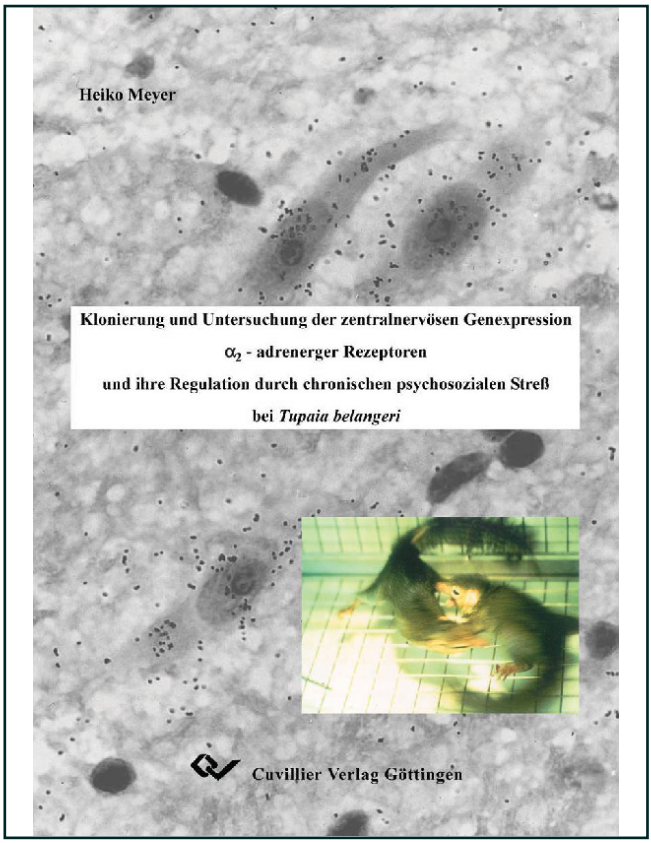
Heiko Meyer (Autor)

Klonierung und Untersuchung der zentralnervösen Genexpression a2-adrenerger Rezeptoren und ihre Regulation durch chronischen psychosozialen Streß bei Tupaia belangeri



https://cuvillier.de/de/shop/publications/3519

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

1.	**EINLEITUNG**	**1**
1. 1.	Funktion des zentralen noradrenergen Systems	3
1. 2.	α_2-Adrenerge Rezeptoren und ihre Rolle im monoaminergen System	5
1. 2. 1.	Pharmakologische, physiologische und molekularbiologische Klassifizierung α_2-adrenerger Rezeptorsubtypen	5
1. 2. 2.	Molekulare Struktur und Wirkungsweise α_2-adrenerger Rezeptoren	8
1. 3.	Auswirkungen von chronischem Streß auf das periphere und zentrale noradrenerge System	12
1. 4.	Verwendung von Tupaia belangeri (Spitzhörnchen) in der Streßforschung	13
1. 5.	Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2.	**MATERIAL UND METHODEN**	**16**
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 α_{2A}-, α_{2B}- und α_{2C}- adrenergen Rezeptorgene	21
2. 6. 1.	Extraktion von genomischer DNA	21
2. 6. 2.	Extraktion von poly(A)$^+$ RNA	21
2. 6. 3.	Reverse Transkription der poly(A)$^+$ 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 E.coli	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
3.	**ERGEBNISSE**	**35**
3. 1.	Klonierung der α_{2A}-, α_{2B}- und α_{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 α_2-adrenergen Rezeptoren	41
3. 2.	Regionale Verteilung der mRNA der α_{2A}, α_{2B} und α_{2C}-adrenerger Rezeptoren im Gehirn von Tupaia belangeri	45
3. 3.	Auswirkung der psychosozialen Belastung auf physiologische Merkmale männlicher Tupaia belangeri	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 α_2-adrenerger Rezeptoren bei chronisch gestreßten Tupaias und bei Kontrolltieren	61
3. 5. 1.	Quantifiziereung der α_{2A}-adrenergen Rezeptor-mRNA	66
3. 5. 2.	Quantifiziereung der α_{2B}-adrenergen Rezeptor-mRNA	68
3. 5. 3.	Quantifiziereung der α_{2C}-adrenergen Rezeptor-mRNA	69
4.	**DISKUSSION**	**71**
4. 1.	Sequenzanalyse der klonierten α_2-adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und C	71
4. 2.	Charakterisierung der Genexpression der α_{2A}-, α_{2B}- und α_{2C}-adrenergen Rezeptoren im Gehirn von Tupaia belangeri	73
4. 2. 1.	Alpha$_2$-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 quantitativer Rezeptorautoradiographie 81
4. 4. 1. Mögliche physiologische Bedeutung der streßinduzierten mRNA-Regulation α_{2A}-adrenerger Rezeptoren 84
4. 4. 2. Mögliche Auswirkungen auf das periphere Hormonsystem 86
4. 5. Mögliche Ursachen für die streßinduzierten Regulierung α_2-adrenerger Rezeptoren 88

5. ZUSAMMENFASSUNG 91

6. LITERATURVERZEICHNIS 93

7. METHODISCHER ANHANG 106

7.1. Verbrauchsmaterial und Geräte 106
7. 2. Puffer, Medien und Lösungen 108

8. ABKÜRZUNGEN 110