Fragmentlängen (s. Abb. 5. 1.) eingezeichnet. Ferner sind die T7- und SP6-Promotorregionen gekennzeichnet und die Leserichtung der an diese Positionen bindenden T7- und SP6-RNA-Polymerasen. In den *in situ*-Hybridisierungsexperimenten dienten diese zur *in vitro* Transkription der *sense*- und *antisense*-orientierten cRNA-Sonden.



**Abb. 5. 3.:** Plasmidkarte des klonierten  $\alpha_{2B}$ -adrenergen PCR-Fragments BI (1356 bp).



**Abb. 5. 4.:** Plasmidkarte des klonierten  $\alpha_{2C}$ -adrenergen PCR-Fragments CI (1200 bp).

### 3. 1. 3. DNA-Sequenzen der klonierten Rezeptorgene

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob es sich bei den klonierten PCR-Amplifikaten um  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgenfragmente handelte, wurden die Plasmidklone sequenziert. Die rekombinanten Plasmide aus den PCR-Klonierungsexperimenten wurden mit manuellen und automatisierten DNA-Sequenzanalysen ausgewertet. Zunächst wurden jeweils zwei

unabhängige Klone eines jeden cDNA-Fragments analysiert. Wiesen diese Sequenzen auf einzelnen Positionen unterschiedliche Nucleotide auf, wurde das Ergebnis mit der Sequenzierung eines dritten Klons überprüft. Der cDNA-Klon des  $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptorsubtypen umfaßte das Start- und das Stopcodon und somit die gesamte codierende Region des Rezeptorgens. Nachdem Fragmente von jeweils 90 % und 86 % der codierenden cDNA-Sequenzen des  $\alpha_{2A}$ - und des  $\alpha_{2C}$ -AR amplifiziert worden waren, konnten unter Verwendung zusätzlicher Primerpaare der 5'- und der 3'-Terminus des  $\alpha_{2A}$ - sowie der 3'-Terminus des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgens mit der PCR isoliert und kloniert werden. Somit wurden aus den PCR-Fragmenten die kompletten kodierenden Sequenzen des A- und des B-Subtypen und 88 % der Sequenz des C-Rezeptorgens entschlüsselt (Abb. 6. 1. bis 6. 3.).

| <b><math>\alpha_{2A}</math>-AR</b> |            |            |                     |            |             |                |      |    |  |
|------------------------------------|------------|------------|---------------------|------------|-------------|----------------|------|----|--|
| 5'                                 | TGGCCGAGGG | CAGCTTTGCG | CCC <b>ATG</b> GGCT | CCCTGCAGCC | GGACGCGGGC  | AACGCAAGCT     | 60   |    |  |
|                                    | GGAACGGGAC | CGAGGCGCCA | GGGGGCGGCG          | CCCGGGTCAC | CCCGTACTCC  | CTGCAGGTGA     | 120  |    |  |
|                                    | CGCTGACGCT | GGTGTGCCTG | GCCGGCCTGC          | TCATGCTGCT | AACCGTGTTT  | GGCAACGTGC     | 180  |    |  |
|                                    | TGGTCATCAT | CGCGGTGTTT | ACCAGCCGCG          | CGCTCAAGGC | ACCCCAAAAC  | CTCTTCCTGG     | 240  |    |  |
|                                    | TGTCCCTGGC | CTCGGCCGAC | ATCCTCGTGG          | CCACGCTTGT | CATCCCTTTC  | TCGTTGGCCA     | 300  |    |  |
|                                    | ACGAGGTCAT | GGGCTACTGG | TACTTCGGTA          | AGGCGTGGTG | TGAGATCTAC  | CTGGCGCTCG     | 360  |    |  |
|                                    | ACGTCCTCTT | CTGCACGTCG | TCCATCGTGC          | ACCTGTGTGC | CATCAGCCTG  | GACCGCTACT     | 420  |    |  |
|                                    | GGTCCATCAC | ACAGGCCATC | GAGTACAACC          | TGAAGCGCAC | GCCGCGCCGC  | ATCAAGGTCA     | 480  |    |  |
|                                    | TCATCTTCAC | CGTGTGGGTC | ATCTCAGCGG          | TCATCTCCTT | CCCGCCGCTC  | ATCTCCATCG     | 540  |    |  |
|                                    | AGAAGAAGGG | CAGCTGGGCG | GGCCCCGAGC          | CCGCGGAGCC | GCGCTGCGAG  | ATCAACGACC     | 600  |    |  |
|                                    | AGAAGTGCTA | CGTCATCTCG | TCGTGCATCG          | GCTCCTTCTT | CGCTCCCTGC  | CTCATCATGA     | 660  |    |  |
|                                    | TCCTGGTCTA | CGTGGCGATC | TACCAGATCG          | CCAAGCGCCG | CACCCGCGTG  | CCGCCTAGCC     | 720  |    |  |
|                                    | GCCGGGGTCC | GGACGCCACG | GCCGCCCCAC          | CCGGGGGCGC | AGAGCGCAGG  | CCCAATGGCC     | 780  |    |  |
|                                    | TGGGCCCCGA | GCGCGGCGCT | GGGCCCCGCG          | GCGCCGAGGC | GGAAACCGCTG | CCCACCCAGC     | 840  |    |  |
|                                    | TCAACGGGCG | CCCGGGGGAC | CCCGCCCCGG          | CCGGGCTGCG | AGACACTGAC  | GCGCTGGACC     | 900  |    |  |
|                                    | TGGAGGAGAG | CTCGTCTTCC | GAGCACGCCG          | AGCGGCCCCC | AGGGCCCCGC  | AGGCCCGAGC     | 960  |    |  |
|                                    | GCGGTCCCCG | GGCCAAGGGC | AAGGCCCGGG          | CGAGCCAGGT | GAAGCCCCGG  | GACAGCCTGC     | 1020 |    |  |
|                                    | GCCGCGCGCG | GCCGGGGACG | ACCGGGCCCC          | GGGCTCTGGC | AGCCGGGCGG  | GGGGAGGAGC     | 1080 |    |  |
|                                    | GCGTCGGGGG | CGCCAAGGCG | TCGCGCTGGC          | GCGGGCGGCA | GAACCGCGAG  | AAGCGGTTCA     | 1140 |    |  |
|                                    | CGTTCTGTCT | GGCCGTGGTC | ATCGGAGTGT          | TCGTGGTGTG | CTGGTTCCCC  | TTCTTTTCTA     | 1200 |    |  |
|                                    | CGTACACTCT | CACGCGGGTG | GGCTGCTCGC          | TGCCGCGCAC | GCTATTCAAG  | TTCTTCTTCT     | 1260 |    |  |
|                                    | GGTTCGGCTA | CTGCAACAGC | TCGCTGAACC          | CGGTCATCTA | CACCATCTTC  | AACCACGACT     | 1320 |    |  |
|                                    | TCCGCCGCGC | CTTCAAGAAG | ATCCTCTGTC          | GGGGGGACAG | GAAGCGGATC  | GT <b>GTGA</b> | 1376 | 3' |  |

**Abb. 6. 1.:** Basensequenz des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptorgens von *Tupaia belangeri*. Die kursiv gesetzten Basen markieren einen Teil des 5'-nichtcodierenden Bereiches des Rezeptorgens, die fettgedruckten Triplets jeweils das Start- und Stopcodon der gencodierenden DNA-Sequenz. Abkürzungen der Basen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

### $\alpha_{2B}$ -AR

```

5' ATGGTCCACC AGGAGCCCTA CTCCGTGCAG GCCACCGCGG CCATCGCGGC GGTCACTACT 60
TTCTTCATCC TCTTCACCAT CTTGGGCAAC GCGCTGGTCA TCCTGGCTGT CGTGACCAGC 120
CGTCCCTCC GCGCCCCGCA AAACCTTTTC CTGGTGTGCG TGGCGGCCGC CGACATCCTG 180
GTGGCTACAC TCATCATCCC TTTCTCTCTG GCCAACGAGC TGCTGGGCTA CTGGTACTTC 240
CGGCGCACGT GGTGCGAGGT GTACCTGGCG CTCGATGTGC TCTTCTGCAC CTCGTCCATC 300
GTGCACCTGT GCGCCATCAG CCTGGACCGC TACTGGGCCG TGAGCCGCGC GCTCGAGTAC 360
AACTCCAAGC GCACCCCGCG CCGCATCAAG TGCATCATCC TCACCGTGTG GCTCATCGCA 420
GCCGTCATCT CGCTGCCGCC CCTCATCTAC AAGGGCGACC AGGGCCCCCA GCCCGAGGG 480
CGCCCCCAGT GCAAGCTCAA CCAAGAGGCC TGGTACATCT TGGCCTCCAG CATCGGCTCT 540
TTCTTTGCTC CCTGCCTCAT CATGATACTT GTCTACCTGC GCATCTATCT GATCGCCAAA 600
CGCAGCAACC GCAGAGGTCC CAGGGTCAAG CGGGGTCCTT GGCAGGGTGG GTCCAAGCAG 660
CCCCGCCCTG TCCCTGGCCG GGCTTCAGCC TCAGCCAAGC TACCAACCCT GGCTCTTCT 720
CTGGCTACGG CGGGAGAGGC CAATGGGCAC TCCAAGCCTC CTGGGAACAG GGAGGACGGG 780
GAGACCCCTG AAGATCCTGG GACACGGGTC TTGCCACCCA GCTGGGCTGC TCTTGCCAGC 840
TCAGGCCAGG GCCAGAAGGA GGGTGTTCGT GAGGCTTCTG CAGAAGAGGA GGAGGAAGAG 900
GAGGAAGAGG AGGAGGAAGA GGAGGAAGGG TGTGAACCTC CGGAAGTGCC TGTGTCTCCT 960
GCCTCGGTTT GCAGCCCACC CCTGCAGCAA CCACAAGGCT CCCGCGTGCT GGCCACCCTT 1020
GTGTGGCCAG TGTCTTGAG CAGGGGCGTG GTGCTGCGA GTGGGCAAGT GTGGCGCCG 1080
CGGGCGCACC TGACCCGGGA GAAGCGCTTC ACCTTCGTGC TGGCTGTGGT CATTGGTGTG 1140
TTTGTACTCT GCTGGTTCCC CTTCTTCTTC AGTACAGCC TGGGCGCCAT CTGCCCAGC 1200
CACTGCAAGG TGCCCCACGG CCTCTTCCAG TTCTTCTTCT GGATTGGCTA CTGCAACAGC 1260
TCACTGAACC CTGTCATCTA ACCATCTTC AACCAGGACT TCCGCGGTGC CTTCCGAAGG 1320
ATCCTTTGCC GCCCGTGGAC CCAGACTGCC TGGTGA 3' 1356

```

**Abb. 6. 2.:** Basensequenz des  $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptorgens von *Tupaia belangeri*. Die fettgedruckten Triplets markieren jeweils das Start- und das Stopcodon der gencodierenden DNA-Sequenz.

### $\alpha_{2C}$ -AR

```

5' GGCAGCCGTG GTGGGTTTCC TCATCGTCTT CACCGTGGTG GGCAACGTGC TGGTGGTGAT 60
CGCTGTGCTG ACCAGCCGGG CGCTGCGCGC GCCGCAAAAT CTCTTCCTAG TGTCTCTGGC 120
CTCGCTGAA ATCCTGGTGG CCACGCTGGT CATGCCCTTC TCGCTGGCCA ACAGGCTCAT 180
GGCCTACTGG TACTTCGGGC AGGTGTGGTG CCGCGTGTAC CTGGCGCTCG ATGTGCTCTT 240
CTGCACCTCG TCCATCGTGC ACCTGTGCGC CATCAGCCTG GACCGCTACT GGTCCGTGAC 300
GCAAGCCGTC GAGTACAATC TGAACGCGC GCCGCGCCGC GTCAAGGCCA CCATTGTGGC 360
TGTGTGGCTC ATCTCGGCGG TCATCTCCTT TCCGCGGTTG GTCTCGCTCT ACCGCCAGCC 420
CGACGGCGCT GTCTACCCGC AGTGCGGCCT CAACGACGAG ACCTGGTACA TCCTGTCTCT 480
CTGCATCGGC TCCTTCTTCG CGCCTGCCT CATCATGGGC CTGGTCTATG CGGCATCTA 540
CCGTGTGGCC AAGCTGCGCA CGCGCAGCT CAGCGAGAAG CGCGCCCCG TCGGCCCGA 600
CGGCGGTCC CCGACACGG AGAACGGGCT GGGCGCGGCG GCAGGCGAAA ACGGGCACTG 660
CGCGCCCCCG CGCACTGATG TGGAGCCGGA CGAGAGCAGC GCTGCTGCAG AAAGGCGGCG 720
GCGCAGGGGA GCCCTGCGGA GGGCGGACG GCGGCGAGCG GGTGCCGAGG GGAGCTCGGG 780
CGCTGCGGAC GGGCCGGGGC CCGAGTTGGC GGCTGAGTCG GGGGCCGGA CCGCTCCAG 840
GTCCCCGGGG CCCGTTGGCC GCCTGTGCGC CGCCAGCTCG CGCTCCGTCT AGTTCTTCTT 900
GTCGCGTGGG CGCCGGGCTC GCAGCAGCGT GTGCCGCGC AAGGTGGCCC AGGCGCGAGA 960
GAAGCGCTTC ACCTTTGTGT TGGCGGTGGT CATGGGCGTG TTCGTGCTCT GCTGGTTCCC 1020
GTTCTTCTTC AGTACAGCC TGTATGGCAT CTGCCGCGAG GCCTGCCAGG TGCTGGCCCC 1080
ACTTTCAAG TTCTTCTTCT GGATCGGATA CTGCAACAGT TCGTCAACC CGTCACTA 1140
CACCGTCTTC AATCAGGACT TCCGCGGCTC CTTCAAGCAC ATCCTCTTCC GACGGAGGAG 1200
AAGGGGCTTC AGGCAGTGA 3' 1219

```

**Abb. 6. 3.:** Partielle Basensequenz des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgens von *Tupaia belangeri*. Gemäß der homologen Rezeptorsequenzen des Menschen, der Ratte, der Maus und des Meerschweinchens befindet sich das Startcodon 162 Nucleotide upstream des 5'-Terminus. Das fettgedruckte Triplett markiert das Stopcodon der gencodierenden DNA-Sequenz.

### 3. 1. 4. Aminosäuresequenz-Vergleiche der $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren

Aus den DNA-Sequenzen des  $\alpha_{2A}$ -AR, des  $\alpha_{2B}$ -AR und des  $\alpha_{2C}$ -AR wurden mithilfe des Computerprogrammes *SeqApp* (Version 1.9) die offenen Leseraster für die Proteintranslation konstruiert. Unter Verwendung des Programmes *Clustal W* (HIGGINS und SHARP, 1989) wurden die hergeleiteten Aminosäuresequenzen den in der *GenBank*-Datenbank veröffentlichten Sequenzen anderer Spezies gegenübergestellt. Es wurden die Aminosäuresequenzen des Menschen (Homo) ( $\alpha_{2A}$ -AR: KOBILKA *et al.*, 1987, korrigierte Sequenz 1994;  $\alpha_{2B}$ -AR: LOMASNEY *et al.*, 1994; ;  $\alpha_{2C}$ -AR: REGAN *et al.*, 1988), der Ratte (Rattus) ( $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2C}$ -AR: LANIER *et al.*, 1991;  $\alpha_{2B}$ -AR: ZENG *et al.*, 1990) und der Maus ( $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2C}$ -AR: LINK *et al.*, 1992,  $\alpha_{2B}$ -AR: CHRUSCINSKI *et al.*, 1992) sowie des  $\alpha_{2A}$ -AR des Wildschweines (GUYER *et al.*, 1990), des  $\alpha_{2B}$ -AR des Rinds (STANHOPE *et al.*, 1997) und des  $\alpha_{2C}$ -AR des Meerschweinchens (SVENSSON *et al.*, 1996) mit den entsprechenden  $\alpha_2$ -adrenergen Aminosäuresequenzen von *Tupaia belangeri* verglichen (Abb. 7. 1. bis 7. 3.).

## Ergebnisse

|                     |            |            |            |            |             |            |     |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| Tupaia- $\alpha$ 2A | MGSLQPDAGN | ASWNGTEAPG | GGARVTPYSL | QVTLTLVCLA | GLLMLLTVFG  | NVLVIIAVFT | 60  |
| Homo                | .....      | .....      | ...A....   | .....      | .....       | .....      |     |
| Mus                 | .....      | S.....     | ..T.A....  | .....      | ....F....   | .....      |     |
| Rattus              | .....      | S.....     | ..T.A....  | .....      | ....F....   | .....      |     |
| Sus                 | .....E...  | .....      | ...A....   | .....      | ....F....   | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | SRALKAPQNL | FLVSLASADI | LVATLVIPFS | LANEVMGYWY | FGKAWCEIYL  | ALDVLFCST  | 120 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | .....      | ...T....    | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....      | .....      | ...V....    | .....      |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....      | .....      | ...V....    | .....      |     |
| Sus                 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | IVHLCAISLD | RYWSITQAIE | YNLKRTPRRI | KAIIFTVWVI | SAVISFPPLI  | SIEKKGSLGG | 180 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | ...I.C...  | .....       | ....GG..   |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....      | ...V....   | .....       | ....AG..   |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....      | ...V....   | .....       | ....AG..   |     |
| Sus                 | .....      | .....      | .....      | ...V....   | .....       | ....AGG..  |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | PQPAEPRCEI | NDQKWYVISS | CIGSFFAPCL | IMILVYVRIY | QIAKRRTTRVP | PSRRGPDATA | 240 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | ....V....  |     |
| Mus                 | Q.....S.K. | .....      | S.....     | .....      | .....       | ....CS     |     |
| Rattus              | Q.....S.K. | .....      | S.....     | .....      | .....       | ....CS     |     |
| Sus                 | Q.....     | .....      | .....      | .....      | .....       | ....A....  |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | APPGGAERRP | NGLGPERGAG | PAGAEAEPLP | TQLNGAPGDP | APAGLRDTDA  | LDLEESSSSE | 300 |
| Homo                | .....T.... | .....S.... | .G.....    | .....E.... | ....P....   | .....D     |     |
| Mus                 | .....D.... | .....      | .T.....    | .....      | ....P....   | .....      |     |
| Rattus              | .....D.... | .AV.....   | T.....     | .....      | ..TRP..G..  | .....      |     |
| Sus                 | .L.....    | .....V.... | RV.....    | .V.....E   | ....P..A.G  | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | HAERPPGPRR | PERGPRAKGK | ARASQVKPGD | SLRRRGPGTT | GPGALAAGPG  | EERVGGAKAS | 360 |
| Homo                | .....      | .....G.... | .....      | ..P.R...A. | .I.TP....   | ....A....  |     |
| Mus                 | .....      | .D.....    | T.....     | ..P....AA  | ....SGS.H.  | ...G....   |     |
| Rattus              | ...PRQ..GK | .....      | TK.....    | ....AA     | ....SGS.Q.  | ...A....   |     |
| Sus                 | .....      | S.....S.   | .....      | ..P....AP  | ....P.T.A.  | ...G.V.... |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | RWRGRQNREK | RFTFVLAVVI | GVFVVCWFPE | FFTYTLTAVG | CSVPRTLFKF  | FFWFGYCNS  | 420 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | .....      | .....       | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....      | .....I...  | .P..SQ..N.  | .....      |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....      | .....I...  | .P..YQ..N.  | .....      |     |
| Sus                 | .....      | .....      | .....      | .....      | ...P....    | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2A | LNPVIYTIFN | HDFRRAFKKI | LCRGDRKRIV |            |             |            | 450 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      |            |             |            |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....      |            |             |            |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....      |            |             |            |     |
| Sus                 | .....      | .....      | .....      |            |             |            |     |

**Abb. 7. 1.:** Aus der DNA-Sequenz hergeleitete Aminosäuresequenz des  $\alpha$ <sub>2A</sub>-AR von *Tupaia belangeri* und Vergleiche mit den entsprechenden Rezeptorproteinsequenzen des Menschen (Homo), der Maus (Mus), der Ratte (Rattus) und des Schweins (Sus). Der international angewandte Ein-Buchstaben-Code für die Aminosäuren hat den folgenden Schlüssel: A = Alanin, C = Cystein, D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin, G = Glycin, H = Histidin, I = Isoleucin, K = Lysin, L = Leucin, M = Methionin, N = Asparagin, P = Prolin, Q = Glutamin, R = Arginin, S = Serin, T = Threonin, V = Valin, W = Tryptophan, Y = Tyrosin. Die Punkte markieren übereinstimmende Aminosäurereste.

|                     |            |            |            |            |            |            |     |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| Tupaia- $\alpha$ 2B | MVHQEPYSVQ | ATAAIAAVIT | FLILFTIFGN | ALVILAVLTS | RSLRAPQNLF | LVSLAAADIL | 60  |
| Homo                | .D..D....  | .....A..   | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....SA..  | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Rattus              | .D.....    | .....SA..  | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Bos                 | -----      | ---        | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | VATLIIPFSL | ANELLGYWYF | RRTWCEVYLA | LDVLFCTSSI | VHLCAISLDR | YWAWSRALEY | 120 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | W.A.....   | .....      | .....      | .....      |     |
| Rattus              | .....      | .....      | W.A.....   | .....      | .....      | .....      |     |
| Bos                 | .....      | .....      | W.....     | .....      | .....      | ---        |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | NSKRTPRRIK | CIILTVWLIA | AVISLPPLIY | KGDQGPQPRG | RPQCKLNQEA | WYILASSIGS | 180 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....      | ...R.E.H.  | L...E....  | .....      |     |
| Rattus              | .....C...  | .....      | .....      | ...R.DA..  | L...E....  | .....      |     |
| Bos                 | .....      | F...I....  | .....      | .....LA    | .....      | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | FFAPCLIMIL | VYLRIYLIAK | RSNRRGPRVK | RGPWQGGSKQ | PRPVPGRASA | SAKLPTLASS | 240 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | G..G..E..  | ...DH.G.L. | ....A....  |     |
| Mus                 | .....      | .....V...  | ..HC..LGA. | ..SGE.E..K | ...AA.GVP. | ...V...V.P |     |
| Rattus              | .....      | .....V...  | ..HC..LGA. | ..SGE.E..K | .Q..A.GVPT | ...V...V.P |     |
| Bos                 | .....      | .....      | ..HC....-  | G..GERE... | .H....EV.D | .....Q     |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | LATAGEANGH | SKP-PGNRED | GETPEDPGTR | VLPPSWAALA | SSGQGQKEGV | REASAEIEEE | 300 |
| Homo                | V.S.R.V... | ..S.T.EK.E | .....T...  | A.....P    | N.....     | CG..P.D.A. |     |
| Mus                 | .SSV.....  | P....REK.E | .....EA.   | A...N.S..P | R.V.D..K.T | SG.T..KGA. |     |
| Rattus              | .SSV.....  | P....REK.E | .....EA.   | A...T.S..P | R.....K.T  | SG.T...GD. |     |
| Bos                 | ...P.....C | .Q.R..EKG. | .....A...P | A.....P.IP | K.....     | CGS.P...A. |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | EEEEEEEEEE | GCEPPEVPVS | PASVCSPLQ  | QPQGSRLVAT | LRGQVLLSRG | VGAASGQWWR | 360 |
| Homo                | .....      | E...QA...  | ...A.....  | .....      | .....G..   | ...IG....  |     |
| Mus                 | .D....--V. | E...QTL.A. | ...FN....  | ...T.....  | .....KN    | ..V.....   |     |
| Rattus              | .D....--V. | E...QTL.A. | ...N....   | ...T.....  | .....GKN   | ..V.....   |     |
| Bos                 | .....--    | ...QAL.A.  | -..A.....  | .....      | .....G..   | T.T.GA.... |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | RRAHLTREKR | FTFVLAVVIG | VFVLCWFPPF | FSYSLGAICP | QHCKVPHGLF | QFFFWIGYCN | 420 |
| Homo                | ...V.....  | .....      | .....      | .....      | K.....     | .....      |     |
| Mus                 | ..TQ.S...  | .....      | ..V.....   | .....      | .....      | .....      |     |
| Rattus              | ..TQ.S...  | .....      | ..V.....   | .....      | .....      | .....      |     |
| Bos                 | ..TQ.S...  | .....      | .....      | .....      | .....      | -----      |     |
| Tupaia- $\alpha$ 2B | SSLNPVIYTI | FNQDFRRAFR | RILCRPWTQT | AW         |            |            | 452 |
| Homo                | .....      | .....      | .....      | ..         |            |            |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....Q.... | G.         |            |            |     |
| Rattus              | .....V     | .....      | .....      | G.         |            |            |     |
| Bos                 | -----      | -----      | -----      | --         |            |            |     |

**Abb. 7. 2.:** Hergeleitete Aminosäuresequenz des  $\alpha_{2B}$ -AR von *Tupaia belangeri* und Sequenzvergleiche mit den entsprechenden Rezeptorproteinen des Menschen (Homo), der Maus (Mus), der Ratte (Rattus) und des Rinds (Bos). Code siehe Abb. 7.1. Die Striche zeigen nicht identifizierte Aminosäurereste (Bos, 5' und 3'-Ende) sowie in Abhängigkeit einer optimierten Sequenzübereinstimmung vom Computer als fehlend eingestufte Aminosäurereste an.

|                     |            |            |             |            |             |            |     |
|---------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-----|
| Tupaia- $\alpha_2C$ | AAVVGFLIVF | TVVGNVLVVI | AVLTSRALRA  | PQNLFLVSLA | SAEILVATLV  | MPFSLANELM | 60  |
| Homo                | .....      | .....      | .....       | .....      | ..D.....    | .....      |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....       | .....      | ..D.....    | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....       | .....      | ..D.....    | .....      |     |
| Cavia               | .....      | .....      | .....       | .....      | ..D.....    | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | AYWYFGQVWC | GVYLALDVLV | CTSSIVHLCA  | ISLDRYWSVT | QAVEYNLKRT  | PRRVKATIVA | 120 |
| Homo                | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Rattus              | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Mus                 | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Cavia               | .....      | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | VWLISAVISF | PPLVSLYRQP | DGAVYPQCGL  | NDETWYILSS | CIGSFFAPCL  | IMGLVYARIY | 180 |
| Homo                | .....      | .....      | ..A.....    | .....      | .....       | .....      |     |
| Rattus              | .....      | ..F..R..   | ..A.....    | .....      | .....       | .....      |     |
| Mus                 | .....      | ..F..R..   | ..A.....    | .....      | .....       | .....      |     |
| Cavia               | .....I...  | ..F....    | ..A..R..    | .....      | .....       | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | RVAKLRTRL  | SEKRAPVGP  | GASPTTENGL  | GAAA-----E | NGHCAPPRTD  | VEPDESSAAA | 240 |
| Homo                | ...R.....  | .....      | .....       | ...GE....  | ...PA.....  | .....      |     |
| Rattus              | .....      | ..G.AR..   | .....       | ..K.....   | .....E..... | ..E.....   |     |
| Mus                 | .....      | ..G.A...   | .....       | ..K.....   | .....E..... | ..E.....   |     |
| Cavia               | .....      | ..G.A..E   | ..E.....    | ...AAAAG.. | ...A.....   | ..E.....   |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | ERRRRRGALR | RGRRRRAGAE | GSSGAADG--  | PGPELAASGA | RTASRSPGPG  | GRLSRASSRS | 300 |
| Homo                | .....-G..  | .....      | ..GA.G...QG | A..GA.Q... | L.....      | .....      |     |
| Rattus              | R....-..V. | .....E...  | ..DT.S....  | ..G...E... | .....       | .....      |     |
| Mus                 | R....-.... | .....E...  | ..DT.S....  | ..G...Q... | .....       | .....      |     |
| Cavia               | R....-.... | ..A.QE..V. | APP.LGSA..  | A----.DP.. | LSV.....    | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | VEFFLSRGRR | ARSSVCRRKV | AQAREKRFTF  | VLAVVMGVFV | LCWFPFFFSY  | SLYGICREAC | 360 |
| Homo                | .....R..   | .....      | .....       | .....      | .....I..    | .....      |     |
| Rattus              | .....R..   | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Mus                 | .....R..   | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Cavia               | .....R..   | .....      | .....       | .....      | .....       | .....      |     |
| Tupaia- $\alpha_2C$ | QVPGPLFKFF | FWIGYCNSSL | NPVIYTVFNQ  | DFRRSFKHIL | FRRRRRGFRQ  |            | 410 |
| Homo                | .....      | .....      | .....       | ..P.....   | .....       |            |     |
| Rattus              | ..L.E..... | .....      | .....       | .....      | .....       |            |     |
| Mus                 | ..L.E..... | .....      | .....       | .....      | .....       |            |     |
| Cavia               | ..L.T..... | .....      | ...I...     | .....      | .....       |            |     |

**Abb. 7. 3.:** Hergeleitete partielle Aminosäuresequenz des  $\alpha_{2C}$ -AR von *Tupaia belangeri* und Sequenzvergleiche mit den homologen Rezeptorproteinen des Menschen (Homo), der Maus (Mus), der Ratte (Rattus) und des Meerschweinchens (Cavia). Code siehe Abb. 7.1. und 7.2.

Tabelle 4 faßt die Ergebnisse der Aminosäuresequenzvergleiche in einer Übersicht zusammen und macht deutlich, daß alle drei  $\alpha_2$ -AR von *Tupaia belangeri* höhere Homologien zu den entsprechenden humanen Rezeptorsequenzen aufweisen, als zu denen der Nagetiere. Der  $\alpha_{2C}$ -AR verfügt über die höchste Interspezies-Homologie und der  $\alpha_{2B}$ -AR über die geringste. Der  $\alpha_{2A}$ -AR von *Tupaia belangeri* trägt in der 5. transmembranen Region gemeinsam mit den humanen und porcinen Speziesvarianten den Aminosäurerest Cystein<sup>201</sup>, während die entsprechenden Rezeptoren der Nager an gleicher Position einen Serinrest tragen (Abb. 6. 1.). Mutageneseexperimente haben gezeigt, daß diese Position an der Rezeptor-

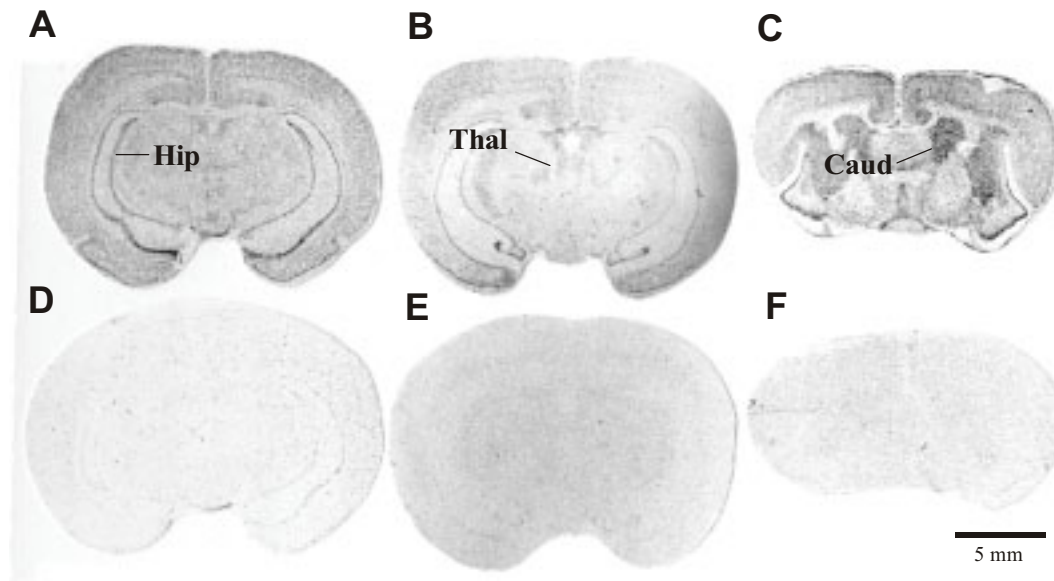
Ligandeninteraktion teilnimmt und maßgeblich über die pharmakologische Bindungsselektivität des Rezeptorsubtyps entscheidet (LINK et al., 1992).

**Tab. 4.:** Übersicht über die relativen AS-Sequenzhomologien der klonierten  $\alpha_2$ -AR zu den Speziesvarianten des Menschen (Homo), der Maus (Mus), der Ratte (Rattus), des Schweins (Sus), des Rinds (Bos) und des Meerschweinchens (Cavia).

| %      | $\alpha_{2A}$ -AR |      |      |        | $\alpha_{2B}$ -AR |      |      |        | $\alpha_{2C}$ -AR |      |      |        |
|--------|-------------------|------|------|--------|-------------------|------|------|--------|-------------------|------|------|--------|
|        | Tupaia            | Homo | Mus  | Rattus | Tupaia            | Homo | Mus  | Rattus | Tupaia            | Homo | Mus  | Rattus |
| Tupaia | -                 | 95.3 | 92.9 | 90.9   | -                 | 91.3 | 83.9 | 83.9   | -                 | 95.8 | 95.3 | 94.8   |
| Homo   | 95.3              | -    | 92.4 | 89.8   | 91.3              | -    | 83.7 | 83.9   | 94.5              | -    | 93.8 | 93.3   |
| Mus    | 92.9              | 92.4 | -    | 96.0   | 83.9              | 83.7 | -    | 96.2   | 95.3              | 93.8 | -    | 99.3   |
| Rattus | 90.9              | 89.8 | 96.0 | -      | 83.9              | 83.9 | 96.2 | -      | 94.5              | 93.3 | 99.3 | -      |
| Sus    | 93.6              | 93.1 | 92.9 | 89.6   | -                 | -    | -    | -      | -                 | -    | -    | -      |
| Bos    | -                 | -    | -    | -      | 87.6              | 87.3 | 82.2 | 82.9   | -                 | -    | -    | -      |
| Cavia  | -                 | -    | -    | -      | -                 | -    | -    | -      | 91.7              | 91.5 | 93.0 | 92.5   |

### 3. 2. Regionale Verteilung der mRNA der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ - adrenerger Rezeptoren im Gehirn von *Tupaia belangeri*

Die Autoradiographiefilme und die emulsionsbeschichteten Objektträger demonstrieren die Expression aller drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene im Gehirn von *Tupaia belangeri*. Die Hybridisierungsspezifität der *antisense* cRNA-Sonden (mRNA-komplementär) wurde durch die subtypspezifischen Verteilungsmuster demonstriert und anhand von *sense*-orientierten cRNA-Sonden, die lediglich eine schwache Hintergrundhybridisierung erzeugten, überprüft (Abb. 8). Die mRNA-Expression der einzelnen Rezeptorsubtypen erwies sich als heterogen bezüglich ihrer Stärke und ihrer regionalen Verteilung.



**Abb. 8:** Autoradiographische Darstellung der Hybridisierungsspezifität der [ $^{35}$ S]-markierten *antisense*-Ribosonden durch Markierung angrenzender Schnitte mit *sense*-orientierten Sonden. A-C = *antisense*; D-F = *sense*; A/D =  $\alpha_{2A}$ , B/E =  $\alpha_{2B}$ ; C/F =  $\alpha_{2C}$ ; A/D, B/E = Frontalschnitte durch das Vorderhirn (Schnittebene A 2.5, Tigges und Shantha, 1969); C/F = Frontalschnitt durch das Vorderhirn (mehr rostral; A 7.0). Abk.: Hip = Hippocampus; Thal = Thalamus; Caud = N. caudatus.

Eine Übersicht über die mRNA-Verteilung der  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptoren im Gehirn von *Tupaia belangeri* ist Tabelle 5 zu entnehmen.

**Tab. 5:** mRNA-Verteilung der  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -AR im Gehirn von *Tupaia belangeri*

| Hirnregion <sup>1</sup>             | mRNA-Expression <sup>2</sup> |               |               |
|-------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
|                                     | $\alpha_{2A}$                | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ |
| <i>Hirnstamm und Pons</i>           |                              |               |               |
| N. tractus solitarius               | ++                           | -             | +             |
| N. hypoglossus                      | +                            | -             | +             |
| N. dorsalis vagi                    | +/++                         | -             | -/+           |
| N. facialis                         | +                            | -             | -/+           |
| N. gigantocellularis reticularis    | +                            | -             | -             |
| N. reticularis lateralis            | ++/+++                       | -             | +             |
| N. tractus spinalis nervi trigemini | +                            | -             | +             |
| N. parabrachialis lateralis         | ++                           | -             | -/+           |
| Locus coeruleus                     | +++                          | -             | +             |
| N. subcoeruleus                     | ++/+++                       | -             | +             |
| N. motorius nervi trigemini         | +                            | -             | +             |
| N. reticularis tegmenti pontis      | +++                          | -             | +             |
| N. reticularis parvocellularis      | +                            | -             | -             |
| Griseum centrale pontis             | +                            | -             | -             |
| Brückenkerne                        | +++                          | -             | +             |
| N. medialis vestibularis            | ++                           | -             | -             |

Tab. 5 (Fortsetzung)

| Hirnregion                              | mRNA-Expression <sup>2</sup> |               |               |
|-----------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
|                                         | $\alpha_{2A}$                | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ |
| <i>Thalamus</i>                         |                              |               |               |
| N. geniculatum mediale                  | -                            | +             | -             |
| N. geniculatus lateralis, pars dorsalis | -/+                          | +             | -             |
| N. geniculatus lateralis pars ventralis | -/+                          | +             | -             |
| N. habenularis lateralis / medialis     | +                            | ++            | +             |
| N. reticularis                          | -                            | -/+           | -/+           |
| N. anterior dorsalis / medialis         | -                            | ++            | +             |
| N. anterior ventralis                   | -                            | ++            | +             |
| N. medialis dorsalis                    | -                            | +             | -             |
| Ventraler Kernkomplex                   | -                            | -/+           | -/+           |
| N. lateralis posterior                  | -                            | +             | -/+           |
| N. lateralis dorsalis                   | -                            | -/+           | -             |
| N. centralis lateralis                  | -                            | +             | -             |
| N. centralis medialis                   | -                            | -/+           | -             |
| N. intermedius                          | +                            | ++            | -/+           |
| N. paraventricularis                    | -/+                          | +             | -/+           |
| N. rhomboideus                          | -/+                          | +             | -/+           |
| Zona incerta                            | +                            | -             | -/+           |
| <i>Hypothalamus</i>                     |                              |               |               |
| Area dorsalis                           | +                            | +             | +             |
| Area medialis                           | +                            | -             | -/+           |
| Area lateralis                          | +                            | -             | -/+           |
| N. periventricularis                    |                              |               |               |
| N. paraventricularis                    | +                            | -             | -/+           |
| Area posterior                          | +                            | -             | -             |
| N. präammillaris                        | +                            | -             | -             |
| N. supramammillaris                     | +                            | -             | -             |
| N. corporis mammillaris                 | +                            | -             | +             |
| N. Subthalamicus                        | +                            | -             | +             |
| <i>Septum</i>                           |                              |               |               |
| N. dorsalis septi                       | -/+                          | ?             | -             |
| N. lateralis septi                      | ++                           | +             | +             |
| N. medialis septi                       | -/+                          | -             | -             |
| N. septohippocampi                      | ++                           | -/+           | -             |
| N. fasciculi diagonalis                 | +                            | ?             | +             |
| <i>Amygdala</i>                         |                              |               |               |
| N. medialis                             | +                            | -             | -/+           |
| N. corticalis                           | +                            | -             | +             |
| N. basalis medialis                     | +                            | +             | +             |
| N. basalis lateralis                    | +                            | -             | -             |
| N. lateralis                            | +                            | -             | +             |
| N. centralis                            | +                            | -             | +             |

Tab. 5 (Fortsetzung)

| Hirnregion                                     | mRNA-Expression <sup>2</sup> |               |               |
|------------------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
|                                                | $\alpha_{2A}$                | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ |
| <i>Olfaktorisches System</i>                   |                              |               |               |
| Bulbus olfactorius                             |                              |               |               |
| Str. granulosum internum                       | ++                           | -/+           | ++            |
| Str. plexiforme externum                       | -                            | -             | -             |
| Str. glomerulosum                              | ++                           | -/+           | ++            |
| N. tractus olfactorii                          | +                            | -             | +             |
| Cortex piriformis                              | ++                           | -/+           | ++            |
| Tuberculum olfactorium                         |                              |               |               |
| Plexiforme Zellschicht                         | -                            | -             | -             |
| Polymorphe Zellschicht                         | +                            | ?             | -             |
| Pyramidale Zellschicht                         | +/+++                        | ?             | +/+++         |
| Agranulärer Cortex                             | +                            | -             | +             |
| Clastrum                                       | +                            | -             | +             |
| <i>Hippocampus</i>                             |                              |               |               |
| Gyrus dentatus                                 |                              |               |               |
| Granuläre Zellschicht                          | ++                           | +             | ++/+++        |
| Polymorphe Zellschicht                         | -/+                          | -             | -             |
| CA1    Pyramidale Zellschicht                  | ++                           | -/+           | ++            |
| CA3    Pyramidale Zellschicht                  | ++                           | -/+           | ++            |
| Subiculum                                      | +                            | -             | +             |
| <i>Großhirnrinde</i>                           |                              |               |               |
| Allocortex                                     |                              |               |               |
| Cingulum                                       | +                            | -             | -/+           |
| Infralimbischer medialer frontaler Cortex (IL) | +                            | -             | +             |
| Insula                                         | +                            | -             | -             |
| Isocortex                                      |                              |               |               |
| Cortex frontalis 1/2                           | +/+++                        | -/+           | ++            |
| Cortex frontalis 3                             | +                            | -/+           | +             |
| Cortex parietalis (Par)                        | +                            | -             | +             |
| Cortex temporalis (Te)                         | -                            | -             | +             |
| Cortex occipitalis (Oc)                        | +                            | -             | +             |
| <i>Basalganglien</i>                           |                              |               |               |
| N. caudatus                                    | -/+                          | -/+           | ++            |
| Putamen                                        | -/+                          | -/+           | ++            |
| Globus pallidus                                | -                            | -             | -             |
| N. accumbens septi                             | -                            | -             | ++            |
| N. striae terminalis                           | +                            | -             | +             |
| <i>Kleinhirn</i>                               |                              |               |               |
| Granuläre Zellschicht                          | ++                           | +             | ++            |
| Molekulare Zellschicht                         | -                            | -             | -             |

**Tab. 5** (S. 48): <sup>1</sup> Hirnregionen identifiziert gemäß *A Stereotaxic Brain Atlas of the Tree Shrew (Tupaia glis)* (Tigges J. und Shantha T. R., 1969) und *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos G. und Watson C., 1986). <sup>2</sup> Stärke des Hybridisierungssignals: - = keine, + = schwache, ++ = mittlere, +++ = starke Hybridisierung; -/+ = sehr schwach, nur wenig über der Hintergrundmarkierung; +/-+ = zwischen + und ++; ++/+++ = zwischen ++ und +++, ? = nicht ermittelt.

### *Hirnstamm und Pons*

In dem Hirnregionen der Medulla oblongata und der Brücke wies die  $\alpha_{2A}$ -Ribosonde die stärksten Hybridisierungssignale auf (Abb. 9 A und D). In den Kerngebieten des lateralen retikulären Tegmentums und des Tractus solitarii konnte jeweils eine mittlere bis starke Genexpression des  $\alpha_{2A}$ -AR demonstriert werden. Diese Regionen wurden ebenfalls von der  $\alpha_{2C}$ -Sonde markiert, in einer jedoch wesentlich geringeren Intensität (Abb. 9 C und F). Die motorischen Neurone des dorsalen Vaguskerne, des Hypoglossuskerns, des Facialiskerns und des Trigemuskerns wurden von der  $\alpha_{2A}$ - und der  $\alpha_{2C}$ -Sonde markiert, wobei sich die  $\alpha_{2C}$ -spezifische Hybridisierung wiederum als schwächer erwies.

Die stärkste Hybridisierung im gesamten Tupaia-Gehirn wies die  $\alpha_{2A}$ -Sonde in der noradrenergen Zellgruppe des LC auf. Diese war gleichzeitig die stärkste gemessene Hybridisierung aller drei Subtypen und wurde als oberer Richtwert für die Genexpressionsvergleiche in Tabelle 2 verwendet. Der N. subcoeruleus, der sich ventral an den LC anschließt, zeigte ebenfalls eine starke Expression des A-Subtypen. Im ventralen Bereich des Pons konnten mit der  $\alpha_{2A}$ -Sonde spezifische Signale in den Brückenkernen und dem N. reticulotegmentalis nachgewiesen werden, die fast das Niveau der LC-Hybridisierung erreichten. In diesen vier Kerngebieten wurden in einer wesentlich schwächeren Ausprägung ebenfalls mRNA des  $\alpha_{2C}$ -AR detektiert. Gebiete, in denen ausschließlich Hybridisierungssignale der für den  $\alpha_{2A}$ -AR codierenden mRNA gefunden werden konnten, waren der N. reticularis gigantocellularis, der N. parvocellularis reticularis, das zentrale Brückengrau und der N. medialis vestibularis. Im gesamten Bereich des Hirnstammes und der Brücke konnte keine Genexpression des  $\alpha_{2B}$ -AR lokalisiert werden (Abb. 9 B und E).

### *Thalamus*

Der im Zwischenhirn gelegene Thalamus ist die einzige Region des Tupaia-Hirns, in welcher die Ribosonde des  $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptorsubtyps die stärksten Signale aller drei Subtypen zeigte. Messenger RNA dieses Rezeptors konnte in einer schwachen bis mittleren Quantität in fast allen thalamischen Nuclei detektiert werden. Lediglich in der ventral gelegenen Zona incerta des rostralen Thalamus konnte kein Signal dieses Subtyps lokalisiert

werden. Die stärkste neuronale Genexpression des  $\alpha_2B$ -AR wurde im Bereich des dritten Ventrikels im N. habenularis und dem N. paraventricularis festgestellt (Abb. 9 B und 10 B). In dieser Region konnten auch die A- und C-adrenergen Rezeptorgene in einer geringen Expressionsstärke lokalisiert werden. Der A-Subtyp ist der am schwächsten exprimierte  $\alpha_2$ -AR im Thalamus und wies außer in der Habenula noch schwache Hybridisierungssignale im ventro- und dorsolateralen N. geniculatum, dem N. paraventricularis, dem N. rhomboideus, der zona incerta und dem intermedialen thalamischen Nucleus auf. Die  $\alpha_{2C}$ -Sonde hybridisierte darüber hinaus im retikulären, dem anterodorsalen / medialen und dem anteroventralen thalamischen Nucleus sowie zu einem sehr geringen Maß im ventralen Kernkomplex und dem N. lateroposterioris.

### *Hypothalamus*

Im ventralen Bereich des Zwischenhirns ist das  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptorgen in einer gleichmäßigen und relativ geringen Expressionsstärke exprimiert und ist am stärksten in der medialen und lateralen hypothalamischen Region vertreten (Abb.10 A und Abb. 11 A). Die mRNA des  $\alpha_{2C}$ -AR konnte ebenfalls in einigen Regionen des Hypothalamus in einer schwachen Expression detektiert werden. Im vorderen dorsalen Nucleus des Hypothalamus konnte eine Coexpression aller drei  $\alpha_2$ -AR lokalisiert werden. Diese Region war gleichzeitig die einzige des Hypothalamus, die eine spezifische Markierung mit der  $\alpha_{2B}$ -adrenergen cRNA-Sonde aufwies. Die posteriore hypothalamische Region wurde ausschließlich von der  $\alpha_{2A}$ -rezeptorspezifischen Ribosonde markiert.

### *Hippocampus*

Die Auswertungen der Hirnschnitte zeigten in der granulären Zellschicht des Gyrus dentatus Markierungen aller drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene (Abb. 10). Der  $\alpha_{2C}$ -AR war der am stärksten exprimierte Subtyp und auch mRNA des  $\alpha_{2A}$ -AR konnte hier in einer mittleren Expressionsstärke gefunden werden. Das mittlere bis starke Expressionsniveau dieser beiden Subtypen lag allerdings auf der hohen Packdichte der Körnerzellen in dieser Schicht begründet, unter dem Mikroskop zeigten die einzelnen Zellen in mit Photoemulsion beschichteten Schnitten eine verhältnismäßig schwache Hybridisierungsintensität. Die Pyramidenzellschicht der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus zeigte eine mittlere Hybridisierungsstärke der  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA. Diese Region wurde zusätzlich in einer nur wenig über der Hintergrundhybridisierung liegenden Stärke von der

$\alpha_{2B}$ -spezifischen Sonde markiert. Im Subiculum konnten lediglich schwache Hybridisierungen des A- und des C-Subtypen detektiert werden.

### *Amygdala*

Messenger RNA des  $\alpha_{2A}$ -AR wurde in einer relativ schwachen Expressionsstärke im gesamten Bereich der Amygdala nachgewiesen. Auch der  $\alpha_{2C}$ -AR ist in dieser Hirnregion weit verbreitet, zeigt jedoch ein noch schwächeres Expressionsniveau als der A-Subtyp. Im basolateralen Nucleus konnten allerdings keine  $\alpha_{2C}$ -positiven Signale nachgewiesen werden. Im basomedialen amygdaloiden Nucleus sowie der Massa intercalata hybridisierten die Ribosonden aller drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren.

### *Septum und Basalganglien*

Der septohippocampale Nucleus und das laterale Septum wurden als Nuclei mit der intensivsten  $\alpha_{2A}$ -spezifischen Markierung des frontalen Zwischenhirns identifiziert (Abb. 12 A). Der an das Septum lateral angrenzende N. caudatus des Striatums wies hingegen lediglich eine nur wenig oberhalb der Hintergrundmarkierung liegende Signalstärke auf. Im Putamen erzeugte die  $\alpha_{2A}$ -Sonde ein ähnlich schwaches Signal wie im N. caudatus. Im Septum und in den Basalganglien konnte für den  $\alpha_{2C}$ -AR ein zur  $\alpha_{2A}$ -adrenozeptor-spezifischen Expression nahezu inverses Hybridisierungsmuster nachgewiesen werden: Während der ventrale Teil des Septums nur schwach von der  $\alpha_{2C}$ -Ribosonde markiert wurde, wurden im gesamten Bereich des N. caudatus und des Putamens Zellen mit einer mittelstarken  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgenexpression lokalisiert (Abb. 12 C). In den meisten Zellen des lateralen Septums, des septohippocampalen Nucleus sowie des N. caudatus und des Putamens konnte auch mit der  $\alpha_{2B}$ -AR-spezifischen Sonde ein schwaches Hybridisierungssignal detektiert werden (Abb. 12 B).

### *Olfaktorisches System*

In den Nuclei des olfaktorischen Systems wurde überwiegend mRNA des  $\alpha_{2A}$ - und des  $\alpha_{2C}$ -Subtypen in einer schwachen bis mittleren Ausprägung detektiert. Am stärksten waren diese Subtypen im primären olfaktorischen Cortex, dem piriformen Cortex, exprimiert. Im Stratum granulosum internum des Riechkolbens (Bulbus olfactorius) konnten Signale des A- und des C- Subtypen in einer mittleren und Signale des B-Subtypen in einer schwachen Stärke lokalisiert werden. Das Stratum glomerulosum wurde in jeweils ähnlicher Intensität

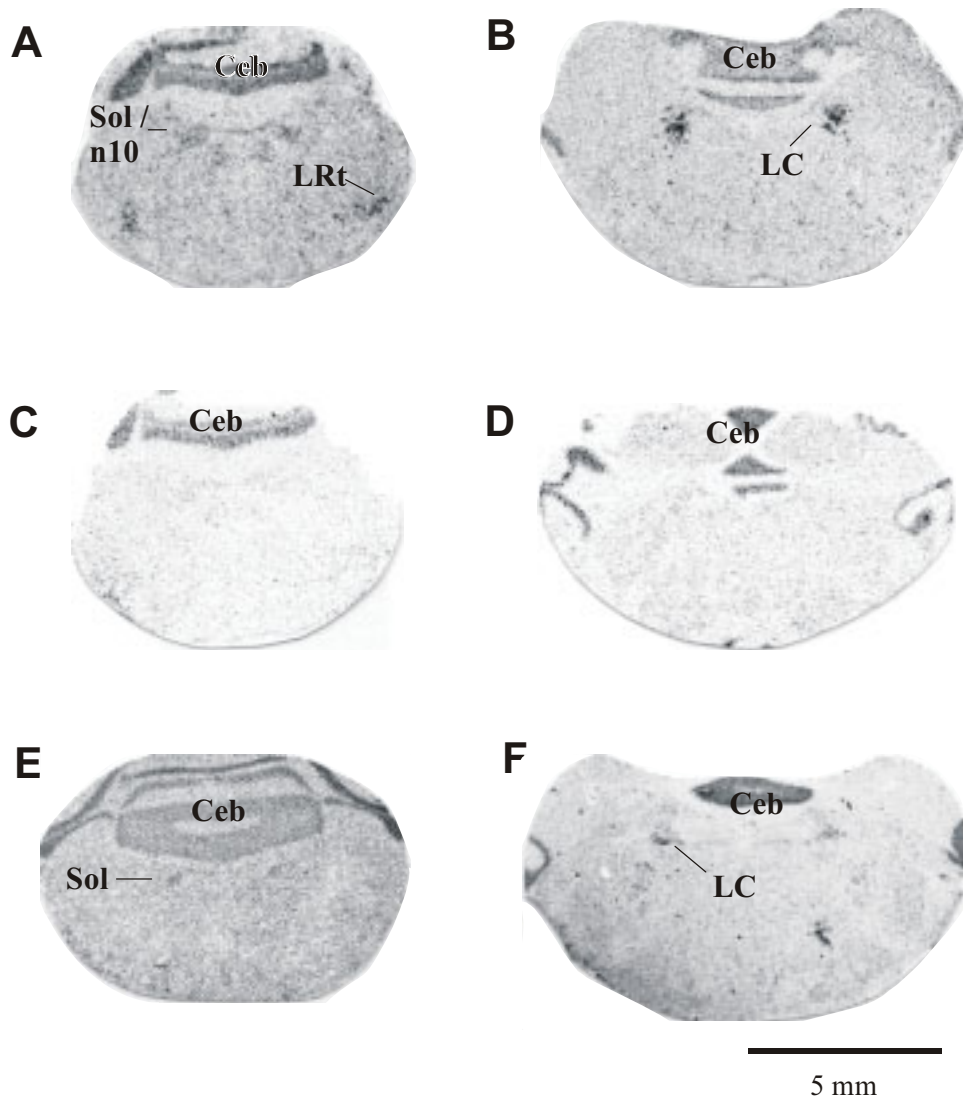
von den *antisense*-Sonden markiert, während die externe plexiforme Zellschicht keine spezifischen Hybridisierungssignale aufwies.

#### *Cortex cerebri*

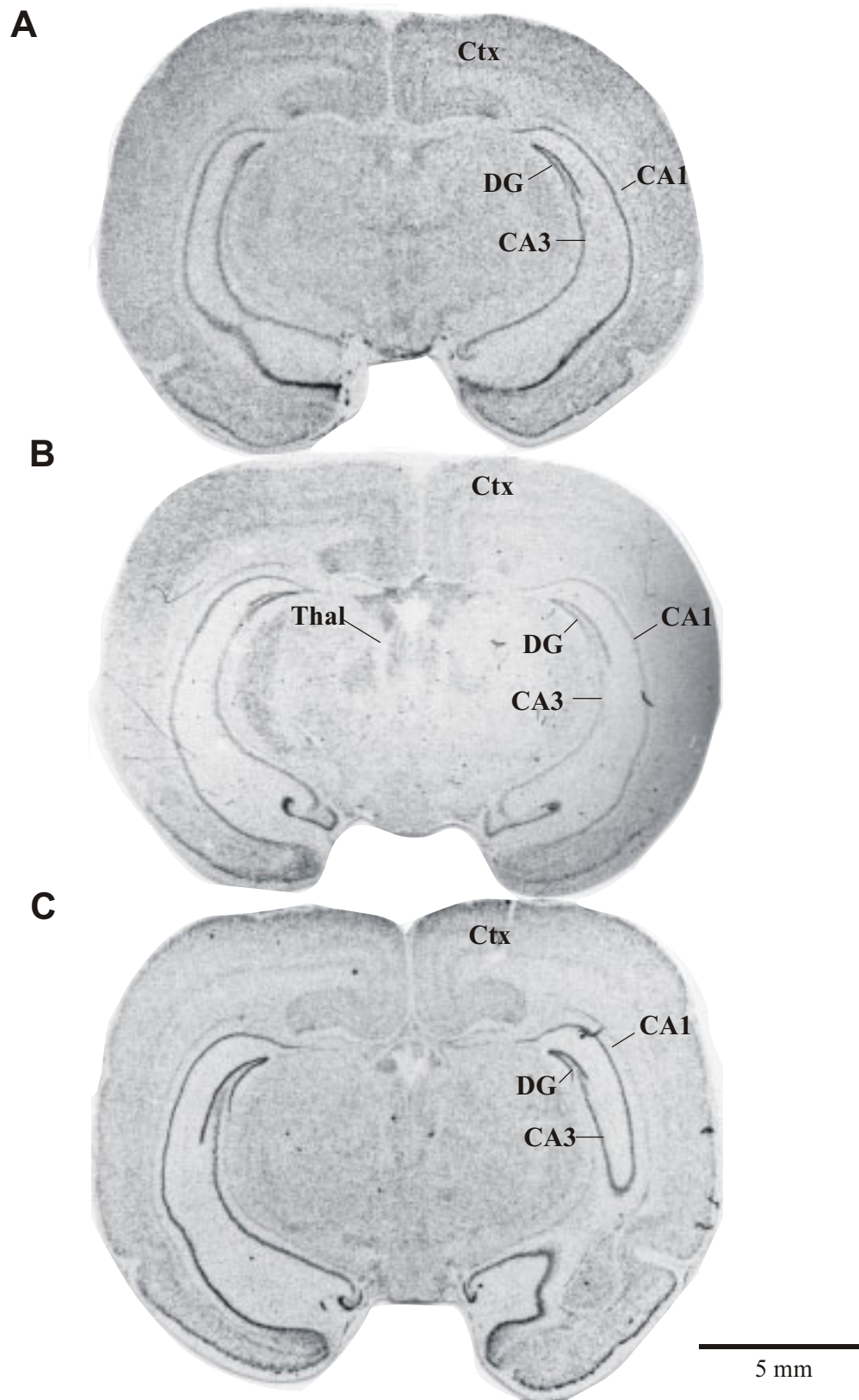
Unter allen corticalen Regionen wurde der frontale Cortex am intensivsten mit der  $\alpha_{2A}$ - und der  $\alpha_{2C}$ -spezifischen cRNA-Sonde hybridisiert und in einer nur wenig über der Hintergrundmarkierung liegenden Intensität von der  $\alpha_{2B}$ -Sonde (Abb. 12). Innerhalb der sechs Schichten des Neocortex wiederum wiesen die zweite und die sechste Zellschicht die stärksten Hybridisierungssignale auf. In der äußersten Zellschicht, der Molekularschicht, konnten keine Hybridisierungssignale detektiert werden. In dieser Zellschicht wurden nur sehr wenige und vereinzelt liegende Neuronen lokalisiert; keine dieser Zellen wurde von den drei *antisense*-Sonden markiert. In den übrigen Regionen des Allocortex und des Isocortex konnten nur relativ schwache Signale des A- und des C-Subtypen beider Subtypen detektiert werden (Abb. 11 und 12).

#### *Cerebellum*

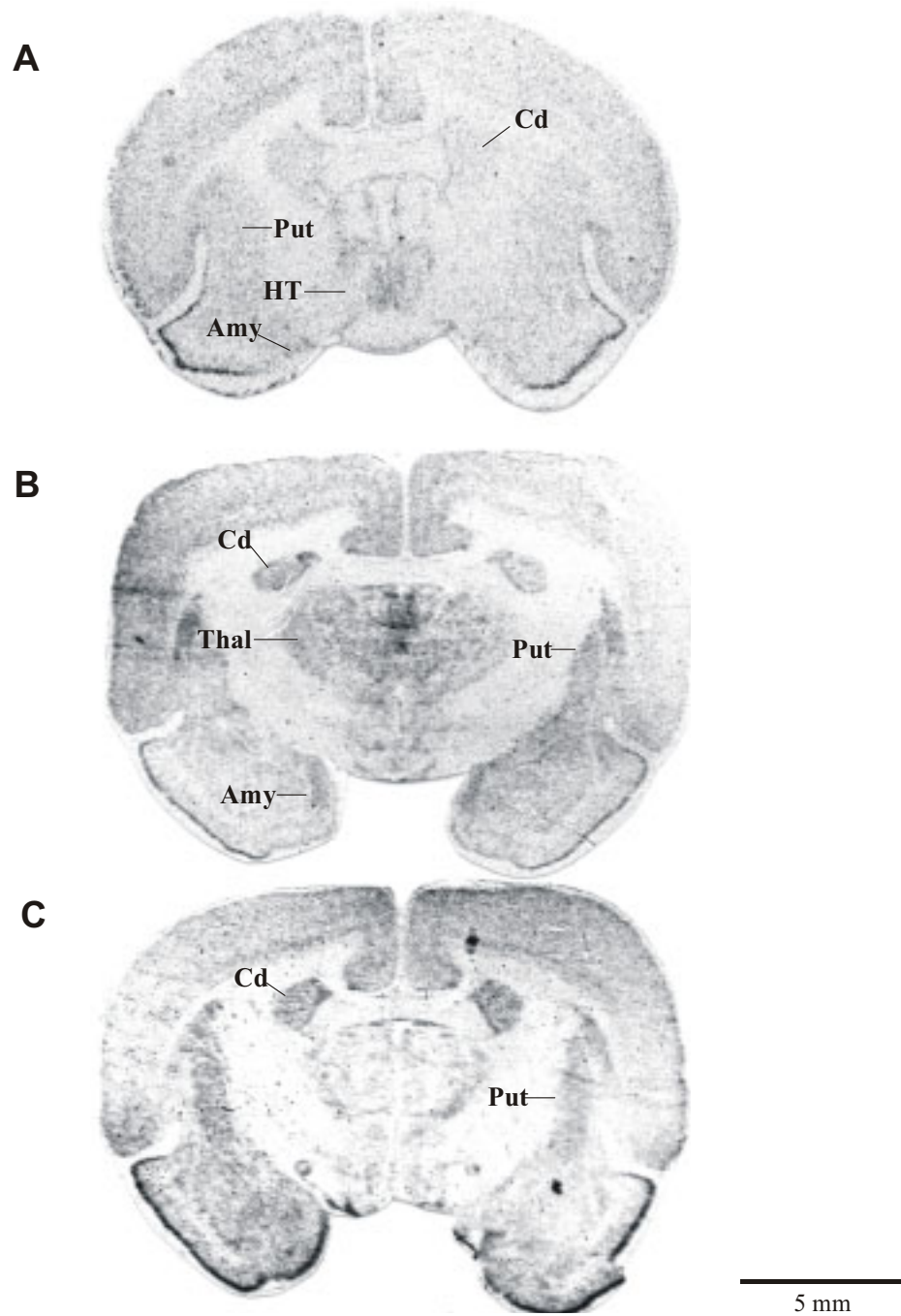
In der Körnerzellschicht des Kleinhirns hybridisierten die Ribosonden aller drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren mit mittlerer Intensität. Die Molekularschicht wies keine spezifischen Hybridisierungssignale auf (Abb. 9).



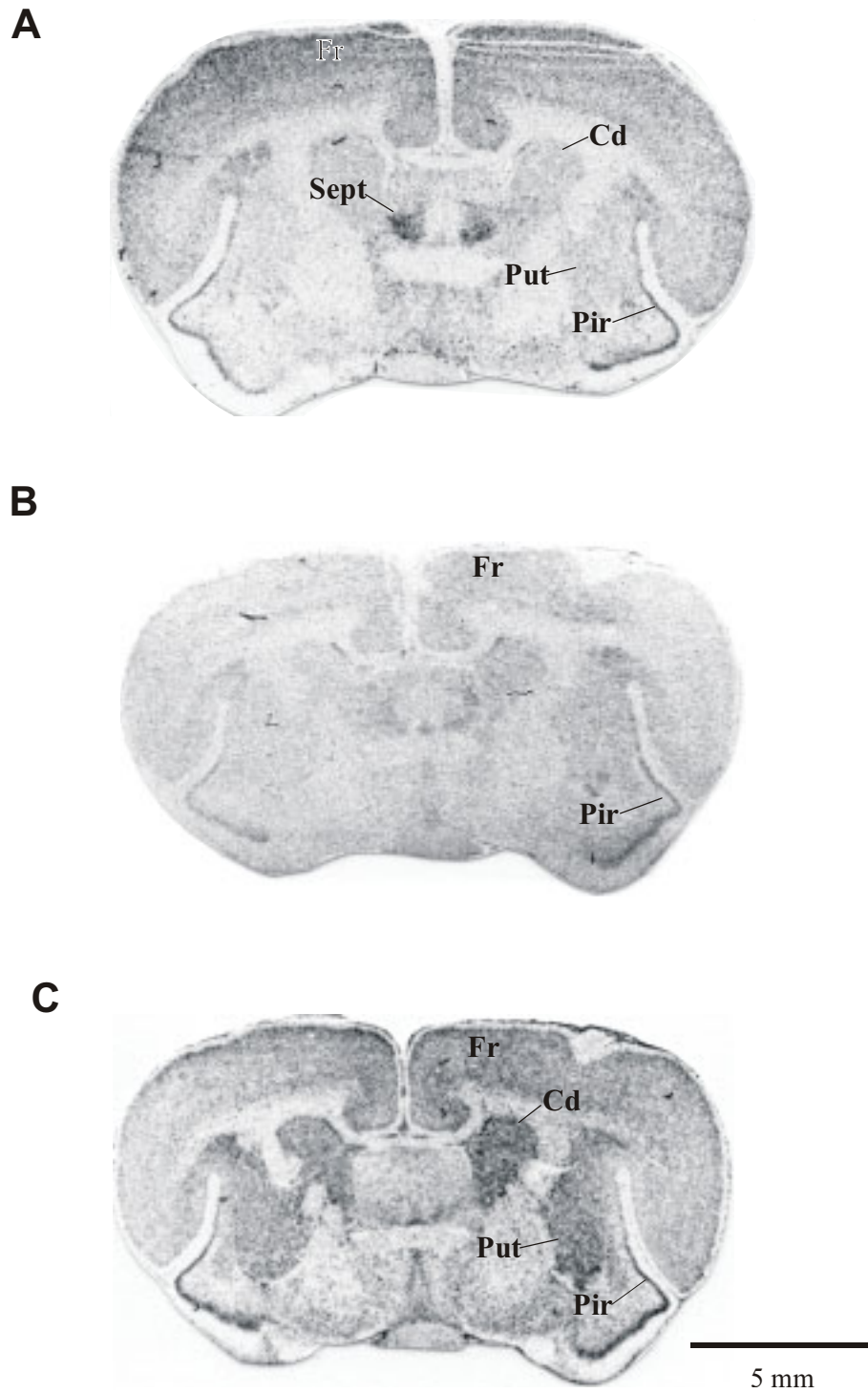
**Abb. 9:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_2$ -AR [ $^{35}\text{S}$ ]-RNA-Sonden in Frontalschnitten des Hirnstammes (A, C, E) und der Brücke (B, D, F); A, B =  $\alpha_{2A}$ ; C, D =  $\alpha_{2B}$ ; E, F =  $\alpha_{2C}$ . Ceb = Cerebellum; LC = Locus coeruleus; LRt = Laterales retikuläres Tegmentum; n10 = dorsaler motorischer Vagus Kern; Sol = N. tractus solitarii.



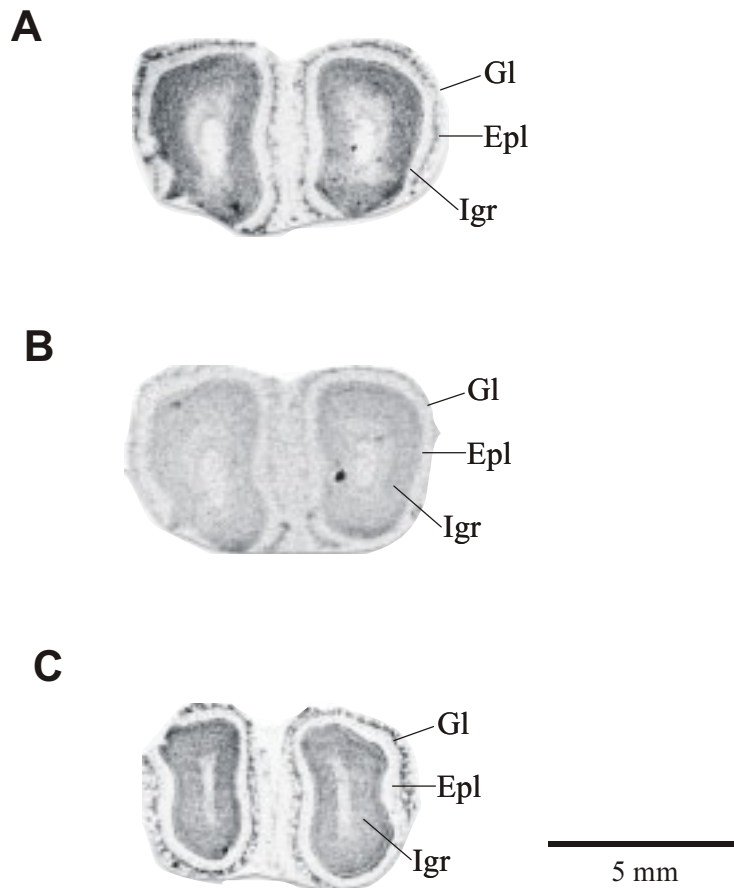
**Abb. 10:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_2$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden in Frontalschnitten des Vorderhirns; A =  $\alpha_{2A}$ ; B =  $\alpha_{2B}$ ; C =  $\alpha_{2C}$ . Ctx = Cortex cerebri, CA1, CA3 Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus, Thal = Thalamus, DG = Gyrus dentatus



**Abb. 11:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_2$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden in Frontalschnitten des Vorderhirns (weiter rostral als Abb. 10); A =  $\alpha_{2A}$ ; B =  $\alpha_{2B}$ ; C =  $\alpha_{2C}$ . Amy = Amygdala; Cd = N. caudatus; HT = Hypothalamus; Put = Putamen; Thal = Thalamus.



**Abb. 12:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_2$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden in Frontalschnitten des Vorderhirns (weiter rostral als Abb. 11); A =  $\alpha_{2A}$ ; B =  $\alpha_{2B}$ ; C =  $\alpha_{2C}$ . Cd = N. caudatus; Fr = Cortex frontalis; Pir = Cortex piriformis; Put = Putamen; Sept = Septum.



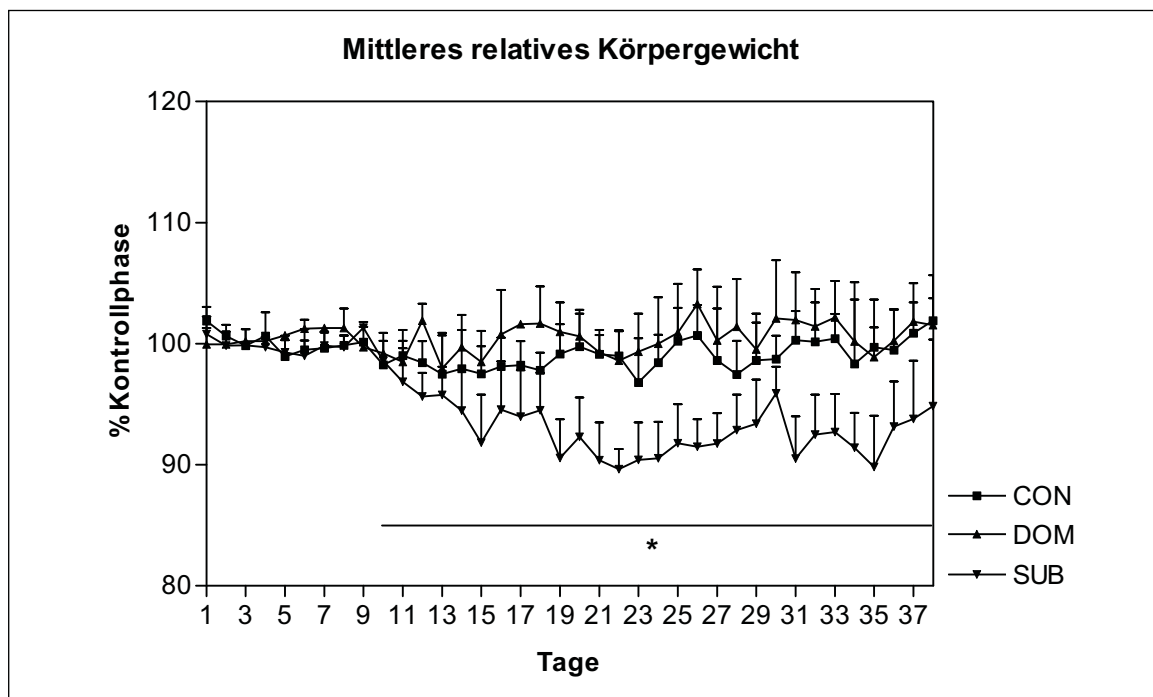
**Abb. 13:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_2$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden in Frontal-schnitten des Bulbus olfactorius. IGr = Stratum granulosum internum; Epl = Stratum plexiforme externum; Gl = Stratum glomerulosum.

### 3. 3. Auswirkung der psychosozialen Belastung auf physiologische Merkmale männlicher *Tupaia belangeri*

Während der Kontrollphase und der Konfrontationsphase wurden die Kontrolltiere und die für die Konfrontation bestimmten Tupaia allmorgendlich gewogen. Aus dem täglich eingesammelten Morgenurin wurde der Cortisolgehalt bestimmt (siehe Kap. 2. 3.).

### 3. 3. 1. Veränderung des Körpergewichts

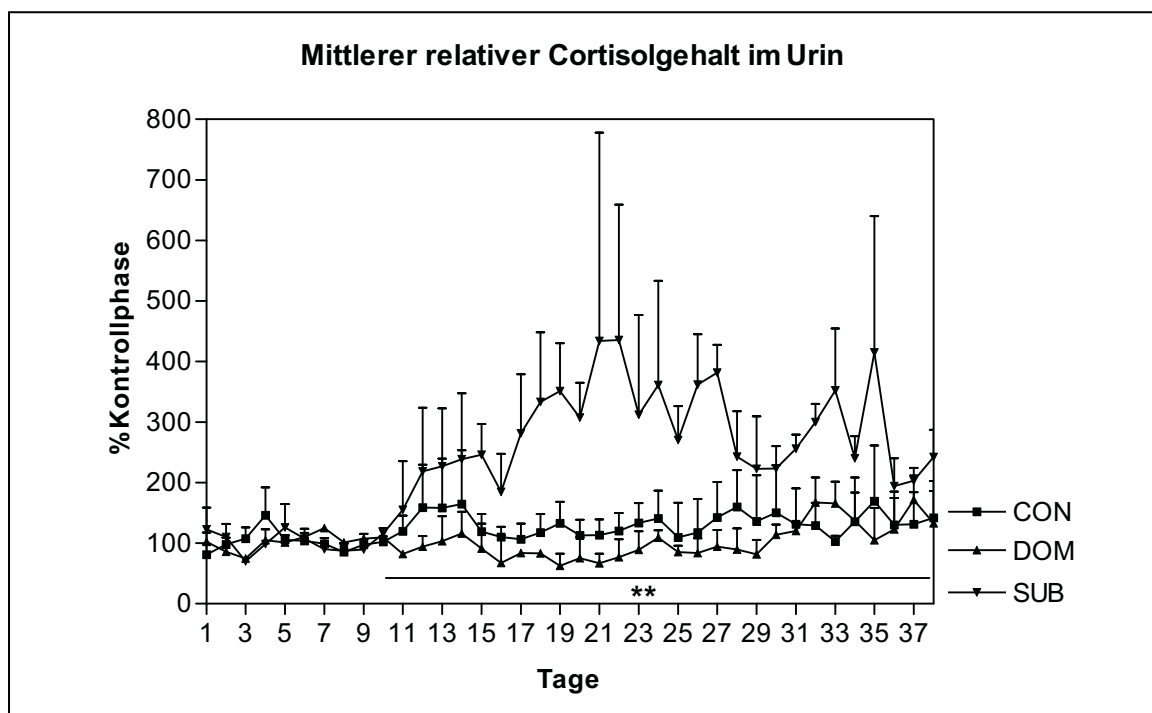
Zu Versuchsbeginn wogen die Tiere zwischen 195 und 280 g ( $235 \pm 30$  g,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n = 12$ ). Die Gruppen unterschieden sich in den Mittelwerten ihrer Gewichte zu Versuchsbeginn nicht signifikant voneinander (ANOVA,  $p \leq 0.5$ ). Zur Ermittlung des Basisgewichts wurde jede Gruppe während der zehntägigen Kontrollphase täglich gewogen. Während die subordinaten Tiere im Laufe der 28tägigen Konfrontationsphase durchschnittlich 7.25 % Gewicht verloren, ergab das Wiegen der Tiere der Kontrollgruppe und der dominanten Tupaia keine wesentlichen Veränderungen der Körpergewichte. Abb.14 veranschaulicht die Gewichts-entwicklung der einzelnen Gruppen während der Kontroll- und der Konfrontationsphase.



**Abb. 13:** Mittlere relative Gewichtsentwicklung ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) während der Kontrollphase (Tag 1 - Tag 10) und der Konfrontationsphase (Tag 11 - Tag 38), bei dominanten (DOM,  $n = 4$ ) und subordinaten (SUB,  $n = 4$ ) Tupaia sowie bei Kontrolltieren (CON,  $n = 4$ ). Signifikante Abweichungen von SUB im Vergleich zu CON während der Konfrontation: \*  $p \leq 0.05$ , Student's t-Test.

### 3.3.2. Veränderung des Cortisolgehaltes im Urin

Als ein Grad für die streßbedingte Belastung der Tupaia wurde aus dem täglich gesammelten Morgenurin das Nebennierenhormon Cortisol mittels Radioimmuno-Assay quantifiziert. Um die gemessenen Cortisolwerte auf eine gemeinsame physiologische Bezugsgröße zu bringen, wurden sie auf der Grundlage der ebenfalls quantifizierten Kreatininwerte korrigiert. Im Laufe einer zehntägigen Kontrollphase wurden die Kontrolltiere und die zur Konfrontation bestimmten Tiere an die tägliche Handhabung gewöhnt. Während dieser Phase wurde der Morgenurin reflektorisch genommen und auf seinen physiologischen Cortisolgehalt hin analysiert. Wie Abb. 15 zeigt, lag der mittlere physiologische Cortisolgehalt in der Kontrollphase (Tag 1 bis Tag 10) bei den Versuchstieren auf dem gleichen Niveau wie bei der nichtgestreßten Tieren. Im Laufe der Konfrontationsphase stieg der mittlere physiologische Cortisolgehalt beim SUB signifikant um bis zu 440% an, während er bei der Gruppe der dominanten Tiere nicht wesentlich von dem Niveau während der Kontrollphase abwich.



**Abb. 15:** Mittlere relative Veränderung des Cortisolgehaltes im Morgenurin ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) während der Kontrollphase (Tag 1 - Tag 10) und der Konfrontationsphase (Tag 11 - Tag 38), bei dominanten (DOM,  $n = 4$ ) und Subordinaten (SUB,  $n = 4$ ) Tupaia sowie bei Kontrolltieren (CON,  $n = 4$ ). Signifikante Abweichungen von SUB im Vergleich zu CON: \*\*  $p \leq 0.01$ , Student's t-Test.

### 3. 4. Zelluläre Verteilung der Rezeptor-mRNA

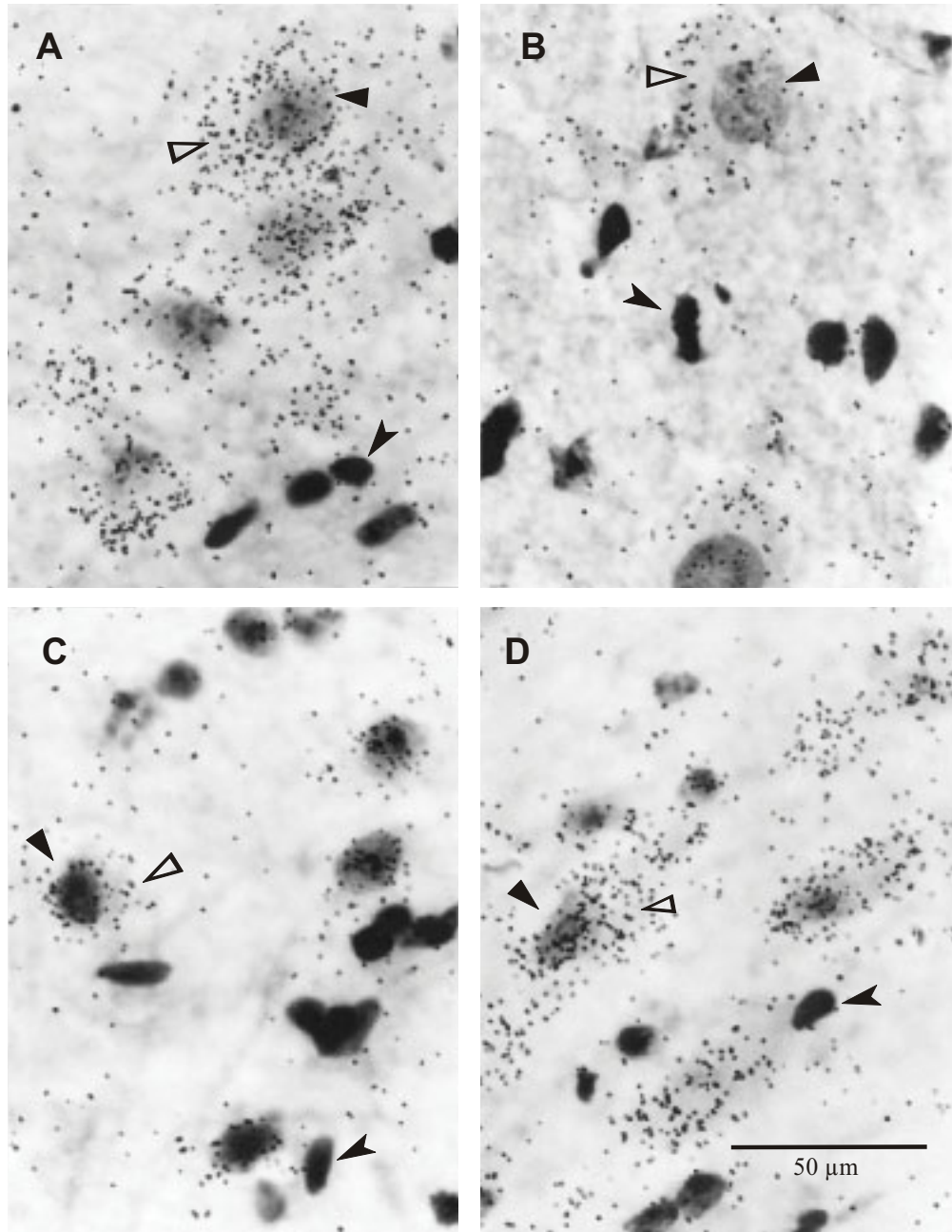
Die Exposition der hybridisierten Hirnschnitte mit einer Photoemulsion ermöglichte eine mikroskopische Analyse der zentralnervösen Genexpression der  $\alpha_2$ -AR auf zellulärer Ebene. Die schwach radioaktiv markierten mRNA-cRNA-Hybride im Gewebe reduzieren Silberbromid in der Photoemulsion zu atomarem Silber, welches in der Hellfeld-Lichtmikroskopie als schwarze Silberkörner erscheint. Die Gegenfärbung der Präparate durch eine Nissl-Kernfärbung mit Toluidinblau ermöglicht es, die Silberkörner einzelnen Zellen und unterschiedlichen Zellkompartimenten zuzuordnen.

In einer ca. 370fachen Vergrößerung der Schnitte wurde deutlich, daß mRNA aller drei  $\alpha_2$ -AR sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus einzelner Neuronen lokalisiert ist. Hinsichtlich der Ausprägung der Expression in den subzellulären Regionen konnten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Rezeptorsubtypen festgestellt werden. Auch ergaben sich keine Korrelationen zwischen einer subzellulären Signalexpression und dem Status der Tiere (SUB oder CON), woraus keine streßabhängige Verteilung der mRNA im Neuron geschlußfolgert werden konnte. Vereinzelt waren Silberkörner auch zwischen den Zellen lokalisiert, doch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei diesen *grains* ausschließlich um Hintergrundhybridisierungen handelte, oder ob sie in einzelnen Neuronen den Transport oder die Speicherung von mRNA-Molekülen in neuronalen Terminalien anzeigen. Als nicht-neuronale Elemente wiesen einzelne Gliazellen spezifische Hybridisierungssignale auf. Gliazellen konnten in allen Hirnregionen aufgrund ihrer gleichmäßigen Verteilung, ihrer Größe und ihrer intensiven Kernfärbung identifiziert werden. Die Signale in der Glia wurden vor allem von der  $\alpha_{2A}$ -Sonde erzeugt. In vereinzelter Gliazellen wurden jedoch auch mRNA-Signale der Subtypen B und C detektiert.

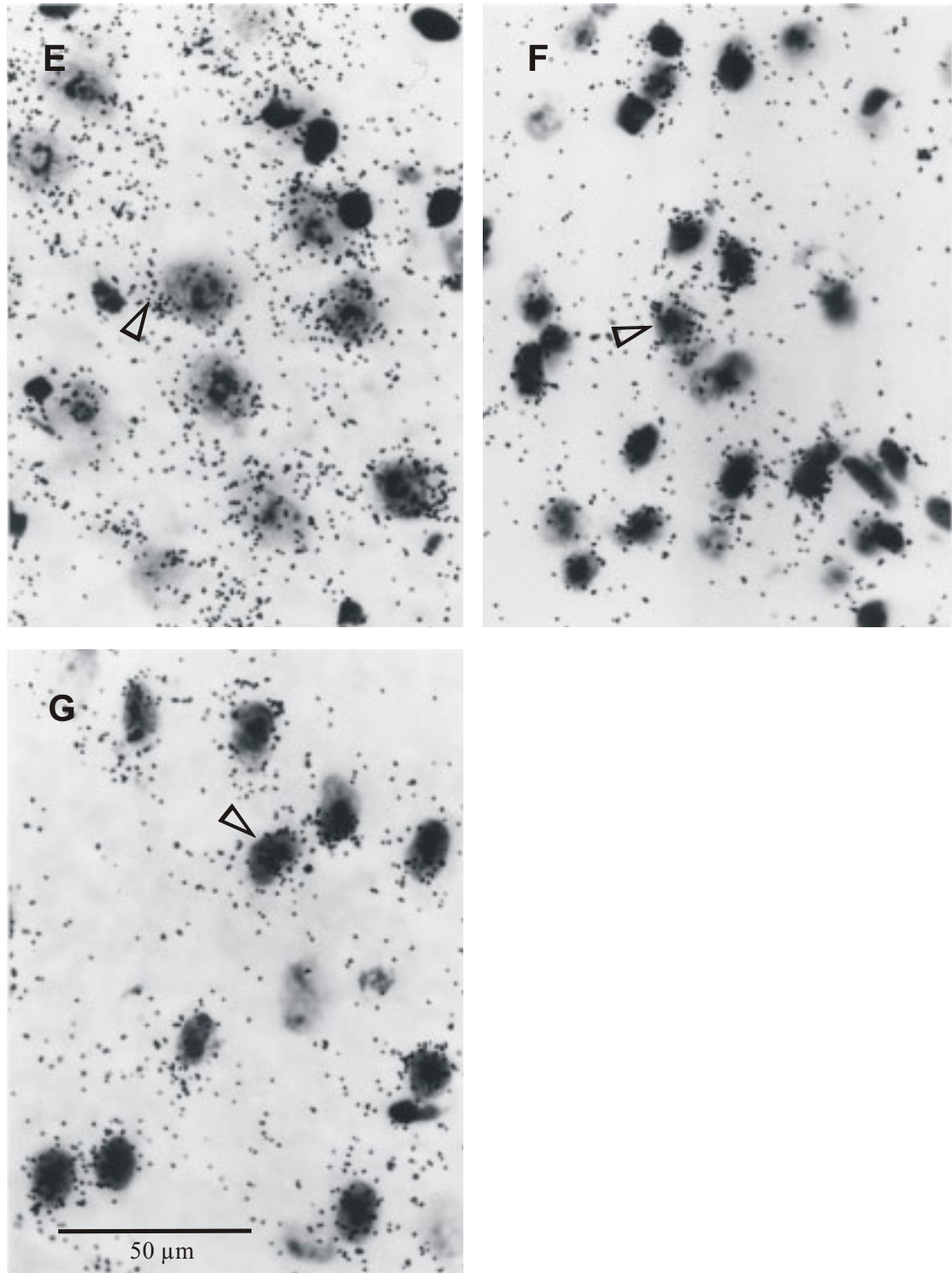
### 3. 5. Quantifizierung der zellulären Genexpression $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren bei chronisch gestreßten Tupaia und bei Kontrolltieren

Zur Klärung der Frage, ob sich chronischer psychosozialer Streß auf die Genexpression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in unterschiedlichen Hirnregionen auswirkt, wurden der mRNA-Gehalt für  $\alpha_2$ -AR auf zellulärer Ebene semiquantitativ ausgewertet. Hierzu wurde bei jeweils vier subordinaten Tupaia und Kontrolltieren die Anzahl der Silberkörner (Grains) je Zelle auf den *in situ*-hybridisierten und photoemulsions-exponierten Hirnschnitten durch computergestütztes Auszählen bestimmt. Es wurden je Tier und Region 50 bis 60 Zellen ausgewertet, die zu gleichen Teilen in der jeweils linken und rechten Hemisphere lokalisiert waren. Um Meßfehler durch sehr dicht akkumulierte Grains auszuschließen, wurde anstelle der Anzahl der Grains/Zelle die von Silberkörnern bedeckte Zelloberfläche ausgewertet. Als Einheit wurde die Anzahl der Bildpunkte (Pixel) angegeben, aus denen sich das digitalisierte Computerbild zusammensetzt. Je nach Expositionszeit ist ein Silberkorn als eine Fläche von 20-30 Pixeln sichtbar (Vergrößerung 360×). Eine Zelle wurde als markiert angesehen und ausgewertet, wenn die von Silberkörnern bedeckte Fläche über der Zelle mindestens um ein fünffaches größer war als eine entsprechende Fläche im umgebenden Gewebe.

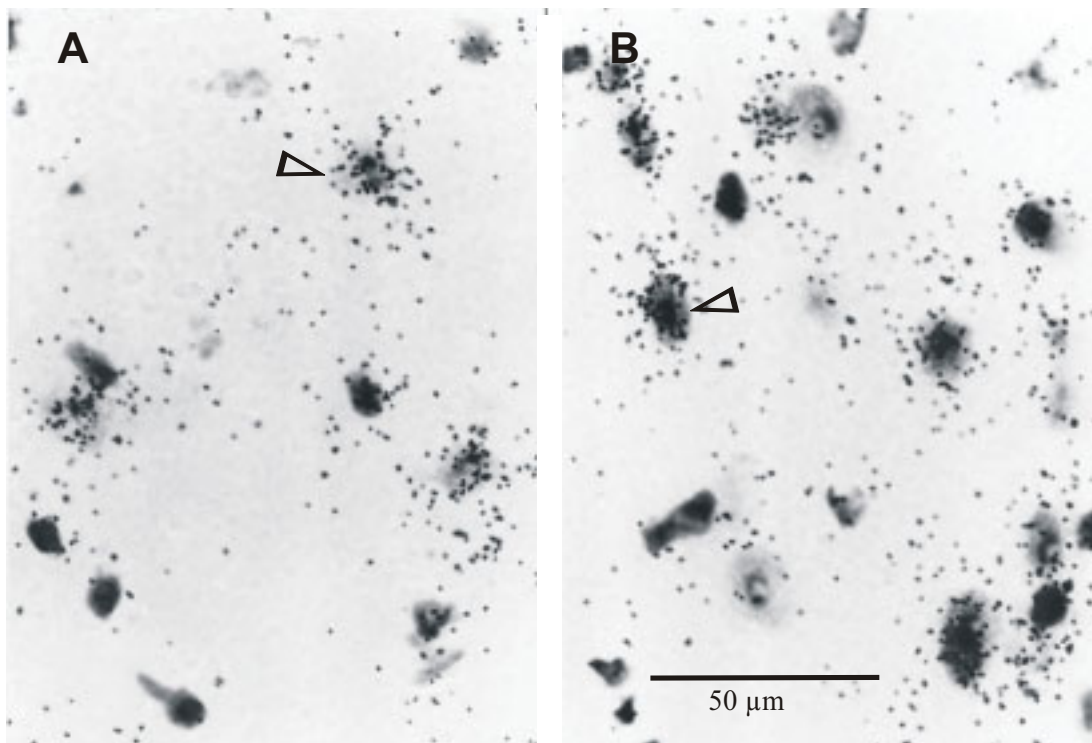
Um zu gewährleisten, daß in den semiquantitativen Vergleichsstudien zwischen subordinaten Tupaia und Kontrolltieren Zellen aus übereinstimmenden Regionen ausgewertet werden, wurden die Schnitte anhand der Nisslfärbung anatomisch verglichen und den Schnittebenen im Tupaia-Hirnatlas (TIGGES und SHANTA, 1969) zugeordnet.



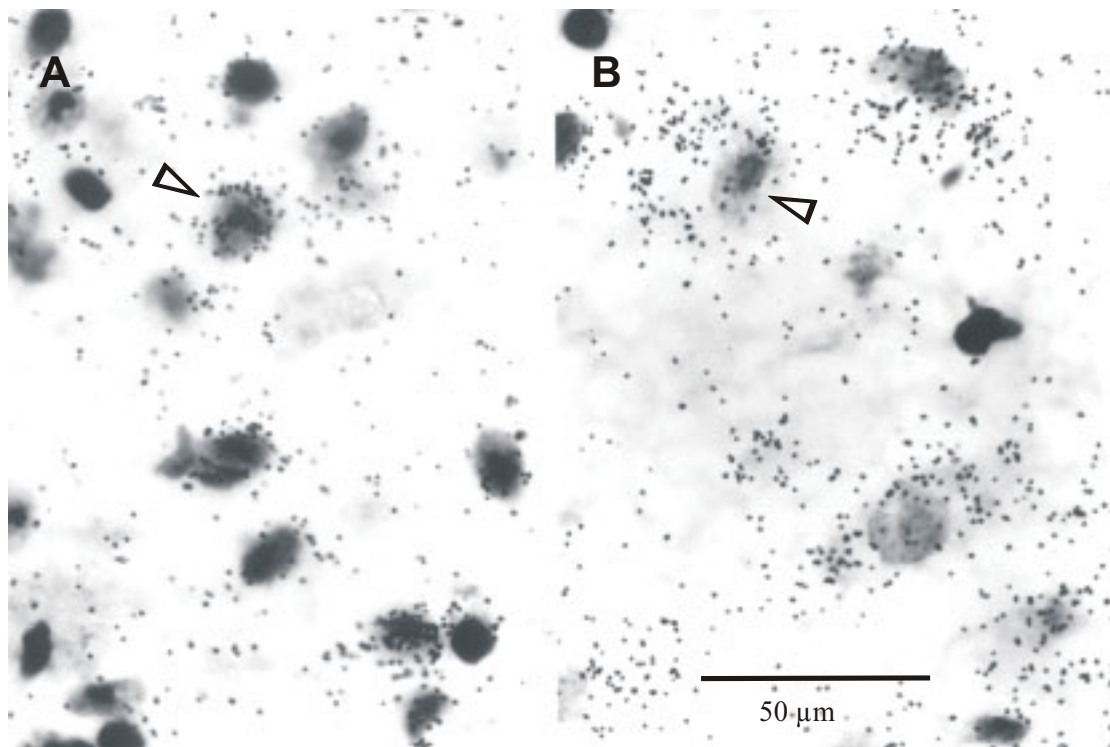
**Abb. 16:** Zelluläre *in situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2A}$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden. Regionen: A = Laterales retikuläres Tegmentum; B = N. dorsalis vagi; C = N. tractus solitarii; D = Locus coeruleus. Die Zellen wurden mit Toluidinblau (Nissl-Kernfärbung) gegengefärbt. Die Zellnuclei und -nucleoli sind deutlich gefärbt. Die Silberkörner erscheinen als schwarze Punkte. Exemplarisch sind für jede Hirnregion Zytoplasma (offene Pfeile) und Zellkerne (geschlossene Pfeile) einzelner, zur Quantifizierung bestimmter Zellen markiert. Dunkel angefärbte Gliazellen sind durch geschlossene Pfeilspitzen markiert.



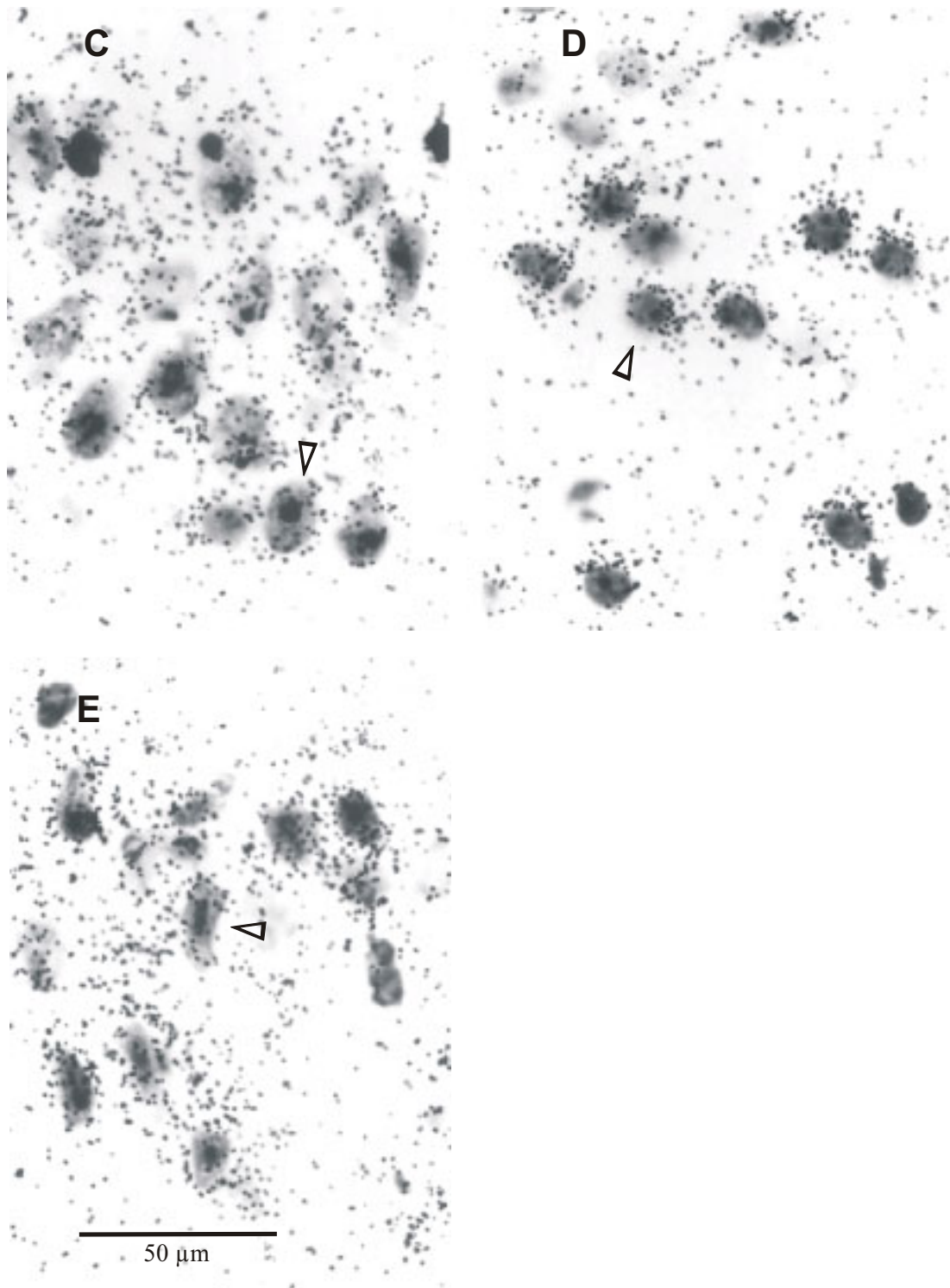
**Abb. 16** (Fortsetzung): Zelluläre *in situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2A}$ -AR [ $^{35}\text{S}$ ]-RNA-Sonden. Regionen: E = Region CA3 des Hippocampus; F = Massa intercalata der Amygdala; G = Cortex frontalis, 2. Zellschicht. Exemplarisch sind für jede Hirnregion einzelne, zur Quantifizierung bestimmte Zellen markiert.



**Abb. 17:** Zelluläre *in situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2B}$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden im Thalamus. Nuclei: A = N. anteroventralis; B = N. paraventricularis. Exemplarisch sind für jede Hirnregion einzelne, zur Quantifizierung bestimmte Zellen mit einem Pfeil markiert.



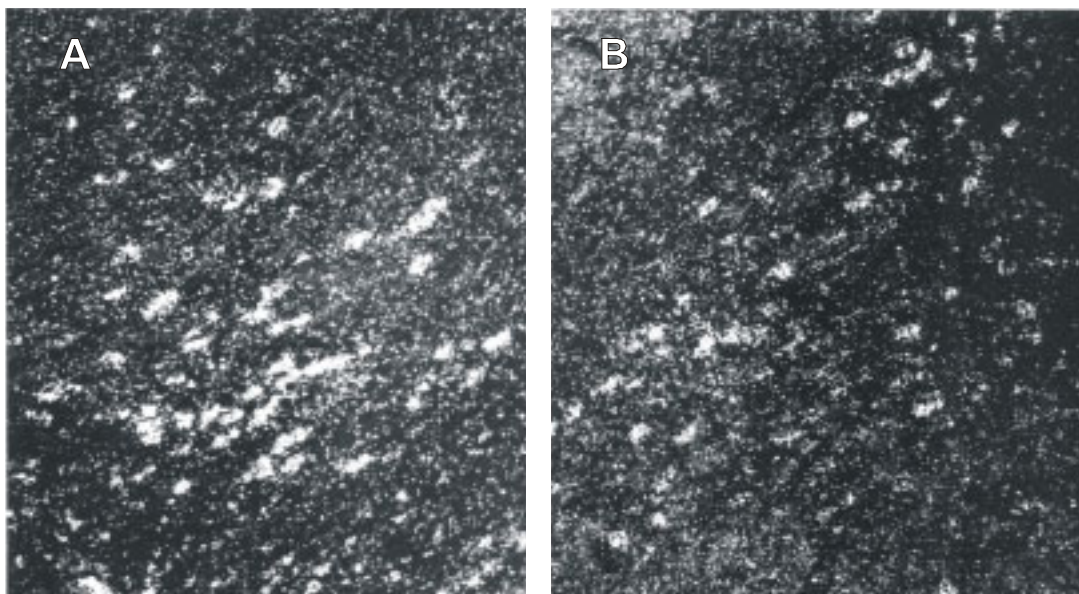
**Abb. 18:** Zelluläre *in situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2C}$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden. Regionen: A = N. tractus solitarii, B = Locus coeruleus. Exemplarisch sind für jede Hirnregion einzelne, zur Quantifizierung bestimmte Zellen mit einem Pfeil markiert.



**Abb. 18** (Fortsetzung): Zelluläre *in situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2C}$ -AR [ $^{35}\text{S}$ ]-RNA-Sonden. Regionen: C = CA3-Region des Hippocampus; D = N. caudatus; E = Cortex frontalis. Exemplarisch sind für jede Hirnregion einzelne, zur Quantifizierung bestimmte Zellen mit einem Pfeil markiert.

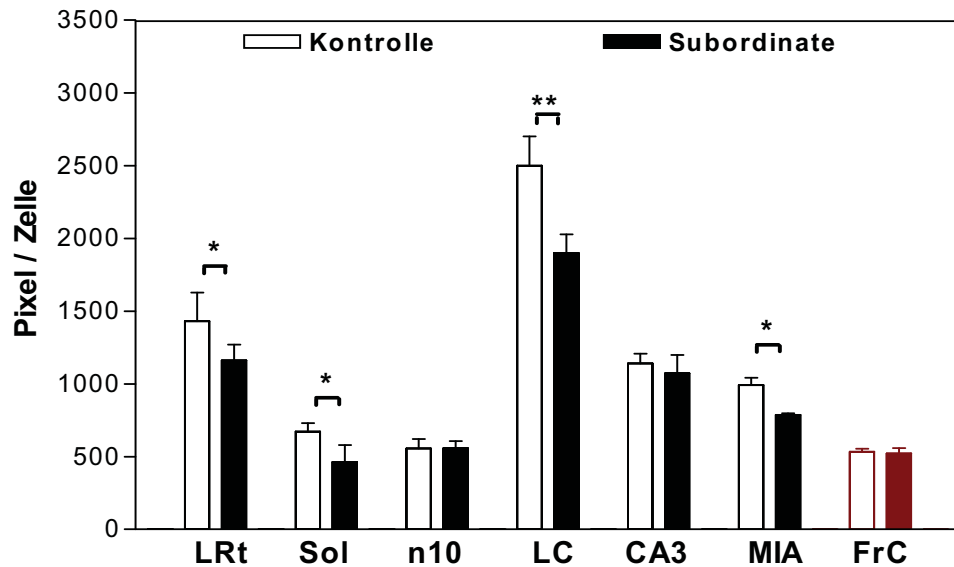
### 3. 5. 1. Quantifizierung der $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptorgen-Expression

Angaben zur Identifizierung und zur Auswahl der quantifizierten Neurone sind dem Kapitel 4.3.1. zu entnehmen. Der Gehalt an mRNA des  $\alpha_{2A}$ -AR wurde in Zellpopulationen des LC, der ventrolateralen Medulla, dem Nucleus Tractus solitarii, dem dorsalen Vaguskerne, der CA3-Region des Hippocampus, der Massa intercalata der Amygdala und der 2. Zellschicht des frontalen Cortex semiquantitativ bestimmt (Abb. 16). Für die zelluläre Quantifizierung der Neuronenpopulationen des N. tractus solitarii, des N. lateralis reticularis und des dorsalen motorischen Vaguskerne wurden Schnitte aus den Ebenen *P 3.5* und *P 4.0* (TIGGES und SHANTHA, 1969) ausgewählt. Im LC wurden Zellen, die sich in der Ebene seiner höchsten neuronalen Dichte befinden (0.5 mm rostral der Ebene *P 2.0*) gemessen. Es zeigte sich, daß in den Neuronen des LC chronisch gestreßter Tupaia signifikant weniger mRNA-Signale lokalisiert waren, als in den entsprechenden Zellen der Kontrollgruppe. Im Mittel wiesen die Zellen des LC in der SUB-Gruppe im Vergleich zur CON-Gruppe eine um 24 % reduzierte mRNA-Expression auf. Die Dunkelfeldaufnahmen in Abbildung 19 zeigen von der  $\alpha_{2A}$ -*antisense*-Sonde hybridisierte LC-Regionen eines nichtgestreßten Kontrolltieres (A) und eines subordinaten Tupaia (B).



**Abb. 19:** *In situ*-Hybridisierungssignale von *antisense*-orientierten  $\alpha_{2A}$ -AR [ $^{35}$ S]-RNA-Sonden im Locus coeruleus. Dunkelfeldaufnahme; Silberkörner erscheinen weiß. A = Kontrolltier; B = Subordinates Tier.

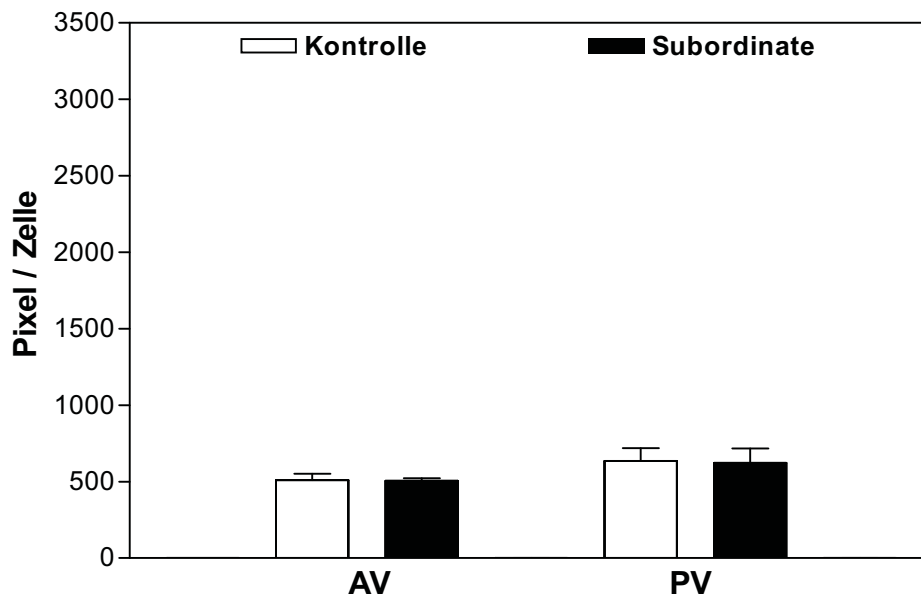
Die ausgewertete Zellpopulation in der ventrolateralen Medulla im Bereich des retikulären lateralen Nucleus zeigte bei subordinaten Tieren ein um 19 % verringertes Hybridisierungsniveau. Die  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptorgen-Expression wurde in einer Zellpopulation im dorsomedialen Bereich des Nucleus tractus solitarii, ventral vom Tractus solitarii gemessen. In dieser Region sind bei Tupaia, analog zur C2-Region der Ratte (HÖKFELT et al., 1984), PNMT-positive, also adrenerge Zellen lokalisiert worden (MITTENDORF et al., 1988). Bei den subordinaten Tieren wies diese Zellgruppe gegenüber jener der Kontrolltiere ein um 30 % geringeres Expressionsniveau der  $\alpha_{2A}$ -mRNA auf. In den quantifizierten Zellregionen des dorsalen Vaguskerne konnte keine signifikante Differenz zwischen den Kontrolltieren und den psychosozial gestreßten Tupaias festgestellt werden. In der CA3-Region des Hippocampus (Ebene *A* 2.5), der Massa Intercalata in der Amygdala-Formation (*A* 5.0 – *A* 5.5) und der zweiten Zellschicht des Cortex frontalis (*A* 7.0) wurden die Zellen aufgrund ihrer großen Anzahl und Packungsdichte zufällig ausgewählt. Ein signifikanter Streßeffekt hinsichtlich der  $\alpha_{2A}$ -AR-Genexpression konnte lediglich für die Neuronenpopulation der Massa intercalata in der Amygdala demonstriert werden. Die SUB-Gruppe hatte hier eine um 20.5 % reduzierte Zahl an Silberkörnern je Zelle. In der CA3-Region des Hippocampus und dem Frontalen Cortex wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Abbildung 20 faßt die Ergebnisse der semiquantitativen ISH mit der  $\alpha_{2A}$ -Ribosonde zusammen.



**Abb. 20:** Anzahl der von der  $\alpha_{2A}$ -AR *antisense* Ribosonde erzeugten Silberkörner pro Zelle ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) in unterschiedlichen Hirnregionen subordinater Tupaia (n = 4) und von Kontrolltieren (n = 4), ausgedrückt als Anzahl digitaler Bildpunkte. Abkürzungen: LRt = laterales retikuläres Tegmentum; Sol = Nucleus Tractus solitarii; n10 = Motoneurone des dorsalen Vaguskerne; LC = Locus coeruleus; CA3 = Region CA3 des Hippocampus; MIA, Massa intercalata der Amygdala; FrC, Frontaler Cortex. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  (Student's t-Test für paarige Stichproben).

### 3. 5. 2. Quantifizierung der $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA

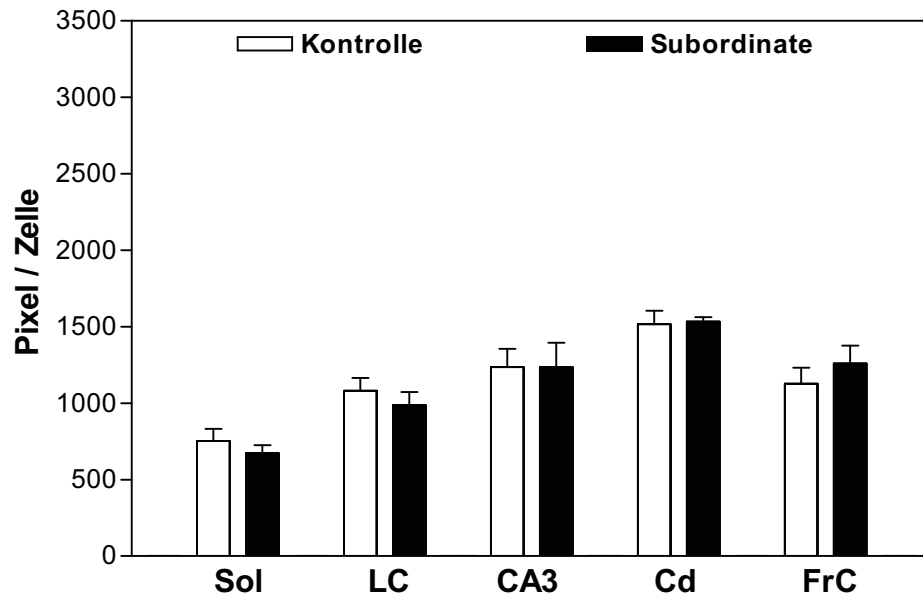
Angaben zur Identifizierung und zur Auswahl der quantifizierten Neurone sind dem Kapitel 4.3.1. zu entnehmen. Die Expressionstärke der für den  $\alpha_{2B}$ -AR codierenden mRNA wurde in Neuronenpopulationen des anteroventralen und des paraventriculären Nucleus des Thalamus gemessen. In beiden Regionen war die mittlere Anzahl der neuronenspezifischen Silberkörner zwischen der Streß- und der Kontrollgruppe ausgeglichen (Abb. 21).



**Abb. 21:** Anzahl der von der  $\alpha_{2B}$ -AR *antisense* Ribosonde erzeugten Silberkörner pro Zelle ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) in unterschiedlichen Hirnregionen von subordinaten Tupaia (n = 4) und von Kontrolltieren (n = 4), ausgedrückt als Anzahl digitaler Bildpunkte. Abkürzungen: AV = anteroventraler Nucleus des Thalamus = PV, paraventriculärer Nucleus des Thalamus.

### 3. 5. 3. Quantifizierung der $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptor-mRNA

Angaben zur Identifizierung und zur Auswahl der quantifizierten Neurone sind dem Kapitel 4.3.1. zu entnehmen. Die Genexpression des  $\alpha_{2C}$ -AR wurde in Neuronenpopulationen des LC, des Nucleus tractus solitarii, der CA3-Region des Hippocampus, der 2. Zellschicht des Frontalen Cortex (diese Regionen entsprechen denen des Subtyps A, Kap. 3. 4. 1.) und im Nucleus Caudatus (Ebene A 7.0) bestimmt. Im N. caudatus beschränkte sich die Auswahl der quantifizierten Neurone auf eine Region mit einer relativ hohen Dichte an markierten Zellen, die an den Ventriculus lateralis angrenzt. Für diesen Rezeptorsubtypen konnte hinsichtlich seiner Genexpression in keiner der ausgewerteten Neuronenpopulationen signifikante streßbedingte Veränderungen beobachtet werden. Subordinate Tiere wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine tendenziell reduzierte  $\alpha_{2C}$ -AR mRNA-Expression in Neuronen des Nucleus Tractus solitarii und des LC sowie eine tendenziell erhöhte Expression im frontalen Cortex auf (Abb. 22).



**Abb. 22:** Anzahl der von der  $\alpha_{2C}$ -AR *antisense* Ribosonde erzeugten Silberkörner pro Zelle ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) in unterschiedlichen Hirnregionen von subordinaten Tupaia (n = 4) und von Kontrolltieren (n = 4), ausgedrückt als Anzahl digitaler Bildpunkte. Abkürzungen: Sol = Nucleus Tractus solitarii; LC = Locus coeruleus; CA3 = Region CA3 des Hippocampus; Cd = Nucleus caudatus; FrC = Frontaler Cortex.

## 4. DISKUSSION

### 4. 1. Sequenzanalyse der klonierten $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C

Als Grundlage für die mRNA-Expressionsstudien in Hirngewebeschnitten von *Tupaia belangeri* wurden von den  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgenen zunächst PCR-Fragmente erzeugt. Diese wurden kloniert und als Matrizen in späteren *in vitro*-Transkriptionen zur Erzeugung von cRNA-Sonden verwendet. Die für die PCR-Amplifikationen der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene A, B und C verwendeten Primersequenzen wurden nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Zunächst sollten die jeweiligen Primerpaare eine möglichst große Region des Rezeptorgens einschließen, um in späteren *in situ*-Hybridisierungsexperimenten eine weitestgehende Subtypspezifität zu gewährleisten. Die dritte intrazelluläre Schleife, deren Nucleinsäuresequenz die größten Unterschiede zwischen den drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren aufweist, sollte in dem PCR-Produkt enthalten sein.

Schließlich wurden die in der Gen-Datenbank des *European Molecular Biological Laboratory (EMBL, Heidelberg)* veröffentlichten Nucleinsäure-Sequenzen der  $\alpha_2$ -AR des Menschen (KOBILKA, et al., 1987; LOMASNEY et al., 1990; REGAN et al., 1988), der Ratte (LANIER et al., 1991; ZENG et al. 1990) und der Maus (LINK et al., 1992; CHRUSCINSKY et al., 1992) unter Zuhilfenahme des *GCG*-Softwarepaketes (*Genetic Computer Group, USA*) nach homologen und für die PCR geeigneten Primersequenzen untersucht. Eine hohe subtypspezifische Sequenzhomologie und eine geringe Homologie mit DNA-Sequenzen anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren waren primäre Kriterien für die Oligonucleotid-Recherche.

Die für die Amplifikation der DNA des  $\alpha_{2B}$ -AR verwendeten *sense*- und *antisense*-Primer beinhalteten jeweils das Start- und das Stopcodon des Rezeptorgens, so daß das amplifizierte Fragment die komplette gencodierende Sequenz des Rezeptors enthielt. Da die kompletten offenen Leserahmen des  $\alpha_{2A}$ - und des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgens nicht in einem Stück amplifiziert werden konnten, wurden für diese Gene Primerpaare entwickelt, die jeweils 90 % ( $\alpha_{2A}$ -AR) und 86 % ( $\alpha_{2C}$ -AR) der gencodierenden Region einschlossen. Der Amino- und der Carboxyterminus des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptorgens sowie der Carboxyterminus des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgens wurden in separaten PCR-Experimenten amplifiziert und kloniert.

Wie bei allen bisher klonierten  $\alpha_2$ -AR liegen auch bei *Tupaia belangeri* die encodierenden Regionen der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C jeweils innerhalb eines Exons. In PCR-Experimenten mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial zeigte sich, daß alle Rezeptorgenfragmente mit den gleichen Primersätzen amplifiziert werden konnten und identische Fragmentlängen aufwiesen, wie die aus mRNA-Pools erzeugten RT-PCR-Produkte. Die Sequenzanalysen der entsprechenden PCR-Fragmente aus genomischer DNA und aus cDNA ergaben ebenfalls eine absolute Übereinstimmung ihrer Nucleinsäuresequenz.

Nach der Klonierung in Plasmidvektoren wurden die cDNA-Fragmente zunächst einer sequenzanalytischen Auswertung unterzogen. Die hohe Homologie zu den veröffentlichten Gensequenzen  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorsubtypen anderer Spezies läßt darauf schließen, daß es sich bei den klonierten Fragmenten um die Subtypen A, B und C der  $\alpha_2$ -AR von *Tupaia belangeri* handelt. Die zentralnervöse Verteilung der *in situ*-Hybridisierungssignale, welche eine große Übereinstimmung zu der mRNA-Verteilung der Rezeptorsubtypen im Gehirn der Ratte und der Maus zeigt, bestätigt dieses Ergebnis.

Die hergeleiteten Aminosäuresequenzen der klonierten Fragmente weisen zu den bei  $\alpha_2$ -AR des Menschen und der Ratte beschriebenen funktionellen Domänen (potentielle Ligandenbindungs-, Phosphorylierungs-, Fettsäureacylierungsstellen) homologe Aminosäurereste auf. Nähere Betrachtungen der subtypspezifischen AS-Sequenzhomologien zeigen, daß die transmembranen Domänen der jeweiligen Rezeptorsubtypen am stärksten konserviert sind und die jeweils dritte intrazelluläre Schleife (intracellular loop, ICL) die größten Sequenzunterschiede aufweist. Der humane  $\alpha_{2A}$ -AR ist in Mutagenese-experimenten bezüglich seiner Interaktion mit G-Proteinen untersucht worden und es zeigte sich, daß der zweite und der dritte ICL für die Kopplung des Rezeptors mit dem G-Protein verantwortlich sind (NEUBIG et al., 1995; EASON und LIGGETT, 1996). Der zweite ICL und der Aminoterminus des dritten ICL bestimmen maßgeblich die Bindungsselektivität des Rezeptorproteins für das G-Protein (NEUBIG et al., 1995). In diesen Regionen besteht eine nahezu absolute AS-Sequenzhomologie zwischen *Tupaia* und den Rezeptorvarianten anderer Spezies. Wie bei den bisher beschriebenen B-Subtypen  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren fehlt auch dem  $\alpha_{2B}$ -AR des Spitzhörnchens aufgrund des verkürzten Aminoterminus potentielle Glycosylierungsstellen (LOMASNEY et al., 1990; ZENG et al. 1990; CHRUSCINSKY et al., 1992).

Der Cysteinrest (C<sup>201</sup>, s. Abb. 7.1.) in der 5 transmembranen Region des  $\alpha_{2A}$ -AR, einer potentiellen Ligandenbindungsdomäne (RAYMOND et al., 1990) läßt vermuten, daß sich

dieser Rezeptor bei *Tupaia* pharmakologisch wie der humane Subtyp verhält. Die  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptorvarianten der Ratte und der Maus tragen an entsprechender Position einen Serinrest, worauf sich ihre im Vergleich zum humanen Rezeptor um das fünffach verringerte Rauwolscinaffinität begründet (LINK et al., 1992; MARJAMÄKI et al., 1993).

#### 4. 2. Charakterisierung der Genexpression der $\alpha_{2A}$ -, $\alpha_{2B}$ - und $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptoren im Gehirn von *Tupaia belangeri*

In der vorliegenden Arbeit ist erstmals die Genexpression der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren und deren subtypspezifische Verteilung im Gehirn von *Tupaia belangeri* beschrieben worden. *In situ*-Hybridisierungsstudien im Gehirn der Ratte ergaben ein subtypspezifisches, zum Teil überlappendes Verteilungsmuster  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorgene in unterschiedlichen Hirnarealen (NICHOLAS et al., 1993; SCHEININ et al., 1994; WINZER-SERHAN und LESLIE, 1997; WINZER-SERHAN et al., 1997). Die Verteilung der mRNA-Hybridisierungssignale der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen im *Tupaia*-Gehirn stimmt im wesentlichen mit den Expressionsmustern überein, die für das ZNS der Ratte und der Maus beschrieben worden sind. Es treten jedoch einige regionale und subtypspezifische Unterschiede auf, die möglicherweise speziescharakteristisch sind. In Tabelle 6 sind die zentralnervösen Genexpressionsniveaus von *Tupaia*, Maus und Ratte in bestimmten Nuclei gegenübergestellt. In den ISH-Studien von SCHEININ et al. (1994), WINZER-SERHAN und LESLIE (1997) und WINZER-SERHAN et al. (1997 a, b), in denen jeweils die Genexpression der  $\alpha_2$ -AR im Gehirn der Ratte beschrieben wurde, lassen sich in einigen Regionen ebenfalls Unterschiede in den Hybridisierungsniveaus der einzelnen Rezeptorsubtypen ausmachen. Diese Abweichungen beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der Hybridisierungsstringenz oder der Spezifität der jeweils verwendeten *antisense*-Ribosonden.

Im Vergleich der ISH-Untersuchungen mit den immunocytochemischen Experimenten, in welchen mit  $\alpha_2$ -subtypspezifischen Antikörpern die Rezeptorproteine detektiert wurden (TALLEY et al., 1996; ROSIN et al., 1997), lassen sich ebenfalls teilweise abweichende Ergebnisse feststellen. Es ist denkbar, daß einige Proteine keinen posttranslationalen Modifikationsprozessen unterworfen sind und in Konformationen vorliegen, die vom Antikörper nicht gebunden werden. Zum Teil basieren mangelnde Übereinstimmungen der

unterschiedlichen histochemischen Experimente wahrscheinlich auf der Tatsache, daß die Rezeptorproteine nach ihrer Translation teilweise in neuronale Terminalien transportiert und dort vom Antikörper detektiert werden, jedoch die RNA-Synthese und damit deren Hybridisierung mit der spezifischen Ribosonde in der Zelle stattfindet. Die Abweichungen der Ergebnisse aus den *in situ*-Hybridisierungen und den immuncytochemischen Untersuchungen können auch in den unterschiedlichen Halbwertzeiten von mRNA-Molekülen und Proteinen begründet liegen.

**Tab. 6:** Vergleich von Literaturdaten zur Genexpression (ermittelt durch *in situ*-Hybridisierung, ISH) und zur Proteinexpression (ermittelt durch Immuncytochemie, IR) der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C in bestimmten Hirnregionen von *Tupaia belangeri*, der Maus und der Ratte.

| Region                  | N. tractus solitarii |               |               | N. dorsalis nervi vagi |               |               | Locus coeruleus |               |               | N. ant. ventr. thalami |               |               | N. paravent. hypothalami |               |               | N. lateralis septi |               |               |
|-------------------------|----------------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|
| Subtyp                  | $\alpha_{2A}$        | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$          | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$   | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$          | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$            | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$      | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ |
| Tupaia ISH              | ++                   | -             | +             | +                      | -             | +             | +++             | -             | +             | -                      | ++            | -/+           | +                        | -             | -/+           | ++                 | +             | +             |
| Maus ISH <sup>1</sup>   | ++                   | -             | +             | +                      | -             | -             | +++             | -             | -             | -                      | -             | -             | +                        | -             | -             | +++                | ++            | -             |
| Ratte ISH <sup>2</sup>  | ++                   | -             | +             | ++                     | -             | -             | +++             | -             | -             | -                      | +             | +             | +                        | -             | -             | +++                | -             | -             |
| Ratte ISH <sup>3</sup>  | +++                  | -             | ++            | +++                    | -             | +             | +++             | -             | +             | -                      | ++            | -             | +++                      | -             | -             | +++                | +++           | +             |
| Ratte IR <sup>4,5</sup> | ++                   | n.b.          | -/+           | +++                    | n.b.          | ++            | +++             | n.b.          | +++           | +                      | n.b.          | ++            | +++                      | n.b.          | +++           | ++/+<br>+++        | n.b.          | +/++          |

| Region                     | N. medialis amygdalae |               |               | Bulbus olfactorius |               |               | Hippocampus CA1 / CA3 <sup>a</sup> |               |               | Cortex frontalis |               |               | N. caudatus / putamen |               |               | Cerebellum str. granulae |               |               |
|----------------------------|-----------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|
| Subtyp                     | $\alpha_{2A}$         | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$      | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$                      | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$    | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$         | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ | $\alpha_{2A}$            | $\alpha_{2B}$ | $\alpha_{2C}$ |
| Tupaia-ISH                 | +                     | -             | -/+           | ++                 | -/+           | ++            | ++                                 | -/+           | ++            | ++               | -             | ++            | -/+                   | -/+           | ++            | ++                       | +             | ++            |
| Maus ISH <sup>1</sup>      | ++                    | -             | +             | +                  | -             | +             | +                                  | +             | ++            | +                | -             | +             | -                     | +             | +++           | +++                      | -             | n.b.          |
| Ratte ISH <sup>2</sup>     | ++                    | -             | -             | -                  | -             | +++           | ++                                 | -             | ++/-<br>CA3   | ++               | -             | +             | -                     | -             | ++            | ++                       | -             | +             |
| Ratte ISH <sup>3,4,5</sup> | +                     | -             | +             | +                  | -             | ++            | ++                                 | -             | ++/-<br>+CA3  | ++               | +             | +             | -                     | +             | +             | +                        | -             | ++            |
| Ratte IR <sup>6,7</sup>    | ++                    | n.b.          | +/++          | +                  | n.b.          | ++            | +                                  | n.b.          | +/++          | +/++             | n.b.          | ++            | +                     | n.b.          | +             | ++                       | n.b.          | ++            |

- = keine, + = schwache, ++ = mittlere, +++ = starke Markierung, n.b. = nicht bestimmt.

<sup>1</sup> WANG et al. (1996); <sup>2</sup> SCHEININ et al. (1994); <sup>3</sup> WINZER-SERHAN et al. (1997 a); <sup>4</sup> WINZER-SERHAN und LESLIE (1997); <sup>5</sup> WINZER-SERHAN et al. (1997 b); <sup>6</sup> TALLEY et al. (1996); <sup>7</sup> ROSIN et al. (1996).

Durch Northern Blot-Analysen von Hirn-Homogenaten konnten ebenfalls Informationen über die regionale RNA-Verteilung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen im ZNS der Ratte erlangt werden (ZENG und LYNCH, 1991). Die *in situ*-Hybridisierungsmethode bietet jedoch im Gegensatz zur RNA-Blot-Hybridisierung die Möglichkeit, Hybridisierungssignale einzelnen, regional begrenzten oder überlappenden Hirnnuclei zuzuordnen. Mit der lichtmikroskopischen Auswertung von emulsionsbeschichteten ISH-Präparaten ist darüber hinaus eine Charakterisierung der neuronalen mRNA-Verteilung möglich.

Die zentralnervöse Verteilung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren bei *Tupaia belangeri* wurde von FLÜGGE et al. (1992) und FLÜGGE (1996) anhand von Rezeptorautoradiographie-Studien beschrieben. Unter Verwendung der  $\alpha_2$ -AR-selektiven Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]Rauwolscin und [ $^3\text{H}$ ]RX821002 wurden  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorbindungsstellen im gesamten Tupaia-Gehirn mit regional unterschiedlich starker Ausprägung nachgewiesen. Eine Aussage über die zentralnervöse Verteilung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen ist mit dieser Methode jedoch nur begrenzt möglich, da den Radioliganden eine eindeutige subtypspezifische Bindungsaffinität fehlt. In Bindungsstudien mit rekombinanten, in Mäusezelllinien exprimierten  $\alpha_2$ -AR des Menschen konnte gezeigt werden, daß der membranständige  $\alpha_{2C}$ -AR eine etwa fünfmal höhere Affinität zu [ $^3\text{H}$ ]Rauwolscin besitzt ( $K_d = 1.4 \text{ nM}$ ) als der A- und der B-Subtyp, die beide eine etwa gleichstarke Bindungsaffinität aufweisen ( $K_d = 7.4 \text{ nM}$ ). [ $^3\text{H}$ ]RX821002 wird vom humanen  $\alpha_{2A}$ -AR und  $\alpha_{2C}$ -AR mit etwa gleicher und vom  $\alpha_{2B}$ -AR mit etwas geringerer Affinität gebunden (MARJAMÄKI et al., 1993). Mit der *in situ*-Hybridisierungsmethode ist es möglich, durch RNA-komplementäre und damit genspezifisch bindende Nucleinsäuresonden die Expression der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen zu differenzieren, sie spezifischen Hirnarealen und den darin befindlichen Zellen zuzuordnen und ihren mRNA-Gehalt semiquantitativ zu bestimmen. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob und mit welcher Translationsrate die detektierte RNA zum Protein übersetzt wird.

#### 4. 2. 1. $\alpha_2$ -adrenerge mRNA-Expression in noradrenergen Hirnnuclei

Die in den noradrenergen Zellen von der  $\alpha_2$ -mRNA codierten Proteine werden als präsynaptische Rezeptoren bezeichnet. Sie werden zum großen Teil in die Nervenendigungen transportiert, wo sie als Autorezeptoren durch Bindung des zelleigenen Transmitters aktiviert werden. Infolge dieser Aktivierung wird die Feuerungsrate der Zelle reduziert, ein Mechanismus, der auch als negative Rückkopplungswirkung des Neurons beschrieben wird (LANGER, 1974; STARKE et al., 1989; LANGER, 1997). Präsynaptische Rezeptoren, die Transmitter binden, welche von benachbarten Zellen ausgeschüttet wurden, werden als präsynaptische Heterorezeptoren bezeichnet (LANGER, 1997). Eine Stimulierung der präsynaptischen  $\alpha_2$ -AR noradrenerger Zellen führt zu einer Inhibierung der spontanen Feuerungsrate der Neurone, zu einer Inhibierung der Synthese von Noradrenalin und zu einer Verringerung der Ausschüttung des Neurotransmitters in den Projektionsgebieten noradrenerger Zellen (AGHAJANIAN und VAN DER MAEHLLEN, 1982; STARKE et al., 1989). Somit besitzen die  $\alpha_2$ -AR eine wichtige Kontrollfunktion für die Aktivität der catecholaminergen Zellen. Elektronen-mikroskopische Auswertungen von Bindungsstudien mit subtypspezifischen Antikörpern konnten kürzlich die Lokalisation  $\alpha_2$ -AR in Terminalien noradrenerger Neurone im ZNS der Ratte nachweisen (LEE et al., 1998 a; LEE et al., 1998 b; MILNER et al., 1998).

#### *Locus coeruleus*

Wie bei der Ratte ist auch bei Tupaia in den noradrenergen Kerngebieten des Hirnstammes und der Brücke der A-Subtyp das am stärksten exprimierte  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptorgen. Der größte Gehalt an AR mRNA wurde im LC detektiert, was den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierungsstudien im Gehirn der Ratte und der Maus entspricht (NICHOLAS et al., 1993; SCHEININ et al., 1994; WANG et al., 1996). In diesen Studien wurde im LC ausschließlich der A-Subtyp lokalisiert. Im LC von Tupaia ist auch die mRNA des  $\alpha_{2C}$ -AR in einem geringen Maße exprimiert. Das Expressionsniveau variierte dabei zwischen den einzelnen Neuronen erheblich. Während sich die Hybridisierungssignale vieler LC-Neurone nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze befanden, konnten in einigen Neuronen dieser Zellgruppe keine  $\alpha_{2C}$ -spezifischen Signale festgestellt werden. FLÜGGE et al. (1992) konnten im LC von Tupaia eine deutliche [ $^3$ H]-Rauwolschinbindung demonstrieren, was jedoch noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die oder den gebundenen Rezeptorsubtypen

zuließ. Bei der Ratte kann aufgrund einer wesentlich geringeren [<sup>3</sup>H]Rauwolscin-Bindungsaffinität des  $\alpha_{2A}$ -AR ( $K_d$ , 28 nM) im Vergleich zum C-Subtypen ( $K_d$ , 1.4 nM) davon ausgegangen werden, daß dieser Ligand vorwiegend den  $\alpha_{2C}$ -AR bindet (HARRISON et al., 1991). Im Hirnstamm der Ratte konnte auch im LC und dem lateralen Tegmentum [<sup>3</sup>H]Rauwolscin-Bindungsstellen nachgewiesen werden (BOYAJIAN et al., 1987; WAMSLEY et al., 1992; ZILLES et al., 1993). In einem weiteren ISH-Experiment, in dem die mRNA-Expression der  $\alpha_2$ -AR während der prä- und postnatalen Entwicklung des Rattenhirns untersucht wurde, konnte im LC der adulten Ratte ebenfalls eine schwache mRNA-Expression des C-Subtypen detektiert werden (WINZER-SERHAN, et al., 1997 b). Auch das Protein dieses Subtypen konnte immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper im LC der Ratte identifiziert (ROSIN et al., 1996) und kürzlich TH-immunoreaktiven, also catecholaminergen Dendriten von LC-Neuronen zugewiesen werden (LEE et al., 1998 b).

#### *Nucleus Tractus Solitarii*

Im Kerngebiet des N. Tractus solitarii konnte ebenfalls mRNA des A- und des C-Subtypen detektiert werden, wobei der  $\alpha_{2A}$ -AR das jeweils höhere Expressionsniveau aufweist. Hybridisierungen mit der für die mRNA des  $\alpha_{2B}$ -AR komplementären Sonde erzeugten im gesamten Bereich des Hirnstammes und der Brücke keine Signale. Diese Ergebnisse stimmen mit den für das Gehirn der Ratte und der Maus beschriebenen Hybridisierungssignalen überein (NICHOLAS et al., 1993; SCHEININ et al., 1994; WANG et al., 1996; WINZER-SERHAN et al., 1997). Da auch mRNA des C-Subtypen in nor / adrenergen Zellen lokalisiert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Rezeptor wie der  $\alpha_{2A}$ -AR auch präsynaptisch lokalisiert ist und autoregulative Funktionen besitzt. Die von LEE et al. (1998 b) beschriebene Lokalisierung des  $\alpha_{2C}$ -AR in den Dendriten catecholaminerger LC-Neuronen und das nur schwache Auftreten dieses Subtypen in coeruleären Axonterminalien legt die Vermutung nahe, daß der C-Subtyp in catecholaminergen Zellverbänden die Aktivierung der Neuronen vor allem durch excitatorische Afferenzen anderer Kerngebiete moduliert, somit also als präsynaptischer Heterorezeptor fungiert. Der LC und der N. tractus solitarii erhalten stark excitatorische Projektionen aus dem in der rostroventralen Medulla gelegenen N. paragigantocellularis (VAN BOCKSTAELE und ASTON-JONES, 1992).

#### 4. 3. Zelluläre Quantifizierung der *in situ*-Hybridisierungssignale

##### 4. 3. 1. Identifizierung der Zellen

Die zur Quantifizierung herangezogenen zentralnervösen Neuronenpopulation wurden auf der Grundlage der anatomischen Hirnatlanten von *Tupaia glis* (TIGGES und SHANTA, 1969) und der Ratte (PAXINOS und WATSON, 1986) ausgewählt. Von besonderem Interesse waren catecholaminerge Zentren im Hirnstammbereich, die wichtige Funktionen in der Anpassung des ZNS, des kardiovaskulären und des hormonellen Systems auf streßinduzierte Reize ausüben und das Gehirn mit Monoaminen versorgen. Die Auswahl der zu quantifizierenden Neuronenpopulationen im Locus Coeruleus und im Bereich des Tractus Solitarius wurden aufgrund anatomischer Vergleiche mit beschriebenen Neuronenpopulationen angestellt, die eine positive Immunreaktion auf Antikörper zeigten, welche spezifisch auf das für die Noradrenalinsynthese limitierende Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) (FLÜGGE et al., 1990) und das für die Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin verantwortliche PNMT (MITTENDORF et al., 1988) reagieren. Da mit der in dieser Arbeit verwendeten Kombination aus ISH und anschließender Kernfärbung mit Toluidinblau einzelne Zellen nicht eindeutig als noradrenerg oder adrenerg identifiziert werden konnten, wurde die Auswahl der Zellen in den nor / adrenergen Kerngebieten nach den Kriterien einer morphologischen Homogenität in den jeweiligen Hirn-Nuclei getroffen. Auch bei den im Diencephalon und im Mesencephalon quantifizierten Zellpopulationen des Hippocampus, des Thalamus, der Amygdala, des Striatums und des Cortex konnte keine Aussage über die Funktion der Neuronen getroffen werden, so daß auch hier die Zellen nach morphologischen Merkmalen ausgewählt wurden. Zellen wurden als markiert angesehen, wenn ihre Markierung mit Silberkörnern mindestens um ein fünffaches stärker als die Hintergrundmarkierung war. In den jeweiligen Regionen wurden Zellen, die einen sichtbaren Zellkern, eine einheitliche Größe und eine einheitlich starke Gegenfärbung mit Toluidinblau aufwiesen, zur quantitativen Auswertung herangezogen.

##### *Locus coeruleus und Kerngebiete des Hirnstammes*

In einer immunocytochemischen Untersuchung sind noradrenerge Neuronen im LC des Menschen in vier morphologisch unterschiedliche Klassen eingeordnet worden: große und kleine *multipolare* Neuronen (kreis- bis rautenförmige Zellkörper) und große und kleine *bipolare* Neuronen (länglicher, ellipsenförmige Zellkörper) (CHAN-PALAY und ASAN,

1989). Im LC von *Tupaia* konnten alle Neuronen, die mit  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -AR *antisense*-Ribosonden markiert waren, ebenfalls einer dieser Gruppen zugeordnet werden. Da innerhalb des LC jedoch auch kleine, nicht-markierte Zellen identifiziert wurden, wurden lediglich große bi- und multipolare Neuronen quantifiziert. Im ventralen reticulären Tegmentum besaßen die zur Auswertung herangezogenen Neurone die gleichen morphologischen Eigenschaften wie im LC, wiesen jedoch eine etwas geringere Größe auf.

Im Bereich der von FLÜGGE et al. (1990) bei *Tupaia* beschriebenen noradrenergen Kernregion des N. tractus solitarii konnten in der vorliegenden Arbeit nur wenige kleinere, kreis- bis rhombenförmige Zellen identifiziert werden, welche mit der  $\alpha_{2A}$ - und der  $\alpha_{2C}$ -spezifischen *antisense*-Ribosonden markiert waren. Alle diese Zellen wurden quantitativ ausgewertet. Die Motoneuronen des dorsalen motorischen Vaguskerns ließen sich aufgrund ihrer ausgeprägten Größe und der gleichmäßigen ovalen Form ihres Zellsomas eindeutig identifizieren.

#### *Kerngebiete des Vorderhirns*

Im N. caudatus des Striatums befinden sich zu 95 % GABAerge *spiny neurons* und zu 5 % Interneuronen (BOLAM und BENNETT, 1995), so daß es aufgrund der Homogenität der ausgewerteten Zellen als sicher gelten kann, daß *spiny neurons* quantifiziert wurden. Die Neuronenpopulation der massa intercalata in der Amygdala besteht morphologisch ebenfalls aus zwei Zelltypen, die aufgrund ihrer Größe generell als mittlere und große Neuronen bezeichnet werden (MILLHOUSE, 1986). Die großen Neuronen machen nur einen Anteil von 5 % der gesamten Zellpopulation aus und werden mit Nissl-Kernfärbetechnik wesentlich stärker angefärbt, als die Neuronen mittlerer Größe (MILLHOUSE, 1986). In die Auswertungen wurden lediglich schwach angefärbte Zellen von mittlerer Größe einbezogen. Im Hippocampus wurden Neuronen der pyramidalen Zellschicht der CA3-Region untersucht. Mit Nissl-Kernfärbemethoden kann jedoch nicht zwischen den in dieser Schicht lokalisierten Pyramidenzellen und Korbzellen unterschieden werden, so daß die hier quantifizierten Neuronen nicht weiter spezifiziert werden können. Die in der zweiten Zellschicht des frontalen Cortex untersuchten Zellen entsprachen in ihrer Größe und Morphologie in etwa den ausgewerteten Neuronen der hippocampalen CA3-Region.

#### 4. 3. 2. Zelluläre Verteilung der Hybridisierungssignale

Bei der Proteinbiosynthese wird die im Zellkern synthetisierte Rezeptor-mRNA durch die Kernmembran in das Zytoplasma transportiert (LEWIN, 1995), so daß in der vorliegenden Arbeit *in situ*-Hybridisierungssignale im Zellkern (Vorläufer-RNA, mRNA) und im Plasma (mRNA) einzelner Neurone lokalisiert werden konnten. Das Verteilungsmuster der Signale war dabei inhomogen und variierte in der subzellulären Ausprägung. In allen Hirnregionen konnten Zellen lokalisiert werden, die entweder eine höhere Signaldichte im Kern oder im Zytoplasma oder ein ausgeglichenes Expressionsniveau zwischen beiden Zellkompartimenten aufwiesen.

In einer früheren Arbeit wurde bereits im Hirn der Ratte die nukleäre Hybridisierung  $\alpha_2$ -adrenerger Ribosonden beschrieben und diskutiert (NICHOLAS et al., 1993). Da im Laufe der Proteinbiosynthese die Reifung der Vorstufen-RNA zur messenger RNA außerhalb des Nucleus erfolgt (SHARP, 1987), erwarteten die Autoren die Hybridisierungssignale ausschließlich außerhalb des Zellkerns. Zur Erklärung der nukleären Hybridisierungssignale wurde es unter anderem für denkbar gehalten, daß diese Speicherpools von mRNA-Molekülen repräsentieren könnten, die, durch bestimmte zelluläre Signale induziert, ihren Inhalt in das Zytoplasma entlassen. Auch die Möglichkeit einer unspezifischen Hybridisierung der Ribosonden wurde nicht ausgeschlossen. NICHOLAS und Mitarbeiter ließen jedoch unberücksichtigt, daß die Gene  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren zu der Minorität eukaryotischer Gene zählen, deren codierende DNA-Sequenz nicht von Introns unterbrochen ist (KOBILKA et al., 1987; LANIER et al., 1991; LOMASNEY et al., 1990; LINK et al., 1992). Introns sind DNA-Segmente, die transkribiert (Primärtranskript), jedoch vor der Translation durch das *splicing* der Exonsequenzen aus dem Transkript entfernt werden (SHARP, 1987). Primärtranskripte aus intronlosen Genen sind auch für lange, die gesamte gencodierende Region einschließende Ribosonden potentielle Bindungspartner. Die in den Zellkernen gefundenen Hybridisierungssignale stellen somit vermutlich im wesentlichen unreife mRNA-Moleküle dar. Da in der lichtmikroskopischen Auswertung der Hybridisierungssignale eine exakte morphologische Differenzierung zwischen nucleären und perinucleären Zellkompartimenten nicht möglich ist, wurden die Silberkörner über der gesamten Zelloberfläche ausgezählt. Eine Aussage über einen streßstatusabhängigen Gehalt an Kern-RNA und darüber, ob Streß einen Einfluß auf das RNA-processing hat, kann in dieser Arbeit nicht getroffen werden.

Im gesamten Bereich des Hippocampus erzeugten die drei antisense-Sonden auch zwischen den Neuronen Hybridisierungssignale, die aufgrund der hohen Zelldichte nicht eindeutig einzelnen Neuronen zugeordnet werden konnten. Somit kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei diesen Signalen um unspezifische Hintergrundhybridisierungen, Hybridisierungen auf benachbarten, nicht angeschnittenen Neuronen, oder um Hybridisierungen auf neuronalen Terminalien handelt. Die  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorproteine werden nach ihrer Translation im Zytoplasma zu ihrer Wirkungsstätte transportiert und konnten immunocytochemisch im Zytoplasma sowie in neuronalen Terminalien lokalisiert werden (LEE et al., 1998 a; LEE et al., 1998 b; MILNER et al., 1998). Es wurde unter anderem für Glutamaterezeptoren bewiesen, daß besonders im Hippocampus auch mRNA-Moleküle in neuronale Fortsätze transportiert und zu einer Proteinsynthese an der Synapse herangezogen werden (MIYASHIRO et al., 1994). Es gibt bisher allerdings keine Hinweise für eine derartige *on site* –Translation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren. Da sich alle in der vorliegenden Arbeit in den Zellzwischenräumen gefundenen Hybridisierungssignale einzelnen Zellen nicht eindeutig zuordnen ließen, wurden diese grundsätzlich als Hintergrundhybridisierung betrachtet.

#### 4. 3. 3. Vergleich der Ergebnisse aus quantitativer *in situ*-Hybridisierung und quantitativer Rezeptorautoradiographie

Im Vergleich zur ISH mit *antisense*-orientierten Ribosonden, welche die proteincodierenden RNA-Moleküle detektiert, werden in der Rezeptorautoradiographie radioaktiv markierte, rezeptorspezifischen Liganden eingesetzt, mit welchen die Bindungsstellen der Rezeptorproteine in Gewebeschnitten untersucht und quantifiziert werden können.

Die quantitativen ISH-Untersuchungen ergaben, daß infolge einer dauerhaften, psychosozialen Belastung bei *Tupaia belangeri* die für den  $\alpha_{2A}$ -AR codierende mRNA in den untersuchten Neuronengebieten des ventralen medullären Tegmentums zu 19%, des N. tractus solitarii zu 30% und des LC zu 24% herunterreguliert ist. In der massa intercalata der Amygdala ergab die Auswertung bei subordinaten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Herunterregulation von 22%.

Die quantitativen ISH-Studien stimmen im wesentlichen mit den Ligandenbindungsversuchen in Hirnschnitten subordinater Tupaia überein (FLÜGGE et al.,

1992; FLÜGGE, 1996), weisen jedoch bezüglich Ausmaß und Ort der Regulation einige Besonderheiten auf. Die Rezeptorautoradiographie-Experimente, die mit dem  $\alpha_2$ -AR-Antagonisten [ $^3$ H]Rauwolscin durchgeführt wurden, zeigten, daß nach einer zehntägigen psychosozialen Konfrontation subordinate, männliche Tupaia im Vergleich zu dominanten Tieren signifikant weniger Bindungsstellen im N. tractus solitarii, im dorsalen motorischen Vaguskern, im zentralen Höhlengrau, im hinteren Bereich des Hypothalamus und im medialen Nucleus der Amygdala aufweisen (FLÜGGE et al., 1992). Vergleichende Rezeptorautoradiographie-Studien mit Hirnschnitten subordinator und nicht-gestreßter Tupaia unter Verwendung des  $\alpha_2$ -AR-Antagonisten [ $^3$ H]RX821002 zeigten in Präparaten subordinator Tiere nach einer vierwöchigen Streßphase eine signifikante Reduktion  $\alpha_2$ -adrenerger Bindungsstellen im LC, im Solitariuskern und im dorsalen motorischen Vaguskern (FLÜGGE, 1996). Das Ausmaß dieser Regulation betrug jeweils zwischen 10 und 18 Prozent und ist damit etwas geringer als die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte mRNA-Regulation.

In den Kapiteln 3. 2. und 3. 4. der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisierung von mRNA des A- und des C-Subtypen in nor / adrenergen Kerngebieten des LC und des N. tractus solitarii beschrieben. Eine signifikante streßbedingte mRNA-Regulation des  $\alpha_{2C}$ -AR konnte nicht festgestellt werden. Da der  $\alpha_2$ -AR-spezifischen Ligand [ $^3$ H]RX821002 den A- und den C-Subtypen mit etwa gleicher Affinität bindet, (MARJAMÄKI et al., 1993), erklärt sich die etwas geringere Verminderung der  $\alpha_2$ -AR-Bindungsstellen in diesen Hirnnuclei (FLÜGGE, 1996) möglicherweise durch eine geringere oder fehlende Regulierung des C-Rezeptors. Unterschiedliche Halbwertszeiten des Rezeptorproteins und seiner mRNA oder posttranslationale Modifikationen, die die Bindungseigenschaften des Rezeptors verändern, sind ebenfalls mögliche Erklärungen für die leichte Diskrepanz.

Die quantitative Auswertung der *in situ*-Hybridisierungssignale zeigt, daß es in den Motoneuronen des dorsalen Vaguskerns im Gegensatz zu der streßbedingten Reduktion von [ $^3$ H]RX821002-Bindungsstellen nicht zu Veränderungen der für  $\alpha_2$ -AR codierenden mRNA kommt. Im Gehirn von *Macaca fascicularis* wurde demonstriert, daß der dorsale motorische Vaguskern von noradrenergen Neuronen des LC / Subcoeruleus innerviert wird (SWANSON und HARTMAN, 1975), und BERTOLINO und Mitarbeiter (1997) demonstrierten im motorischen Vaguskern der Ratte glutamatergen Input aus dem N. tractus solitarii, welcher von präsynaptischen  $\alpha_2$ -AR moduliert wird. [ $^3$ H]RX821002 bindet in dieser Region also

vermutlich sowohl motoneuronale, als auch präsynaptische, auf afferenten Nervenendigungen lokalisierte  $\alpha_2$ -AR. Für diese Vermutung spricht zudem die Diskrepanz zwischen der oben gezeigten schwachen bis mittleren neuronalen  $\alpha_2$ -adrenergen mRNA-Expression des motorischen Vaguskerne und der starken  $\alpha_2$ -AR-spezifischen Ligandenbindung in dieser Region bei *Tupaia belangeri* (FLÜGGE et al., 1992; FLÜGGE, 1996). Die nach 28 Tagen Streß um 16.1% reduzierte Rezeptorbindung im Vaguskerne (FLÜGGE, 1996) repräsentiert möglicherweise die Reduktion präsynaptischer  $\alpha_{2A}$ -AR auf afferenten Terminalien.

Die streßinduzierte Verminderung von [ $^3$ H]Rauwolscin-Bindungsstellen im zentralen Höhlengrau, dem Hypothalamus und der Amygdala bei *Tupaia belangeri* (FLÜGGE et al., 1992) resultiert möglicherweise ebenfalls aus der Herunterregulation präsynaptischer  $\alpha_2$ -AR afferenter noradrenerger Neuronen, da auch diese Hirnregionen Inputs aus dem LC (FOOTE et al., 1983; HOTELS, 1990; JONES, 1991) erhalten. Im amygdaloiden Kernkomplex wurde die homogene Zellgruppe der Massa intercalata zur Quantifizierung herangezogen. In dieser Region konnte ebenfalls eine streßabhängige Reduzierung der für den A-Subtyp codierenden mRNA detektiert werden. Möglicherweise sind andere Nuclei der Amygdala ebenfalls von einer streßabhängigen Herunterregulation  $\alpha_2$ -adrenerger mRNA betroffen.

Der Hypothalamus wird starkem Maße von aufsteigenden Fasern noradrenerger Kerngebiete der ventrolateralen Medulla und des N. tractus solitarii innerviert (SAWCHENKO und SWANSON, 1982). Da bei *Tupaia* in diesen Kerngebieten ebenfalls eine Reduzierung der zellulären mRNA-Expression des  $\alpha_{2A}$ -AR detektiert wurde, wirkt sich diese Genregulation ebenfalls auf axonterminale Rezeptorproteine in den noradrenergen Zielgebieten aus.

Interessanterweise konnte in der zweiten Zellschicht des frontalen Cortex in der SUB-Gruppe eine zu den Kontrolltieren tendenziell erhöhte Expressionsrate  $\alpha_{2C}$ -adrenerger mRNA detektiert werden. Rezeptorautoradiographie-Studien mit [ $^3$ H]RX821002 hatten gezeigt, daß in der präfrontalen Cortexregion des Tupaiahirns eine zehntägige Streßphase zunächst eine signifikante Herunterregulation der Rezeptorbindungsstellen bewirkte, während nach 28 Tagen psychosozialen Stresses die Bindungsstellen signifikant heraufreguliert waren (FLÜGGE, 1996). Es ist denkbar, daß sich die gegensätzlichen Effekte mit der in dieser Arbeit demonstrierten subtyp- und regionsspezifischen Regulation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren erklären lassen. Da im frontalen Cortex noradrenerge excitatorische Fasern aus dem LC enden (JONES und YANG, 1985), dokumentiert die temporär reduzierte [ $^3$ H]RX821002-Bindung

möglicherweise eine Herunterregulation von präsynaptischen, auf coeruleen Axonterminalien lokalisierten  $\alpha_{2A}$ -AR.

#### 4. 4. 1. Mögliche physiologische Bedeutung der streßinduzierten mRNA-Regulation $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren

Psychosozialer Streß beeinflusst das kardiovaskuläre System und führt unter anderem zu einer Erhöhung der Herzschlagrate bei *Tupaia* (STÖHR, 1986). Die Neuronen der rostralen ventrolateralen Medulla spielen bei der Regulation des kardiovaskulären und des sympathischen Systems eine entscheidende Rolle (UNNERSTALL et al., 1984). Eine lokale Applikation des für  $\alpha_2$ -AR spezifischen Agonisten Clonidin in den lateralen retikulären Nucleus der ventralen Medulla führt bei verschiedenen Säugetieren zu einer Reduktion der Sympathikus-Aktivität (s. Übersichtsartikel von GILLIS et al., 1985 und RUFFOLO et al., 1993). Chronischer psychosozialer Streß führt bei *Tupaia belangeri* unter anderem zu einer konstanten Erhöhung des sympathoadrenalen Systems (FUCHS et al., 1993). Es ist denkbar, daß die streßbedingte Reduktion der mRNA  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren in der ventrolateralen Medulla die Aktivierung des sympathoadrenalen Systems beeinflusst. Da auch der N. tractus solitarii einen starken Einfluß auf die Regulation des arteriellen Blutdruckes ausübt, (UNNERSTALL et al., 1984; BRODY, 1987; KUBO et al., 1990; RUFFOLO et al., 1993), hat die reduzierte Genexpression in dieser Region vermutlich ebenfalls eine modulatorische Auswirkung auf das kardiovaskuläre System. Diese Wirkung wird wahrscheinlich teilweise über den dorsalen motorischen Vagus Kern vermittelt, welcher afferente Projektionen aus dem Solitarius Kern erhält (ROGERS et al., 1980).

Der LC hat durch seine weitreichenden zentralnervösen und sich bis in das Rückenmark hinein erstreckenden Efferenzen einen wesentlichen Anteil an der Regulation des Schlafes, der Wach- oder *Arousal*-Funktionen, der Lern- und Gedächtnisleistungen, des Hormonhaushaltes und des autonomen Nervensystems (FOOTE et al., 1983; JONES, 1991; CIRELLI et al., 1996). Störungen in der Aktivität des LC und damit des noradrenergen Systems werden für die Ausprägung von depressivem Verhalten, Angstzuständen und Panikattacken verantwortlich gemacht (JOHNSTON, 1991; BRADY, 1994). Die bei männlichen *Tupaia*s durch chronischen psychosozialen Stress verursachten depressionsähnlichen Verhaltensmuster (FUCHS et al., 1996) und Störungen des circadianen

Rhythmus (AUE, 1989) lassen sich vermutlich teilweise auf eine Störung des LC / NA-Systems zurückführen.

Die Feuerrate der LC-Neuronen und damit die Versorgung des Gehirns mit NA wird von  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren reguliert, die präsynaptisch auf den Terminalien der LC-Neurone, auf rekurrenten kollateralen Bahnen, oder somato-dendritisch lokalisiert sind (AGHAJANIAN et al., 1977; ENNIS und ASTON-JONES, 1986). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren vermittelt unter anderem die Hyperpolarisierung des Zellmembranpotentials durch Erhöhung der Leitfähigkeit neuronaler  $K^+$ -Kanäle, was eine Postaktivierungs-Inhibierung des LC herbeiführt (AGHAJANIAN und VAN DER MAELEN, 1982). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in den noradrenergen LC-Neuronen bei *Tupaia belangeri* die mRNA des  $\alpha_{2A}$ -AR nach einem vierwöchigen Dauerstreß um 24 % reduziert ist. Durch die streßbedingte Herunterregulierung der  $\alpha_{2A}$ -AR, die somit zumindest teilweise auf die Reduzierung der Rezeptor-mRNA zurückzuführen ist, stehen den noradrenergen Neuronen weniger autoregulatorische Rezeptoren zur Verfügung, die eine agonisteninduzierte Hyperpolarisierung des Membranpotentials und damit eine Inhibierung der neuronalen Aktivität auslösen können. Eine dauerhaft reduzierte Anzahl präsynaptischer  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren würde folglich zu einer anhaltend erhöhten Aktivität des noradrenergen zentralnervösen Systems führen.

Die Schlüsselstellung, die der  $\alpha_{2A}$ -AR bei der Reduktion der sympathischen Aktivität innehat, konnte durch die molekulargenetische Etablierung eines mutierten Mäusestammes demonstriert werden. Durch die Einführung einer Punktmutation in das Genom wurden die  $\alpha_{2A}$ -AR von der Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen entkoppelt, was zu einer funktionellen Inaktivierung des Rezeptors führte. Daraus resultierte eine nahezu vollständige Unterdrückung des durch  $\alpha_2$ -Agonisten ausgelösten blutdrucksenkenden Effektes von  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren (MACMILLAN et al., 1996; MACDONALD et al., 1997). Durch den genetischen *knock out* des Rezeptors, bzw. seiner Funktion, kann jedoch zwischen den physiologischen Einflüssen prä- und postsynaptisch lokalisierter Rezeptoren nicht differenziert werden.

#### 4. 4. 2. Mögliche Auswirkungen auf das periphere Hormonsystem

Der Regulationsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) wird wie folgt beschrieben: Die Sekretion des Corticotropin-Releasinghormons (CRH) durch Neuronen des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus in die *Eminentia mediana* bewirkt die Ausschüttung des Adrenocorticotropin-Hormons (ACTH) aus der Hypophyse. ACTH gelangt über den Kreislauf zur Nebennierenrinde, wo es die Ausschüttung der Glucocorticoide aktiviert (MCEWEN, 1987). Die Glucocorticoide haben eine direkte rückkoppelnde Wirkung auf den Hippocampus und den Hypothalamus, wo sie eine Senkung der CRH-Sekretion herbeiführen und damit den autoinhibitorischen Effekt der (HPA-Achse) hervorrufen (SAWCHENKO, 1987; SAPOLSKY et al., 1990). Diese Rückkopplung wird von Glucocorticoidrezeptoren (GR) im Hippocampus, im Hypothalamus und in der Hypophyse gesteuert. Eine Reduktion der GR im Hippocampus wird unter anderem für die anhaltende Aktivierung der HPA-Achse bei Streß verantwortlich gemacht. (MCEWEN, 1987).

Die Tupaia-Männchen, die sich im Konfrontationsversuch als subordinat erwiesen hatten, zeigten im Vergleich zu den Dominanten und den Kontrolltieren während der gesamten Konfrontationsphase einen signifikant erhöhten Cortisolgehalt im Urin. Es ist möglich, daß die streßbedingte Aktivierung der HPA-Achse und die Reduktion der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptor-mRNA in einer Wechselbeziehung miteinander stehen. Eine durch Ätherstreß hervorgerufene erhöhte Ausschüttung von Catecholaminen führte bei der Ratte zu einer Stimulation der CRH- und der ACTH-Sekretion (RIVIER und VALE, 1983). Durch Injektionen von Noradrenalin und Adrenalin in den lateralen Ventrikel konnte beim Schaf *in vivo* eine sowohl akute als auch dauerhafte Steigerung der ACTH-Sekretion und damit einhergehend eine verstärkte Cortisolausschüttung aus der Nebennierenrinde ausgelöst werden. Dabei erwies sich Noradrenalin im Vergleich zu Adrenalin als der potentere Aktivator der HPA-Achse (LIU et al., 1991). *In vitro*- und *in vivo*-Versuche bei der Ratte machten deutlich, daß in Gegenwart von Glucocorticoiden das CRH-ACTH-System durch noradrenerge Afferenzen aus dem ventralen medullären Faserbündel in einer Glucocorticoid-dosisabhängigen Art und Weise aktiviert wird (GAILLET et al., 1993). Die Aktivität des paraventriculären hypothalamischen Nucleus und damit des CRH-ACTH-Systems wird zum Teil von afferenten LC-Fasern beeinflusst: Chronischer Immobilisierungsstreß führt bei der Ratte zu einer kontinuierlich erhöhten Feuerungsrate des LC (PAVCOVICH et al., 1990), zu einem dauerhaft gesteigerten NA-Einstrom (PACAK et al., 1992) und schließlich zu einer gesteigerten CRH-Genexpression im PVN, (MAMALAKI et al., 1992).

LIU et al. (1991) leiten aus der durch Monoaminygaben erzeugten kontinuierlichen Erhöhung der HPA-Achse das Vermögen zentraler catecholaminerger Transmitterwege ab, durch einen dauerhaft erhöhten Input in den Hypothalamus die inhibierenden Rückkopplungseffekte der Glucocorticoide teilweise aufzuheben. Ferner konnte in hypothalamischen Slice-Präparaten gezeigt werden, daß in steroidhaltigem Medium die CRH-stimulierende Wirkung von NA durch  $\alpha_1$ -AR moduliert wird, während in Abwesenheit von Glucocorticoiden  $\alpha_2$ -AR eine NA-abhängige Reduzierung der CRH-Sekretion bewirken (FEUVRIER et al., 1998).

Bei *Tupaia belangeri* wird infolge eines dauerhaften psychosozialen Stresses ebenfalls eine chronische Aktivierung des zentralen noradrenergen Systems ausgelöst (RAAB und STORZ, 1976). Es ist somit denkbar, daß die bei subordinaten Tupaia induzierte chronische Erhöhung des Cortisolspiegels im Plasma und im Urin ebenfalls auf die partielle Aufhebung des negativen Rückkopplungseffektes der HPA-Achse durch erhöhten nor / adrenergen Input zurückzuführen ist.

Daß chronischer psychosozialer Streß bei *Tupaia* zu einer Herunterregulierung  $\alpha_2$ -AR in noradrenergen Neuronen führt, wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Abnahme zellulärer mRNA und von FLÜGGE (1996) und FLÜGGE et al. (1992) durch die Abnahme von Rezeptorbindungsstellen in noradrenergen Hirnstammregionen demonstriert. Wahrscheinlich trägt diese Herunterregulierung zu der erhöhten Aktivität des catecholaminergen Systems und damit zu einer konstanten Aktivierung der HPA-Achse bei.

Die streßbedingte Herunterregulation  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in der perifornicalen Region des Hypothalamus (FLÜGGE et al., 1992) bedeutet möglicherweise einen Schlüsselmechanismus in der integrativen Modulation des NA- und des HPA-Systems. Es ist denkbar, daß eine chronische Aktivierung des zentralen NA-Systems und der HPA-Achse infolge dauerhafter Belastung *in vivo* zu ähnlichen Veränderungen im hypothalamischen  $\alpha$ -adrenergen Rezeptorsystem führt, wie es in Slice-Präparaten der Ratte demonstriert werden konnte (FEUVRIER et al., 1998; s.o.). Ob chronischer Streß bei *Tupaia* in CRH-sezernierenden Neuronen des Hypothalamus zu einer reduzierten Genexpression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren führt, ist nicht bekannt. Da im Hypothalamus von *Tupaia* eine schwache bis mittlere Genexpression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren detektiert werden konnte (s. Kap. 3. 2.), repräsentieren die Rezeptorbindungsstellen (FLÜGGE et al., 1992) in dieser Region wahrscheinlich sowohl präsynaptische, auf noradrenergen Afferenzen lokalisierte  $\alpha_2$ -AR, als auch postsynaptische  $\alpha_2$ -AR.

#### 4. 5. Mögliche Ursachen für die streßinduzierte Regulierung $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren

Neben der Erforschung der Interaktion zwischen dem neuroendokrinen und dem zentralen catecholaminergen System haben sich bisherige Untersuchungen vornehmlich mit der Frage befaßt, wie sich eine kurz- oder langfristige agonisteninduzierte Stimulation auf die Plastizität  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren auswirkt. Die Experimente wurden überwiegend *in vitro* mit in bestimmten Zelllinien exprimierten Rezeptoren durchgeführt. Es liegen bis heute nur wenig Informationen über die Regulation adrenerger Rezeptoren *in vivo* vor.

Alpha<sub>2</sub>-AR werden in Abhängigkeit von der Dauer der Agonisteneinwirkung reguliert. Eine kurzfristige Behandlung von Zelllinien des Huhns und der Ratte mit Catecholaminen führte zu einer Desensitivierung  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren, d.h. zu einer schnellen und reversiblen Entkopplung der Rezeptoren von ihren funktionellen G-Proteinen, gefolgt von einer Internalisierung des Proteins in das Zytoplasma. Das Rezeptorprotein wird bei der Desensitivierung nicht degradiert und seine Funktion nach Beendigung der Agonisteneinwirkung schnell wiederhergestellt (BOEHM et al., 1995). Eine kurzfristige Stimulation der drei in einer Hamsterzelllinie (CHO-Zellen) exprimierten humanen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren mit Adrenalin resultierte in einer Desensitivierung des A- und des B-Subtypen (EASON und LIGGETT, 1992; HECK und BYLUND, 1998). Nach einer 24stündigen Adrenalinexposition wurden alle drei Rezeptorsubtypen desensitiviert, der  $\alpha_{2C}$ -AR allerdings in einem um das vierfache geringeren Ausmaße als der A- und B-Subtyp (EASON und LIGGETT, 1992). DAUNT et al. (1997) untersuchten mit Hilfe immunocytochemischer Techniken, wie sich eine Agonistenbehandlung verschiedener Zelllinien auf eine Internalisierung membranständiger  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren in den intrazellulären Raum auswirkt. Sie hingegen zeigten, daß sich nach einer Agonistenexposition der Zellen membranständige  $\alpha_{2A}$ -AR nicht internalisieren ließen, während  $\alpha_{2B}$ -AR und  $\alpha_{2C}$ -AR zum Teil von der Zellmembran in intrazelluläre Regionen verschwanden. Der größte Anteil des  $\alpha_{2C}$ -AR befand sich unabhängig von der Agonisteneinwirkung ständig in intrazellulären Kompartimenten. Die Herunterregulierung (*downregulation*) G-Proteingekoppelter Rezeptoren, die durch Rezeptorautoradiographie dokumentiert werden kann und nach einer dauerhaften Agonisteneinwirkung (Stunden bis Tage) auftritt, stellt eine langfristigen Abnahme der Rezeptordichte an der Zelloberfläche dar. Sie ist kurzfristig nicht reversibel, da zur Wiederherstellung des physiologischen Ausgangszustandes in der Regel eine Neusynthese des Rezeptorproteins erforderlich ist (COLLINS et al., 1992; DAUNT et

al., 1997; HECK und BYLUND, 1998). Der Mechanismus der Herunterregulierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptorproteine ist noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit konnte erstmalig eine streßbedingte Abnahme der mRNA  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren dokumentiert werden - ein Prozeß, aus dem sich eine langfristig verringerte Synthese des Rezeptorproteins erklären ließe.

Im vorherigen Kapitel wurde bereits darauf hingewiesen, daß neben dem catecholaminergen Einfluß auf die HPA-Achsenaktivität auch umgekehrt vom hormonalen System eine Modulationswirkung auf das zentrale  $\alpha$ -adrenerge Rezeptorsystem ausgeht (JHANWAR-UNIYAL und LEIBOWITZ, 1986; FEUVRIER et al., 1998). Die Experimente an hypothalamischen Slicepräparaten belegen, daß eine chronische Einwirkung von Steroiden auf den Hypothalamus eine reduzierte Genexpression  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren zur Folge haben kann (FEUVRIER et al., 1998). Interessanterweise wird in der Arbeit von FEUVRIER et al. deutlich, daß der Proteinkinase C (PKC) eine Schlüsselrolle bei der stimulierenden Wirkung von NA auf die CRH-Synthese im Hypothalamus unter Einfluß von Steroiden zukommt. In diesem Zusammenhang fanden REUTTER und Mitarbeiter (1997) heraus, daß nach der Behandlung einer Astrozytenkultur mit PKC und durch Steigerung des intrazellulären cAMP-Niveaus die mRNA  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren herunterreguliert wird. Sie führten den Effekt auf eine Reduzierung der Transkription des Rezeptorgens zurück. In einer anderen Arbeit wurde allerdings eine durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes vermittelte Steigerung der Transkription des humanen  $\alpha_{2A}$ -AR beschrieben (SAKAUE und HOFFMAN, 1991).

Eine dauerhafte Behandlung einer Hamsterzelllinie mit  $\beta_2$ -AR-Agonisten führte zu einer Reduktion der Halbwertszeit, also zu einer Destabilisierung der mRNA  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren (HADCOCK et al., 1989). Dieser Effekt wurde ebenfalls auf die Erhöhung des zellulären cAMP-Gehaltes zurückgeführt (HADCOCK und MALBON, 1991).

Eine cAMP-abhängige Reduktion der Transkriptionsrate  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptorgene ist mehrfach beschrieben worden. Dieser modulatorische Effekt wird bei  $\beta_2$ -AR bestimmten Transkriptionsfaktoren, sogenannten CREB (*cAMP response element binding proteins*) zugeschrieben, die, durch cAMP induziert, an CRE (*cAMP response elements*) in der Promotorregion des Rezeptorgens binden (LEFKOWITZ und CARON, 1988; HADCOCK und MALBON, 1991; COLLINS et al., 1992). Da die N-terminalen Promotorbereiche der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene bisher nicht kloniert und sequenziert werden konnten, kann keine Aussage über transkriptionsregulierende Promotorsequenzen bei *Tupaia belangeri* getroffen

werden. In den Promotorregionen der  $\alpha_{2A}$ -AR des Menschen und der Ratte sind CRE-Sequenzen vermutet, jedoch nicht identifiziert worden (HANDY und GAVRAS, 1992; HANDY et al., 1995). Im 5'-Promotorbereich des  $\alpha_{2A}$ -AR der Ratte wurde allerdings ein Motiv gefunden, das eine positiv wirkende *Sp1*-Konsensus-Sequenz überlappt und durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren die Gentranskription negativ beeinflussen kann (MACLEOD et al., 1992; GIOVANE et al., 1994). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß *Sp1*-Transkriptionsfaktoren von PKC phosphoryliert werden können und dadurch eine geringere DNA-Bindungsaffinität erhalten (LEGGETT et al., 1995). Es ist denkbar, daß Streß mittels Aktivierung der PKC und einer Akkumulation des zellulären cAMP-Gehalts zu Veränderungen in der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Konsensus-Sequenzen führt, was die Gentranskription  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren negativ beeinflussen könnte.

Die Erhöhung des zellulären cAMP-Gehaltes wird unter anderem durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase hervorgerufen. Diese Aktivierung wird zum Teil von stimulierenden  $G_s$ -Proteinen vermittelt, die an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren gekoppelt sind. Die Kopplung von  $\alpha_2$ -AR an inhibierende  $G_i$ -Proteine und einer damit verbundenen Reduktion der Adenylatcyclase (AC) und des second messengers cAMP ist in nahezu allen bisher untersuchten Systemen beschrieben worden (EASON und LIGGETT, 1996; siehe dazu auch Kap. 1. 2. 2.). In Zellmembranen einer CHO-Zelllinie, die mit den humanen  $\alpha_2$ -AR transfiziert wurde, konnte nach einer Stimulation mit dem synthetischen  $\alpha_2$ -AR-spezifischen Agonisten UK-14304 in hoher Konzentration ebenfalls eine funktionelle Kopplung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren an  $G_s$ -Proteine detektiert werden, die eine Aktivierung der AC und der cAMP-Synthese zur Folge hatte (EASON et al., 1992). Das stärkste Kopplungsvermögen an  $G_s$ -Proteine wurde dabei für den  $\alpha_{2A}$ -Subtyp ermittelt. Möglicherweise kann ein cAMP-stimulierender Mechanismus *in vivo* und bei hohen Catecholaminkonzentrationen (z.B. bei Streß) auch durch  $\alpha_2$ -AR vermittelt werden und ist rückwirkend für eine Veränderung der Transkription  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren verantwortlich. Es ist aber auch möglich, daß nach einer streßbedingten Reduzierung  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren verstärkt  $G_s$ -vermittelte intrazelluläre Second-Messenger-Systeme durch  $\beta$ -AR übertragen werden. Ligandenbindungsstellen für  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR konnten im gesamten Tupaia-Gehirn detektiert werden (FLÜGGE et al., 1997) und im Gehirn der Ratte wurde demonstriert, daß  $\beta_2$ -AR präsynaptisch in noradrenergen Neuronen des LC exprimiert sind und auf sie einen stimulatorischen Kontrollmechanismus ausüben (DAHLÖF et al., 1981; HANDLEY und SINGH, 1986).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sind erstmals die für die  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C codierenden Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Sequenzen von *Tupaia belangeri* kloniert und die Verteilung ihrer Boten-RNA (mRNA)-Transkripte im Gehirn von *Tupaia* beschrieben worden. Im Vordergrund stand die Beantwortung der Frage, ob chronischer psychosozialer Streß einen Einfluß auf die zentralnervöse mRNA-Expression der  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene ausübt.

Aus Hirn- und Nierengewebe wurden mit Hilfe der *Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion* (RT-PCR) die gencodierenden Sequenzen des  $\alpha_{2A}$ -AR und des  $\alpha_{2B}$ -AR sowie 90 % der cDNA-Sequenz des  $\alpha_{2C}$ -adrenergen Rezeptorgens von *Tupaia* kloniert und sequenziert. Vergleiche der aus den cDNA-Klonen hergeleiteten Aminosäuresequenzen mit den entsprechenden Sequenzen unterschiedlicher Spezies deutet auf eine stammes-geschichtlich größere Nähe von *Tupaia belangeri* zu den Primaten als zu den Nagern hin.

Aus den cDNA-Klonen wurden  $^{35}\text{S}$ -markierte cRNA-Sonden synthetisiert und diese mit Hirngewebeschnitten *in situ*-hybridisiert. Die autoradiographische Auswertung der *in situ*-Hybridisierungssignale zeigte regional spezifische und zum Teil überlappende Expressions-muster der drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptorgene im Gehirn von *Tupaia belangeri*. Der  $\alpha_{2A}$ -AR konnte in fast allen Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) detektiert werden und erzeugte die intensivsten Hybridisierungssignale in den Zentren noradrenerger und adrenerger Neurone im Hirnstamm, dort vor allem Locus coeruleus. mRNA Expression des  $\alpha_{2C}$ -AR wurde ebenfalls in den meisten untersuchten Hirnarealen nachgewiesen, erreichte im Vergleich zum A-Subtypen jedoch ein durchschnittlich schwächeres Niveau. In den Basalganglien des Vorderhirns wies der  $\alpha_{2C}$ -AR die stärkste Expression unter den drei  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren auf. Der  $\alpha_{2B}$ -AR zeigte sich im ZNS verhältnismäßig schwach exprimiert und war lediglich im Thalamus stärker als die A- und C-Rezeptorsubtypen vertreten.

Eine dauerhafte Konfrontation männlicher Tupaias mit einem dominanten Artgenossen resultierte in einer signifikanten Konzentrationserhöhung des Streßhormons Cortisol im Urin und in einer Reduzierung des Körpergewichts der subordinaten Tiere. Durch eine semi-quantitative Auswertung *in situ*-hybridisierter Hirnpräparate der psychosozial gestressten Tupaias und von nicht-konfrontierten Kontrolltieren konnte in Neuronen der

Hirnstamm-Nuclei des Locus coeruleus, des Nucleus tractus solitarii, des lateralen retikulären Tegmentums und in der Massa intercalata der Amygdala eine streßabhängige Reduktion der mRNA-Transkripte  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptoren nachgewiesen werden. In Neuronen des dorsalen motorischen Vaguskerne, der CA3-Region im Hippocampus und der zweiten Zellschicht des frontalen Cortex konnte keine streßbedingte Genregulation des  $\alpha_{2A}$ -AR detektiert werden. Bezüglich der mRNA-Expression des  $\alpha_{2B}$ -AR und des  $\alpha_{2C}$ -AR zeigte sich in keiner der ausgewerteten Hirnregionen signifikante Unterschiede zwischen gestressten und nicht-gestressten Tieren.

Die Ergebnisse zeigen, daß chronischer psychosozialer Streß bei *Tupaia belangeri* zu einer regional und subtyp-spezifischen Reduzierung der mRNA-Transkripte  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren führt. Bei der streßinduzierten Reduktion  $\alpha_{2A}$ -spezifischer Hybridisierungssignale in den catecholaminergen Hirnzentren handelt es sich möglicherweise um Gentranskripte, die für präsynaptisch lokalisierte Autorezeptoren codieren. Autorezeptoren regulieren durch eine negative Rückkopplungswirkung die Aktivität der Neurone. Eine durch die Abnahme der mRNA bedingte Reduktion dieser Rezeptoren würde den Autoregulationsmechanismus noradrenerger Zellen beeinträchtigen und damit einen maßgeblichen Beitrag zu der bei *Tupaia* und anderen Spezies beobachteten erhöhten Aktivität des zentralnervösen noradrenergen Systems bei psychosozialem Streß leisten.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie E. D. und Jacobs B.L. (1987): Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaption to chronically presented stressful stimuli. *J. Neurosci.* 7: 2844-2848.
- Aghajanian G. K., Cederbaum J. M. und Wang R. Y. (1977): Evidence for norepinephrine mediated collateral inhibition of locus coeruleus. *Brain Res.* 136: 570-577.
- Aghajanian G. K. und van der Maelen C. P. (1982):  $\alpha$ -2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* 215: 1394-1396.
- Ahlquist R. P. (1948): Study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600.
- Åkerman K. E. O., Holmberg C. I., Gee H.-F., Renvaktar A., Soini S., Kukkonen J. P., Näsman J., Enkvist K., Courtney M. J. und Jansson C. (1995):  $\alpha$ -2-adrenergic receptor activation and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . In Lanier S. M. und Limbird L. E. (eds.):  $\alpha$ -2-adrenergic receptors. Structure, function and therapeutic implications. Harwood Academic Publishers, Luxembourg. pp. 85-93.
- Arango V., Ernsberger P., Sved A. F. und Mann J. J. (1993): Quantitative autoradiography of  $\alpha$ -1- and  $\alpha$ -2-adrenergic receptors in the cerebral cortex of controls and suicide victims. *Brain Res.* 630: 271-282.
- Arango V., Underwood M. D. und Mann J. J. (1996): Fewer pigmented locus coeruleus neurons in suicide victims: preliminary results. *Biol. Psychiatry* 39: 112-120.
- Aston-Jones G. und Bloom F. E. (1981): Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J. Neurosci.* 1: 876-886.
- Aston-Jones, G. (1985): Behavioural functions of locus coeruleus derived from cellular attributes. *Physiol. Psychol.* 13: 118-126.
- Aston-Jones G., Astier B. und Ennis M. (1992): Inhibition of noradrenergic locus coeruleus neurons by C1 adrenergic cells in the rostral ventral medulla, *Neuroscience* 48: 371-381.
- Aston-Jones G., Shipley M., Chouvet G., Ennis M., Van Bockstaele E., Pieribone V., Shiekhatter R., Akaoka H., Drolet G., Astier B., Charlety P. Valentino R. und Williams J. (1991): Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology, *Prog. Brain Res.*, 88: 47-75.
- Aue D. (1989): Konfrontation zwischen männlichen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*). Konsequenzen der Sozialkontakte für Verhalten und Physiologie sowie der Einfluß individueller und äußerer Faktoren auf die Dominanzentscheidung. Dissertation, Göttingen.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Struhl K. (eds, 1988): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Autrum H. und von Holst D. (1986): Sozialer "Stress" bei Tupajas (*Tupaia glis*) und seine Wirkung auf Wachstum, Körpergewicht und Fortpflanzung. *Z. vergl. Physiol.* 58: 347-355.
- Axelrod J. und Reisine T.D. (1984): Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.

- Banda P. W., Tuttle M. S. Sherry A. E., Blois M. S. (1980): Total creatinine content of the first morning urine is independent of dietary change. *Clin. Chem.* 26: 535-536.
- Beidler L.M. (1987): Taste. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart. p. 1183.
- Bentley S. M., Drew G. M. und Whiting S. B. (1977): Evidence for two distinct types of postsynaptic  $\alpha$ -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol* 61: 116P-117P.
- Bernstein J. G. (1987): Anxiety, Drug Therapy. In Adelman G. (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 59-60.
- Berthelson S. und Pettinger W. A. (1977): A functional basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Life Sci.* 1: 171-183
- Bertolino M., Vicini S., Gillis R. und Travagli A. (1997): Presynaptic  $\alpha(2)$ -adrenoceptors inhibit excitatory synaptic transmission in rat brain stem. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 35: 654-661.
- Blaxall H. S., Cerutis D. R., Hass N. A., Iversen L. J. und Bylund D. B. (1994): Cloning and expression of the  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor from the OK cell line. *Mol. Pharmacol.* 45: 176-181.
- Boehm S, Huck S, Schwarz K, Agneter E, Drobny H, Singer EA (1995): Rapid agonist-induced desensitization of  $\alpha_2$ -autoreceptors modulating transmitter release. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1143-1148.
- Bolam J. P. und Bennett B. D. (1995): Microcircuitry of the Neostriatum. In Ariano M. A. und Surmeier D. J. (ed.): *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. R. G. Landes Co., New York: pp. 1-19.
- Boyajian C. L., Loughlin S. E. und Leslie F. M. (1987): Anatomical evidence for  $\alpha$ -2-adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 1079-1091.
- Brady L. S. (1994): Stress, antidepressant drugs and the locus coeruleus. *Br. Res. Bull.* 35: 545-556.
- Brody J.M. (1987): Central regulation of blood pressure. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 142-143.
- Bylund D.B. (1985): Heterogeneity of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 835-843.
- Bylund D.B. (1988): Subtypes of  $\alpha_2$ -adrenoceptor: Pharmacological and molecular biological evidence converge. *T.i.P.S.* 9: 356-361.
- Bylund D. B. (1992): Subtypes of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *FASEB J.* 6: 832-839.
- Carter BZ, Malter JS (1991): Biology of disease. Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. *Lab. Invest.* 65: 610-621.
- Cirelli C., Pompeiano M. und Tononi G. (1996): Neuronal gene expression in the waking state. A role for the locus coeruleus. *Science* 274: 1211-1215.
- Chan-Palay V. und Asan E. (1989a): Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in human brains of young and older adults. *J. Comp. Neurol.* 287: 373-392.

- Chan-Palay V. und Asan E. (1989b): Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in human brains of normal young and older adults and in depression. *J. Comp. Neurol.* 287: 357-372.
- Chruscinski A. J., Link R. E., Daunt D. A., Barsh G. S. und Kobilka B. K. (1992): Cloning and expression of the mouse homolog of the human  $\alpha_2$ -C2 adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 186: 1280-1287.
- Collins S., Caron M. G. und Lefkowitz R. J. (1992): From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.* 17: 37-39.
- Corrodi H., Fuxe K und Hökfelt T. (1968): The effect of immobilization stress on the activity of central monoamine neurons. *Life Sci.* 7: 107-112.
- Dahlöf C., Engberg G. und Svensson T. H. (1981): Effects of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists on the firing rate of noradrenergic neurones in the locus coeruleus of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317: 26-30.
- Dahlström A. und Fuxe K. (1964): Evidence for the existence if monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl. 232): 1-55.
- Dahlström A. (1987): The adrenergic nervous system. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 11-14.
- Daunt D. A., Hurt C, Hein L., Kallio J., Feng F. und Kobilka B. K. (1997): Subtype-specific intracellular trafficking of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* 51: 711-720.
- Dickinson K. E. J. und Lefkowitz R. J. (1987): Adrenergic receptors. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 14-16.
- Dohlman HG, Thorner L, Caron MG und Lefkowitz RJ (1991): Model system for the study of 7-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-688.
- Doxey J. C., Smith C. F. C. und Walker J. M. (1977): Selectivity of blocking agents for pre- and postsynaptic  $\alpha$ -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 60: 91-96.
- Dubocovich M. L. und Langer S. Z. (1974): Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and postsynaptic adrenergic receptors. *J. Physiol. (London)* 237: 505-519.
- Dunn A. J. (1987): Neurochemistry of stress. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 1146-1148.
- Eason, M. G., Kurose H., Holt B. D., Raymond J. R. und Liggett S. B. (1992): Simultaneous coupling of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. *J. Biol. Chem.* 267: 15795-15801.
- Eason MG und Liggett SB (1992): Subtype selecticve desensitization of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. Different mechanisms control short and long term agonist promoted desensitization of  $\alpha_2$ C10,  $\alpha_2$ C4 and  $\alpha_2$ C2. *J. Biol. Chem.* 267: 25473-25479.
- Eason M. G. und Liggett S. B. (1996): Chimeric mutagenesis of putative G-protein coupling domains of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 12826-12832.

- Ennis M, Aston-Jones G (1986): Evidence for self- and neighbor-mediated postactivation inhibition of locus coeruleus neurons. *Brain Res.* 374: 299-305.
- Feuquier E., Aubert M., Mausset, A.L., Alonso, G., Gaillet, S., Malaval, F. und Scafarczyk A. (1998): Glucocorticoids provoke a shift from  $\alpha_2$ - to  $\alpha_1$ -adrenoceptor activities in cultured hypothalamic slices leading to opposite noradrenaline effect on corticotropin releasing hormone release. *J. Neurochem.* 70: 1199-1209.
- Flügge G, Jurdzinski A, Brandt S, Fuchs E (1990): Alpha2-adrenergic binding sites in the medulla oblongata of tree shrews demonstrated by in vitro autoradiography: species related differences in comparison to the rat. *J. Comp. Neurol.* 297: 253-266.
- Flügge G, Jöhren O, Fuchs E (1992): [ $^3$ H]Rauwolschine binding sites in the brain of male tree shrews are related to social status. *Brain Res.* 597: 131-137.
- Flügge G (1996): Alterations in the central nervous  $\alpha_2$ -adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. *Neuroscience* 75: 187-196.
- Flügge G., Ahrens O., Fuchs E. (1997): Monoamine receptors in the prefrontal cortex of *Tupaia belangeri* under chronic psychosocial stress. *Cell Tissue Res.* 288: 1-10.
- Flügge G., Ahrens O., Fuchs E. (1997): Beta-adrenoceptors in the tree shrew brain. I. Distribution and characterization of [ $^{125}$ I]iodocyanopindolol binding sites. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17: 401-415.
- Folin O. (1905): A theory of protein metabolism. *Amer. J. Physiol.* 13: 117-138.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983): Nucleus locus coeruleus: New evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol. Rev.* 63: 844-914.
- Foote S. L. (1987): Locus Ceruleus. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 596-597.
- Fuchs E., Jöhren O. und Flügge G. (1993): Psychosocial conflict in the tree shrew: effects on sympathoadrenal activity and blood pressure. *Psychoneuroendocrinology* 18: 557-565.
- Fuchs E., Uno H. und Flügge G. (1995): Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. *Brain Res.* 32: 176-180.
- Fuchs E., Kramer M., Hermes B., Netter P. und Hiemke C. (1996): Psychosocial stress in the tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 219-228.
- Gaillet S., Alonso G., Le Borgne R., Barbanel G., Malaval F., Assenmacher I. und Scafarczyk A. (1993): Effects of discrete lesions in the ventral noradrenergic ascending bundle of the corticotropin stress response depend on the site of the lesion and on the plasma levels of adrenal steroids. *Neuroendocrinology* 58: 408-419.
- Gillis RA, Gatti PJ, Quest JA (1985): Mechanism of the antihypertensive effect of  $\alpha_2$ -agonists. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 7: 38-44.
- Giovane A., Pintzas A., Maira S. M., Sobieszczuk und Wasylyk B. (1994): Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev.* 8: 1502-1513.
- Gold P.W., Goodwin F.K., Chrousos G.P. (1988): Clinical and biochemical manifestations of depression. *N. Engl. J. Med.* 319: 413-420.

- Granata A. R., Kumada M. und Reis D. J. (1985): Sympathoinhibition by A1-noradrenergic neurons is mediated by neurons in the C1 area of the rostral medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.* 14: 387-395.
- Hadcock J. R., Wang H. Y., Malbon C. (1989): Agonist-induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* 264: 19928-19933.
- Hadcock J. R. und Malbon C. C. (1991): Regulation of receptor expression by agonists: transcriptional and post-transcriptional controls. *T.i.N.S.* 14: 242-247.
- Haines D. E. und Swindler D. R. (1972): Comparative neuroanatomical evidence and the taxonomy of the tree shrews (Tupaia). *J. Hum. Evolution* 1: 407-420.
- Handley S. L. und Singh L. (1986): Involvement of the locus coeruleus in the potentiation of the quipazine-induced head-twitch response by diazepam and beta-adrenoceptor agonists. *Neuropharmacol.* 25: 1315-1321.
- Handy D. E. und Gavras H. (1992): Promoter region of the human  $\alpha_2$ A-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* 267: 24017-24022.
- Handy D. E., Zanella MT, Kanemaru A, Tavares A, Flordellis C Haralambos GA (1995): A negative regulatory element in the promoter region of the rat  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptor gene overlaps an SP1 consensus binding site. *Biochem. J.* 311: 541-547.
- Harrison J. K., D'Angelo D. D., Zeng D. und Lynch K. R. (1991): Pharmacological characterization of rat  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* 40: 407-412.
- Heck D. A. und Bylund D. B. (1998): Differential down-regulation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Life Sciences* 62: 1467-1472.
- Holz G. G., Raue S. G. und Dunlap K. (1986): GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319: 670-672.
- Hotels VR (1990): The anatomy and function of noradrenaline in the mammalian brain. In: Heal, DJ Marsden CA (eds): *The Pharmacology of Noradrenaline in the Central Nervous System*. Oxford University Press, New York: pp. 1-40.
- Hökfelt T, Johansson O, Menek G (1984): Chemical anatomy of the brain, *Science* 225: 1326-1334.
- Jang C-S. (1940): The potentiation and paralysis of adrenergic effects by ergotoxine and other substances. *J. Pharmacol.* 71: 87-94.
- Jhanwar-Uniyal M. und Leibowitz S.F. (1986): Impact of circulating corticosterone on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -noradrenergic receptors in discrete brain areas. *Brain Res.* 368: 404-408.
- Johnston AL (1991): The implication of noradrenaline in anxiety. In Briley M, File SE (eds): *New Concepts in Anxiety*. CRC Press, Boston: pp. 347-365.
- Jones BE (1991): Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation. In Barnes CD, Pompeiano O (eds): *The locus coeruleus*. Progress in Brain Research 88. Elsevier, Amsterdam: pp. 15-30.
- Jones B. E., Yang T. Z. (1985): The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.* 242: 56-92.

- Kalen P., Rosegren E., Lindvall O. und Björkland A. (1989): Hippocampal noradrenaline and serotonin release over 24 hours as measured by the dialysis technique in freely moving rats: correlation to behavioural activity state, effect of handling and tail-pinch. *Eur. J Neurosci.* 1: 181-188.
- Kayama Y., Negi T., Sugitani M., Iwama K. (1982): Effects of locus coeruleus stimulation on neuronal activities of dorsal lateral geniculate nucleus and perigeniculate reticular nucleus of the rat. *Neuroscience* 7: 655-66.
- Kobilka B. K., Matsui H, Kobilka T.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  $\alpha_2$ -adrenergic receptor, *Science* 238: 650-656.
- Kobilka B. K. (1995): Adrenergic receptor structure and activation. In Ruffolo R. R. (ed.): *Adrenoceptors. Structure, Function and Pharmacology.* Harwood Academic Publishers, Luxembourg. pp. 119-124.
- Kubo T, Goshima Y, Hata H, Miso Y (1990): Evidence that endogenous catecholamines are involved in  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated modulation of the aortic baroreceptor reflex in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Brain Res.* 526: 313-317.
- Kuchel O. (1992): Stress and Catecholamines. In Jasmin G. und Cantin M. (eds.): *Neuroendocrinology of stress. Methods achieve exp. pathol.* 14. Karger, Basel: pp. 80-103.
- Langer SZ (1974): Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 23: 1793-1800.
- Langer SZ (1997): 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *T.i.P.S.* 18: 95-99.
- Lanier SM, Downing S, Duzic E, Homcy CJ (1991): Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 266: 10470-10478
- Lazarus, R. S. (1966): *Psychological stress and the coping process.* McGraw-Hill Book Co., New York und London.
- Lee A., Rosin D. L. und Van Bockstaele E. J. (1998 a):  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors in the rat nucleus locus coeruleus: subcellular localization in catecholaminergic dendrites, astrocytes, and presynaptic axon terminals. *Brain Res.* 795: 157-169.
- Lee A., Rosin D. L. und Van Bockstaele E. J. (1998 b): Ultrastructural evidence for prominent postsynaptic localization of  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptors in catecholaminergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.* 394: 218-229.
- Lefkowitz R. J. und Caron M. G. (1988): Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 4993-4996.
- Leggett R. W., Armstrong S. A., Barry D. und Mueller C. R. (1995): SP1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J. Biol. Chem.* 270: 25879-25884.
- Liggett SB, Ostrowski J, Chestnut LC, Kurose H, Raymond JR, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992): Sites in the third intracellular loop of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor confer short term agonist-

- promoted desensitization-evidence of a receptor kinase-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 267: 4740-4746.
- Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A, Kobilka BK (1992): Cloning of two mouse genes encoding  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse  $\alpha_2$ -C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Mol. Pharmacol.* 42: 16-27.
- Link R. E., Stevens M. S., Kulatunga M., Scheinin M., Barsh G. S. und Kobilka B. K. (1995): Targeted inactivation of the gene encoding the mouse  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor homolog. *Mol. Pharmacol.* 48: 48-55.
- 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  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 273: 803-805.
- Liu J. P., Clarke I. J., Funder, J. W. und Engler D. (1991): Evidence that the central noradrenergic and adrenergic pathways activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the sheep. *Endocrinology* 129: 200-209.
- Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): Expansion of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5094-5098.
- Luckett W.P. (1980): The suggested evolutionary relationship and classification of tree shrews. In Luckett W.P. (ed.): *Comparative biology and evolutionary relationships of tree shrews*. Plenum Press, New York: pp. 3-31.
- MacLeod K., Leprince D und Stehelin D. (1992): The ets gene family. *Trends Biochem. Sci* 7: 251-256.
- MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M (1997): Gene targeting - homing in on  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor function. *T.i.P.S.* 18: 211-219.
- MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE (1996): Central hypotensive effects of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Science* 273: 801-803.
- MacKinnon AC, Spedding, M Brown C.M (1994):  $\alpha_2$ -Adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences. *T.i.P.S.* 15: 119-123.
- Magarinos AM, McEwen BS, Flügge G Fuchs E (1996): Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* 16: 3534-3540.
- Mamalaki E., Kvetnansky R., Brady L. S., Gold P. W. und Herkenham M. (1992): Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain. *J. Neuroendocrinol.* 4: 689-699.
- Mann D. M. A., Lincoln J., Yates P. O., Stamp J. E. und Toper S. (1980): Changes in the monoamine containing neurons of the human central nervous system in senile dementia. *Br. J. Psychiatry* 136: 533-541.

- Mann D., Yates P. und Marcyniuk B. (1984): A comparison of changes of the nucleus basalis and locus coeruleus in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47: 201-203.
- Marjamäki A, Luomala K, Ala-Uotila S und Scheinin M (1993): Use of recombinant human  $\alpha_2$ -adrenoceptors to characterize subtype selectivity of antagonist binding. *Eur J Pharmacol* 246: 219-226.
- Martin R. D. (1990): Are tree shrews primates ? In Martin R. D. (ed.): *Primate origins and evolution*. Chapman and Hall, London: pp. 191-213.
- Mason, J. W. (1959): Psychological influences on the pituitary-adrenenal cortical system. *Recent Progr. Hormone Res.* 15: 345-389.
- McEwen B. S. (1987): Glucocorticoids. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 467-468.
- McEwen B. S. und Sapolsky R. M. (1995): Stress and cognitive function. *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 205-216.
- McEwen B. S. (1998): Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840: 33-44.
- Melia KR, Rasmussen K, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ, Duman RS (1992): Coordinate regulation of the cyclic AMP system with firing rate and expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus: effects of chronic stress and drug treatment. *J. Neurochem.* 58: 492-592.
- Michel A. D., Loury D. N. und Whiting R. L. (1989): Differences between the  $\alpha_2$ -adrenoceptor in rat submaxillary gland and the  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2B}$  adrenoceptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 98: 890-897.
- Millhouse O. E. (1986): The intercalated cells of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 247: 246-271.
- Milner T. A., Lee A., Aicher S. A. und Rosin D. A. (1998): Hippocampal  $\alpha_2$ -adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 395: 310-327.
- Miyashiro K, Dichter M. und Eberwine J. (1994): On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: Implications for neuronal functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10800-10804.
- Murphy T. J. und Bylund D. B. (1988): Characterization of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the OK cell, an opossum kidney cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 571-578.
- Nahorsky S. R., Barnett D. B. und Cheung Y. D. (1985):  $\alpha$ -adrenoceptor-effector coupling: affinity states or heterogeneity of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor ? *Clin. Sci.* 68 (Suppl. 10): 39s-42s.
- Neuman R. S. und Harley C. W. (1983): Long-lasting potentiation of the dentate gyrus population spike by norepinephrine. *Brain. Res.* 273: 162-165.
- Nichols M., Weih F., Schmid W., De Vack C., Kowentz-Leutz E., Luckow B., Boshart M. und Schütz G. (1992): Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP-induced gene-transcription. *EMBO* 11: 3337-3346.
- Nicholas AP, Pieribone, Hökfelt, T (1993): Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 328: 575-594.

- Nisenbaum LK, Abercrombie ED (1993): Presynaptic alterations associated with enhancement of evoked release and synthesis of norepinephrine in hippocampus of chronically cold-stressed rats. *Brain Res* 608: 280-287.
- Nisenbaum LK, Zigmond MJ, Sved AF, Abercrombie ED (1991): Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *J Neurosci* 11: 1478-1484.
- Ordway G.A., Streator-Smith K. and Haycock J. W. (1994): Elevated tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of suicide victims. *J. Neurochem.* 62: 680-685.
- Pacak K. Armando I, Komoly S., Fukuhara K., Weise V., Holmes C., Kopin J. und Goldstein D. (1992): Hypercorticosolemia inhibits yohimbine-induced release of norepinephrine in the postero-lateral hypothalamus of conscious rats. *Endocrinology* 131: 1369-1376.
- Palkovits M. und Zaborsky L. (1977): Neuroanatomy of central cardiovascular control. nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. *Prog. Brain Res.* 47: 9-34.
- Palkovits M., Zaborszky L., Fenninger A., Mezey E., Fekete M. I., Herman J. P., Kanycska B. und Szabo D. (1980): Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental biochemical and electron microscope studies. *Brain Res.* 191: 161-171.
- Pavcovich L. A., Cancela L. M., Volosin M., Molina V. A., Ramirez O. A. (1990): Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. *Brain Res. Bull.* 24: 293-296.
- Paxinos G. und Watson C. (1986): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Peralta E. G., Winslow J. W., Peterson G. L., Smith D. H., Ashkenazy A., Ramachandran J., Schimerlik M. I. und Capon D. J., (1987): Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 236: 600-605.
- Raab A und Storz H (1976) A long-term study on the impact of sociopsychic stress in tree shrews (*Tupaia belangeri*) on central and peripheral tyrosine hydroxylase activity. *J. Comp. Physiol.* 108: 115-131.
- Rasmussen K. und Aghajanian G. (1987): Response of locus coeruleus neurons to somatosensory stimuli is not blocked by lesions of two major efferent inputs. *Soc. Neurosci.* 13: 475 (Abstr. 133.3).
- Raymond J.R., Hnatowich M., Lefkowitz, R.J., Caron M.G. (1990): Adrenergic Receptors. Models for Regulation of Signal Transduction Processes. *Hypertension* 15: 119-131.
- 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  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 6301-6305
- Regan J. W. und Coteccia S. (1992): The  $\alpha$ -adrenergic receptors: new subtypes, pharmacology, and coupling mechanisms. In Brann M. R. (ed.): *Molecular biology of G-protein-coupled receptors*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 76-112.
- Reis D. J., Granata A. R., Joh T. H., Ross C. A., Ruggiero D. A., Park D. H. (1984): Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. *Hypertension*: II 7-15.

- Reutter M. A., Richards E. M., Sumners C (1997): Regulation of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor mRNA in rat astroglial cultures: role of cyclic AMP and protein kinase C. *J. Neurochem.* 68: 47-57.
- Rivier C. und Vale W. (1983): Modulation of stress-induced ACTH release by by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305: 325-327.
- Rogers R. C., Kita H., Butcher L. L. und Novin D. (1980): Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. *Brain Res. Bull.* 5: 365-373.
- Rosin D. L., Talley E.M., Lee A., Stornetta R.L., Gaylinn B.D., Guyenet P.G. und Lynch, K.R. (1996): Distribution of  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 372: 135-165.
- Rossetti Z., Portas C., Pani L., Carboni S. und Gessa G. (1990): Stress increases noradrenaline release in rat frontal cortex: Prevention by diazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 229-231.
- Ruffolo Jr. R. R., Nichols AJ, Stadel JM, Hieble, JP (1993): Pharmacologic and therapeutic applications of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 243-279.
- Sakaue M. und Hoffman B. B. (1991): cAMP regulates transcription of the  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptor gene in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 266: 5743-5749.
- 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. und Scheinin M. (1996): Genetic alteration of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonselective  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist. *Mol. Pharmacol.* 51: 36-46.
- Sambrook J, Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanders K. A. und Bruce N. W. (1997): A prospective study of psychosocial stress and fertility in women. *Hum. Reprod.* 12: 2324-9.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Sapolsky R. M., Armanini M. P., Packan D. R., Sutton S. W. und Plotsky P. M. (1990): Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretagogue release: relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites. *Neuroendocrinology* 51: 328-336.
- Sawchenko P. und Swanson L. (1982): The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res. Rev.* 4: 275-325.
- Scheinin M., Lomasney J. W., Hayden-Hixson D. M., Schambra U. B., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Freneau Jr. R. T. (1994): Distribution of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Mol. Brain Res.* 21: 133-149.
- Schöneshofer M. und Fenner M. (1981): A convenient and efficient method for the extraction and fractionation of steroid hormones from serum and urine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19: 71-74.
- Selye H. (1936): A syndrom produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.

- Selye H. (1942): Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* 30: 437-453.
- Schramm M. und Selinger Z. (1984): Message transmission: Receptor controlled adenylate cyclase system. *Science* 225: 1350-1356.
- Sharp P. A. (1987): Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235: 766-771.
- Shepherd G. M. (1994): *Neurobiologie*. Springer, Heidelberg.
- Simmoneaux V., Ebadi M. und Bylund D. B. (1991): Identification and characterization of  $\alpha_{2D}$  adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol. Pharmacol.* 40: 235-241.
- Smith M.A., Brady L. S., Glowa J., Gold P. W. und Herkenham M. (1991): Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus ceruleus by in situ hybridization. *Brain Res.* 544: 26-32.
- Stanhope M. J., Madsen O., Waddell V. G., Cleven G. C., de Jong W. W. und Springer M. S. (1998): Highly congruent molecular support for a diverse superordinal clade of edemic african mammals. Unveröffentlicht. Direkte Sequenzeingabe in GenBank, Accession-Nummer: Y15944.
- Starke K. (1971): Influence of  $\alpha$ -receptor stimulants on noradrenaline release. *Naturwissenschaften* 58: 420.
- Starke K. (1972): Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77: 1-124.
- Starke K., Borowsky T. und Endo T. (1975): Preferential blockade of presynaptic  $\alpha$ -adrenoceptors by yohimbine. *Eur. J. Pharmacol.* 34: 385-388.
- Starke K., Göthert M, Kilbinger H (1989): Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69: 864-989.
- Steward O., Kleinman R, Banker G (1994): Sorting and intracellular transport of RNA in neurons: regulation of gene expression at synaptic sites. In Harrison PJ (ed): *Regulation of gene expression and brain function*. Springer, Berlin: pp. 17-29.
- Stöhr W. (1986): Heart rate of tree shrews and its persistent modification by social contact. In Schmidt TH, Dembrowski TM, Blümchen G (eds): *Biological and Psychological Factors in Cardiovascular Disease*. Springer, Berlin: pp. 508-516.
- Stone E. A. (1975): Stress and catecholamines. In: Friedhoff AJ (ed): *Catecholamines and Behavior* 2. Plenum Press, New York: pp. 31-72.
- Strömberg E. (1987): Schizophrenia. In Adelman G (ed.): *Encyclopedia of neuroscience*. Birkhäuser, Stuttgart: pp. 1072-1074.
- Stryer L. (1988) *Hormone Action*. In *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York: pp. 975-1004.
- Svensson S. P. S., Bailey T. J., Pepperl D. J., Grundström N., Ala-Uotila S., Scheinin M., Karlsson J. O. G., Regan J. W. (1993): Cloning and expression of a fish  $\alpha_2$ -adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 110: 54-60.
- Svensson S. P. S., Bailey T. J., Porter A. C., Richman, J. G. und Regan, J. W. (1996): Heterologous expression of the cloned guinea pig  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$  and  $\alpha_2C$  adrenoceptors subtypes: radioligand

- binding and functional coupling to a cAMP-responsive reporter gene. *Biochem. Pharmacol.* 51: 291-300.
- Swanson L. W. und Hartman B. K. (1975): The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamin-beta-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.* 163: 467-505.
- Talley E. M., Rosin D. L., Lee A., Guyenet P. G. und Lynch K. R. (1996): Distribution of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 372: 111-134.
- Tigges J. und Shanta T. R. (1969): A stereotaxic brain atlas of the tree shrew (*Tupaia glis*). Williams und Wilkins, Baltimore.
- Umeda E., Satoh T., Nagashima H., Potter P. E., Tarkovacs G., Vizi E. S. (1997): alpha 2A subtype of presynaptic alpha 2-adrenoceptors modulates the release of [3H]-noradrenaline from rat spinal cord. *Brain Res. Bull.* 42: 129-132.
- Udenfried S., Diekmann-Gerber L., Brink L. und Spector S. (1985): Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing  $^{125}$ I-labelled ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 8672-8676.
- Unnerstall, J. R., Kopajtic T. A., Kuhar MJ (1984): Distribution of  $\alpha_2$  agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Res. Rev.* 7:69-101.
- Van Bockstaele, E. J. und Aston-Jones G. (1992): Collateralized projections from neurons in the rostral medulla to the nucleus locus coeruleus, the nucleus of the solitary tract and the periaqueductal gray. *Neuroscience* 49: 653-668.
- Von Holst D. (1972) Die Funktion der Nebennieren männlicher *Tupaia belangeri*. Nebennierengewicht, Ascorbinsäure und Glucocorticoide im Blut bei kurzem und bei andauerndem soziopsychischem Streß. *J. Comp. Physiol.* 78: 289-306.
- Von Holst D, Fuchs E, Stöhr W (1983): Physiological changes in male *Tupaia belangeri* under different types of social stress. In Dembrowski TM, Schmidt TH, Blümchen G (eds): *Biobehavioral Bases of Coronary Heart Disease*. Karger, Basel: pp. 382-390.
- Von Holst D., (1988): Heutige Spitzhörnchen. In Grizimek B. (ed.): *Enzyklopädie der Säugetiere*, Band 2, Kindler, München.
- Wamsley J. K., Alburges M. E., Hunt M. A. und Bylund D. B. (1992): Differential localization of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes in brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 267-273.
- Wang R, Macmillan LB, Freneau Jr. RT, Magnuson MA, Lindner J, Limbird LE (1996): Expression of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information impaired by 3 kb of 5' regulatory sequence for the  $\alpha_{2A}$ AR-receptor gene in transgenic animals. *Neuroscience* 74:199-218.
- Watanabe Y, McKittrick C. R., Blanchard D. C., Blanchard R. J., McEwen B. S., Sakai R. R. (1995): Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Mol. Brain Res.* 32: 176-180.
- Waterhouse B. D., Sessler F. M., Cheng J. T., Woodward D. J., Azizi S. A. und Moises H. C. (1988) New evidence for a gating action of norepinephrine in central neuronal circuits of mammalian brain. *Brain Res. Bull.* 21: 425-32.

- Weitzell R., Tanaka T. und Starke K. (1979): Pre- postsynaptic effects of yohimbine stereoisomerson noradrenergic transmission inn the pulmonary artery of the rabbit. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308: 127-136.
- Werner U., Starke K. und Schümann H. J. (1970): Wirkungen von Clonidin (ST 155) und BAY a 6781 auf das isolierte Kaninchenherz. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 266: 474.
- Winzer-Serhan U. H. und Leslie F. M. (1997):  $\alpha_{2B}$  adrenoceptor mRNA expression during rat brain development. Dev. Brain Res. 100: 90-100.
- Winzer-Serhan U. H., Raymon H. K., Broide, R. S., Chen Y. und Leslie F. M. (1997): Expression of  $\alpha_2$  adrenoceptors during rat brain development - I.  $\alpha_{2A}$  messenger RNA expression. Neuroscience 76: 241-260.
- Winzer-Serhan U. H., Raymon H. K., Broide, R. S., Chen Y. und Leslie F. M. (1997): Expression of  $\alpha_2$  adrenoceptors during rat brain development - II.  $\alpha_{2C}$  messenger RNA expression and [ $^3H$ ]rauwolscine binding. Neuroscience 76: 261-272.
- Yamamoto K. K., Gonzales G. A. Biggs III, W. H. und Montminy M. R. (1988): Phosphorylation-induced binding of transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature 334: 494-498.
- Zeng D, Harrison JK, D'Angelo DD, Barber CM, Tucker AL, Lu Z, Lynch KR (1990): Molecular characterization of a rat  $\alpha_{2B}$ -adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 3102-3106.
- Zeng D, Lynch KR (1991): Distribution of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor mRNAs in the rat CNS. Mol. Brain Res. 10: 219-225.
- Zilles K., Qu M. und Schleicher A. (1993): Regional distribution and heterogeneity of alpha-adrenoceptors in the rat and human central nervous system. J. Hirnforschung 34: 123-132.

## 7. METHODISCHER ANHANG

### 7. 1. Verbrauchsmaterial und Geräte

Die hier nicht erwähnten Chemikalien wurden in höchster Reinheit von den Firmen Merck, Darmstadt und Serva, Heidelberg bezogen. Wasser wurde in einer Milli-Q-Anlage (Millipore-Waters, USA) deionisiert und bei 121 °C / 1 bar autoklaviert.

| 7.1.1. Chemikalien                                                                                             | Hersteller                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Acrylamid                                                                                                      | Roth, Karlsruhe               |
| N,N' -Methylen-bisacrylamid                                                                                    | Roth, Karlsruhe               |
| Agarose I                                                                                                      | Whatman-Biometra, Göttingen   |
| Harnstoff                                                                                                      | Roth, Karlsruhe               |
| Natriumhydroxyd                                                                                                | J. T. Baker, Niederlande      |
| Salzsäure                                                                                                      | J. T. Baker, Niederlande      |
| Dextransulfat                                                                                                  | Pharmacia, Schweden           |
| Isoamylalkohol                                                                                                 | Roth, Karlsruhe               |
| Bacto-Agar, Bacto-Trypton                                                                                      | Difco Laboratories, USA       |
| BioMax-Autoradiographiefilme,<br>Photoemulsion NTB 2,<br>Entwickler D 19, LX 24,<br>Fixierer Polymax,<br>X-Gal | Kodak, USA<br>Roth, Karlsruhe |
| Tissue Tec                                                                                                     | Miles Inc., USA               |
| Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (24:24:1)                                                                 | Biometra-Whatman, Göttingen   |
| IPTG                                                                                                           | Boehringer, Mannheim          |
| Blau / Orange 6×Gel-Ladepuffer                                                                                 | Promega, USA                  |
| 7.1.2. Kompetente Zellen                                                                                       | Hersteller                    |
| Epicurian coli®                                                                                                |                               |
| Stamm XL 1-Blue                                                                                                | Stratagene, USA               |

| 7.1.3. Nucleotide                                                              | Hersteller                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| dNTP-Gemisch                                                                   | Boehringer, Mannheim                                 |
| rATP, rCTP, rGTP                                                               | Promega, USA                                         |
| [ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-UTP                                              | ICN, USA                                             |
| Oligonucleotid-Primer                                                          | Whatman-Biometra, Göttingen<br>KEBO Lab Oy, Finnland |
| $\lambda$ / <i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III -<br>DNA-Längenstandard            | Promega, USA                                         |
| 7.1.4. Enzyme (incl. Reaktionspuffer)                                          | Hersteller                                           |
| <u>Restriktions-Endonucleasen</u>                                              |                                                      |
| <i>Alw</i> 44 I, <i>Sac</i> I, <i>Stu</i> I                                    | Boehringer, Mannheim                                 |
| <i>Bst</i> XI, <i>Bpu</i> 1102I                                                | MBI Fermentas, Litauen                               |
| <i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> I                                                    | Pharmacia, Schweden                                  |
| <i>Bam</i> HI, <i>Not</i> I                                                    | Promega, USA                                         |
| <u>Ribonuclease-Inhibitor</u>                                                  |                                                      |
| RNasin®                                                                        | Promega, USA                                         |
| <u>Nucleasen</u>                                                               |                                                      |
| RNase A, DNase I                                                               | Promega, USA                                         |
| <u>DNA-Polymerase</u>                                                          |                                                      |
| Expand®High Fidelity PCR-System                                                | Boehringer, Mannheim                                 |
| <u>Modifizierende Enzyme</u>                                                   |                                                      |
| T7-, SP6-Reverse Transkriptase,<br>AMV-Reverse Transkriptase,<br>T4 DNA-Ligase | Promega, USA                                         |
| 7.1.5. Kits                                                                    | Hersteller                                           |
| <u>poly(A)<sup>+</sup>RNA-Extraktion</u>                                       |                                                      |
| Micro-Fast Tract Kit                                                           | Invitrogen, USA                                      |
| <u>cDNA-Erststrangsynthese</u>                                                 |                                                      |
| cDNA-Cycle Kit                                                                 | Invitrogen, USA                                      |
| <u>DNA-Gelelution</u>                                                          |                                                      |
| QIAEX II Gel Extraktion Kit                                                    | Qiagen GmbH, Hilden                                  |
| <u>DNA-Ligation</u>                                                            |                                                      |
| pGem-T Vector Systems                                                          | Promega, USA                                         |
| <u>in vitro-Transkription</u>                                                  |                                                      |

|                                                |                     |
|------------------------------------------------|---------------------|
| Riboprobe® Sytems                              | Promega, USA        |
| <u>DNA-Präparation</u>                         |                     |
| Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System | Promega, USA        |
| QIAGEN-tip 100 Plasmid Midi Kit                | Qiagen GmbH, Hilden |
| <u>DNA-Sequenzierung</u>                       |                     |
| Sequenase 2.0 DNA-Sequencing Kit               | Pharmacia, Schweden |

| 7.1.7. Geräte                                 | Hersteller                  |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| β-Counter <i>1209 RACKBETA</i>                | LKB, USA                    |
| Digitales Bildauswertungssystem               | Imaging Inc., Kanada        |
| Video Camera CCD 72                           | MTI,                        |
| Creatinine Analyzer 2                         | Beckman, USA                |
| Kryostat <i>1720</i>                          | Leitz                       |
| Mikroskop <i>Axioplan</i>                     | Zeiss                       |
| DNA-Sequenzierungssystem <i>Poker Face II</i> | Pharmacia-Heraeus, Schweden |
| Tischzentrifugen                              | Eppendorf, Hamburg          |
| Thermocycler <i>UNO II</i>                    | Whatman-Biometra, Göttingen |
| Horizontale Gel-Elektrophoresen               | Whatman-Biometra, Göttingen |
|                                               | Pharmacia, Schweden         |
| Geldokumentations-System                      |                             |
| Eagle Eye® II Still Video                     | Stratagene, USA             |

| 7.2. Puffer / Medium / Lösung | Zusammensetzung                                                                                                                                                     |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agarosegel-Lösung (1 %)       | 1 % (w/v) Agarose in 1×TBE,<br>0.5 mg / ml Ethidiumbromid                                                                                                           |
| Hybridisierungspuffer (ISH)   | 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0,<br>0.3 M NaCl, 1×Denhardt's Solution,<br>10 % (w/v) Dextransulfat, 0.1 µg / ml<br>tRNA, 0.1 M DTT, 50 % (v/v)<br>deion. Formamid |
| LB-Medium                     | 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 1 % (w/v)<br>Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt                                                                                          |
| LB-Selektiv-Agarplatten       | 1.5 % Agar in LB-Medium, 50 µg/ml<br>Ampicillin                                                                                                                     |

---

|                                                                         |                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NTE-Puffer                                                              | 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0,<br>1mM EDTA                                                                                               |
| Polyacrylamidgel-Lösung (PAGE, 7 %)<br>(Rotiphorese Gel 40), 10 % (v/v) | 42 % (w/v) Harnstoff, 17.5 % (v/v) 40<br>prozentige Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung<br>10×TBE, 0.1 % (v/v) TEMED, 0.8 %<br>Ammoniumpersulfat   |
| PFA-Fixierungslösung                                                    | 4 % (w/v) PFA in 1×PBS                                                                                                                        |
| PBS-Stammlösung (10 ×)                                                  | 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                     |
| SOC-Medium                                                              | 20 % (w/v) Bacto-Trypton, 0.5 % (w/v)<br>Hefeextrakt, 0.05 % (w/v) NaCl, 10 mM<br>MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose |
| SSC-Stammlösung (20 ×)                                                  | 3 M NaCl, 0.3 M Na <sub>3</sub> Citrat                                                                                                        |
| TE-Puffer                                                               | 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA                                                                                                              |
| TBE-Stammlösung (10 ×)                                                  | 1 M Tris, 0.85 M Borsäure,<br>20 mM EDTA                                                                                                      |

---

**8. ABKÜRZUNGEN**

|                  |                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A                | Adenin                                                                                                                   |
| Abb.             | Abbildung                                                                                                                |
| AC               | Adenylatcyclase                                                                                                          |
| ACTH             | Adrenocorticotrophes Hormon                                                                                              |
| AMV              | Avian Myeloblastosis Virus                                                                                               |
| AR               | Adrenerger Rezeptor                                                                                                      |
| AS               | Aminosäure                                                                                                               |
| bp               | Basenpaare                                                                                                               |
| C                | Cytosin                                                                                                                  |
| Ca <sup>++</sup> | Calcium-Ionen                                                                                                            |
| cAMP             | zyklisches Adenosin-Monophosphat                                                                                         |
| CCD              | charge coupled device (Ladungsgekoppeltes Bauelement)                                                                    |
| cDNA             | complementary DNA (komplementäre DNA)                                                                                    |
| CHO-Zellen       | Chinese Hamster Ovary cells (Hamster-Ovarzellen)                                                                         |
| Ci               | Curie (Maßeinheit der Radioaktivität)                                                                                    |
| Cl               | Chlor                                                                                                                    |
| cpm              | counts per minute (Maß für radioaktiven Zerfall, Radioaktivität eines Stoffes)                                           |
| CRE              | cAMP Response Element (Binderegion für CREB, die Transkription beeinflussendes Element in der Promotorregion eines Gens) |
| CREB             | cAMP response element binding protein (Transkriptionsfaktor; Protein, welches an CRE bindet)                             |
| cRNA             | complementary RNA (komplementäre RNA)                                                                                    |
| CRH              | Corticotrophin-Releasing-Hormon                                                                                          |
| dATP             | Desoxyadenosin-Triphosphat                                                                                               |
| dCTP             | Desoxycytidin-Triphosphat                                                                                                |
| dGTP             | Desoxyguanosin-Triphosphat                                                                                               |
| dTTP             | Desoxythymidin-Triphosphat                                                                                               |
| dNTP             | Desoxyribonucleosid-Triphosphat                                                                                          |
| ddNTP            | Didesoxyribonucleosid-Triphosphat                                                                                        |
| DEPC             | Diethylpyrocarbonat                                                                                                      |
| DMV              | Dorsaler motorischer Vaguskern                                                                                           |

---

|                  |                                                                                       |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA              | Desoxyribonucleinsäure                                                                |
| DNase            | Desoxyribonuclease (DNA-abbauendes Enzym)                                             |
| DTT              | Dithiothreitol                                                                        |
| EDTA             | Ethylendiamin-tetraacetat                                                             |
| EMBL             | European Molecular Biological Laboratories                                            |
| EtOH             | Ethanol                                                                               |
| G                | Guanin                                                                                |
| ×g               | Formelzeichen für die Gravitationsbeschleunigung                                      |
| G-Protein        | GTP-bindendes Protein                                                                 |
| GR               | Glucocorticoid-Rezeptor                                                               |
| GTP              | Guanosin-Triphosphat                                                                  |
| K <sup>+</sup>   | Kalium-Ionen                                                                          |
| <sup>3</sup> H   | Tritium                                                                               |
| h                | Stunde                                                                                |
| H <sub>2</sub> O | Wasser                                                                                |
| HPA-Achse        | hypothalamo-pituitary-adrenal axis<br>Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse |
| IPTG             | Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside                                                |
| ISH              | <i>In situ</i> Hybridisierung                                                         |
| LB               | Luria Bertanii                                                                        |
| LC               | Locus coeruleus                                                                       |
| M                | Molekulargewicht                                                                      |
| MeOH             | Methanol                                                                              |
| min              | Minute                                                                                |
| μl               | Mikroliter                                                                            |
| MP               | Maximum Parsimony                                                                     |
| mRNA             | messenger (Boten-) RNA                                                                |
| n                | Anzahl der Meßwerte                                                                   |
| N.               | Nucleus                                                                               |
| NA               | Noradrenalin                                                                          |
| NaAc             | Natriumacetat                                                                         |
| NaCl             | Natriumchlorid                                                                        |
| NaOH             | Natriumhydroxid                                                                       |
| NTE-Puffer       | NaCl-Tris-EDTA-Puffer                                                                 |

---

|                 |                                                                    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| NTS             | Nucleus tractus solitarii                                          |
| PAGE            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                    |
| PBS             | phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)      |
| PFA             | Paraformaldehyd                                                    |
| SSC             | Sodiumchloride-sodiumcitrate buffer                                |
| p               | Signifikanzniveau der Richtigkeit einer statistischen Aussage      |
| PCR             | Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)              |
| pH-Wert         | Maßzahl für die Konzentration der Wasserstoffionen in einer Lösung |
| PKC             | Proteinkinase C                                                    |
| RIA             | Radioimmuno-Assay                                                  |
| RNA             | Ribonucleinsäure                                                   |
| RNase           | Ribonuclease (RNA-hydrolysierendes Enzym)                          |
| RNasin®         | RNase-Inhibitor (PROMEGA)                                          |
| RT              | Reverse Transkription                                              |
| RT-PCR          | Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion                    |
| <sup>35</sup> S | Radioisotop des Schwefels                                          |
| SDS             | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)                      |
| SEM             | standard error mean (Mittlerer Fehler des Mittelwerts)             |
| T               | Thymin                                                             |
| t               | Formelzeichen für die Zeit                                         |
| T               | Formelzeichen für die Temperatur                                   |
| TBE             | Tris-Bor-EDTA                                                      |
| TEMED           | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                                 |
| U               | Uracil                                                             |
| UTP             | Uridintriphosphat                                                  |
| ü. N.           | über Nacht                                                         |
| U/min           | Umdrehungen in der Minute                                          |
| Vol             | Volumen                                                            |
| X-Gal           | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid                    |
| ZNS             | Zentrales Nervensystem                                             |

## DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. B. Brenig für die Vertretung der vorliegenden Arbeit gegenüber der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität in Göttingen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Fuchs für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel in der Abteilung für Neurobiologie am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen.

Einen besonderen Dank richte ich an Frau Dr. G. Flügge für die Vergabe des Themas, für die gute Betreuung und schließlich für die Revision der Arbeit. Ich möchte Frau Dr. Flügge weiterhin für die kompetente Unterweisung in allen neuroanatomischen Fragen und für die vielen anregenden Diskussionen danken.

An Herrn Prof. Dr. M. Scheinin geht mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragende Unterstützung meiner molekularbiologischen Experimente in der Abteilung für Pharmakologie der Universität Turku. Die motivierenden fachlichen Diskussionen und nicht zuletzt die erfrischenden Tage in den finnischen Schären trugen zum Gelingen dieser Arbeit und zu einem unvergessen bleibenden Jahr in Finnland bei.

Ich danke allen Mitarbeitern der Alpha<sub>2</sub> Adrenergic Receptor Group der Universität Turku für die freundschaftlich-kollegiale Zusammenarbeit. Einen besonderen Dank richte ich an Dr. J. Ruuskanen für seine Unterstützung bei der manuellen DNA-Sequenzierung.

Ich danke Herrn Dr. G. Dowe vom MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen für die spontane Übernahme der automatischen DNA-Sequenzierungen.

Ich danke allen Kollegen vom Deutschen Primatenzentrum, namentlich Frau S. Rudolph, Frau M. Vorwald, Frau S. Lüert und Herrn A. Heutz für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihren maßgebenden Beitrag zum experimentellen Teil dieser Arbeit und Frau M. Hampe für die prompte Erledigung der vielen fotografischen Reproduktionen. Besonders danke ich Frau Dr. U. Meyer für die gute Kooperation an der Laborbank und für die Freundschaft und Zerstreuung über diese hinaus.

Ein liebes Dankeschön richte ich an meine Eltern, die mir mit ihrem Rückhalt und ihrer stets gewährten Entscheidungsfreiheit ein Studium erst ermöglichten.

Mein größter Dank aber gilt meiner Frau Zerina, ohne deren Liebe, Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise unterstützt durch ein Stipendium des DAAD (HSP II AUFE) für Finnland und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 406).



## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name: Heiko Meyer  
Anschrift: Begasstr. 10, 12157 Berlin  
Geburtsdatum /-Ort: 31.01.1965 in Wittingen  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

### **Schulbildung**

1977 – 1984 Gymnasium Hankensbüttel  
15. 06. 1984 Abitur

### **Berufsausbildung**

1986 – 1988 Praktische Berufsausbildung zum Landwirt  
06. 08. 1988 Abschlußprüfung zum Landwirt

### **Hochschulstudium**

1988 – 1994 Studium der Agrarwissenschaften  
an der Georg-August-Universität Göttingen,  
Studienrichtung Tierproduktion  
10. 01. 1994 Abschlußprüfung zum Diplom-Agraringenieur (Dipl.-Ing. agr.)

### **Berufliche Tätigkeiten**

1994 – 1995 Auslandsstipendium des DAAD  
Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. M. Scheinin,  
Abt. Pharmakologie und Medizinische Pharmakologie,  
Universität Turku, Finnland  
1995 – 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen der Dissertation  
bei Prof. Dr. E. Fuchs, Abt. Neurobiologie  
am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen  
seit Dezember 1998 Anstellung als Wissenschaftlicher Verkaufsberater  
bei der Firma Stratagene Europe





