

1. EINLEITUNG

Alpha₂-adrenerge Rezeptoren (α_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 α_2 -adrenerge Rezeptorgene von unterschiedlichen Spezies kloniert und pharmakologisch charakterisiert worden (MACDONALD et al., 1997). α_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). α_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 α_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 α_2 -adrenerge Agonisten zur therapeutischen Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt und finden weitere Verwendung als Analgetika und Sedativa. Die Einsatzbereiche α_2 -adrenerger Antagonisten liegen teilweise in der Behandlung von psychosomatischen Erkrankungen. Allerdings konnten auf diesem Anwendungsgebiet aufgrund einer unzureichenden Subtypspezifität α_2 -adrenerger Liganden noch keine hochwirksamen Präparate entwickelt werden (RUFFOLO, 1993).

Das noradrenerge System und mit ihm das α_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 α_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 α_2 -adrenerger Rezeptoren (α_2 -AR) führt (FLÜGGE et al., 1992; FLÜGGE, 1996).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob diese streßinduzierte Herunterregulation α_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 α_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 α_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 α_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. α_2 -Adrenerge Rezeptoren und ihre Rolle im monoaminergen System

1. 2. 1. Pharmakologische, physiologische und molekularbiologische Klassifizierung α_2 -adrenerger Rezeptorsubtypen

Basierend auf pharmakologischen Kriterien wurden adrenerge Rezeptoren (AR) zunächst in zwei Hauptgruppen, α - und β -AR, unterteilt (AHLQUIST, 1948). Es zeigte sich, daß α -AR-Antagonisten in niedrigen Konzentrationen die Wirkung einer Stimulation des Sympathikus verstärken können (JANG, 1940). In späteren Arbeiten wurde gezeigt, daß α -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 α -Rezeptoren ausgelöst wurden. Aus *in vivo*-Studien an Milzgewebe der Katze und der Lungenarterie des Kaninchens schloß man, daß bestimmte Pharmaka, wie die α -Blocker Phenoxybenzamin (DUBOCOVICH und LANGER, 1974) und Prazosin (DOXEY et al., 1977) vorwiegend an postsynaptische α -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 α_1 - und α_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 α -AR verfügte, ersetzte eine pharmakologische Klassifizierung die Einteilung nach anatomischen Gesichtspunkten und es stellte sich heraus, daß α_2 -AR sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sind (BENTLEY et al., 1977).

Aufgrund von Bindungsaffinitäten für unterschiedliche Radioliganden konnten α_2 -adrenerge Rezeptorsubtypen in unterschiedlichen Gewebehomogenaten diverser Spezies charakterisiert werden (BERTHELSEN und PETTINGER, 1977). Eine Unterscheidung zwischen α_{2A} -AR und α_{2B} -AR wurde hinsichtlich ihrer divergierenden Sensitivität für Prazosin getroffen. Der α_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 α_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 α_{2C} -AR wurde erstmals in Nierengewebekultur des Opossums beschrieben (MURPHY und BYLUND, 1988). Sein hauptsächliches Unterscheidungskriterium zum α_{2B} -AR ist eine höhere Affinität zu Rauwolscin und ein etwas höheres Oxymetazolin/Prazosin-Affinitätsverhältnis. Ein vierter Subtyp, α_{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 α_{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 α_{2A} eingestuft (BYLUND, 1992).

Bis heute sind vier verschiedene α_2 -adrenerge Rezeptoren diverser Spezies kloniert und in verschiedenen Zellsystemen charakterisiert worden, α_{2A}/α_{2D} -AR, α_{2B} -AR und α_{2C} -AR. Zunächst wurde ein α_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 α_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 α_2 -adrenerger Rezeptoren wurden die Klone α_2 -C10 als Subtyp A, α_2 -C2 als Subtyp B und α_2 -C4 als Subtyp C klassifiziert. Bis heute sind außer den humanen α_2 -AR drei α_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 α_{2A} -AR des Schweines (GUYER et al., 1990), der α_{2C} -AR des Opossums (BLAXALL et al., 1994) und ein α_2 -AR eines Fisches (*Labrus ossifagus*) (SVENSSON et al., 1993) kloniert worden. Die annähernd sequenzhomologen Speziesvarianten des α_{2A} -AR weisen bei der Ratte, der Maus und dem Meerschweinchen pharmakologisch die Eigenschaften des α_{2D} -AR auf (LANIER et al., 1991). Für die reduzierte Rauwolscin- und Yohimbinaffinität des α_{2D} -AR wird ein Aminosäureaustausch in der 5. transmembranen Region in Position 201 des Rezeptorproteins verantwortlich gemacht (LINK et al., 1992). Der α_{2D} -Subtyp trägt an dieser Stelle einen Serinrest, während das α_{2A} -Adrenozeptorgen für Cystein codiert.

Hybridisierungen mit α_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 α_2 -adrenerger Rezeptoren aufzeigen, was auf eine unterschiedliche Funktion der Rezeptorsubtypen *in vivo* hinweist. Aufgrund der Lokalisierung der mRNA α_{2A} -adrenerger Rezeptoren in noradrenergen Nuclei wurde dieser Subtyp als der präsynaptische α_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 α_{2A} -AR die Ausschüttung von *in vitro*-perfundiertem [3 H]Noradrenalin aus noradrenergen Kerngebieten des Hirnstammes steuert (UMEDA et al., 1997). Die Präsenz des α_{2A} -AR und des α_{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 α_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 α_2 -AR Agonisten ausgelösten kardiovaskulären hypotensiven Effekte durch den A-Subtypen vermittelt; dem α_{2C} -AR werden eher feinmodulatorische oder den α_{2A} -AR unterstützende Wirkungen zugeschrieben. Durch die Stimulation des α_{2B} -AR in der glatten Gefäßmuskulatur wird ein vorübergehender Blutdruckanstieg erzielt (LINK et al., 1996), ein Effekt also, welcher der Stimulation zentralnervöser α_{2A} -AR entgegenwirkt. Über die Funktionen postsynaptischer α_2 -adrenerger Rezeptoren im ZNS, besonders der Subtypen B und C, herrscht noch weitestgehend Unklarheit.

1. 2. 2. Molekulare Struktur und Wirkungsweise α_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 α_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).