

Modulation der Neurotransmitterfreisetzung durch präsynaptische Cannabinoid-CB₁-Rezeptoren und andere Rezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kirsten Schulte

aus Unna

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erster Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Schlicker

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

Erscheinungsjahr 2012

*Für meine Familie
und Florian*

Abkürzungsverzeichnis

% (m/V)	Masse in Volumen-Prozent
% (V/V)	Volumenprozent
[³⁵ S]	Isotop des Schwefels mit der Atommasse 35
[³ H]	Tritium (Isotop des Wasserstoffs mit der Atommasse 3)
[x]	Konzentration eines Stoffes x
°C	Grad Celsius
Δ ⁹ -THC	Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol (Abbildung 2)
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
2-AG	2-Arachidonoylglycerol (Abbildung 4)
A	Agonist
A	Ampere
ADA	Adenosindesaminase
AM-251, -281, -630, -4113, -6545	Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
bar	Bar
Bed.	Bedingungen
B _{ges}	Gesamtbindung des Radioliganden
B _{max}	maximale Anzahl an Bindungsstellen
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
B _x	x-ter basaler Efflux
bzw.	beziehungsweise
c	centi- (10 ⁻²)

Abkürzungsverzeichnis

ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAN	Kanada
CB	Cannabinoid
CB _x	Cannabinoid-Rezeptor vom Subtyp x
cDNA	DNA, die aus mRNA revers transkribiert wurde (complementary DNA)
CH	Schweizerische Eidgenossenschaft
CP 55,940	Cannabinoid-Rezeptor-Agonist (Abbildung 6)
D	Bundesrepublik Deutschland
Da	Dalton
DAG(L)	Diacylglycerol(-Lipase)
DAMGO	μ-Opioidrezeptor-Agonist
(d)CTP	(Desoxy-) Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
(d)GTP	(Desoxy-) Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNPA	NPFF ₂ -Rezeptor-Agonist
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPDPE	δ-Opioidrezeptor-Agonist
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
DSE	depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Erregung (Depolarisation-induced suppression of excitation)
DSI	depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung (Depolarisation-induced suppression of inhibition)
(d)TTP	(Desoxy-) Thymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Konzentration eines Agonisten, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (ethyleneglycoltetraacetic acid)

Abkürzungsverzeichnis

EMA	Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency)
EP _x	Prostaglandin E-Rezeptor vom Subtyp x
et al.	und andere Autoren (et alii)
f	femto- (10 ⁻¹⁵)
F	Französische Republik
FAAH	Fettsäureamidhydrolase (fatty acid amide hydrolase)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure (gamma-aminobutyric acid)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GIRK	G-Protein-gekoppelter, einwärtsgerichteter Kaliumkanal (inwardly rectifying G-protein-coupled K ⁺ channel)
Glu	Glutamat
GPR	„verwaister Rezeptor“: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der aufgrund konservierter Sequenzen in Genbank-Recherchen gefunden wurde, für den aber noch kein Ligand bekannt ist (orphan G-protein-coupled receptor)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-Hydrolyse
GTPγS	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high-density lipoprotein)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HU 210	Cannabinoid-Rezeptor-Agonist (Abbildung 3)
h	Stunde
H _x	Histamin-Rezeptor vom Subtyp x
Hz	Hertz
I	Italienische Republik
IL-1β	Interleukin-1β
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt

Abkürzungsverzeichnis

JWH-015	Cannabinoid-Rezeptor-Agonist
k	Geschwindigkeitskonstante
k	kilo- (10^3)
K_D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
K_i	Verdrängungskonstante
k_{off}	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante
k_{on}	Assoziations-Geschwindigkeitskonstante
KH	Krebs-Henseleit
l	Liter
L	(freier) Ligand
L.	Linné
log	dekadischer Logarithmus
m	Meter
m	milli- (10^{-3})
M	molar (mol/l)
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (mitogen-activated protein)
MAX	Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors
mGlu(-R)	metatroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
MIN	Radioligandbindung in Anwesenheit einer hohen Inhibitor-Konzentration
mol	Mol
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Meerschwein
M_x	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp x
n	Anzahl der Messwerte
n	nano- (10^{-9})
NADA	N-Arachidonoyldopamin (Abbildung 4)
NArPE	N-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin
NAT	Noradrenalin-Transporter

Abkürzungsverzeichnis

NESS 0327	8-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-1,4,5,6-tetrahydro-N-1-piperidiny- benzo[6,7]cyclohepta[1,2-c]pyrazol-3-carboxamid
n_H	Hill-Koeffizient
NL	Niederlande
NPB	Neuropeptid B
NPFF	Neuropeptid FF
NPW	Neuropeptid W
n.s.	nicht signifikant
O-2050	Cannabinoid-Rezeptor-Antagonist (Abbildung 3)
p	negativer dekadischer Logarithmus einer Konzentration
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p	pico- (10^{-12})
P2-Pellet	zweites Pellet einer sequentiellen Zentrifugation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pA_2	negativer dekadische Logarithmus der Antagonistenkonzentration, bei der die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten um den Faktor 2 verschoben wird.
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PGE_2	Prostaglandin E_2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (potentia Hydrogenii)
P_i	anorganisches Phosphat (inorganic phosphate)
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
RGS	Regulator des G-Proteinsignals (regulator of G-protein signalling)
RL	rezeptorgebundener Radioligand
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde

Abkürzungsverzeichnis

s	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SF	Superfusion
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzelllinie
SR 141716A,	Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten (Abbildung 3)
SR 144528	
S _x	x-te Reizperiode
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline) mit Tween
THC	Tetrahydrocannabinol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
u.a.	unter anderem
U	Umdrehungen
U	Unit
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCHSR	5-(4-chlorophenyl)-3-[(E)-2-cyclohexylethenyl]-1-(2,4-dichlorophenyl)- 4-methyl-1H-pyrazol
Wt	Wildtyp
x	„dose ratio“: Quotient aus EC ₅₀ -Werten eines Agonisten in An- und Abwesenheit eines Antagonisten
x _i	Einzelmesswert
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
A. Einleitung.....	1
1 Präsynaptische Rezeptoren.....	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.2 Cannabinoid-Rezeptoren.....	3
1.3 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	13
1.4 Neuropeptid-Rezeptoren	13
1.5 Prostaglandin E-Rezeptoren	16
1.6 Histamin-Rezeptoren.....	17
2 Ziele dieser Arbeit	18
B. Material und Methoden	20
1 Material.....	20
1.1 Arbeitsgeräte	20
1.2 Verbrauchsmaterial	21
1.3 Chemikalien	21
1.4 Strukturformeln	24
1.5 Radiochemikalien	25
1.6 Kits für die Molekularbiologie.....	25
1.7 Primersequenzen	25
1.8 Antikörper	26
1.9 Puffer und Lösungen	27
1.10 Tiere.....	31
1.11 Humanes Gewebe	31
1.12 Datenbanken und Computer-Software	31
2 Methoden.....	32
2.1 Superfusion	32
2.2 Radioligandbindungsstudien	35
2.3 [³⁵ S]-GTPγS-Bindungsstudien.....	39
2.4 Western Blot Analyse.....	41
2.5 mRNA Expressionsanalyse	44

Inhaltsverzeichnis

2.6	Statistik.....	47
C.	Ergebnisse	49
1	Untersuchungen am Cannabinoid-CB ₁ -Rezeptor.....	49
1.1	Charakterisierung von O-2050, Virodhamin und N-Oleylglycin.....	49
1.2	Interaktion des präsynaptischen CB ₁ -Rezeptors mit dem muskarinischen Autorezeptor	60
2	Untersuchungen an Peptid-Rezeptoren.....	64
2.1	Effekt von Neuropeptid W.....	65
2.2	Effekt von Neuropeptid FF und dNPA.....	67
2.3	Effekt von Interleukin-1 β	70
3	Untersuchungen an anderen Rezeptoren	73
3.1	Suche nach einem funktionellen Modell für den EP ₃ -Rezeptor.....	73
3.2	Analyse der Histamin-H ₄ -Rezeptor mRNA-Expression.....	74
D.	Diskussion	75
1	Methodische Vorbemerkungen.....	75
1.1	Versuchsbedingungen in der Superfusion	75
1.2	Bindungsstudien.....	78
2	Untersuchungen am Cannabinoid-CB ₁ -Rezeptor.....	80
2.1	Untersuchungen zu O-2050 und zum endogenen Tonus am CB ₁ -Rezeptor.....	80
2.2	Charakterisierung von Virodhamin.....	83
2.3	Charakterisierung von N-Oleylglycin.....	84
2.4	Interaktion des präsynaptischen CB ₁ -Rezeptors mit dem muskarinischen Autorezeptor	85
3	Untersuchungen an Peptid-Rezeptoren.....	88
3.1	Einfluss von Neuropeptiden auf die Transmitterfreisetzung.....	88
3.2	Einfluss von Interleukin-1 β auf die Neurotransmitterfreisetzung.....	90
4	Untersuchungen an anderen Rezeptoren	91
4.1	Suche nach einem funktionellen Modell für den EP ₃ -Rezeptor.....	91
4.2	Analyse der Histamin-H ₄ -Rezeptor mRNA Expression	92
E.	Zusammenfassung.....	94
F.	Literaturverzeichnis	97

Inhaltsverzeichnis

G. Eigene Veröffentlichungen.....	115
1 Originalarbeiten.....	115
2 Kongressbeiträge (Vorträge und Posterpräsentationen)	115
Erklärung	117
Danksagung.....	118
Lebenslauf	119

A. Einleitung

1 Präsynaptische Rezeptoren

Neuronale Kommunikation geschieht unter anderem über endogene biochemische Botenstoffe, sogenannte Neurotransmitter, welche aus den Nervenendigungen freigesetzt werden. Nach der Durchquerung des synaptischen Spalts entfalten sie an ihren entsprechenden Rezeptoren auf dem Zellkörper (Soma) und auf den Dendriten anderer Neuronen entweder eine exzitatorische oder inhibitorische Wirkung (Südhof 2004).

Präsynaptische Nervenendigungen (Axonendigungen) sind auf ihrer Zellmembran mit Rezeptoren ausgestattet, die die Freisetzung von Neurotransmittern desselben Neurons modulieren. Diese präsynaptischen Rezeptoren werden als Autorezeptoren bezeichnet, wenn sie durch den Transmitter des betreffenden Neurons aktiviert werden. Sie sind an einer negativen Rückkopplung beteiligt, da der freigesetzte Neurotransmitter über ihre Aktivierung seine eigene weitere Freisetzung hemmend reguliert und so eine Feineinstellung des chemischen Signals ermöglicht. Neben den Autorezeptoren besitzen Nervenendigungen ebenfalls freisetzungsmulierende präsynaptische Heterorezeptoren. Sie werden von anderen Neurotransmittern als dem des eigenen Neurons aktiviert, zum Beispiel von Transmittern aus benachbarten Neuronen oder auch von lokal synthetisierten oder mit dem Blut herantransportierten Substanzen. Neben den Rezeptoren auf ihren Endigungen besitzen Neuronen auch Rezeptoren auf ihren Zellkörpern und Dendriten, sogenannte somadendritische Rezeptoren, die die Erregungsleitung modulieren (Langer 2008, Raiteri 2001).

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die meisten präsynaptischen Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt und gehören der Superfamilie der heptahelikalen Rezeptoren an. Sie bestehen aus Untereinheiten mit sieben transmembranalen Schleifen, deren Raumstruktur wiederum eine α -Helix-Struktur aufweist und die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind.

Wird ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor durch einen Agonisten aktiviert, ändert er seine Konformation und bindet ein membrangebundenes heterotrimeres G-Protein (Abbildung 1).

Einleitung

Im inaktiven Zustand besteht das G-Protein aus einer α -Untereinheit, einer $\beta\gamma$ -Untereinheit und GDP, welches an die α -Untereinheit gebunden ist. Die Bindung des Agonisten bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und führt an der α -Untereinheit zum Austausch von GDP gegen GTP. Die damit einhergehende Konformationsänderung des G-Proteins bewirkt den Zerfall in eine aktivierte α -Untereinheit und in einen Komplex aus β - und γ -Untereinheit. Das α -Monomer und das $\beta\gamma$ -Dimer können nun ihrerseits weitere Effektorproteine beeinflussen. Die G-Proteine sind so lange aktiv, bis das GTP, welches an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden ist, wieder in GDP und P_i hydrolysiert wird. Die Hydrolyse wird durch die GTPase Aktivität der α -Untereinheit katalysiert und kann durch RGS-Proteine (regulators of G-protein signaling) beschleunigt werden. Nach der Spaltung von GTP reassoziieren die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten wieder und das Heterotrimer kann erneut durch einen Rezeptor rekrutiert werden. Der Rezeptor kann nach seiner Aktivierung noch weitere G-Proteine anregen oder wieder in den inaktiven Zustand übergehen (Oldham und Hamm 2008).

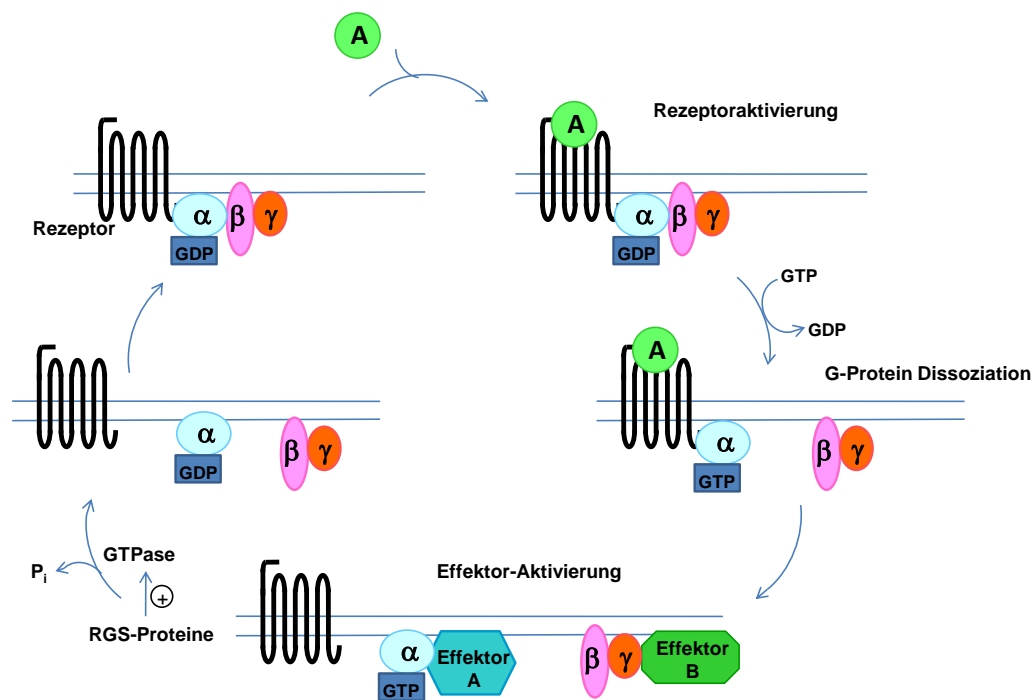


Abbildung 1: Der G-Protein Zyklus. A, Agonist. Erklärung der weiteren Abkürzungen, siehe Text und Abkürzungsverzeichnis. Modifiziert nach Offermanns (2003).

Bisher sind mehr als 20 $G\alpha$ -Untereinheiten beschrieben worden, die nach ihrer strukturellen und funktionellen Homologie in vier Familien ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$) eingeteilt werden.

Die zellulären Effekte, die durch die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors induziert werden, sind durch die spezifische Kopplung an eine dieser Familien bestimmt. Ein inhibitorischer Effekt auf die neuronale Aktivität wird meist durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor der $G_{i/o}$ Familie hervorgerufen, wohingegen eine Kopplung des Rezeptors an G-Proteine der G_q und G_s Familie meist einen stimulatorischen Effekt auf die neuronale Aktivität bewirkt. Der $\beta\gamma$ -Komplex des heterotrimeren G-Proteines setzt sich aus fünf β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten zusammen, jedoch bestehen in den verschiedenen $\beta\gamma$ -Kombinationen keine großen Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, Effektorsysteme zu regulieren (Wettschureck und Offermanns 2005, Brown und Sihra 2008). Die meisten präsynaptisch inhibitorischen Rezeptoren im zentralen Nervensystem sowie die in dieser Arbeit untersuchten präsynaptischen Rezeptoren koppeln an G-Proteine der $G_{\alpha_{i/o}}$ -Familie. G_{α_i} ist das sogenannte inhibitorische (inhibitory) G-Protein und G_{α_o} das sogenannte andere (other) G-Protein, das in der Regel die gleichen Effekte wie das G_{α_i} -Protein vermittelt (Aktories et al. 2009). Ihre Aktivierung durch die Bindung eines Neurotransmitters an einen Rezeptor im zentralen Nervensystem bewirkt eine Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung. Der genaue Mechanismus der Inhibition wird im nächsten Kapitel am Beispiel des CB_1 -Rezeptors beschrieben.

Präsynaptische Rezeptoren stellen eine geeignete Zielstruktur für Wirkstoffe dar, die als Agonisten, Partialagonisten, inverse Agonisten oder Antagonisten die Freisetzung modulieren und möglicherweise weniger unerwünschte Nebenwirkungen bergen als Wirkstoffe, die an der Postsynapse angreifen.

1.2 Cannabinoid-Rezeptoren

Bisher wurden zwei Cannabinoid-Rezeptoren kloniert, der CB_1 - und der CB_2 -Rezeptor (Matsuda et al. 1990, Munro et al. 1993). Es gibt jedoch Hinweise auf weitere Cannabinoid-Rezeptoren, da einige Cannabinoide auch unabhängig von ihrer Aktivität an CB_1 - und CB_2 -Rezeptoren Effekte auslösen (Begg et al. 2005). Weiterhin wird vermutet, dass zwei weitere „verwaiste“ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, GPR55 und GPR119 auch zur Cannabinoid-Rezeptor-Familie gehören (Brown et al. 2007). Der CB_1 -Rezeptor wird vorwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert, eine besonders hohe Rezeptordichte besitzt er im Hippokampus, in den Basalganglien, im Kleinhirn und im Cortex (Herkenham et al. 1991). In

der Peripherie wird er, jedoch in weitaus geringerer Dichte, in der Hypophyse, in Adipozyten, in glatten Muskelzellen, in der Leber, im Gastrointestinaltrakt, in der Nebenniere und im Urogenitaltrakt (in der Harnblase, in der Gebärmutter, im Samenleiter) (Pagotto et al. 2006) sowie präsynaptisch auf sympathisch innervierten Nervenendigungen (Ishac et al. 1996) exprimiert.

Der CB₂-Rezeptor wird überwiegend peripher exprimiert, vor allem auf Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen) (Galiègue et al. 1995, Munro et al. 1993) und Osteoblasten und Osteoklasten (Bab und Zimmer 2008). Im zentralen Nervensystem wird der CB₂-Rezeptor auf Mikroglia gefunden, seine Präsenz auf bestimmten Neuronen ist jedoch sehr umstritten (Cabral et al. 2008).

Innerhalb des zentralen Nervensystems ist der CB₁-Rezeptor auf präsynaptischen Axonendigungen von gabaergen, glutamatergen, noradrenergen, cholinergen, serotonergen und dopaminergen Neuronen lokalisiert (Schlicker und Kathmann 2001). Die Bindung eines Agonisten an den zentralen CB₁-Rezeptor führt - wie in Abbildung 1 gezeigt - zur Freisetzung der α - sowie der $\beta\gamma$ -Untereinheit des $G\alpha_{i/o}$ -Proteins. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit diffundiert zu benachbarten spannungsabhängigen Calciumkanälen vom N- (Mackie und Hille, 1992) und P/Q-Typ (Twitchell et al. 1997), vermindert deren Offenwahrscheinlichkeit und hemmt so die Calcium-abhängige Exozytose der Neurotransmitter. Des Weiteren aktiviert die $\beta\gamma$ -Untereinheit spannungsunabhängige G-Protein-regulierte Kaliumkanäle (GIRK) und bewirkt somit eine Abnahme des intrazellulären Kaliumspiegels, welche eine Hyperpolarisation der Nervenzelle zur Folge hat (Guo und Ikeda 2004); auch dieser Mechanismus könnte die Hemmung der Transmitter-Freisetzung erklären. Die α -Untereinheit bewirkt eine Hemmung der Adenylatcyclase, welche die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP) katalysiert. Der Angriffspunkt des gebildeten cAMP ist die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Die resultierende verringerte Aktivierung der PKA, welche die Erregbarkeit der Zelle und den Kaliumausstrom durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine beeinflusst, könnte ebenfalls bei der Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung eine Rolle spielen (Ameri 1999, Howlett 1985, Offermanns 2003). Als weitere Signalwege werden der MAP-Kinaseweg (Demuth und Molleman 2006) und die Phospholipase C aktiviert (Sugiura et al. 1997).

1.2.1 Cannabinoide

Der Ausdruck Cannabinoide bezog sich ursprünglich auf die bioaktiven Inhaltsstoffe der Hanfpflanze (*Cannabis sativa* L.). Neben dem psychotrop wirkenden Inhaltsstoff Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni und Mechoulam 1964) wurden 70 weitere Cannabinoide aus *Cannabis sativa* L. isoliert, unter ihnen Δ^8 -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol und Cannabidiol (Elsohly und Slade 2005). Abbildung 2 zeigt drei der wichtigsten natürlichen Cannabinoide.

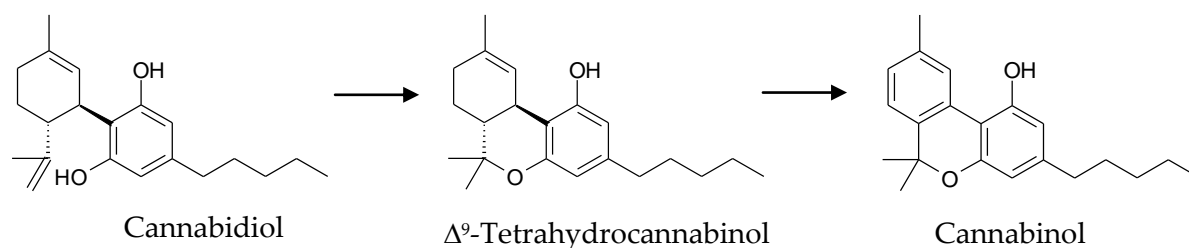
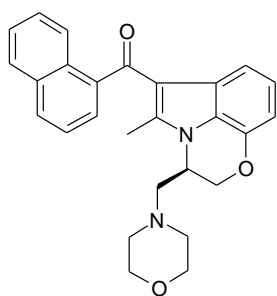


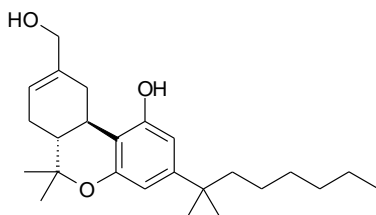
Abbildung 2: Strukturformeln einiger natürlicher Cannabinoide der Hanfpflanze

Heute ist der Begriff Cannabinoide weiter gefasst und beinhaltet generell Substanzen, die wie die Inhaltsstoffe der Hanfpflanze wirken, also auch synthetische und endogene Liganden (Pertwee 2005b). Synthetische Liganden besitzen gegenüber pflanzlichen Cannabinoiden häufig den Vorteil einer höheren Affinität, Subtypenselektivität und besseren Wasserlöslichkeit. Die ersten synthetischen Cannabinoide wurden ausgehend von Δ^9 -THC entwickelt, zu ihnen zählen unter anderem die Agonisten CP 55,940 und HU-210 sowie der Antagonist O-2050. Eine weitere Gruppe stellen die Aminoalkylindole dar, die sich strukturell völlig von den vorgenannten Stoffen unterscheiden. Zu ihnen zählen der Agonist WIN 55,212-2 sowie einige CB₂-selektive Liganden wie AM-630 und JHW-015. Zu den subtypenspezifischen Antagonisten zählen die Diarylpyrazolderivate Rimonabant (SR141716A), AM-251 und AM-281 (CB₁-Rezeptor) sowie SR144528 (CB₂-Rezeptor) (Pertwee 2008). Einige Strukturformeln sind in Abbildung 3 abgebildet.

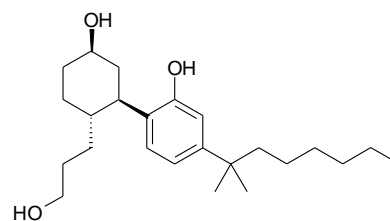
Cannabinoid-Rezeptor Agonisten



WIN 55,212-2

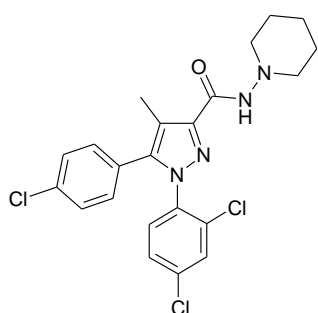


HU 210

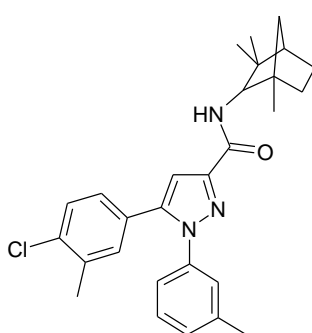


CP 55,940

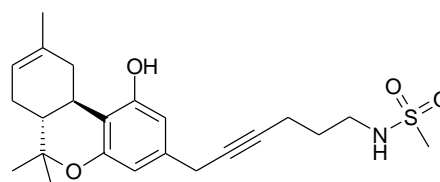
Cannabinoid-Rezeptor Antagonisten



Rimonabant
(CB₁-selektiv)



SR 144528
(CB₂-selektiv)



O-2050

Abbildung 3: Strukturformeln ausgewählter synthetischer Cannabinoid-Rezeptor Liganden.

Die endogenen Liganden an Cannabinoid-Rezeptoren, sogenannte Endocannabinoide, zählen zur Gruppe der Eicosanoide. Als erste Endocannabinoide wurden Arachidonylethanolamid, welches als Anandamid bezeichnet wurde (Devane et al. 1992), und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Mechoulam et al. 1995) entdeckt. Später folgten 2-Arachidonoylglycerylether (Noladinether) (Hanus et al. 2001), N-Arachidonoyldopamin (NADA) (Bisogno et al. 2000) und O-Arachidonylethanolamin (Virodhamin) (Porter et al. 2002); die umfassende pharmakologische Charakterisierung der drei zuletzt genannten Substanzen steht jedoch noch aus (Strukturformeln siehe Abbildung 4).

Einleitung

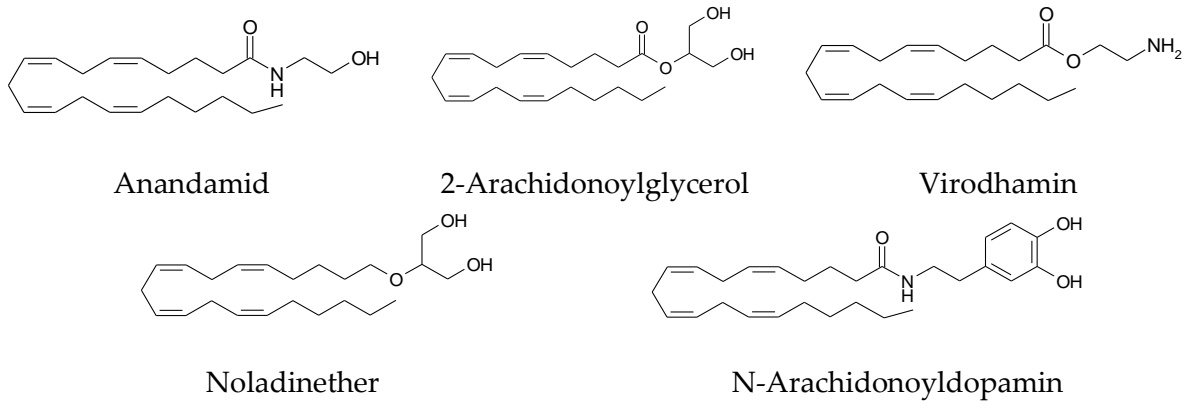


Abbildung 4: Strukturformeln der Endocannabinoide Anandamid, 2-Arachidonoylglycerol, Virodhamin, Noladinether und N-Arachidonoyldopamin.

Die Applikation von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten führt in der Maus zu einer verminderten Körpertemperatur, einem verringerten Schmerzempfinden, zum Verharren in einer ungewöhnlichen Körperhaltung (Katalepsie) und Sedierung, die sich in einer verringerten spontanen Aktivität äußert. Diese charakteristischen Wirkungen lassen sich als „Maus-Tetrad“ zusammenfassen (Martin et al. 1987) und sind mit Rimonabant antagonisierbar.

1.2.2 Endogener Tonus

Die meisten Antagonisten wie Rimonabant verhalten sich am CB₁-Rezeptor als inverse Agonisten und bewirken einen Effekt, der dem eines Agonisten entgegengesetzt ist. Die Neurotransmitterfreisetzung wird folglich durch die Bindung von Rimonabant an den präsynaptischen CB₁-Rezeptor gesteigert (Schlicker und Kathmann 2001). Diesem Effekt können zwei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen (Pertwee 2005a und Abbildung 5). Zum einen könnten Endocannabinoide in der Biophase des Rezeptors akkumulieren und über die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren eine tonische Hemmung der Transmitterfreisetzung hervorrufen. Diese inhibitorische Wirkung der Endocannabinoide wird durch einen kompetitiven Antagonisten wie Rimonabant aufgehoben. Zum anderen könnte der Rezeptor eine spontane Aktivität auch in Abwesenheit eines Liganden besitzen. Ein Teil der Rezeptoren liegt im aktiven Zustand vor, ist an G-Proteine gekoppelt und aktiviert diese. Eine solche konstitutive Aktivität ist von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt (Seifert und Wenzel-Seifert 2002) und beruht auf dem Zwei-Zustands-Modell (Leff 1995). Dieses Gleichgewicht zwischen aktivierten und inaktivierten Rezeptoren

wird durch Rimonabant in Richtung des inaktiven Zustandes verschoben. Um besser zwischen den beiden Modellen unterscheiden zu können, wird ein neutraler CB₁-Rezeptor Antagonist benötigt. Ein neutraler Antagonist ist nicht in der Lage das Gleichgewicht der Spontanaktivität zu verschieben und somit würde hier kein Einfluss auf die Neurotransmitterfreisetzung erwartet (Morisset et al 2000).

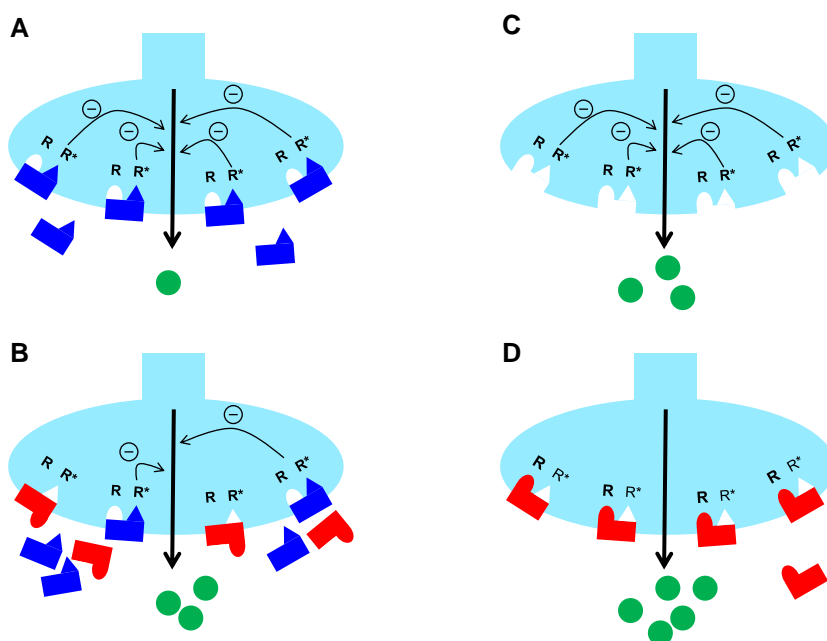


Abbildung 5: Zwei Erklärungen für die Erhöhung der Transmitterfreisetzung durch Rimonabant. Endocannabinoide (blaue Symbole) akkumulieren in der Biophase des Rezeptors und hemmen die Transmitterfreisetzung (A). Rimonabant (rote Symbole) verringert die Hemmung durch seinen kompetitiven Antagonismus (B). Der zweite Mechanismus beruht auf der konstitutiven Aktivität der Rezeptoren. Im aktiven Zustand (R*) koppeln sie an G_i-Proteine und hemmen die Transmitterfreisetzung (C). Rimonabant stabilisiert seinen Rezeptor im inaktiven Zustand (R) und hebt die konstitutive Hemmung auf. Modifiziert nach van Diepen et al. (2008).

1.2.3 Das Endocannabinoid-System

Das Endocannabinoid-System umfasst die CB₁- und CB₂-Rezeptoren, ihre endogenen Liganden, die sogenannten Endocannabinoide, und die entsprechenden Enzyme für ihre Synthese und für ihren Abbau. Endocannabinoide unterscheiden sich von klassischen Neurotransmittern, insofern sie nicht in Vesikeln in Nervenendigungen gespeichert werden, sondern bei Bedarf aus membrangebundenen Vorläufern synthetisiert werden (Abbildung 6). Anandamid entsteht aus einem Produkt aus Arachidonsäure und Phosphatidylethanolamin, N-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin (NArPE), welches durch die N-Acetyltransferase gebildet wird. Die Phospholipase D katalysiert die Entstehung von Anandamid aus NArPE.

Einleitung

Die Phospholipase C bildet den 2-AG Vorläufer 1,2-Diacylglycerol aus Phosphatidylinositol. Das Diacylglycerol wird durch die DAG-Lipase α in 2-AG gespalten (Tanimura et al. 2010).

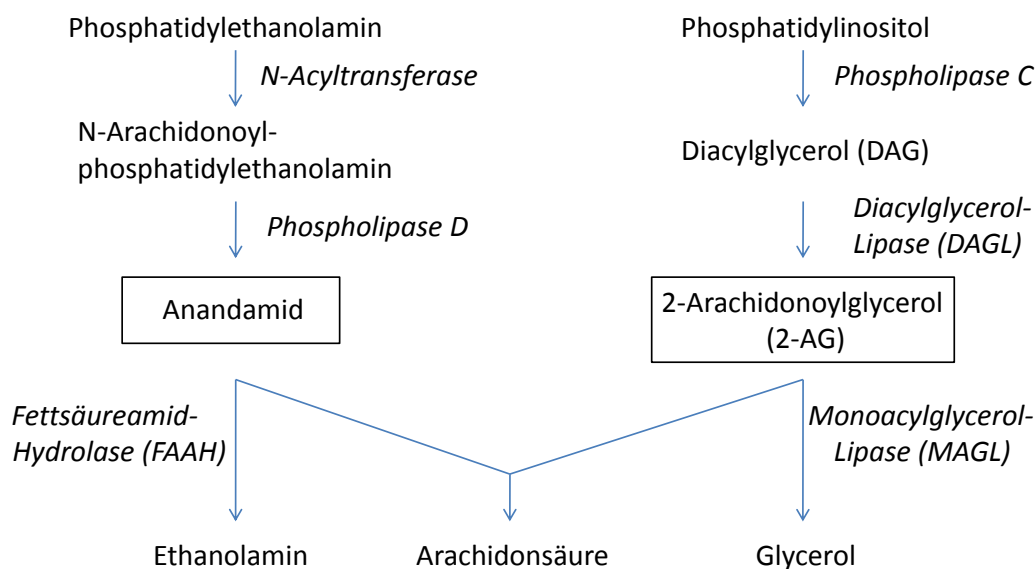


Abbildung 6: Wichtigste Biosynthese- und Abbauege für Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol. Modifiziert nach Hashimotodani et al. (2007).

Der Stimulus zur Bildung von 2-AG und Anandamid ist ein starker Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle, die durch eine postsynaptische Depolarisation geöffnet wurden, oder die Aktivierung von $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren wie metabotrope Glutamaterezeptoren der Gruppe 1 (mGluR_{1/5}) oder muskarinische Acetylcholinrezeptoren (M_{1/3}). Auch eine Kombination aus beiden Mechanismen ist möglich (Kano et al. 2009, Piomelli 2003). Die gebildeten Cannabinoide gelangen wahrscheinlich durch passive Diffusion entsprechend ihres Konzentrationsgefälles in den synaptischen Spalt (Glaser et al. 2003). Daneben wird auch die Existenz eines Endocannabinoid-Membran-Transporters postuliert (Ligresti et al. 2004). Nach Durchquerung des synaptischen Spalts binden sie an präsynaptisch lokalisierte CB₁-Rezeptoren benachbarter Neuronen, die ihrerseits die Neurotransmitterfreisetzung hemmen. Dieser Vorgang der retrograden Informationsübertragung ist sowohl für hemmende gabaerge Neuronen (Depolarisation-induced suppression of inhibition, DSI) beschrieben worden als auch für exzitatorische glutamaterge Neuronen (Depolarisation-induced suppression of excitation, DSE) (Hashimotodani et al. 2007, Kano 2009). Der Informationsfluss erfolgt hier also nicht von prä-

nach postsynaptisch, wie bei der neuronalen Übertragung durch klassische Neurotransmitter, sondern in umgekehrter (retrograder) Richtung (Abbildung 7).

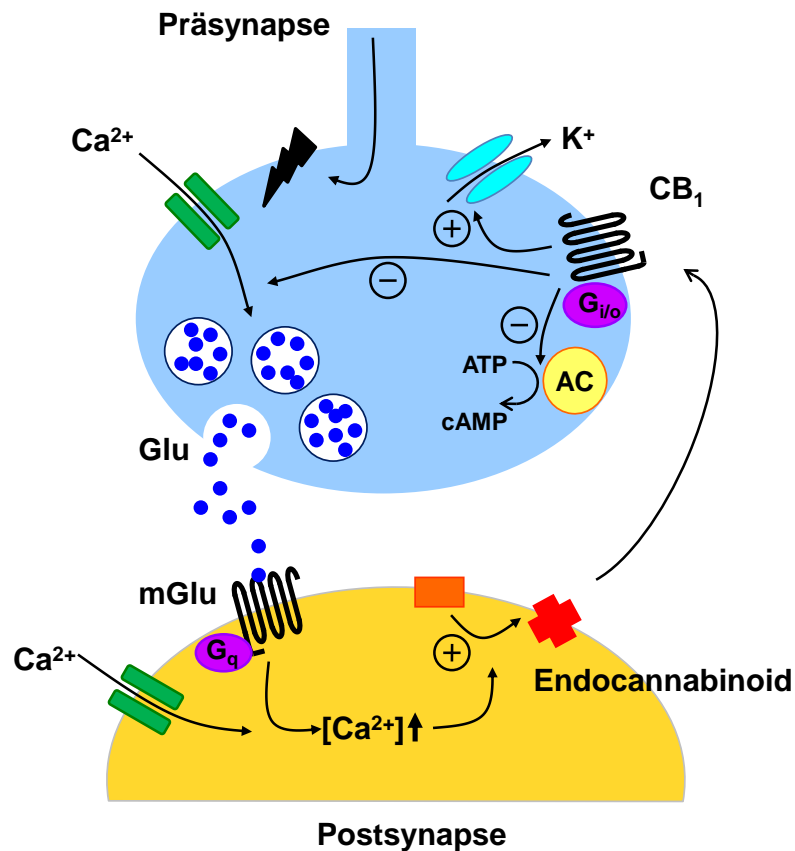


Abbildung 7: Beispiel für die präsynaptische Modulation der Transmitterfreisetzung. Die Ausschüttung von Glutamat (Glu) bewirkt nach einer Aktivierung des postsynaptischen Glutamat-Rezeptors (mGlu) eine Freisetzung von Endocannabinoiden, die wiederum durch Aktivierung des präsynaptischen CB_1 -Heterorezeptors die weitere Glutamatfreisetzung hemmen.

Die Endocannabinoide werden nach Aufnahme aus dem synaptischen Spalt durch enzymatische Hydrolyse ihrer Ester und Amide inaktiviert. Anandamid wird durch die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) (Cravatt et al. 1996, Abbildung 6) und 2-AG durch die Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) (Dinh et al. 2002, Abbildung 6) und zu einem geringeren Teil durch die Alpha-Beta-Hydrolasen 6 und 12 (Fischerstrand et al. 2010, Marrs et al. 2010) abgebaut. Neben diesen wichtigsten Mechanismen wurden für beide Endocannabinoide noch weitere Synthese- und Abbauege beschrieben.

Das Endocannabinoid-System ist an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt. Es wird aktiviert, wenn der Körper auf Stressfaktoren trifft, um ein stabiles Milieu aufrechtzuerhalten. Es reduziert die Schmerzwahrnehmung, die Körpertemperatur, die lokomotorische Aktivität und die neuronale Aktivität. Es moduliert Lernprozesse und die

Gedächtnisverarbeitung und führt so zu einer beschleunigten Erholung von aversiven Ereignissen. Ferner steuert es die Nahrungsaufnahme und spielt eine Rolle in Entzündungsprozessen und verschiedenen Stoffwechselprozessen (Di Marzo et al. 2004).

1.2.4 CB₁-Knockout Modell

Neben einer Reihe von CB₁-Rezeptor selektiven Agonisten und Antagonisten stellt die CB₁-Knockout-Maus, bei der durch Ausschalten des CB₁-Rezeptorgens das CB₁-Rezeptorprotein nicht mehr exprimiert wird, ein experimentelles Instrument für die Untersuchung der physiologischen Rolle des CB₁-Rezeptors dar. Bis heute wurden drei verschiedene CB₁-Knockout-Mäuse (Ledent et al. 1999, Marsicano et al. 2002, Zimmer et al. 1999) und eine Reihe weiterer Mäuse mit einem konditionellen CB₁-Knockout auf spezifischen Neuronen generiert (Agarwal et al. 2007, Domenici et al. 2006, Marsicano et al. 2003, Monory et al. 2006).

Die in dieser Arbeit verwendete, von Zimmer et al. (1999) generierte CB₁-Knockout Maus mit einem genetischen C57BL6/J Hintergrund weist neben einer geringeren Fertilität eine erhöhte Sterberate auf, wahrscheinlich aufgrund einer erhöhten Neigung zu epileptischen Anfällen (Valverde et al. 2005). Entgegen den Erwartungen wies die CB₁-Knockout-Maus eine Hypoalgesie, eine erhöhte Katalepsie und eine reduzierte lokomotorische Aktivität auf. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den durch Rimonabant hervorgerufenen Effekten und zu dem Verhalten der von Ledent et al. (1999) generierten CB₁-Knockout-Maus mit einem genetischen CD1 Hintergrund. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte in unterschiedlichen experimentellen Untersuchungsmethoden liegen, im genetischen Hintergrund oder in adaptiven Effekten, wurde aber nicht abschließend geklärt (Steiner et al. 1999). Applizierte CB₁-Rezeptor-Agonisten wie Δ^9 -THC zeigen in der CB₁-Knockout-Maus keine Wirkung mehr mit der Ausnahme einer antinoczeptiven Wirkung im Tail-Flick-Schmerztest (Zimmer et al. 1999).

1.2.5 FAAH-Knockout Modell

Zur genauen Untersuchung der physiologischen Effekte von Anandamid *in vivo* wurde eine FAAH-Knockout-Maus generiert, die aufgrund einer genetischen Ablation das Enzym Fettsäureamid-Hydrolase nicht exprimiert. Bisherige Bemühungen, die Wirkungen von Anandamid zu untersuchen, wurden durch sehr schnelle Hydrolyse in weniger als fünf

Minuten erschwert (Willoughby et al. 1997). Aus der Unfähigkeit, Fettsäureamide abzubauen, resultiert bei der FAAH-Knockout-Maus eine mehr als 15-fach erhöhte Anandamid-Konzentration im Gehirn, die sich in einem verringerten Schmerzempfinden äußert. Ferner bewirkt die Gabe von Anandamid in der FAAH-Knockout-Maus dosisabhängige spezifische Verhaltensreaktionen einschließlich einer reduzierten lokomotorischen Aktivität, einer Analgesie, einer Hypothermie und Katalepsie. Diese Effekte von Anandamid werden durch den CB₁-Rezeptor vermittelt, da sie durch Rimonabant gehemmt werden können (Cravatt et al. 2001).

1.2.6 Interaktion des CB₁-Rezeptors mit anderen präsynaptischen Rezeptoren

Der CB₁-Rezeptor wird vorwiegend präsynaptisch auf Axonendigungen exprimiert und seine Aktivierung führt zur Hemmung der Freisetzung verschiedenster Neurotransmitter (Schlicker und Kathmann 2001, Szabo und Schlicker 2005). Ein Neuron ist in der Regel mit einer Vielzahl an unterschiedlichen präsynaptischen Rezeptoren ausgestattet, von denen viele an G_{i/o}-Proteine gekoppelt sind und den gleichen Signaltransduktionsweg aktivieren. Die verschiedenen präsynaptisch lokalisierten G_{i/o}-Protein-gekoppelten Rezeptoren arbeiten nicht unabhängig voneinander, vielmehr beeinflussen sie sich gegenseitig in ihrer Funktion. So vermindert die vorherige Aktivierung eines Rezeptors durch einen Agonisten den Effekt eines anschließend aktivierten anderen Rezeptors. Im Gegensatz dazu verstärkt die vorherige Blockade eines Rezeptors durch einen Antagonisten den Effekt, der durch einen weiteren, anschließend aktivierten Rezeptor ausgelöst wird. Eine gegenseitige Beeinflussung von präsynaptischen inhibitorischen Rezeptoren ist bekannt für noradrenerge (Schlicker und Göthert 1998) sowie für cholinerge Neuronen (Giaroni et al. 1999, Shakirzyanova et al. 2006). Beispielsweise wird die inhibitorische Wirkung des CB₁-Rezeptors auf die Noradrenalinfreisetzung im Meerschwein-Hippokampus durch vorherige Blockades des α_{2D}-Autorezeptors verstärkt (Schlicker und Göthert 1998). Bisher wurde auf verschiedene Aspekte von CB₁-Rezeptoren abgehoben, diese Rezeptoren stehen ganz im Vordergrund dieser Dissertationsschrift. Auf fünf weitere Rezeptor-Systeme, die ebenfalls die Transmitterfreisetzung beeinflussen oder dies aufgrund ihrer Transduktionsmaschinerie tun könnten, wird im Folgenden eingegangen. Diese Systeme wurden hier weniger intensiv untersucht, und deshalb wird die einleitende Darstellung im Wesentlichen auf die in diesem

Kontext interessierenden Aspekte beschränkt. Lediglich bei Neuropeptid W und Neuropeptid FF (die bislang wenig Beachtung gefunden haben) wurde eine ausführlichere Darstellung gewählt.

1.3 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Acetylcholin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im zentralen und im peripheren Nervensystem. Es bindet sowohl an muskarinische Acetylcholinrezeptoren als auch an nikotinische Acetylcholinrezeptoren. Während muskarinische Acetylcholinrezeptoren zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, sind nikotinische Acetylcholinrezeptoren ligandgesteuerte Ionenkanäle (Aktories et al. 2009). Bisher wurden fünf Subtypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors kloniert (M_1 - M_5) (Caulfield und Birdsall 1998). Sie werden anhand ihrer spezifischen Kopplung an verschiedene G-Proteine in zwei Klassen eingeteilt: der M_2 - und der M_4 -Rezeptor aktivieren $G_{i/o}$ -Proteine, während der M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptor G_q -Proteine aktiviert (Wess 1996). Mithilfe von subtypspezifischen Knockout-Mäusen wurde im Hippokampus vorwiegend der M_2 -Rezeptor und im Cortex sowie im Striatum der M_4 -Rezeptor als präsynaptisch inhibitorischer Rezeptor identifiziert (Zhang et al. 2002a). An den $G_{i/o}$ Signaltransduktionsweg gekoppelt, führt ihre Aktivierung zu einer Hemmung der Acetylcholinfreisetzung. Auch in der Peripherie, im Vorhof und in der Harnblase, konnte nachgewiesen werden, dass der präsynaptische Autorezeptor die Eigenschaften eines M_4 -Rezeptors besitzt (Zhou et al. 2002).

Außer als Autorezeptoren agieren präsynaptische muskarinische Acetylcholinrezeptoren auch als präsynaptische Heterorezeptoren, vor allem auf noradrenergen Neuronen im Vorhof, in der Harnblase und im Samenleiter (M_1 , M_2 , M_3) (Trendelenburg et al. 2005) sowie auf dopaminergen Neuronen im Striatum (M_3 , M_4 , M_5) (Zhang et al. 2002b).

1.4 Neuropeptid-Rezeptoren

1.4.1 Neuropeptid W-Rezeptoren

Im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms wurden Gene für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert, ohne dass deren Liganden und Funktion bekannt waren. Zu diesen zählen auch GPR7 und GPR8 (O'Dowd et al. 1995), für welche die

endogenen Liganden Neuropeptid B (Fujii et al. 2002) und Neuropeptid W (Shimomura et al. 2002) identifiziert wurden. GPR7 und GPR8 wurden daraufhin jeweils als NPBW₁-Rezeptor und NPBW₂-Rezeptor bezeichnet (Alexander et al. 2008). Die N-terminale Aminosäure Tryptophan verleiht dem Neuropeptid W gemäß dem Einbuchstabencode für Aminosäuren seinen Namen; dieses Tryptophan ist bei Neuropeptid B translational bromiert, was der Anlass war, bei der Namensgebung ein "B" zu verwenden. Beide Rezeptoren sind G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelt (Mazzocchi et al. 2005) und werden durch die 23 Aminosäure langen Neuropeptide B und W aktiviert, ferner auch durch die verlängerte Hauptform der Neuropeptide, die jeweils 29 und 30 Aminosäuren lang ist (Brezillon et al. 2003). Interessanterweise konnte das Gen, welches den NPBW₂ Rezeptor kodiert, bei Nagern nicht detektiert werden (Lee et al. 1999). Die RT-PCR Analyse von humanem Gewebe zeigte eine vorwiegend zentrale Expression von NPBW₁-Rezeptor-mRNA, zum Beispiel im Hippokampus, im Thalamus und in der Amygdala. In der Maus ergab sich eine ähnliche Verteilung, mit zusätzlicher mRNA Expression im Hypothalamus (Brezillon et al. 2003). Eine NPBW₁-Rezeptor-Protein Expression wurde jedoch nur im Hypothalamus und in der Amygdala durch die Bindung des Radioliganden [¹²⁵I]-NPW bestätigt (Singh et al. 2004). In peripheren Geweben konnte NPBW₁-Rezeptor mRNA in der Hypophyse, in der Nebenniere und im Hoden nachgewiesen werden. In humanem Gewebe wurde in allen genannten Geweben zusätzlich NPBW₂-Rezeptor-mRNA gefunden (Brezillon et al. 2003). Hinsichtlich der Neuropeptide wurde entsprechende mRNA in vielen verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns nachgewiesen, mRNA für NPW zum Beispiel in der Substantia nigra, Amygdala und im Hippokampus, mRNA für NPB zusätzlich im Thalamus und Hypthalamus (Singh und Davenport 2006). Ferner wurde mRNA für die Neuropeptide im urogenitalen System detektiert (Fujii et al. 2002). Die Neuropeptide B und W spielen eine Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme. Eine wiederholte Applikation der Neuropeptide in das Hirnventrikelsystem bewirkte bei Mäusen eine verminderte Nahrungsaufnahme (Tanaka et al. 2003). Ferner wurde bei männlichen Mäusen ohne NPBW₁-Rezeptoren oder ohne NPB-Protein eine Gewichtszunahme beobachtet (Ishii et al 2003, Kelly et al. 2005). Das Neuropeptidsystem beeinflusst weiterhin die Hormonsekretion, so steigert es die Sekretion von Corticosteron und Prolaktin und hemmt die Sekretion von Somatotropin (Baker et al. 2003). Neuropeptid B und Neuropeptid W scheinen in der

Modulation von Schmerzen involviert zu sein, so wirkt eine intrathekale Injektion der Neuropeptide schmerzstillend gegenüber akuten inflammatorischen Stimuli. Weiterhin zeigen NPB-Knockout-Mäuse eine Hyperalgesie gegenüber akuten inflammatorischen Schmerzreizen (Kelly et al. 2005).

1.4.2 Neuropeptid FF-Rezeptoren

Das Octapeptid Neuropeptid FF und das Octadecapeptid Neuropeptid AF wurden erstmalig aus dem Rinderhirn isoliert (Yang et al. 1985). Neben diesen beiden Neuropeptiden wird auch das Octapeptid Neuropeptid SF aus demselben Propeptid (proNPFF_A) gebildet. Ein gemeinsames Merkmal ist ihre Arginin-Phenylalanin-Amid-Struktur (RFamid) (Alexander et al. 2008). Sie fungieren, neben weiteren Peptiden aus einem zweiten Propeptid (proNPFF_B), als endogene Liganden für die „verwaisten“ G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR147 und GPR74, die als NPFF₁- und NPFF₂-Rezeptor bezeichnet wurden (Alexander et al. 2008, Bonini et al. 2000). Beide sind an G $\alpha_{i/o}$ -Proteine gekoppelt (Gouardères et al. 2007) und hemmen die Adenylatcyclase, aber die genauen intrazellulären Signaltransduktionswege sind noch ungeklärt (Mollereau et al. 2005b).

Mithilfe von radioaktiv markierten selektiven Liganden wurde die Lokalisation für beide NPFF-Rezeptorsubtypen im zentralen Nervensystem der Ratte bestimmt. Der NPFF₂-Rezeptor wird in hoher, der NPFF₁-Rezeptor in weitaus geringerer Dichte im Hippokampus, im Thalamus und einigen hypothalamischen Kernen exprimiert. Im Hinterhorn des Rückenmarks und in den Raphé Kernen wird ausschließlich der NPFF₂-Rezeptor exprimiert (Gouardères et al. 2002).

Neben dieser Rezeptorverteilung liegen viele weitere Hinweise dafür vor, dass Neuropeptid FF eine Rolle in der Schmerzempfindung spielt, da es Opioidrezeptor-vermittelte Effekte moduliert. So hemmen NPFF₁- und NPFF₂-Rezeptoren in isolierten Neuronen sowie in SH-SY5Y Zellen den durch einen Opioidrezeptor-Agonisten hervorgerufenen Calciumeinstrom (Kersanté et al. 2006, Mollereau et al. 2005a, Roumy et al. 2003). Auf der anderen Seite steigert ein NPFF-Analogon die Freisetzung des endogenen Opioids Met-enkephalin, indem es den δ -Opioid-Autorezeptor im Rückenmark blockiert (Ballet et al. 1999). Auch in die hormonelle Regulation greift Neuropeptid FF ein, indem es beispielsweise die Freisetzung von Gonadoliberin hemmt (Saito et al. 2010). Ferner führt eine intrazerebrovaskuläre

Injektion von Neuropeptid FF zu einer verringerten Nahrungsaufnahme in Ratten (Dockray et al. 2004) und zu einer Hypothermie in Mäusen (Moulédous et al. 2010). Auch periphere Effekte von Neuropeptid FF werden beobachtet, so erhöht eine intravenöse Injektion von NPFF und einem NPFF-Analogen den Blutdruck und die Herzfrequenz in Ratten (Allard et al. 1995, Huang et al. 2000).

1.4.3 Interleukin-1 β -Rezeptoren

Seit langem ist bekannt, dass das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 β eine Rolle in der akuten Phase der Entzündungsreaktion spielt (Dinarello 2009). Es ist jedoch auch an der Regulation neurosekretorischer Prozesse beteiligt, indem es die Freisetzung von Neuropeptiden und Monoaminen reguliert (Song et al. 2006). Interleukin-1 β Immunoreaktivität wurde in Monozyten, aber auch in Mikroglia und in Neuronen gezeigt und der entsprechende IL-1 β -Rezeptor ist im Gehirn weit verbreitet (Parnet et al. 2002). Der IL-1 β -Rezeptor ist ein Tyrosin-Kinase-assoziiertes Rezeptor, der eine Vielzahl seiner biologischen Effekte über die Modulation des biosynthetischen Profils von Zielzellen erreicht. Seine Aktivierung führt beispielsweise über die Phosphorylierung nachgeschalteter Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung inflammatorischer Gene (Bankers-Fulbright et al. 1996).

1.5 Prostaglandin E-Rezeptoren

Prostaglandine sind ad hoc gebildete Mediatoren, werden also nicht wie Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert. Sie wirken auf glattmuskuläre Gewebe wie Gefäße, Darm und Uterus, beeinflussen die Magensaftsekretion, wirken auf die Aggregation der Blutplättchen, besitzen eine wichtige Rolle bei der Schmerz- und Fieberentstehung und sind bei inflammatorischen Prozessen beteiligt (Aktories et al. 2009). Man unterscheidet fünf Typen von Prostaglandinen, u.a. Prostaglandine der E-Serie. Diese wirken über vier Subtypen (EP₁-EP₄) (Alexander et al. 2008). Sie sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt.

Prostaglandine der E-Serie inhibieren u.a. die Freisetzung von Noradrenalin (Reimann et al. 1981) und Serotonin (Schlicker et al. 1987) im zentralen Nervensystem und von Noradrenalin und Acetylcholin im autonomen Nervensystem (Boehm und Kubista 2002, Fuder und Muscholl 1995). Mithilfe des selektiven EP₃-Rezeptor-Antagonisten L-826,266 (Juteau et al. 2001) konnte bestätigt werden, dass diese Wirkungen durch den präsynaptisch lokalisierten

EP₃-Rezeptor vermittelt werden (Günther et al. 2010). Diese Annahme beruhte ursprünglich nur auf Daten, die mit selektiven Agonisten und mit Antagonisten mit fehlender Affinität für den EP₃-Rezeptor erhoben wurden.

1.6 Histamin-Rezeptoren

Histamin wird in Vesikeln gespeichert und dient als Gewebshormon (periphere Gewebe) und Neurotransmitter (zentrales Nervensystem). Histamin wirkt auf glattmuskuläre Gewebe wie Gefäße, Darm und Lungen, beeinflusst die Magensaftsekretion, ist ein Mediator von Schmerz und Juckreiz und ist bei inflammatorischen Prozessen beteiligt (Aktories et al. 2009). Histamin wirkt über vier Rezeptor-Subtypen (H₁-H₄), davon ist bisher nur der H₃-Rezeptor sicher als präsynaptischer Rezeptor identifiziert worden. Der H₃-Rezeptor wird vorwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert (Drutel et al. 2001) und hemmt die depolarisationsinduzierte Freisetzung von Histamin über die Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen und die darauffolgende Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (H₃-Autorezeptor). Darüber hinaus wurde der H₃-Rezeptor auch an serotonergen, noradrenergen und glutamatergen Neuronen des Gehirns und Sympathikus- und Parasympathikus-Neuronen innerhalb des autonomen Nervensystems nachgewiesen (H₃-Heterorezeptor) (Schlicker et al. 1994). Über diese Mechanismen sind H₃-Rezeptoren an der zentralen Regulation des Hunger- und Durstgefühls, der Körpertemperatur, des Gedächtnisses und des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (Feuerstein 2008).

Die Klonierung des H₄-Rezeptors im Jahr 2000 ging der Beschreibung seiner Funktion voraus. Dieser Rezeptor wird vor allem auf Zellen des hämatopoetischen Systems und des Immunsystems exprimiert und besitzt eine proinflammatorische Funktion (Kiss und Keserű 2009). Zu seiner zentralen Lokalisation gibt es widersprüchliche Angaben. So konnten einige Autoren den H₄-Rezeptor im Gehirn gar nicht detektieren (Liu et al. 2001, Morse et al. 2001, Nakamura et al. 2000, Nguyen et al. 2001, Oda et al. 2000), wohingegen Cogé et al. (2001) geringe Mengen an H₄-Rezeptor-mRNA im Kleinhirn und im Hippokampus, nicht jedoch im Cortex fanden. Strakhova et al. (2009) wiesen schließlich H₄-Rezeptor-mRNA in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems der Ratte und des Menschen nach, konnten jedoch keine Expression im Hippokampus der Ratte feststellen. Connelly et al.

(2009) zeigten die Expression des H₄-Rezeptors im Cortex der Maus und des Menschen mittels Immunhistochemie.

2 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Wirkung von drei verschiedenen Substanzen am CB₁-Rezeptor charakterisiert werden. So sollte die Affinität von O-2050 ermittelt werden und insbesondere geprüft werden, ob diese Substanz, die von Gardner und Mallet (2006) als neutraler CB₁-Rezeptor Antagonist beschrieben wurde, diese Eigenschaft auch in unserem Versuchsmodell besitzt. Weiterhin sollte die Affinität und die intrinsische Aktivität des Endocannabinoids Virodhamin am CB₁-Rezeptor näher charakterisiert werden. Schließlich sollte die Affinität von N-Oleylglycin zum CB₁-Rezeptor geprüft werden. Diese Substanz war bei der Suche nach endogenen Substanzen in humanem Blutplasma, die in ihrer Struktur Cannabinoiden gleichen und somit möglicherweise Cannabinoidrezeptoren aktivieren können, identifiziert worden. Zur Charakterisierung der drei Substanzen wurden Superfusionsstudien, [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien und klassische Radioligandbindungsstudien verwendet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion des präsynaptischen CB₁-Rezeptors mit dem muskarinischen Autorezeptor. So sollte zunächst untersucht werden, ob eine verstärkte Aktivierung des CB₁-Rezeptors durch eine erhöhte Konzentration an Endocannabinoiden, wie sie in FAAH-Knockout-Mäusen auftritt, die Funktion des muskarinischen Autorezeptors beeinträchtigt. Ferner sollte überprüft werden, ob die gesteigerte Funktion des muskarinischen Autorezeptors in CB₁-Rezeptor defizienten Mäusen auf einer veränderten Expression bestimmter Proteine beruht. Dazu wurde die Expression des M₂-Rezeptors und der nachgeschalteten G_{α_{i/o}}-Proteine im Hippokampus von CB₁-Knockout-Mäusen mithilfe von Western Blots bestimmt werden und mit der Expression in Wildtyp-Mäusen verglichen werden.

Modulierende Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung sind für Cannabinoide, viele niedermolekulare Substanzen und Peptide wie Opiode und Neuropeptid Y gezeigt worden, jedoch existieren kaum Befunde für andere Peptide. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit mithilfe von Superfusionsstudien der Einfluss von Neuropeptid W und Neuropeptid FF auf die Noradrenalinfreisetzung untersucht werden. Ihre Kopplung an G-Proteine der G_{i/o}

Familie lässt eine inhibitorische Wirkung vermuten. Der Effekt von Interleukin-1 β sollte ebenfalls untersucht werden, denn hier liegen aus der Literatur Hinweise sowohl auf einen inhibitorischen (MohanKumar und MohanKumar 2002) als auch auf einen fazilitatorischen (Russell et al. 2008) Effekt hinsichtlich der Noradrenalinfreisetzung im Gehirn vor.

Außerdem ergaben sich im Rahmen anderer Projekte in unserer Arbeitsgruppe noch zwei weitere Ziele. So sollte mit [³⁵S]-GTP γ S-Bindungsstudien ein weiteres funktionelles Modell für den EP₃-Rezeptor ermittelt werden. Dies würde ein bereits von uns entwickeltes EP₃-Rezeptor-Modell, bei dem die Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung gemessen wird, ergänzen. Schließlich sollte - da die Angaben zur zentralen Lokalisation des H₄-Rezeptors in der Literatur widersprüchlich sind - dieser Rezeptor auf mRNA-Ebene im humanen und murinen Cortex mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Bei positivem Ausgang könnte dies die Grundlage für die Charakterisierung eines präsynaptisch exprimierten H₄-Rezeptors mithilfe von Superfusionsexperimenten schaffen.

B. Material und Methoden

1 Material

1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage Extend ED124S, Sartorius, Göttingen, D

Cell Harvester IH 120, Inotech, Wohlen, CH

Dispensetten 2 ml und 5 ml, Brand, Wertheim, D

DNA Gelektrophorese-System Run One, Embi Tec, San Diego, USA

Entwicklungsmaschine, CP 1000, Agfa, Köln, D

Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6000 TA, Beckman Coulter, Fullerton, USA

Fraktionssammler Multirac 2111, LKB, Freiburg, D

Gelektrophorese- und Blotting-System (Mini-Protean Tetra System), Bio-Rad, München, D

Guillotine, Eigenbau der Institutswerkstatt

Homogenisator Potter-Elvehjem Braun 853302/4, B. Braun, Melsungen, D

Kühlzentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, D

Kühlzentrifuge Typ J2-21, Beckman, München, D

Laborwaage TE 610, Sartorius, Göttingen, D

Magnetrührer, ARE Heating Magnetic Stirrer, VELP Scientifica srl, Usmate, I

Mikrowelle, Severin, Sundern, D

Multipette Nr. 4710, Eppendorf, Hamburg, D

pH-Meter Five Easy, Mettler Toledo, Gießen, D

Pipetten Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, D

Präparierbesteck, Everhards, Meckenheim, D

Rollerpumpe, Eigenbau der Institutswerkstatt

Roller-Mixer SRT6, Stuart, Staffordshire, UK

Schwenkschüttler Duomax 1030, Heidolph, Schwabach, D

Spannungsquelle PowerPac 300, Bio-Rad, München, D

Stimulator 215/II, Hugo Sachs, March-Hugstetten, D

Superfusionsanlage, Eigenbau der Institutswerkstatt

Thermocycler T3000, Biometra, Göttingen, D

Thermomixer 5350, Eppendorf, Hamburg, D
Thermostat Typ MP, Julabo, Seelbach, D
Tischzentrifuge Typ 5415C, Eppendorf, Hamburg, D
Ultra-Turrax T10 Basic, IKA Werke, Staufen, D
UV-Transilluminator Gel Doc® XR, Bio-Rad, München, D
UV/VIS Spektralphotometer BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D
UV/VIS Spektralphotometer Nano Drop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, USA
Vakuum Controller IH 195, Inotech, Wohlen, CH
Vortexer ZX3, VELP Scientifica srl, Usmate, I
Wasserbad Typ 1083, GFL, Burgwedel, D
Wasserbad und Schüttler 4010, Köttermann, Hänigsen, D

1.2 Verbrauchsmaterial

Autoradiographiefilme, ECL-Hyperfilm™, GE Healthcare, München, D
Faltenfilter 597½, Schleicher & Schuell, Dassel, D
Filter GF/B Nr. 1821915, Whatman, Maidstone, UK
Filter GF/C Nr. 1822915, Whatman, Maidstone, UK
Küvetten 67.741, Sarstedt, Nümbrecht, D
Midi-Vials™ 8ml, Perkin-Elmer, Boston, USA
Multipetten-Spitzen Combitips®, Eppendorf, Hamburg, D
Parafilm PM-956, Pechiney Plastic Packaging, Chigaco, USA
Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen, steril mit Filter, Axygen, Union City, USA
PVDF Blotting Membran Immobilon® P 0,45µm, Millipore, Schwalbach, D
Reaktionsgefäße 2 ml, Biozym, Oldendorf, D
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml und 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D

1.3 Chemikalien

Lösungen von Pharmaka wurden je nach Löslichkeit und Versuchsbedingungen in Aqua dem., DMSO, Ethanol oder Versuchspuffer hergestellt. Die jeweiligen Kontrollversuche ohne Pharmakon enthielten das entsprechende Volumen Lösungsmittel.

Material und Methoden

1Kb DNA Ladder, Invitrogen, Darmstadt, D

2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

40% Acrylamid/Bis Lösung, 29:1, Bio-Rad, München, D

Adenosindesaminase, Roche, Mannheim, D

AF-DX 384 (*N*-[2-[2-[(Dipropylamino)methyl]-1-piperidinyl]ethyl]-5,6-dihydro-6-oxo-11*H*-pyrido[2,3-*b*][1,4]benzodiazepine-11-carboxamide), Thomae, Biberach an der Riss, D

Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Agarose, Carl Roth, Karlsruhe, D

BSA (Rinderserumalbumin), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Calciumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, D

Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂), Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim, D

Coomassie-Brillantblau G 250, Serva, Heidelberg, D

CP 55,940, Biotrend, Köln, D

DAMGO, ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin), NeoMPS, Strasburg, F

Desipramin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

D(+)-Glucose, AppliChem GmbH, Darmstadt, D

DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck KGaA, Darmstadt, D

dNPA ((D)-NP-(N-Me)AFLFQPQRFamide), synthetisiert und freundlich überlassen von Prof. J.-M. Zajac, IPBS, Universität Toulouse, F

DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin), NeoMPS, Straßburg, F

DEPC (Diethylpyrocarbonat), Sigma-Chemie, Steinheim, D

DPDPE (((D)-Pen², (D)-Pen⁵)-enkephalin), NeoMPS, Straßburg, F

ECL-Chemilumineszenz-Reagenz, GE Healthcare, München, D

EDTA-Dinatriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure), Carl Roth, Karlsruhe, D

EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure), Carl Roth, Karlsruhe, D

Entwickler- und Fixierer- Stammlösung, Adefo-Chemie, Dietzenbach, D

Ethanol absolut, KMF Laborchemie, Lohmar, D

Ethidiumbromid 10 mg/ml, Bio-Rad, München, D

Glycin, Merck KGaA, Darmstadt, D

GDP (Guanosin-5'-diphosphat-natriumsalz), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Material und Methoden

GTP γ S (Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)-tetralithiumsalz), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Hemicholinium-3, ChemCon, Freiburg, D

innuSolv RNA Reagent, Analytic Jena, Jena, D

Interleukin-1 β (rekombinant, human), Innogenetics, Gent, B

Isopropanol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Kaliumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, D

Kaliumhydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, D

L(+)-Ascorbinsäure, Merck KGaA, Darmstadt, D

Lumagel-Safe® (Szintillationsflüssigkeit), Lumac LSC, Groningen, NL

Magnesiumchlorid-hexahydrat, Merck KGaA, Darmstadt, D

Magnesiumsulfat, Merck KGaA, Darmstadt, D

Milchpulver, fettfrei, Bio-Rad, München, D

Naltrindol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Natriumchlorid, Carl Roth, Karlsruhe, D

Natriumhydrogencarbonat, KMF Laborchemie, Lohmar, D

Neuropeptid FF (FLFQPQRFamid), synthetisiert und freundlich überlassen von Prof. J.-M. Zajac, IPBS, Universität Toulouse, F

Neuropeptid W 1-23 (Ratte), NeoMPS, Straßburg, F

N-Oyleylglycin, synthetisiert und freundlich überlassen von Prof. U. Fuhr, Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln, D

O-2050, Tocris, Ellisville, USA

ortho-Phosphorsäure 85%, Merck KGaA, Darmstadt, D

Oxotremorin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Polyethylenimin 50% (m/V), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

POPOP (1,4-Di-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol), Acros Organics, New Jersey, USA

PPO (2,5-Diphenyloxazol), Acros Organics, New Jersey, USA

Precision plus All Blue standard (Protein Maßstab), Bio-Rad, München, D

R(+)-WIN-55,212-2, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Rauwolscin, Carl Roth, Karlsruhe, D

Rimonabant (SR 141716A), Sanofi Recherche, Montpellier, F

Saccharose, Merck KGaA, Darmstadt, D

Salzsäure 1 M, KMF Laborchemie, Lohmar, D

SDS (Natriumdodecylsulfat), VWR, Darmstadt, D

Soluene®-500 (0,5 M quarternäres Ammoniumhydroxid in Toluol), Perkin-Elmer Boston,
USA

Sulproston, Bayer-Schering Pharma, Berlin, D

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Toluol, Merck KGaA, Darmstadt, D

Tris-Base, Pufferan®, Carl Roth, Karlsruhe, D

Tris-HCl, Pufferan®, Carl Roth, Karlsruhe, D

Tween® 20, Carl Roth, Karlsruhe, D

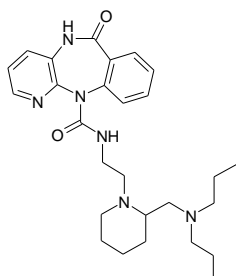
Virodhamin, BioTrend, Köln, D

1.4 Strukturformeln

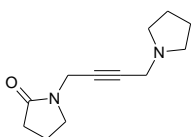
Cannabinoid-Rezeptor-Liganden:

siehe Kapitel A.1.2.1

Muskarin-Rezeptor-Liganden:

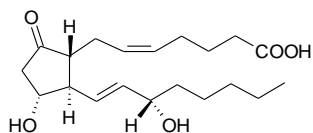


AF-DX 384

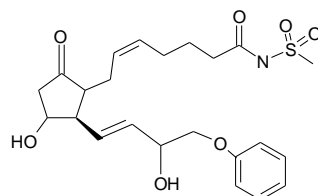


Oxotremorin

Prostanoid-Rezeptor-Liganden:

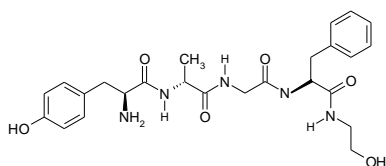


Prostaglandin E₂

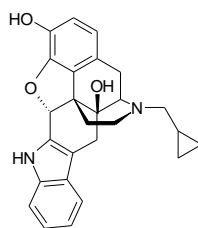


Sulproston

Opioid-Rezeptor-Liganden:

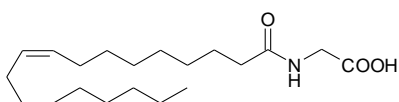


DAMGO



Naltrindol

Weitere:



N-Oleoylglycin

1.5 Radiochemikalien

[³H]-Noradrenalin (spezifische Aktivität: 53 Ci/mmol), PerkinElmer, Boston, USA

[³H]-Rimonabant (spezifische Aktivität: 44 Ci/mmol), Amersham, Little Chalfont, UK

[Methyl-³H]-Cholinchlorid (spezifische Aktivität: 86 Ci/mmol), PerkinElmer, Boston, USA

[³⁵S]-GTPγS (spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol), Perkin Elmer, Boston, USA

1.6 Kits für die Molekularbiologie

1Kb DNA Größenstandard, Invitrogen, Darmstadt, D

innuSolv RNA Reagent, Analytic Jena, Jena, D

Taq Core Kits 10, MP Biomedicals, Illkirch, F

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Mannheim, D

1.7 Primersequenzen

Maus:

- H₄ Rezeptor (modifiziert nach Liu et al. 2001)

forward: 5'-GTT TAA CTG GAA TTT TGG AAG TGG AAT CTG CAT G-3'

reverse: 5'-ACC AAG AAA GCC AGT ATC CAA ACA GCC ACC ATT TGA
GC-3'

- GAPDH

forward: 5'-CGG CAA ATT CAA CGG CAC AGT CA-3'

reverse: 5'-GGT TTC TCC AGG CGG CAC GTC-3'

Mensch:

- H₄ Rezeptor (nach Strakhova et al. 2009)
forward: 5'-GAT CTC CAT TCC TTT GTA CAT CC-3'
reverse: 5'-AGC CTT TTG AAA GCG CTT GTG AC-3'
- GAPDH (nach Strakhova et al. 2009)
forward: 5'-GAA GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG T-3'
reverse: 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'

Alle Primer wurden synthetisiert von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, D und mit Wasser für die PCR auf 10 pmol/μl verdünnt.

1.8 Antikörper

Primärantikörper:

- Ziegen Anti-mAChR M2 (C-18), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Verdünnung 1:200
- Kaninchen Anti-Gα_{i-3} (C-10), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Verdünnung 1:1000
- Kaninchen Anti-Gα_o (K-20), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Verdünnung 1:1000
- Maus Anti-α-Tubulin, Dianova, Hamburg, D
Verdünnung 1:1000

Sekundärantikörper:

- Esel Anti-Goat, IgG-HRP Conjugate, Chemicon, Schwalbach, D
Verdünnung 1:10.000
- Ziege Anti-Mouse, IgG-HRP Conjugate, Dianova, Hamburg, D
Verdünnung 1:1000
- Ziege Anti-Rabbit, IgG-HRP Conjugate, Cell Signaling, Danvers, USA
Verdünnung 1:1000

Die Antikörper wurden in TBS-T Puffer, welcher 1 % Milchpulver und 0,05 % (m/V) Natriumazid enthielt, verdünnt.

1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in Aqua dem. hergestellt, wenn nicht anders angegeben.

1.9.1 Puffer und Lösungen für Superfusionsstudien

Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung für die Superfusion (KH)

118 mM NaCl

23 mM NaHCO₃

4,8 mM KCl

1,2 mM KH₂PO₄

1,2 mM MgSO₄

10 mM Glucose

0,06 mM Ascorbinsäure

0,03 mM Na₂EDTA

1,3 oder 3,25 mM CaCl₂

Die Lösung wurde mit Carbogen (95 Vol. % O₂, 5 Vol. % CO₂) gesättigt.

1.9.2 Puffer und Lösungen für Radioligandbindungsstudien

TE-Puffer

50 mM Tris

5 mM Na₂EDTA

Der pH wurde dabei nicht durch Zugabe von HCl oder NaOH eingestellt, sondern ein geeigneter Anteil von Tris-HCl und Tris-Base eingesetzt (Tabelle 1), bei dem der Puffer bei der Inkubationstemperatur des Versuchs einen pH von 7,4 - 7,5 erreichte.

TE-Inkubationspuffer (bei 20 °C pH 7,55)

6,61 g Tris-HCl

0,70 g Tris-Base

1,86 g Na₂EDTA

ad 1000 ml

TE-Waschpuffer (bei 20 °C pH 7,34)

7,02 g Tris-HCl

0,67 g Tris-Base

1,86 g Na₂EDTA

ad 1000 ml

Tabelle 1: Tabelle zur Ermittlung der Einwaagen von Säure und Base bei der Herstellung von Tris-EDTA-Puffer pH 7,4-7,5.

Inkubations- Temperatur	pH bei 20 °C	Einwaage Tris (g) pro Liter	
		Tris-HCl	Tris-Base
4 °C (Waschpuffer)	7,34	7,02	0,67
25 °C	7,55	6,61	0,70

Szintillationscocktail I (mit hoher Wasseraufnahmekapazität)

Lumagel® Safe, Lumac LSC, Groningen, NL

Szintillationscocktail II (mit geringer Wasseraufnahmekapazität)

6 % PPO, 0,1 % POPOP, in Toluol.

1.9.3 Puffer und Lösungen für [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien

Tris-EGTA Reaktionspuffer

50 mM Tris

1 mM EGTA

3 mM MgCl₂

100 mM NaCl

pH 7,4

1.9.4 Puffer und Lösungen zur Arbeit mit Proteinen

Tris-Saccharose-Puffer für die Membranaufbereitung

10,27 % Saccharose, in TE-Puffer

Bradford-Stammlösung

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250

50 ml Ethanol 50 % (V/V)

100 ml Phosphorsäure 85 %

Aqua dem. ad 250 ml

Die Stammlösung wurde vor dem Erstgebrauch etwa vier Wochen bei 4 °C gelagert.

Bradford-Arbeitslösung

1 Volumenteil Bradford-Stammlösung

16 Volumenteile Aqua dem.

durch einen Faltenfilter filtriert, bei Bedarf frisch hergestellt.

Lauf-Puffer

Tris Base 25 mM

Glycin 200 mM

SDS 1 % (m/V)

Transfer-Puffer

Laufpuffer mit 20 % Methanol

Lämmli Probenpuffer (3-fach)

Tris-HCl 187,5 mM pH 6,8

Glycerol 30 % (V/V)

SDS 6 %

Bromphenolblau 0,015 %

TBS-Puffer

Tris 10 mM

NaCl 140 mM

pH 8

TBS-T-Puffer

0,1 % (V/V) Tween 20 in TBS

Strippuffer

Glycin 25 mM

SDS 1 % (m/V)

pH 2

Blockinglösung

5 % (m/V) fettfreies Milchpulver in TBS-T Puffer

Phosphatgepufferte Salzlösung

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8,1 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

pH 7,4

ECL- Detektionslösung

ECL-Lösung 1 (Peroxidsalzlösung) und

ECL-Lösung 2 (Luminol und Verstärker)

Im Verhältnis 1:1 mischen

1.9.5 Puffer und Lösungen zur Arbeit mit Nukleinsäuren

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC in Aqua bidest.

über Nacht inkubiert, anschließend autoklaviert

TAE Puffer (10-fach)

Tris 0,4 M

Essigsäure 0,2 M

EDTA pH 8,0 10 mM

Probenpuffer (6-fach)

Ficoll Typ 400 18 %

EDTA pH 8,0 0,12mM

TAE Puffer 10fach 60 %

Bromphenolblau 0,15 %

Xylencyanol FF 0,15 %

1.10 Tiere

Dunkin-Hartley Meerschweine, C57BL6/J Wildtyp-Mäuse und NMRI Mäuse, Charles River Laboratories, Sulzfeld, D

CB1^{-/-} Mäuse, Prof. A. Zimmer, Institut für Molekulare Psychiatrie, Bonn, D

FAAH^{-/-} Mäuse, Prof. B. Cravatt, The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA

Alle Tiere waren männlichen Geschlechts und zwischen 8 und 16 Wochen alt. Eine Ausnahme bildet die Versuchsreihe mit Neuropeptid W, in der Tiere weiblichen Geschlechts verwendet wurden.

1.11 Humanes Gewebe

Das humane Neocortexgewebe stammte von einer 32 Jahre alten Patientin, die in der Klinik für Neurochirurgie, Uniklinikum Bonn wegen Epilepsie operiert wurde. Der operative Zugang zum subcortikalen epileptischen Fokus wurde gewonnen, indem nach operationstechnischen Gesichtspunkten unter Umgehung funktionell wichtiger Regionen Cortexgewebe penetriert und dabei teilweise entfernt wurde. Die Verwendung dieses Gewebes, welches ansonsten verworfen worden wäre, wurde für Versuchszwecke von der Bonner Ethikkommission genehmigt. Von der Patientin wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt.

1.12 Datenbanken und Computer-Software

GraphPad InStat 1.0 und Prism 5.0, GraphPad, San Diego, USA

MDL Isis/Draw 2.5, MDL, Santa Clara, USA

Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Quantity One Basic 4.6.2, Bio-Rad, München, D

2 Methoden

2.1 Superfusion

2.1.1 Versuchsanordnung

Die Tiere wurden dekapitiert und die benötigten Organe entnommen. Diese wurden in eiskalter KH zwischengelagert und möglichst zügig weiterpräpariert, und zwar:

- Großhirnrinde: Die Rinde wurde von den anderen Hirnteilen getrennt, in Schichten von 0,3 mm Dicke geschnitten und diese zu Scheiben von 3 mm Durchmesser gestanzt.
- Hippokampus: Der Hippokampus wurde aus dem Gesamthirn herauspräpariert, Schichten von 0,3 mm Dicke geschnitten und diese zu Scheiben von 2 mm Durchmesser gestanzt.
- Hypothalamus: Der Hypothalamus wurde aus dem Gesamthirn herauspräpariert, Schichten von 0,3 mm Dicke geschnitten und diese zu Scheiben von 2 mm Durchmesser gestanzt.
- Retina: Linse und Glaskörper wurden aus dem Auge entfernt und die Retina herausgelöst. Es wurden Scheiben von 3 mm Durchmesser gestanzt.
- Vorhof: Das Herz wird auf Höhe der Vorhöfe aufgeschnitten und die Vorhofwände herausgeschnitten und in Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten.

Die Gewebestücke wurden anschließend 30 Minuten in KH, die [³H]-Cholin 100 nM enthielt, oder 60 Minuten in KH, die 25 nM [³H]-Noradrenalin enthielt, unter ständiger Begasung mit Carbogen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in den Superfusionskammern auf Polypropylnetzen zwischen zwei Platinelektroden platziert und mit KH superfundiert.

Das Superfusionsmedium enthielt als Hilfspharmaka Desipramin und Rauwolscin je 1 µM bei [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten Geweben (außer bei den Versuchen an der Retina) und Hemicholinium-3 10 µM bei [³H]-Cholin-vorinkubierten Geweben. Die Superfusion erfolgte bei 37°C mit einem Durchlauf von 1 ml/min unter ständiger Begasung mit Carbogen.

Die Tritiumabgabe wurde durch zwei 2-minütige Reizperioden (S₁ und S₂) durch Rechteckimpulse stimuliert. Eine Ausnahme bildeten die Versuche mit Interleukin-1β mit zwei weiteren 2-minütigen Reizperioden (S₃ und S₄). Die genauen Stimulationsparameter,

Material und Methoden

der Zeitpunkt der Stimulation und die Gesamtversuchsdauer unterschieden sich in einzelnen Versuchsreihen und können Tabelle 2 entnommen werden.

Auch der so genannte „Pharmakonwechsel“ erfolgte zu unterschiedlichen Zeiten, aber immer zwischen S₁ und S₂. Damit ist die Einleitung der zu untersuchenden Substanz in die Superfusionslösung gemeint. Im Allgemeinen wurden Agonisten zum Pharmakonwechsel, Antagonisten von Beginn der Superfusion an zugegeben.

Ab der 5. Minute vor S₁ wurde das Superfusat (also die KH, die die Kammer bereits passiert hat) kontinuierlich in 5-Minuten-Fractionen gesammelt und mit 1,2 Volumenanteilen Szintillationscocktail I gemischt. Nach Versuchsende wurden die Gewebestücke in 0,5 ml Soluene® aufgelöst und mit 5 ml Szintillationscocktail II versetzt. Die Bestimmung des Tritiumgehalts der Superfusate und Gewebeproben erfolgte schließlich durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler.

Tabelle 2: Versuchsbedingungen in den verschiedenen Versuchsreihen. Abkürzungen: SF - Dauer der Superfusion; Reiz-Bed. - Stimulationsparameter; Ph. - Zugabe des Pharmakons; Ca²⁺-Konz. - Calciumkonzentration im Superfusionsmedium; MS - Meerschwein

Spezies	Gewebe	Tracer	SF (min)	Reiz ab min	Reiz-Bed. (Hz; mA; ms)	Ph. (ab min)	Ca ²⁺ -Konz. (mM)	Kapitel C.
Maus C57BL6/J	Cortex	[³ H]-NA	110	S ₁ :40; S ₂ :90	0,3; 50; 2	62	1,30	2.2
NMRI	Cortex	[³ H]-NA	210	S ₁ :40; S ₂ :90; S ₃ :140; S ₄ :190	0,3; 50; 2	77	1,30	2.3
C57BL6/J	Hippokampus	[³ H]-Cholin	110	S ₁ :40; S ₂ :90	3; 200; 2	62	3,25	1.2.1
C57BL6/J	Hippokampus	[³ H]-NA	110	S ₁ :40; S ₂ :90	0,3; 50; 2	62	1,30	2.1
C57BL6/J	Hypothalamus	[³ H]-NA	110	S ₁ :40; S ₂ :90	0,3; 50; 2	62	1,30	2.1
C57BL6/J	Vorhof	[³ H]-NA	110	S ₁ :40; S ₂ :90	3; 200; 2	62	3,25	2.2
MS	Retina	[³ H]-NA	120	S ₁ :60; S ₂ :100	3; 50; 2	82	1,30	1.1.4

2.1.2 Versuchsauswertung: Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung

Die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde berechnet als Anteil des Tritiums in Prozent, das zu Beginn der einzelnen 5-Minuten-Sammelperioden im Gewebe vorhanden war.

Der basale Efflux, d.h. die ohne Stimulation gemessene Tritiumabgabe, wurde in den Sammelperioden vor dem Pharmakonwechsel (B_1) und vor S_2 (B_2) bestimmt. Der Quotient B_2/B_1 ist somit ein Maß für den Einfluss einer beim Pharmakonwechsel eingeleiteten Substanz auf die basale Tritiumfreisetzung. In den Versuchen mit Interleukin- 1β wurde der basale Efflux in den Sammelperioden 15-20 Minuten nach S_1 (B_1) und vor S_2 bzw. S_3 oder S_4 (B_2 , B_3 , B_4) bestimmt.

Die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde berechnet als Fläche zwischen den Kurven der basalen und der totalen Tritiumfreisetzung während der Stimulation und den nachfolgenden 13 Minuten. Dabei wurde ein linearer Abfall der basalen Tritiumfreigabe zwischen der Fraktion -5 bis 0 min vor und der Fraktion 15 bis 20 Minuten nach der Stimulation angenommen.

Zur Quantifizierung der Pharmakoneffekte wurde der Quotient aus der durch S_2 (bzw. S_3 oder S_4) und der durch S_1 stimulierten Tritiumabgabe gebildet und mit dem entsprechenden Quotienten der Kontrolle verglichen. In Studien, in denen das zu untersuchende Pharmakon von Beginn der Superfusion an anwesend war, wurde die durch S_1 stimulierte Tritiumabgabe mit dem entsprechenden Wert der Kontrolle verglichen.

2.1.3 Berechnung pharmakologischer Wirkstärken

Die Wirkstärke eines Agonisten wird mit dem pEC_{50} -Wert charakterisiert, definiert als der negative dekadische Logarithmus der Konzentration, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft.

Die Wirkstärke eines kompetitiven Antagonisten wird mit dem pA_2 -Wert charakterisiert. Er ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration, bei der die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten um den Faktor zwei nach rechts verschoben wird (Arunlakshana und Schild 1959).

Zur Berechnung des pA_2 -Wertes dient Gleichung 1:

$$pA_2 = \log\left(\frac{[E']}{[E]} - 1\right) - \log[B] \quad \text{Gleichung 1}$$

[E'] Konzentration des Agonisten, die in Anwesenheit des Antagonisten eine halbmaximale Wirkung hervorruft; [E] Konzentration des Agonisten, die in Abwesenheit des Antagonisten eine halbmaximale Wirkung hervorruft; [B] Konzentration des Antagonisten.

Streng genommen müsste man bei den in dieser Arbeit gezeigten pA_2 -Werten von „scheinbaren pA_2 -Werten“ sprechen, da nur eine oder zwei statt mindestens drei Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten untersucht wurden. Der Übersichtlichkeit halber wurde aber auf diese Differenzierung verzichtet.

2.2 Radioligandbindungsstudien

2.2.1 Theoretische Grundlagen

Die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor folgt dem Massenwirkungsgesetz und kann durch folgendes Reaktionsschema beschrieben werden:



[R], [L] Konzentration des freien Rezeptors bzw. Liganden, [RL] Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes, k_{on} , k_{off} Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. Dissoziation.

Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. die Assoziations- und Dissoziationsvorgänge laufen mit gleicher Geschwindigkeit ab, kann die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D wie folgt definiert werden:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad \text{Gleichung 3}$$

K_D , ausgedrückt in mol/l ist ein Maß für die Affinität des Liganden am Rezeptor und entspricht derjenigen Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren durch den Liganden besetzt ist.

Die maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} errechnet sich theoretisch aus der Summe von freien und besetzten Rezeptoren.

Die Sättigungsbindung ist eine Methode zur Bestimmung des Bindungsparameters K_D eines Radioliganden und der maximalen Anzahl der zu besetzenden Rezeptoren (B_{max}). In der

vorliegenden Arbeit wurden keine Sättigungsbindungen durchgeführt, da auf entsprechende bereits ermittelte K_D und B_{max} Werte in unserem Labor zurückgegriffen werden konnte. Der theoretische Hintergrund wird an dieser Stelle im Hinblick auf die Auswertung erläutert. In Sättigungsbindungen wird die Interaktion eines Rezeptors mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden untersucht. Nach Gleichgewichtseinstellung wird die Gesamtbindung als Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung gemessen. Die unspezifische Bindung des Radioliganden an den Filtern und an anderen Proteinen im Reaktionsansatz wird in Anwesenheit eines im Überschuss zugesetzten unmarkierten Liganden bestimmt, der mit hoher Affinität an die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor wie der Radioligand bindet und diesen somit aus der Rezeptorbindung verdrängt. Die Differenz aus der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung ergibt die spezifische rezeptorgebundene Radioligandmenge.

Die spezifische Bindung des Radioliganden [RL] pro mg Protein aufgetragen gegen die Radioligandkonzentration [L] ergibt eine hyperbolische Sättigungsisotherme, die mit folgender Gleichung beschrieben werden kann:

$$[RL] = \frac{B_{max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Sättigungsisotherme erreicht mit zunehmender Radioligandkonzentration ein Plateau, das der maximalen Rezeptorkonzentration (B_{max}) entspricht. Die Radioligandkonzentration, die zu einer halbmaximalen Besetzung der Bindungsstellen führt, ergibt den K_D -Wert des Radioliganden.

Zur linearen Visualisierung nach Scatchard wird der Quotient aus spezifischer Bindung und freier Radioligandkonzentration $[RL]/[L]$ gegen die spezifische Bindung des Radioliganden [RL] aufgetragen. Es ergibt sich eine Gerade, wenn eine einheitliche Rezeptorpopulation vorliegt.

Die Affinität eines unmarkierten Liganden, der um die gleiche Rezeptorbindungsstelle wie der Radioligand konkurriert (kompetitive Interaktion), wird mithilfe von Konkurrenzexperimenten bestimmt. Dabei wird die konstant gehaltene Radioligandkonzentration mit aufsteigenden Konzentrationen des nicht markierten Liganden, auch Inhibitor oder Kompetitor genannt, versetzt. Mit steigender Konzentration

des Inhibitors wird der Radioligand zunehmend aus seiner Rezeptorbindung verdrängt. Wird die gemessene spezifische Bindung des Radioliganden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Inhibitors aufgetragen, resultiert ein sigmoider Kurvenverlauf, der mit der Hill-Gleichung beschrieben wird:

$$B_{ges} - MIN = \frac{MAX - MIN}{1 + \left[\frac{IC_{50}}{[I]} \right]^{n_H}} \quad \text{Gleichung 5}$$

B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden, MIN Radioligandbindung in Anwesenheit einer hohen Konzentration des Inhibitors (d.h. einer Konzentration, welche die spezifische Bindung vollständig inhibiert), MAX Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors, IC_{50} Konzentration des Inhibitors, die die spezifische Bindung des Radioliganden auf 50% reduziert (entspricht dem Wendepunkt der Kurve), $[I]$ Konzentration des Inhibitors, n_H Hill-Koeffizient.

Der Hill-Koeffizient n_H ist ein Maß für die Steilheit der Kurve, im Falle einer kompetitiven Hemmung ergibt sich ein Wert nicht signifikant verschieden von -1.

Die Bestimmung der Affinität eines Inhibitors zum Rezeptor durch die Verdrängungskonstante K_i erfolgt nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 6}$$

$[L]$ Konzentration des Radioliganden.

2.2.2 Membranpräparation

Zur Präparation von Proteinsuspension für die Radioligandbindungsexperimente wurden männliche Dunkin-Hartley Meerschweine und männliche C57BL6/J Mäuse dekapitiert, das Hirn entnommen und die Großhirnrinde (Kortex) und der Hippokampus sofort präpariert. Je zwei Kortizes oder zwei Hippocampi vom Meerschwein oder sechs Hippocampi von der Maus wurden in ein tariertes Becherglas, gefüllt mit 25 ml Tris-Saccharose-Puffer, überführt und ausgewogen. Die Gewebe wurden dann mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators mit 10 Hüben bei 1200 U/min eine Minute lang homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 5 ml Tris-Saccharose-Puffer nachgespült und 10 Minuten mit 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 25 Minuten mit 25000 x g erneut zentrifugiert. Das erhaltene P2-Pellet wurde zweimal in je 10 ml TE-Puffer resuspendiert und anschließend 10 Minuten mit 25000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in TE-Puffer (für Verdrängungsbindungen) oder Tris-EGTA-Puffer

(für GTP γ S Bindungen) erneut mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators mit 10 Hüben bei 1200 U/min eine Minute lang homogenisiert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinsuspension, falls notwendig, mit dem TE-Puffer auf die benötigte Proteinkonzentration verdünnt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Bradford (1976) beruht auf der Farbänderung des roten Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 bei der Ausbildung eines blauen stabilen Protein-Farbstoff-Komplexes. Diese Farbentwicklung kann photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Proteinbestimmung wurden 0,15 ml der zu untersuchende Proteinsuspension mit 2 ml der Bradford-Arbeitslösung versetzt und innerhalb von 30 Minuten photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die im Konzentrationsbereich von 1 bis 15 μ g Protein mit BSA als Standard aufgenommen wurde. Der Leerwert wurde mit 0,15 ml Aqua dem. bestimmt.

2.2.4 Verdrängungsstudien

Die Verdrängungsstudien am CB₁ Rezeptor wurden mit [³H]-Rimonabant als Radioligand durchgeführt. Die Reaktionsansätze von je 500 μ l Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen wie folgt zusammengesetzt (alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im 500 μ l Reaktionsansatz und alle Substanzen wurden im Inkubationspuffer gelöst und verdünnt):

- 50 μ l [³H]-Rimonabant (spezifische Aktivität: 44 Ci/mmol) 0,5 nM
- 50 μ l einer von zehn aufsteigenden Konzentrationen Kompetitor *oder* CP 55,940 3 μ M (unspezifische Bindung) *oder* Inkubationspuffer (totale Bindung)
- 300 μ l Inkubationspuffer
- 100 μ l Proteinhomogenat (60-100 μ g/ 500 μ l Endkonzentration)

Jeder Messwert wurde in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die Reaktion startete durch Zugabe des Proteinhomogenats. Die Proben wurden über 60 Minuten bei 25 °C inkubiert und anschließend durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf mit 0,3 % Polyethylenimin-vorbehandelte GF/C-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei

Waschschritte mit je 2 ml eiskaltem Waschpuffer. Die einzelnen Filter wurden jeweils in Szintillationsvials überführt und mit 4 ml Szintillationscocktail I versetzt. Die Proben wurden dann mindestens 12 Stunden lang geschüttelt und anschließend die Radioaktivität der aufgelösten Filter in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.2.5 Versuchsauswertung

Alle Bindungsstudien wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 ausgewertet. Dazu wurden die Werte für die unspezifische Bindung von den erhaltenen Werten für die Gesamtbindung (totale Bindung) abgezogen und in Prozent der maximalen Bindung (Kontrollwert ohne Kompetitor) umgerechnet. Mit diesen Werten wurde dann eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Zu den mathematischen Grundlagen siehe 2.2.1. Zur Berechnung der IC_{50} wurden die Versuche einzeln ausgewertet und Mittelwert und SEM von n Versuchen gebildet. Für die Abbildungen wurden von jedem Versuch die Mittelwerte der einzelnen Punkte verwendet und neu regrediert.

2.3 [^{35}S]-GTP γ S-Bindungsstudien

2.3.1 Theoretische Grundlagen

In [^{35}S]-GTP γ S-Radioligand-Bindungsstudien wird das Ausmaß der G-Protein Aktivierung, welche durch die Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgelöst wird, untersucht (Lazareno 1999). Hierbei wird die Affinität der radioaktiv markierten, hydrolysestabilen GTP-Analogs substanz [^{35}S]-GTP γ S (Abbildung 8) zur G_{α} -Untereinheit des G-Proteins ermittelt.

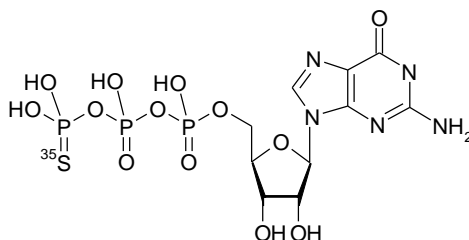


Abbildung 8: [^{35}S]-Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) ([^{35}S]-GTP γ S)

Im Ruhezustand des Rezeptors ist GDP an die G_{α} -Untereinheit des G-Proteins gebunden. Die Bindung eines Agonisten an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung und führt zum Austausch von GDP gegen GTP. Anstelle von GTP

bindet jedoch [³⁵S]-GTP γ S irreversibel an die G α -Untereinheit. Auf diese Weise wird der erste Schritt in der Signaltransduktion nach der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors quantitativ gemessen. Je stärker die Aktivierung durch einen Agonisten ausfällt, desto mehr G-Proteine binden [³⁵S]-GTP γ S und die gemessene Radioaktivität nach Filtration des Reaktionsansatzes nimmt zu. Um das Konformations-Gleichgewicht zum inaktiven Zustand hin zu verschieben, wird dem Inkubationspuffer GDP und Natriumchlorid im Überschuss zugesetzt. [³⁵S]-GTP γ S bindet irreversibel an die G-Proteine und es kommt nicht zu einer Gleichgewichtseinstellung. Daher sind eine exakte Einhaltung der Inkubationszeit und Reaktionsbedingungen entscheidend.

2.3.2 Versuchsanordnung

Reaktionsansätze von je 500 μ l Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen wie folgt zusammengesetzt (alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im 500 μ l Reaktionsansatz und alle Substanzen wurden in Tris-EGTA Reaktionspuffer gelöst und verdünnt):

- 50 μ l [³⁵S]-GTP γ S (spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol) 0,05 nM
- 50 μ l GDP (30 μ M)
- 50 μ l einer von zehn aufsteigenden Konzentrationen eines Liganden *oder* GTP γ S 10 μ M (unspezifische Bindung) *oder* Tris-EGTA Reaktionspuffer (totale Bindung), alle in Tris-EGTA Reaktionspuffer mit 0,5 % BSA
- 300 μ l Tris-EGTA Reaktionspuffer
- 50 μ l Proteinhomogenat (5-10 μ g/ 500 μ l Endkonzentration)

Sollte die Interaktion von zwei Liganden am Rezeptor untersucht werden, so wurden 50 μ l des Tris-EGTA Reaktionspuffers durch 50 μ l eines Liganden in Tris-EGTA Reaktionspuffer mit 0,5 % BSA ersetzt. BSA dient als Lösungsvermittler für die sehr lipophilen Cannabinoide und verhindert eine Absorption an Glas- und Kunststoffoberflächen (Pertwee 1997). Jeder Messwert wurde in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Das Proteinhomogenat wurde vor dem Versuch 10 Minuten bei 30 °C mit Adenosindesaminase 0,004 U/ml inkubiert und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Dieser Schritt soll endogen vorhandenes Adenosin deaktivieren, da auch dieses in der Lage ist, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu aktivieren. Die Reaktion startete durch Zugabe des Proteinhomogenats. Die Proben wurden über 60

Minuten bei 30 °C inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde ein unbehandelter Whatman GF/B-Filter in den Inotech Cell-Harvester gelegt, einmal mit Tris-EGTA Reaktionspuffer mit 0,5 % BSA je Reaktionsröhrchen gespült und dann verworfen. Dieser Schritt diente der Reduzierung von unspezifischen Bindungsstellen und sollte somit den Verlust der sehr lipophilen Substanzen an den inneren Oberflächen des Harvesters vermeiden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf unbehandelte GF/B-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschrirte mit je 2 ml eiskaltem Waschpuffer. Die einzelnen Filter wurden jeweils in Szintillationsvials überführt und mit 4 ml Szintillationscocktail I versetzt. Die Proben wurden dann mindestens 12 Stunden lang geschüttelt und anschließend die Radioaktivität der aufgelösten Filter in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.3.3 Auswertung

Die [³⁵S]-GTP γ S-Radioligand-Bindungsstudien wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 ausgewertet. Dazu wurden die Werte für die unspezifische Bindung von den erhaltenen Werten für die Gesamtbindung (totale Bindung) abgezogen. Der Zahlenwert dieser Differenz in dpm wird gleich 100 % (Basalwert) gesetzt. Die in Gegenwart der Testsubstanz ermittelte spezifische Bindung, welche sich ebenfalls aus der Differenz von Gesamtbindung minus unspezifischer Bindung errechnet, wird auf diesen Basalwert (100 %) bezogen und gegen die Testsubstanz-Konzentration [M] aufgetragen. Mit diesen Werten wurde dann eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Für die Abbildungen wurden von jedem Versuch die Mittelwerte der einzelnen Punkte verwendet und neu regrediert.

2.4 Western Blot Analyse

2.4.1 Synaptosomen-Präparation

Zur Präparation von Synaptosomen aus Hippokampi wurden männliche C57BL6/J Wildtyp Mäuse und CB₁-Knockout-Mäuse dekapitiert, das Hirn entnommen und die Hippokampi sofort präpariert. Synaptosomen stellen isolierte präsynaptische Nervenendigungen dar, die sich nach Abtrennung der Axone zu eigenständigen Kompartimenten zusammengeschlossen haben (Gray und Whittaker 1962). Je vier Hippokampi wurden in den Potter-Elvehjem-Homogenisator, gefüllt mit 1600 μ l Tris-Saccharose-Puffer, überführt und

mit 10 Hüben bei 800 U/min eine Minute lang homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in zwei 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 400 µl Tris-Saccharose-Puffer nachgespült und 10 Minuten mit 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 25 Minuten mit 12000 x g erneut zentrifugiert. Das erhaltene P2-Pellet wurde in 800 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend 15 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Alle Schritte wurden zum Schutz vor Proteasenaktivität auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe B.2.2.3) wurde die Synaptosomensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur analytischen Trennung von Proteinen. SDS bewirkt, besonders nach vorheriger Reduktion der Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol, die Entfaltung der Proteine und bildet mit ihnen Komplexe mit einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältnis. Die Eigenladung der Proteine wird durch die starke negative Ladung des SDS maskiert. Der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix bewirkt eine Auftrennung nach Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) für das Gelsystem Mini-Protean Tetra (Bio-Rad) verwendet. Die Proteine werden zunächst am Ende eines Sammelgels konzentriert, bevor sie gleichzeitig in ein 10 %iges Trenngel übertreten und die Proteinauftrennung beginnt. Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Aqua dem.	4,97 ml	2,98 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) +SDS	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) +SDS	-	0,5 ml
Acrylamid/Bis 40%	2,48 ml	0,5 ml
20% Ammoniumpersulfat	50 µl	20 µl
TEMED	4 µl	4µl

Zur Denaturierung wurden die Proteinproben mit Laemmli-Probenpuffer, dem zuvor 1:20 β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Das Gel wurde in der Kammer fixiert, mit Laufpuffer geflutet und mit den Proben sowie einem Proteinstandard zur Größenabschätzung beladen. Die Elektrophorese lief bei konstanten 100 V über einen Zeitraum von ca. 140 Minuten ab.

2.4.3 Western Blot

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden wurden anschließend ebenfalls im Mini-Protean Tetra System elektrophoretisch auf eine hydrophobe PVDF-Membran transferiert. Diese Membranen zeichnen sich durch eine hohe Proteinbindekapazität aus. Vor ihrem Einsatz muss die Membran in Ethanol aktiviert werden, da sie ansonsten mit wässrigen Lösungen nicht benetzbar ist. Um die Transferrate zu erhöhen, enthält der Transferpuffer 20 % Methanol. Dies lockert die Bindung des SDS an die Proteine und erleichtert somit die Bindung an die Membran.

Das zu blottende Gel, bei dem das Sammelgel entfernt wurde, die PVDF-Membran und die Schaumstoffschwämme wurden zunächst in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Sandwich aus Gel, Membran und Schaumstoffschwämmen luftblasenfrei in eine Blotkassette gelegt. Diese Kassette wurde in eine mit eiskaltem Transferpuffer und einem Kühlelement befüllte Blotkammer überführt, so dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet waren. Der Transfer wurde bei 300 mA für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 15 Sekunden in Methanol gewaschen und bei Raumtemperatur ca. 30 min getrocknet. Die trockene Membran wurde wieder in Ethanol befeuchtet und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für eine Stunde mit Blockinglösung inkubiert, um die Sensitivität des Systems zu erhöhen und Hintergrundsignale gering zu halten. Der nächste Schritt bestand nun in der Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Epitop des zu detektierenden Proteins. Hierzu wurde die Membran nach dreimal fünfminütigem Waschen in TBS-T Puffer über Nacht bei 4 °C mit der jeweiligen Primärantikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal in TBS-T gewaschen (5 min), um überschüssigen Erstantikörper zu entfernen. In einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte nun die Bindung des entsprechenden mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörpers an die konstante Region des Primärantikörpers. Nach drei fünfminütigen Waschsritten mit TBS-T Puffer wurde die mit Proteinen besetzte Membranseite zur Detektion mit 1 ml ECL-Lösung benetzt, in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Bei dieser enzymatischen Nachweisreaktion katalysiert das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase die Substratumsetzung in ein lumineszierendes Produkt. Zur Detektion der Lumineszenzsignale wurden in der

Dunkelkammer nacheinander Röntgenfilme für verschiedene Zeiten aufgelegt (je nach Stärke des Signals für 3 Sekunden bis zu 1 Minute) und diese anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt und getrocknet. Schließlich wurden die Filme eingescannt und die Bandenintensitäten konnten mithilfe der Quantity One Software densitometrisch vermessen werden und auf diese Weise quantitativ ausgewertet werden. Zur Ermittlung des Ausmaßes der Proteinexpression wurde der Quotient aus den densitometrisch ermittelten Werten für die zu untersuchenden Protein-Banden mit den dazugehörigen α -Tubulin-Banden gebildet.

2.4.4 Strippen bereits detektierter Membranen

Nach dem Immunoblot und der Detektion wurden die Protein-Antikörperbindungen durch 30-minütige Inkubation mit Strippuffer wieder gelöst. Es folgten zwei zehnminütige Waschschriffe mit phosphatgepufferter Salzlösung. Durch eine einstündige Inkubation mit Blockinglösung, wie unter 2.4.3 beschrieben, wurde die Membran auf die Reaktion mit dem zweiten Primärantikörper Anti-Tubulin vorbereitet.

2.5 mRNA Expressionsanalyse

2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Cortexgeweben

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des innuSOLV Kits nach Angaben des Herstellers. Im Einzelnen wurde eine männliche C57BL6/J Maus durch Dekapitation getötet und die Milz und der Cortex herauspräpariert. Das humane kortikale Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in eisgekühlten KH-Puffer gegeben und unmittelbar aus dem neurochirurgischen Operationssaal ins Labor gebracht. Makroskopisch erkennbare Anteile von weißer Substanz und Gefäßen wurden abpräpariert. Anschließend wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Gewebe wurden je mit 1 ml innuSOLV versetzt und mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Nach Versetzen mit 200 μl Chloroform und 10 Minuten Zentrifugation bei $12500 \times g$ wurde die obere wässrige Phase, die die gelöste RNA und Proteine enthält, abpipettiert und mit 500 μl Isopropanol gemischt. Die so gefällte RNA wurde zu einem Pellet abzentrifugiert (10 Minuten $12500 \times g$), einmal mit 1 ml Ethanol 75 % (V/V) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde je nach Größe mit 25-50 μl DEPC-Wasser

aufgenommen und direkt der Reversen Transkription unterzogen oder bei -80 °C gelagert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die erfolgreiche Isolation und die erhaltene Konzentration wurden durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm überprüft. Dies ist möglich, da die mesomeren Strukturen der Purin- und Pyrimidinbestandteile der Nukleinsäuren durch UV-Licht angeregt werden und eine Absorption gemessen werden kann. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm stellt ein Maß für die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteine dar. Er sollte im Falle der RNA bei ~2,0 liegen.

2.5.3 Reverse Transkription

Zum Nachweis der exprimierten Transkripte durch anschließende PCR-Amplifikation musste die isolierte mRNA zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde eine rekombinante Reverse Transkriptase aus dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet, die in *E. coli* exprimiert wird. Das Reaktionsgemisch, bestand aus je

500 ng RNA in 11 µl Aqua dem. steril

4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer 5x

2 µl dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM)

2 µl Random Hexamer Primer

0,5 µl Reverse Transcriptase

0,5 µl Protector RNase Inhibitor

und wurde 10 min bei 25 °C, 30 min bei 55 °C und 5 min bei 85 °C im Heizblock inkubiert.

Die erhaltene cDNA wurde direkt der PCR unterzogen oder bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA (Mullis et al. 1986). Der Prozess besteht aus einer Serie von 25-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus 3 Schritte umfasst. Zunächst wird die doppelsträngige Template-DNA in Einzelstränge denaturiert. In der anschließenden Annealingphase hybridisieren die spezifischen Primer (17-28 Bp lange Oligonukleotide) durch Temperatursenkung an ihre komplementäre Region auf der DNA.

Material und Methoden

Sie bilden nun den Startpunkt für die folgende DNA-Neusynthese durch die temperaturstabile Taq-Polymerase.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl cDNA

je 1,25 µl Primer forward und reverse

4 µl dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 1,25 mM)

2,5 µl Taq Puffer mit MgCl₂

0,25 µl Taq DNA Polymerase 5 U/µl

13,75 µl Aqua dem. steril.

Folgende PCR-Programme wurden durchlaufen:

Cortex Mensch:

	H₄Rezeptor	GAPDH
Denaturierung	94 °C, 45 sec	94 °C, 45 sec
Annealing	55 °C, 90 sec	55 °C, 90 sec
Elongation	68 °C, 120 sec	68 °C, 120 sec
	40 Zyklen	25 Zyklen

Cortex Maus:

	H₄Rezeptor	GAPDH
Denaturierung	94 °C, 40 sec	94 °C, 30 sec
Annealing	64 °C, 40 sec	55 °C, 30 sec
Elongation	72 °C, 120 sec	72 °C, 45 sec
	35 Zyklen	25 Zyklen

Dem ersten Zyklus wurde eine fünfminütige Denaturierungsphase vorgeschaltet. Nach dem letzten Zyklus wurde eine zehnminütige finale Elongation durchgeführt, um die Synthese unvollendeter PCR-Produkte zu beenden.

2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Negativ geladene Nukleinsäuren besitzen in einem elektrisch geladenen Feld unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und werden gemäß ihrer Größe und Konformation aufgetrennt. Die Konzentration des Agarosegels variierte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 1,5-3 % (m/V) und enthielt zusätzlich zum Laufpuffer Ethidiumbromid 0,8 µl/ml zur Visualisierung von DNA im

UV-Licht. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei Raumtemperatur mit konstanter Spannung (100 V) für ca. 20 Minuten. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6-fach Probenpuffer gemischt, der die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol FF enthält, mit deren Hilfe sich die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente abschätzen lässt. Nach erfolgter Auftrennung wurden die DNA-Stränge auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit dem Quantity One Programm digital fotografiert. Anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards konnte die Länge der Fragmente qualitativ beurteilt werden.

2.6 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetischer Mittelwert $\bar{x} \pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n Experimenten. Das arithmetische Mittel ist definiert wie folgt:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gleichung 7}$$

x_i : Einzelmesswerte, n Anzahl der Messwerte

Die Standardabweichung s wird aus dem Mittelwert nach folgender Gleichung berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Gleichung 8}$$

Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet sich wie folgt:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Der Vergleich der Mittelwerte aus unterschiedlichen Versuchsreihen erfolgte unter Verwendung des t-Tests nach Student für ungepaarte Datensätze mit vergleichbarer Standardabweichung. Die Standardabweichungen wurden mit dem F-Test, der auf dem Vergleich der Summe der Fehlerquadrate basiert, verglichen.

Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war. Dabei wurden folgende Visualisierungen verwendet: $0,05 > p \geq 0,01$: *;

Material und Methoden

$0,01 > p \geq 0,001$: **; $p < 0,001$: ***. Wurden mehrere Versuchswerte mit der gleichen Kontrolle verglichen, wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit p der Bonferroni Korrektur unterzogen (Curtin und Schulz 1998).

C. Ergebnisse

1 Untersuchungen am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor

1.1 Charakterisierung von O-2050, Virodhamin und N-Oleoylglycin

1.1.1 Effekt von Adenosindesaminase auf die [³⁵S]-GTPγS Bindung

Das Nukleosid Adenosin ist weit verbreitet im Gehirn und findet sich folglich auch in der Membranpräparation der Hippokampi für [³⁵S]-GTPγS Bindungsexperimente wieder. Endogenes Adenosin bindet an Adenosin-A₁-Rezeptoren, die im Gehirn, unter anderem im Hippokampus, hoch exprimiert sind (Fastbom et al. 1987). Der A₁-Rezeptor ist an G_{i/o}-Proteine gekoppelt, und seine Aktivierung durch endogenes Adenosin führt folglich zu einer Erhöhung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung. Um ein gutes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen zu erreichen, sollte die basale Aktivität in Agonist-stimulierten [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien möglichst gering gehalten werden. Moore et al. (2000) empfehlen eine Inaktivierung von endogenem Adenosin mit Adenosindesaminase (ADA), die es in den inaktiven Metaboliten Inosin umwandelt. Um den Effekt der Adenosindesaminase auf die basale und stimulierte [³⁵S]-GTPγS Bindung zu quantifizieren, wurde ein Teil der Proteinsuspension unmittelbar vor dem Versuch mit Adenosindesaminase inkubiert und die Ergebnisse mit der Kontrolle verglichen. Abbildung 9 zeigt, dass die Vorbehandlung der Proteinsuspension mit Adenosindesaminase die basale [³⁵S]-GTPγS Bindung um ca. 30 % verminderte.

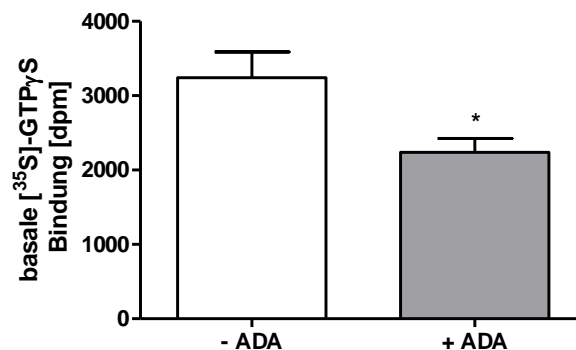


Abbildung 9: Wirkung von Adenosindesaminase (ADA) 0,004 U/ml auf die basale [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 9 ± 1 %. *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Wie erwartet konnte durch die Senkung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung die durch den CB-Agonisten WIN 55,212-2 stimulierte maximale [³⁵S]-GTPγS Bindung gesteigert werden. Abbildung 10 zeigt, dass die durch WIN 55,212-2 3,2 μM stimulierte spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung durch eine Vorbehandlung mit Adenosindesaminase um ca. 45 % erhöht werden konnte.

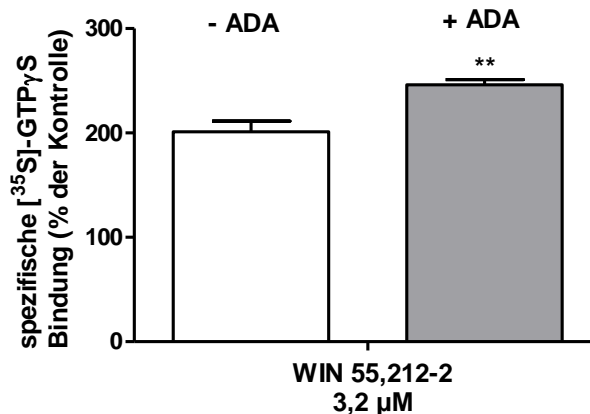


Abbildung 10: Wirkung von Adenosindesaminase (ADA) auf den stimulierenden Effekt von WIN 55,212-2 3,2 μM auf die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 9 ± 1%. **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Membransuspensionen vor allen [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien mit Adenosindesaminase vorbehandelt.

1.1.2 Charakterisierung von O-2050

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der Erhöhung der Neurotransmitterfreisetzung durch den inversen Agonisten Rimonabant genauer zu untersuchen wird neben einem Agonisten ein neutraler Antagonist benötigt. In früheren Experimenten in unserer Arbeitsgruppe wurden bereits einige neutrale Antagonisten untersucht, diese eigneten sich jedoch nicht zur weiteren Untersuchung des endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor. Die Substanz VCHSR (Hurst et al. 2002) beispielsweise besaß eine sehr geringe Potenz und zu geringe Löslichkeit (unveröffentlichte Daten) und die Substanz NESS 0327 (Ruiu et al. 2003) wies eine sehr große Diskrepanz zwischen ihrer Affinität und Potenz am CB₁-Rezeptor auf (Kurz 2008). Die Substanz O-2050 wurde als neutraler Antagonist ohne intrinsische Aktivität am CB₁-Rezeptor publiziert (Gardner und Mallet 2006) und sollte näher charakterisiert werden.

Zur Bestimmung der Affinität von O-2050 am CB₁-Rezeptor wurden Verdrängungsstudien mit dem Tritium-markierten CB₁-Rezeptor-Antagonisten [³H]-Rimonabant in einer Membransuspension der Großhirnrinde des Meerschweins durchgeführt. An diesem Rezeptor wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit Radioligandbindungsstudien an Meerschwein-Großhirnrindenmembran durchgeführt (Schultheiss et al 2005). Der dort ermittelte K_D-Wert (2,12 ± 0,56 nM) und die maximale Anzahl an Bindungsstellen (B_{max}: 2340 ± 424 fmol/mg Protein) konnten zur Berechnung der geeigneten Radioligandkonzentration und der IC₅₀ aus dem pK_i Wert herangezogen werden. O-2050 zeigte eine gute Affinität am CB₁-Rezeptor und konnte den Radioliganden mit einem pK_i von 6,8 ± 0,1 (IC₅₀: 161,2 ± 14,2 nM) verdrängen. Als Positivkontrolle diente der inverse Agonist Rimonabant, der eine Affinität am CB₁-Rezeptor mit einem pK_i von 7,8 ± 0,1 (IC₅₀: 21,8 ± 7,1 nM) aufwies (Abbildung 11).

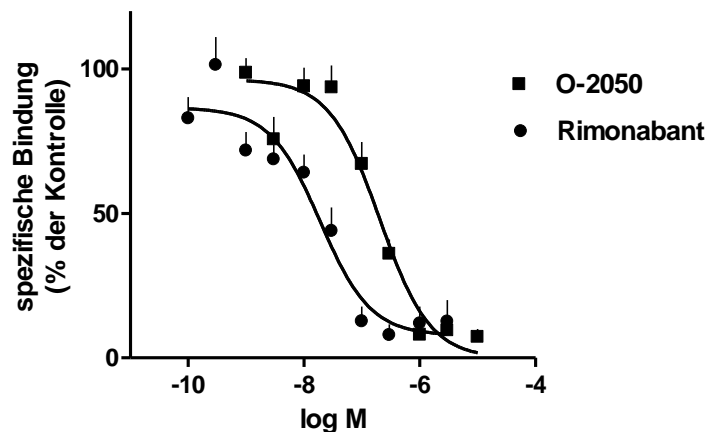


Abbildung 11: Einfluss von O-2050 und Rimonabant auf die spezifische [³H]-Rimonabant-Bindung (0,5 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 4-5 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: 60-100 µg; unspezifische Bindung (in Gegenwart von 3 µM CP 55,940): 59 ± 2 %.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Substanzen auch in einem funktionellen Modell, der [³⁵S]-GTPγS Bindung, untersucht. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, herauszufinden, ob ein Ligand ein Agonist, inverser Agonist oder neutraler Antagonist ist.

Abbildung 12 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Beeinflussung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung durch den Agonisten WIN 55,212-2, den inversen Agonisten Rimonabant und O-2050 am CB₁-Rezeptor. Die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung wurde durch den Agonisten WIN 55,212-2 um 141 ± 12 % gesteigert (Maximaleffekt bei 32 µM),

Ergebnisse

während O-2050 die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung nicht beeinflusste. Der inverse Agonist Rimonabant hemmte die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung bis zu 32 ± 2 % in der höchsten hier untersuchten Konzentration von 32 μM (Tabelle 3).

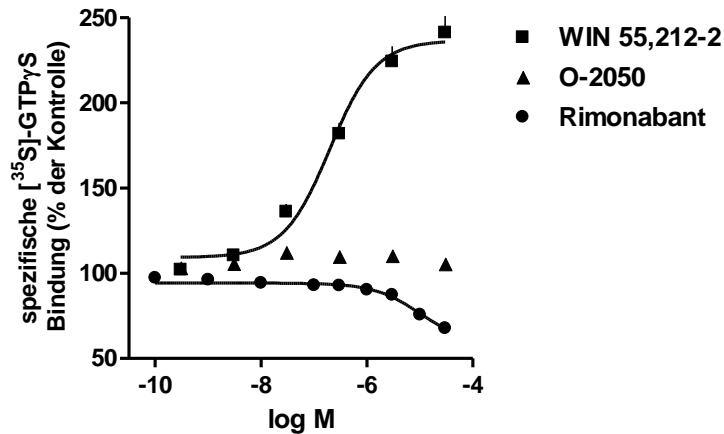


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von O-2050, Rimonabant und WIN 55,212-2 für die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 8-13 Experimenten. Bei vielen Daten ist der doppelte SEM-Wert kleiner als die Höhe des Symbols. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 14 ± 1 %.

Tabelle 3 zeigt die maximale Änderung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung durch Rimonabant und WIN 55,212-2 in der höchsten eingesetzten Konzentration (32 μM), sowie deren pEC₅₀ Werte.

Tabelle 3: pEC₅₀ Werte und Änderung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung durch Rimonabant 32 μM und WIN 55,212-2 32 μM.

Ligand	pEC ₅₀ Wert	Änderung des Basalwertes in %
Rimonabant	5,0 ± 0,1	- 32 ± 2 ¹
WIN 55,212-2	6,7 ± 0,1	+ 141 ± 12 ²

¹ kleiner als der Maximalwert, der aufgrund der beschränkten Löslichkeit von Rimonabant nicht ermittelt werden konnte.

² Maximaleffekt

Zur Bestimmung der Wechselwirkung von WIN 55,212-2 mit O-2050 wurden aufsteigende Konzentrationen des Agonisten mit einer fixen Konzentration des Antagonisten (0,1 μM) untersucht. Die Zugabe von O-2050 führte zu einer Hemmung der durch WIN 55,212-2 hervorgerufenen Steigerung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung und verursachte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 13). Der pEC₅₀ Wert

Ergebnisse

von WIN 55,212-2 wurde um eine log-Stufe verringert. Der Maximaleffekt von WIN 55,212-2 in der höchsten eingesetzten Konzentration unterschied sich nicht in An- und Abwesenheit des Antagonisten ($p > 0,05$) (Tabelle 4). Diese Beobachtungen weisen auf einen kompetitiven Antagonismus von O-2050 am CB₁-Rezeptor hin, ohne diesen zu beweisen.

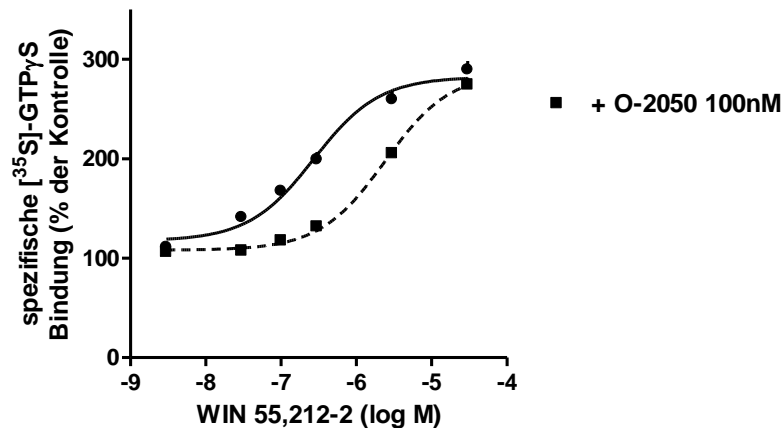


Abbildung 13: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran in Anwesenheit von O-2050 (0,1 μM). Mittelwert und SEM von 5 Experimenten. Bei vielen Daten ist der doppelte SEM-Wert kleiner als die Höhe des Symbols. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 19 ± 1%.

Tabelle 4: pEC₅₀ Werte und Maximaleffekte für die Steigerung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung von WIN 55,212-2 32 μM in An- und Abwesenheit von O-2050 0,1 μM.

Ligand	pEC ₅₀ Wert	Änderung des Basalwertes in %
WIN 55,212-2	6,6 ± 0,1	+ 189,3 ± 8,9 ¹
WIN 55,212-2 + O-2050	5,6 ± 0,1	+ 174,4 ± 7,1 ¹

¹ Werte, die bei WIN 55,212-2 32 μM ermittelt wurden; für beide Kurven kann ein Maximaleffekt von ca. 180 % angenommen werden.

Weiterhin wurde die Wechselwirkung von Rimonabant mit O-2050 am CB₁-Rezeptor untersucht, da ein neutraler Antagonist sowohl die Wirkung eines Agonisten als auch die eines inversen Agonisten hemmen sollte (Pertwee 2005a). Aufsteigende Konzentrationen von Rimonabant wurden mit einer fixen Konzentration (0,1 μM) O-2050 versetzt (Abbildung 14). Die Anwesenheit von O-2050 führte jedoch nicht zu einer Abschwächung, sondern im Gegenteil zur Verstärkung der durch Rimonabant hervorgerufenen Hemmung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung.

Ergebnisse

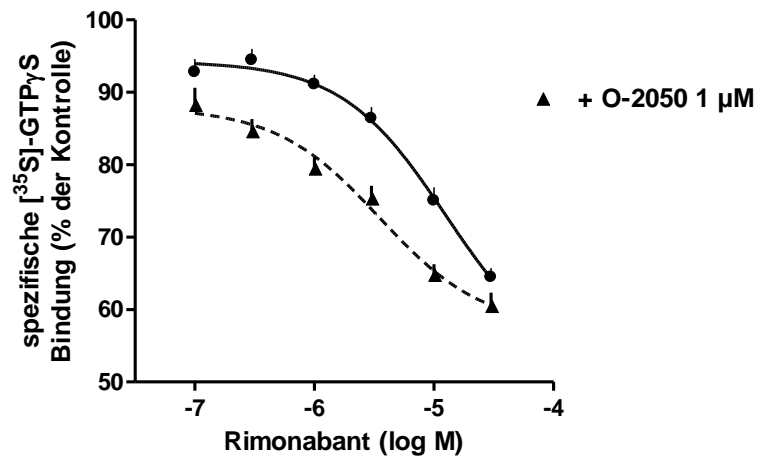


Abbildung 14: Einfluss von Rimonabant auf die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran in Anwesenheit von O-2050. Mittelwert und SEM von 5 Experimenten. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 16± 1 %.

Tabelle 5: pEC₅₀ Werte und Änderung der basalen [³⁵S]-GTPγS Bindung durch Rimonabant in An- und Abwesenheit von O-2050.

Ligand	pEC ₅₀ Wert	Änderung des Basalwertes in %
WIN 55,212-2	4,9 ± 0,1	- 35,6 ± 1,3
WIN 55,212-2 + Rimonabant 1 μM	5,5 ± 0,1	- 39,4 ± 1,7

Die Verstärkung der Wirkung von Rimonabant wurde in einer weiteren Versuchsreihe noch genauer untersucht. Hinsichtlich der Verstärkung der Wirkung von Rimonabant 10 μM zeigte O-2050 einen konzentrationsabhängigen, signifikanten Effekt, der offenbar bei 1 μM sein Maximum erreicht (Abbildung 15).

Ergebnisse

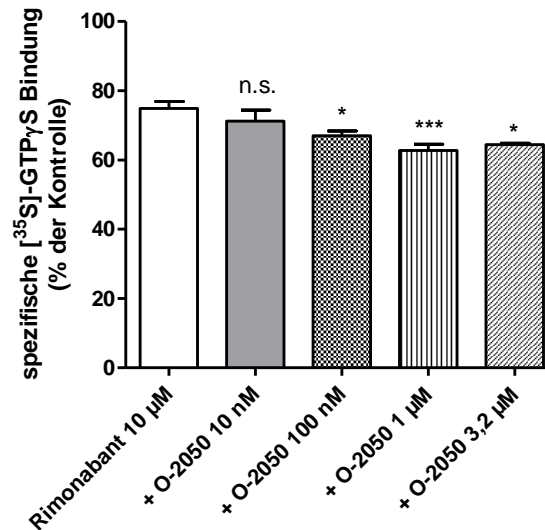


Abbildung 15: Hemmung der spezifischen [³⁵S]-GTP γ S Bindung (0,05 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran durch Rimonabant in An- und Abwesenheit von O-2050. Mittelwert und SEM von 3-13 Experimenten. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μ M GTP γ S): 18 \pm 1%. *p<0,05; ***p<0,001 im Vergleich zu Rimonabant alleine.

1.1.3 Charakterisierung von Virodhamin

Endocannabinoide werden, ebenso wie Prostanoid, aus Arachidonsäure gebildet (Di Marzo et al. 2005). Neben der Aktivierung verschiedener Rezeptoren, unter anderem des CB₁- und CB₂-Rezeptors, entfalten sie einige ihrer Wirkungen über Umwandlungsprodukte, einschließlich Prostanoid (Grainger und Boachie-Ansah 2001, van Dross 2009). Ein solcher von der Cannabinoid-Rezeptor-Aktivierung unabhängiger Effekt wurde für das Endocannabinoid Virodhamin beobachtet. Virodhamin wird in der humanen Lungenarterie in ein vasodilatatorisch wirkendes Prostanoid umgewandelt, welches zum direkten vasodilatatorischen Effekt von Virodhamin beiträgt (Kozłowska et al. 2008). In unserer Arbeitsgruppe wurde daraufhin in der Lungenarterie der Maus untersucht, ob Virodhamin die Noradrenalinfreisetzung über ein Umwandlungsprodukt der Prostaglandin E-Serie hemmt. Dazu sollte die Substanz Virodhamin und ihr Verhalten am CB₁-Rezeptor näher charakterisiert werden. Die Affinität von Virodhamin am CB₁-Rezeptor wurde mit dem Radioliganden [³H]-Rimonabant in Meerschwein-Großhirnrindenmembran bestimmt. In Verdrängungsstudien konnte Virodhamin die Bindung von [³H]-Rimonabant mit einem pK_i von 5,3 \pm 0,1 (IC₅₀: 4,12 \pm 1,7 μ M) hemmen, erreichte aber bei Weitem nicht die Potenz von Rimonabant mit einem pK_i von 7,8 \pm 0,1 (IC₅₀: 21,8 \pm 7,1 nM), welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Abbildung 16).

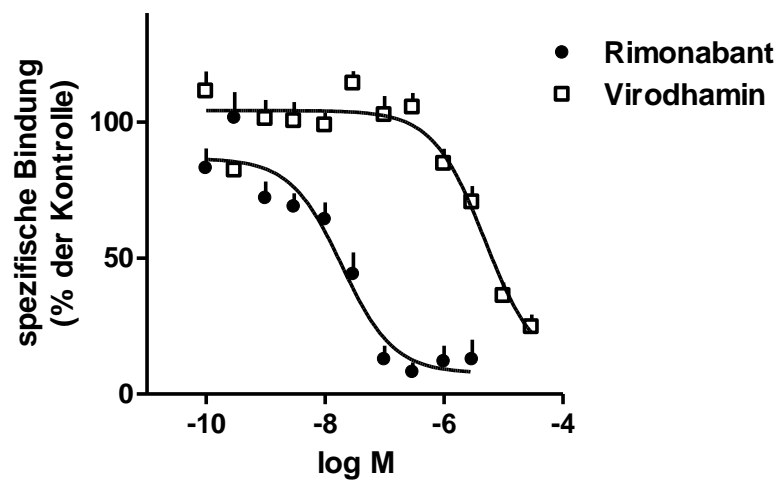


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Verdrängung von 0,5 nM [³H]-Rimonabant von Meerschwein-Großhirnrindenmembran durch Rimonabant und Virodhamin. Mittelwert und SEM von 4-6 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: 100 µg; unspezifische Bindung (in Gegenwart von 3 µM CP 55,940): 57 ± 1%.

Die intrinsische Aktivität von Virodhamin wurde in [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien an Maus-Hippokampusmembran untersucht. WIN 55,212-2 stimulierte die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung, wohingegen Rimonabant die Bindung verminderte. Virodhamin steigerte die [³⁵S]-GTPγS Bindung schwach in Konzentrationen von 0,3 bis 10 µM. Seine intrinsische Aktivität verglichen mit der Wirkung des vollen Agonisten WIN 55,212-2 beträgt 0,24. Die jeweiligen pEC₅₀ Werte sowie die Maximaleffekte sind in Tabelle 6 aufgelistet. Virodhamin 30 µM konnte den Maximaleffekt der steigenden Wirkung von WIN 55,212-2 30 µM auf die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung nahezu aufheben (Abbildung 17).

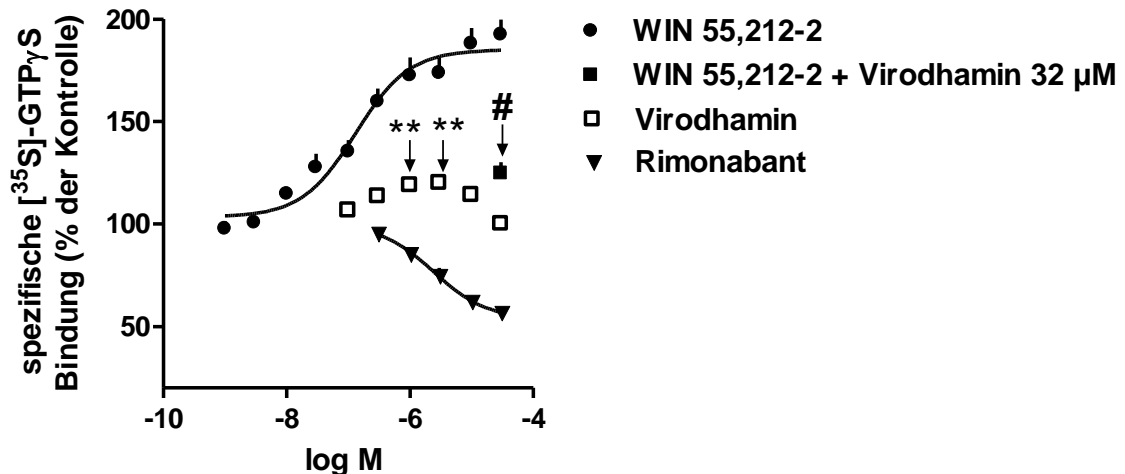


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den Einfluss steigender Konzentrationen von WIN 55,212-2, Virodhamin und Rimonabant auf die spezifische [³⁵S]-GTP γ S Bindung (0,05 nM) im Hippokampus der Maus und Einfluss von Virodhamin 32 μ M auf die Wirkung von WIN 55,212-2 32 μ M. Mittelwert und SEM von 5 Experimenten. Bei vielen Daten ist der doppelte SEM-Wert kleiner als die Höhe des Symbols. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μ M GTP γ S): 16 \pm 1%. **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle (nicht gezeigt); # der Wert ist signifikant unterschiedlich von WIN 55,212-2 alleine (p<0,001) und Virodhamin alleine (p<0,05).

Tabelle 6: pEC₅₀ Werte und Änderung der basalen [³⁵S]-GTP γ S Bindung durch Rimonabant, WIN 55,212-2 und Virodhamin.

Ligand	pEC ₅₀ Wert	Änderung des Basalwertes in %
WIN 55,212-2	6,9 \pm 0,1	+ 82,5 \pm 7,3
Rimonabant	5,6 \pm 0,2	- 43,2 \pm 2,3
Virodhamin	6,8	+ 20,1 \pm 3,0

1.1.4 Charakterisierung von N-Oleylglycin

Zunächst wurde untersucht, ob N-Oleylglycin eine Affinität am CB₁-Rezeptor besitzt. Dazu wurden Verdrängungsstudien mit [³H]-Rimonabant an Meerschwein-Großhirnrindenmembran durchgeführt. N-Oleylglycin konnte den Radioliganden nur in sehr hohen Konzentrationen vom Rezeptor verdrängen, die Affinität war mit einem pK_i von 4,5 \pm 0,7 sehr gering. Als Positivkontrolle wurde der inverse Agonist Rimonabant eingesetzt, welcher eine starke Affinität mit einem pK_i von 7,8 \pm 0,1 zeigte (Abbildung 18).

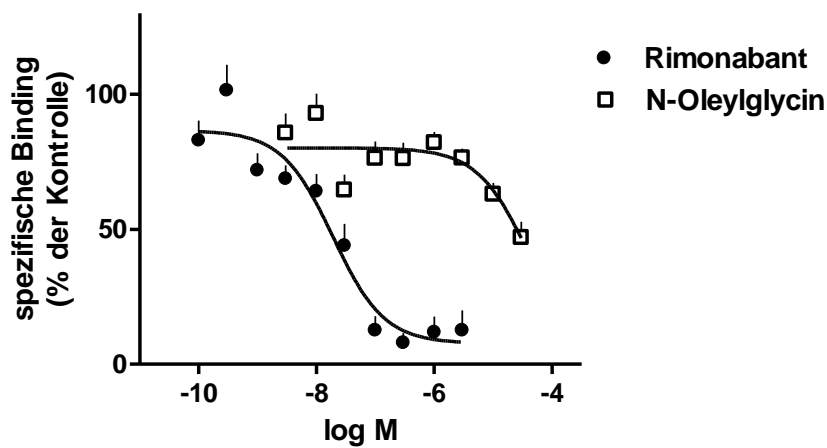


Abbildung 18: Einfluss von N-Oleylglycin und Rimonabant auf die spezifische [³H]-Rimonabant-Bindung (0,5 nM) an Meerschwein-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 4-5 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: 85-100 µg; unspezifische Bindung (in Gegenwart von 3 µM CP 55,940): 56 ± 2 %.

In Superfusionsstudien an Meerschwein-Retina-Scheiben wurde weiterhin untersucht, ob N-Oleylglycin eine agonistische oder antagonistische Wirksamkeit an präsynaptischen CB₁-Rezeptoren aufweist. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob diese Substanz die Freisetzung von [³H]-Noradrenalin zu hemmen vermag bzw. ob sie eine Wechselwirkung mit dem Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 zeigt. Die erhaltenen Parameter der Tritiumfreisetzung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S₂/S₁) in superfundiertem Gewebe. N-Oleylglycin war von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten. Mittelwert ± SEM von n Experimenten.

Spezies	Gewebe	Zusatz	B ₁ (%)	S ₁ (%)	S ₂ /S ₁	n
Meerschwein	Retina	-	0,78 ± 0,06	11,89 ± 5,51	0,53 ± 0,079	7
		N-Oleylglycin 32µM	0,95 ± 0,10	14,21 ± 3,08	0,60 ± 0,004	5-6

N-Oleylglycin in Konzentrationen von 1 µM bis 32 µM verminderte die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung nicht, wohingegen WIN 55,212-2 in der Konzentration von 1 µM eine Hemmung von 66 % erreichte (Abbildung 19 und Abbildung 21).

Ergebnisse

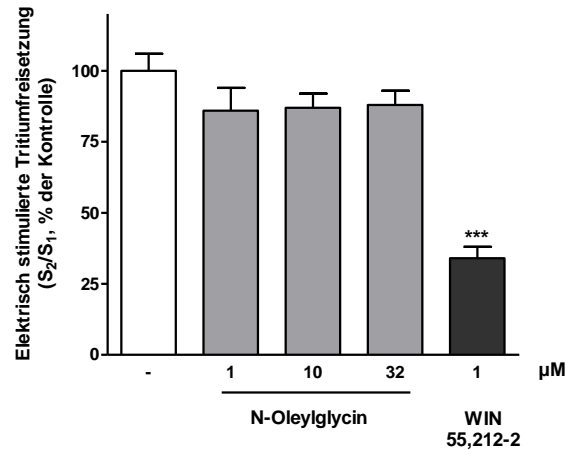


Abbildung 19: Einfluss von N-Oleylglycin und WIN 55,212-2 (Zugabe ab der 62. min) auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Retinascheiben des Meerschweins. Mittelwert \pm SEM aus 9-11 Experimenten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 20 zeigt beispielhaft den Einfluss von N-Oleylglycin und WIN 55,212-2 auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung von $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin in der Retina des Meerschweins.

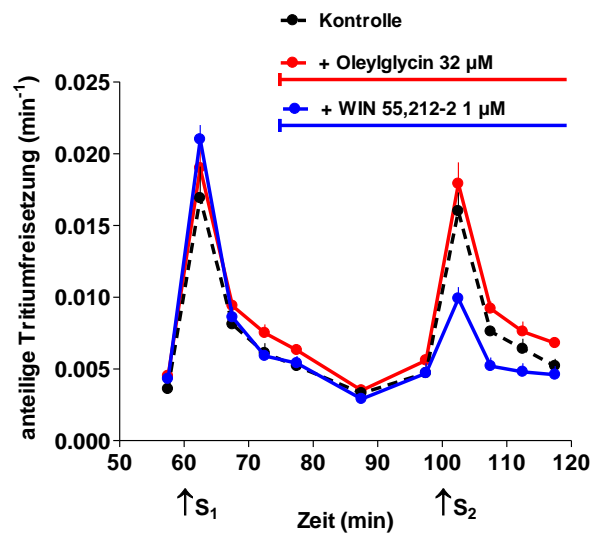


Abbildung 20: Einfluss von N-Oleylglycin 32 μM und WIN 55,212-2 1 μM (Zugabe ab der 77. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung in $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Retinaschnitten des Meerschweins. Elektrische Reize (3 Hz, 50 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 60 (S₁) und 100 (S₂) Minuten, Mittelwert und SEM aus 5-9 Experimenten.

Zusätzlich wurde eine mögliche Änderung der Wirkung von WIN 55,212-2 am CB₁-Rezeptor durch eine Interaktion mit N-Oleylglycin überprüft. Abbildung 21 zeigt allerdings, dass der Hemmeffekt von WIN 55,212-2 auf die stimulierte Tritiumfreisetzung in An- und Abwesenheit von 32 μM N-Oleylglycin etwa gleich stark ausgeprägt ist.

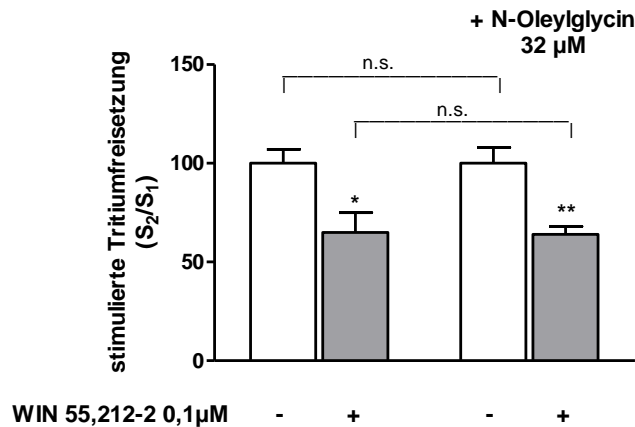


Abbildung 21: Wirkung von N-Oleylglycin 32 µM auf den hemmenden Effekt von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Retina-Scheiben des Meerschweins. Mittelwert und SEM von 3 Experimenten. *p<0,05; **p<0,01 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

1.2 Interaktion des präsynaptischen CB₁-Rezeptors mit dem muskarinischen Autorezeptor

Die Acetylcholinfreisetzung aus cholinergen Neuronen wird sowohl durch den muskarinischen Autorezeptor als auch durch andere präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren moduliert. Präsynaptische Rezeptoren arbeiten nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion. Die anatomische Kolo-kalisierung von präsynaptischen M₂-Rezeptoren und präsynaptischen CB₁-Rezeptoren im Hippokampus der Maus wurde mittels Immunohistochemie nachgewiesen (Fukudome et al. 2004). In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der Effekt des muskarinischen Acetylcholinrezeptor-Agonisten Oxotremorin auf die Acetylcholinfreisetzung in Hippokampusschnitten der Ratte gesteigert war, wenn der CB₁-Rezeptor gleichzeitig blockiert wurde (Schulte und Schlicker 2010). Ferner konnte gezeigt werden, dass der Hemmeffekt von Oxotremorin auf die Acetylcholinausschüttung auch in Hippokampusschnitten der CB₁-Rezeptor defizienten Maus verstärkt war.

1.2.1 Modulation der M₂-Rezeptor-Funktion durch eine verstärkte Aktivierung des CB₁-Rezeptors in der FAAH-Knockout-Maus?

In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob die Funktion des muskarinischen Autorezeptors durch eine verstärkte Aktivierung des CB₁-Rezeptors moduliert wird. Dazu wurden Superfusionsversuche an Hippokampusschnitten von FAAH-Knockout-Mäusen

Ergebnisse

durchgeführt, die einer erhöhten Konzentration des Endocannabinoids Anandamid ausgesetzt sind, da ihnen das Anandamid-abbauende Enzym FAAH (fatty acid amide hydrolase) fehlt. Tabelle 8 zeigt, dass es bei der basalen Tritiumfreisetzung B_1 keinen signifikanten Unterschied zwischen der FAAH-Knockout-Maus und Wildtyp Maus gibt. Auch der Muskarin- M_2/M_4 -Rezeptor-Antagonist AF-DX 384 beeinflusste die basale Tritiumfreisetzung nicht, erhöhte jedoch die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (S_1) in beiden Mausstämmen um ca. 40 %.

Tabelle 8: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in [3H]-Cholin-vorinkubiertem superfundierten Gewebe. AF-DX 384 war von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten. Mittelwert \pm SEM von n Experimenten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Spezies	Gewebe	Zusatz	B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
Wildtyp-Maus	Hippokampus	-	$0,29 \pm 0,09$	$2,59 \pm 0,14$	$1,20 \pm 0,07$	7-13
		AF-DX 384 0,1 μ M	$0,27 \pm 0,08$	$4,00 \pm 0,45(**)$	$1,12 \pm 0,06$	8-11
FAAH-Knockout-Maus		-	$0,27 \pm 0,07$	$2,71 \pm 0,22$	$1,28 \pm 0,09$	10-13
		AF-DX 384 0,1 μ M	$0,26 \pm 0,05$	$4,41 \pm 0,31(***)$	$1,15 \pm 0,07$	9-11

Abbildung 22 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der Freisetzung von Acetylcholin aus Hippokampusschnitten von FAAH-Knockout- und Wildtyp-Mäusen durch Oxotremorin. Bei einer Oxotremorinkonzentration von 10 μ M wurde in der FAAH-Knockout-Maus und in der FAAH-Wildtyp-Maus eine vergleichbare Hemmwirkung um jeweils 63 ± 5 % und 65 ± 3 % erreicht. Die entsprechenden pEC_{50} Werte betragen jeweils 6,15 und 6,34. Die Zugabe von AF-DX 384 0,1 μ M bewirkte eine Rechtsverschiebung der beiden Kurven mit scheinbaren pA_2 -Werten von 8,12 und 8,03 für die FAAH-Knockout-Maus bzw. die Wildtyp-Maus. Der Effekt von Oxotremorin 100 μ M in der FAAH-Knockout-Maus war in Anwesenheit von AF-DX 384 0,1 μ M statistisch nicht unterschiedlich von der FAAH-Wildtyp-Maus. In allen untersuchten Parametern (Maximaleffekt und pEC_{50} -Wert von Oxotremorin sowie pA_2 -Wert von AF-DX 384) ergab sich also kein Unterschied zwischen den beiden Mäuse-Stämmen.

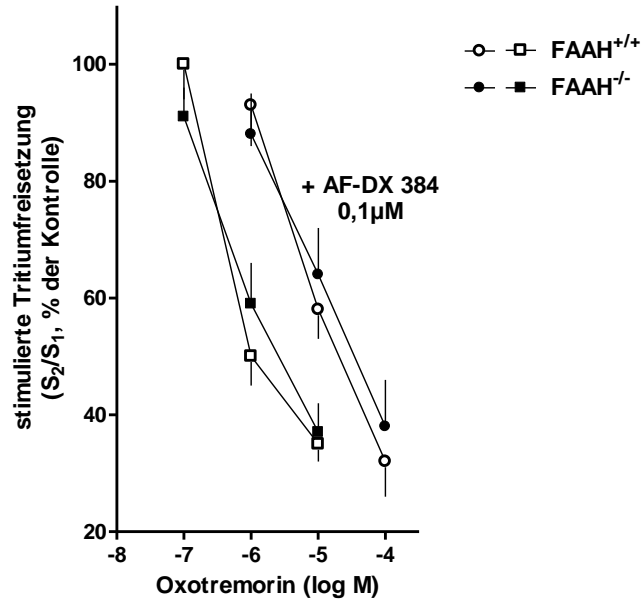


Abbildung 22: Konzentrationsabhängiger Effekt von Oxotremorin auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in [³H]-Cholin-vorinkubiertem superfundierten Hippokampusgewebe der FAAH-Knockout-Maus (FAAH^{-/-}) und Wildtyp-Maus (FAAH^{+/+}) und dessen Interaktion mit AF-DX 384 0,1 μM. Mittelwert und SEM von 7-10 Experimenten.

Die Transmitterfreisetzung *per se* (S₁) unterschied sich in der FAAH-Knockout-Maus nicht von der Wildtyp-Maus, dies änderte sich auch nicht nach Zugabe von AF-DX 384. AF-DX 384 führte in der FAAH-Knockout-Maus und in der Wildtyp-Maus zu einer signifikanten Steigerung der Acetylcholinfreisetzung *per se* jeweils um 54 ± 11 % (p<0,01) und um 63 ± 7 % (p<0,001) (Tabelle 8, Abbildung 23).

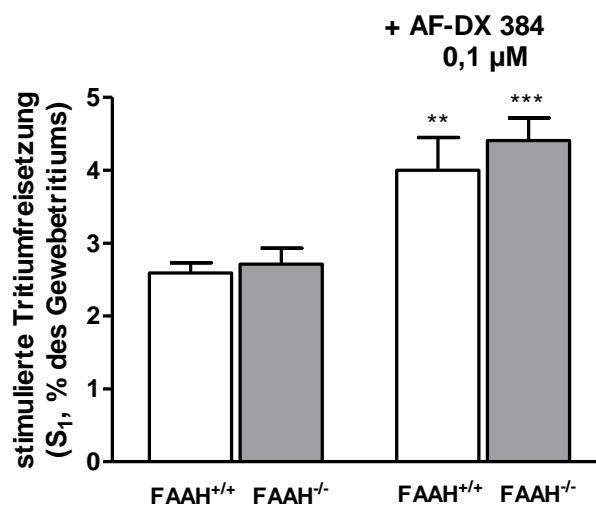


Abbildung 23: Elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in [³H]-Cholin-vorinkubiertem superfundierten Hippokampusgewebe der FAAH-Knockout-Maus (FAAH^{-/-}) und Wildtyp-Maus (FAAH^{+/+}) in An- und Abwesenheit von AF-DX 384 0,1 μM. Mittelwert und SEM von 7-10 Experimenten. **p<0,01 und ***p<0,001 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne AF-DX 384.

1.2.2 Modulation der M₂-Rezeptor-Funktion durch veränderte Expression des M₂-Rezeptors in der CB₁-Knockout-Maus?

Wie bereits in Kapitel C.1.2 erörtert, ist die Wirkung von Oxotremorin 10 μ M auf die Transmitterfreisetzung in Hippokampuschnitten der CB₁-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus verstärkt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer veränderten Proteinexpression in der CB₁-Knockout-Maus liegen. Denkbar ist zum einen eine verstärkte Expression von M₂-Rezeptoren sowie eine verstärkte Expression von G α_i - und G α_o -Proteinen, welche bei der Aktivierung von M₂-Rezeptoren rekrutiert werden. Beide Szenarien würden zu einer verstärkten Wirkung von Oxotremorin in der CB₁-Knockout-Maus führen. Zum Vergleich der Proteinexpression von M₂-Rezeptoren, G α_i - und G α_o -Proteinen wurden Western Blots aus Synaptosomen von Hippokampusgewebe der CB₁-Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus angefertigt. Abbildung 24 zeigt Western Blots mit repräsentativen Banden der Antikörper gegen das G α_i -Protein bei 41 kDa, gegen das G α_o -Protein bei 39 kDa und gegen den M₂-Rezeptor bei 75 kDa (Abbildung 24). Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin eingesetzt, dessen Banden bei 50 kDa erscheinen (nicht gezeigt).

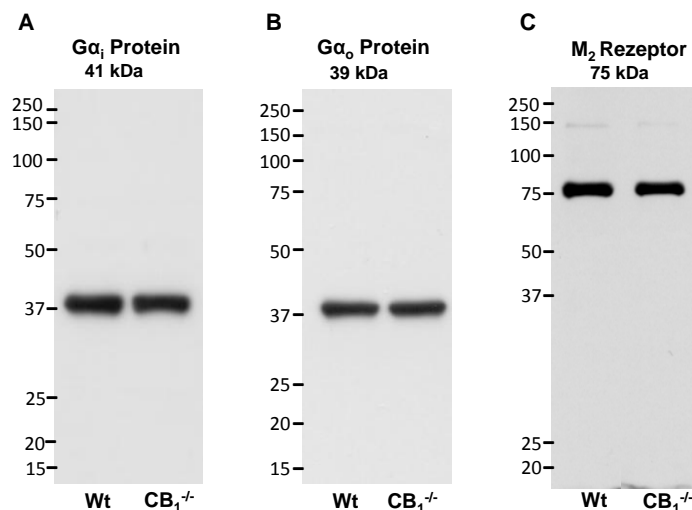


Abbildung 24: Repräsentative Western Blots mit Antikörpern gegen das G α_i -Protein (A), das G α_o -Protein (B) und den M₂-Rezeptor (C) in Synaptosomen von Hippokampusgewebe der CB₁-Knockout-Maus (CB₁^{-/-}) und der Wildtyp-Maus (Wt). Zur Kontrolle des Proteingehaltes der einzelnen Proben wurde α -Tubulin auf dem gleichen Blot mit einem Antikörper markiert (nicht gezeigt). Der parallel aufgetragene Protein-Molekulargewichtsstandard ist jeweils links neben dem entsprechenden Blot gezeigt.

Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigte, dass die Expression des M₂-Rezeptors in der CB₁-Knockout-Maus und in der Wildtyp-Maus gleich stark ausgeprägt ist. Die Expression des G_{α_i}- und des G_{α_o}-Proteins ist in der CB₁-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus tendenziell erhöht. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab sich jedoch nur beim G_{α_o}-Protein (um 15 ± 2 % in der CB₁-Knockout-Maus; Abbildung 25).

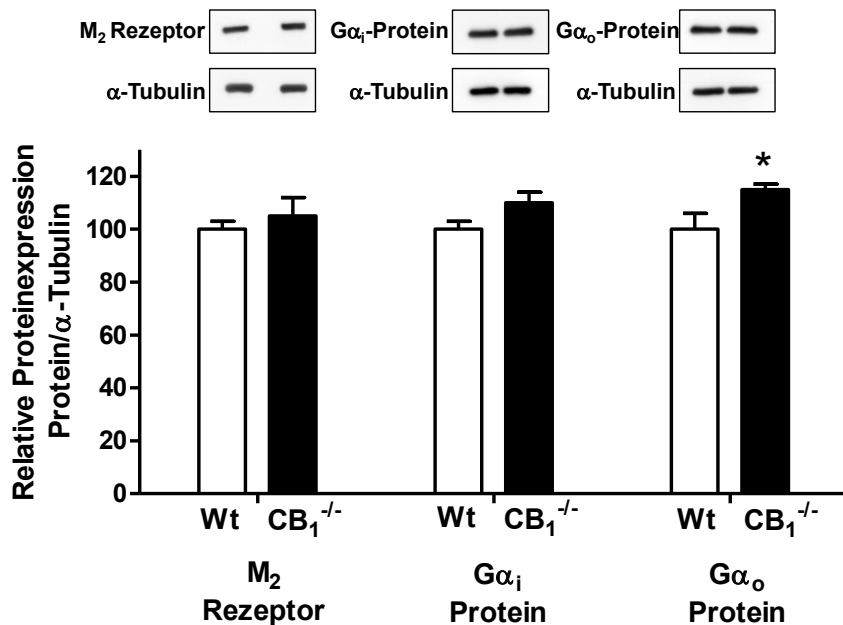


Abbildung 25: Densitometrische Auswertung der M₂-Rezeptor-, G_{α_i}-Protein- und G_{α_o}-Protein-Expression in Synaptosomen von Hippocampi der CB₁-Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus. Die Werte wurden auf α-Tubulin als internen Standard normalisiert und die Quotienten der CB₁-Knockout-Maus angegeben als Prozentanteil der entsprechenden Quotienten der Wildtyp-Maus. Mittelwert und SEM von 6-7 Experimenten in Dreifachbestimmung aus 6 unterschiedlichen Membranpräparationen (G_{α_i}- und G_{α_o}-Protein) bzw. 3 unterschiedlichen Membranpräparationen (M₂ Rezeptor). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Wildtyp-Maus.

2 Untersuchungen an Peptid-Rezeptoren

Ein inhibitorischer Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung wurde für viele niedermolekulare Verbindungen gezeigt, jedoch ist der Einfluss von vielen Peptiden auf die Noradrenalinfreisetzung weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollten nun die Neuropeptide Neuropeptid W (NPW) und Neuropeptid FF (NPFF) sowie das Protein Interleukin-1 β (IL-1 β) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung getestet werden. Da ein Effekt nicht mit Sicherheit erwartet werden konnte, wurde in allen

Versuchen der EP₃-Rezeptor Agonist Sulproston als Positivkontrolle eingesetzt, welcher in den entsprechenden Geweben die Noradrenalinfreisetzung stark vermindert.

2.1 Effekt von Neuropeptid W

Der Effekt von Neuropeptid W auf präsynaptische Rezeptoren wurde anhand von Superfusionsstudien an Hippokampus- und Hypothalamusschnitten der Maus untersucht, da in diesen Geweben mRNA für NPW und den NPBW₁-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Singh und Davenport 2006). Da im Nebennierenmark NPW-Immunoreaktivität in Noradrenalin-synthetisierenden Zellen detektiert wurde (Fujii et al. 2002), erschien es plausibel zu untersuchen, ob NPW die Noradrenalinfreisetzung beeinflusst. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die wichtigsten Parameter der jeweiligen Kontrollversuche in beiden Versuchsreihen.

Tabelle 9: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S₂/S₁) in [³H]-Noradrenalin-vorinkubiertem superfundierten Gewebe. Mittelwert ± SEM von n Experimenten.

Spezies	Gewebe	B ₁ (%)	S ₁ (%)	S ₂ /S ₁	n
Maus	Hypothalamus	0,20 ± 0,01	2,52 ± 0,17	1,00 ± 0,03	5
	Hippokampus	0,24 ± 0,03	8,13 ± 0,28	1,07 ± 0,03	3-4

NPW 1 μM beeinflusste die stimulierte Tritiumfreisetzung in beiden [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten Geweben jedoch nicht. Sulproston als Positivkontrolle hemmte die Tritiumfreisetzung erwartungsgemäß in beiden Geweben um jeweils 90 ± 1 % und um 78 ± 7 % (p<0,001) (Abbildung 26).

Ergebnisse

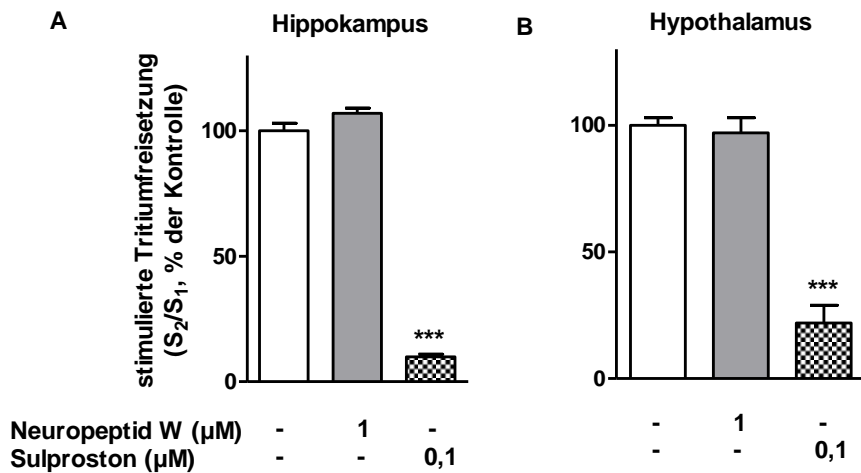


Abbildung 26: Wirkung von Neuropeptid W und Sulproston auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Hippokampuschnitten (A) und Hypothalamusschnitten (B) der Maus. Mittelwert und SEM von 4-5 Experimenten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Auch wenn der zeitliche Verlauf der Tritiumabgabe (Abbildung 27) untersucht wird, ist deutlich zu erkennen, dass Neuropeptid W weder im Hippokampus noch im Hypothalamus einen Effekt zeigt, Sulproston die Tritiumfreisetzung in beiden Geweben jedoch stark hemmt.

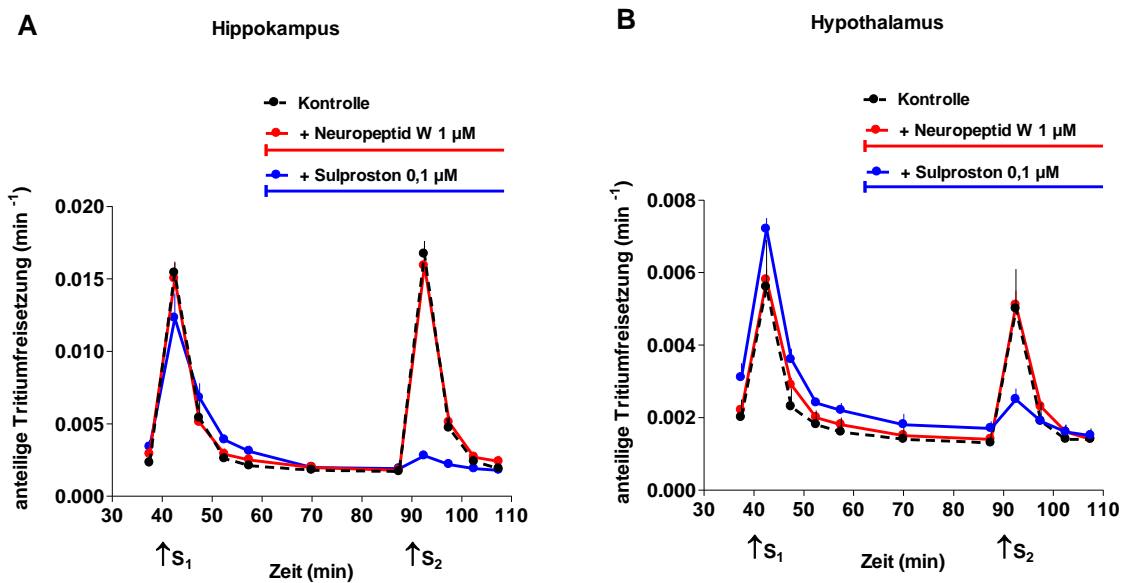


Abbildung 27: Einfluss von Neuropeptid W und Sulproston (Zugabe nach der 62. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung in $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Hippokampuschnitten (A) und Hypothalamusschnitten (B) der Maus. Elektrische Reize (0,3 Hz; 50 mA; 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Bei einigen Daten ist der doppelte SEM-Wert kleiner als die Höhe des Symbols. Mittelwert und SEM aus 3-6 Experimenten.

2.2 Effekt von Neuropeptid FF und dNPA

Es ist bekannt, dass Neuropeptid FF Opioid-Rezeptor vermittelte Effekte moduliert, und hierfür werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Mollereau et al, 2005b). In dieser Arbeit sollte der Effekt von Neuropeptid FF auf die Noradrenalinfreisetzung untersucht werden. Zum einen ist eine Interaktion von Neuropeptid FF mit dem δ -Opioidrezeptor, welcher ebenfalls für eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung bekannt ist, denkbar. Zum anderen könnte NPFF die Noradrenalinfreisetzung direkt durch Aktivierung von NPFF₂-Rezeptoren hemmen. Aus diesem Grunde wurde der Effekt von NPFF und einem NPFF₂-Rezeptor Agonisten auf die Noradrenalinfreisetzung im Vorhof und in der Großhirnrinde der Maus untersucht. Weiterhin wurden beide Substanzen auf eine mögliche Wechselwirkung mit der hemmenden Wirkung eines δ -Opioidrezeptor Agonisten auf die Noradrenalinfreisetzung hin getestet. Tabelle 10 zeigt den Vergleich der basalen Tritiumfreisetzung (B_1) und der stimulierten Tritiumfreisetzung (S_1 , S_2/S_1) in den Kontrollexperimenten mit verschiedenen Zusätzen. Der Basalwert wurde durch die Pharmaka nicht verändert.

Tabelle 10: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in [³H]-Noradrenalin-vorinkubiertem superfundierten Gewebe. NPFF, dNPA und Naltrindol waren von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten. Mittelwert \pm SEM von n Experimenten.

Spezies	Gewebe	Zusatz	B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
Maus	Atrium	-	0,21 \pm 0,01	5,38 \pm 0,50	0,84 \pm 0,03	4
		NPFF 0,32 μ M	0,23 \pm 0,03	5,18 \pm 0,94	0,86 \pm 0,09	4
		dNPA 0,32 μ M	0,20 \pm 0,01	5,60 \pm 1,03	0,85 \pm 0,08	4
		Naltrindol 0,001 μ M	0,22 \pm 0,02	4,97 \pm 0,48	0,83 \pm 0,03	6
	Cortex	-	0,17 \pm 0,01	11,80 \pm 0,7	0,80 \pm 0,1	4

In der folgenden Versuchsreihe am [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten Vorhofgewebe der Maus wurde der Effekt von NPFF und dem NPFF₂-Rezeptor Agonisten dNPA auf die stimulierte Tritiumfreisetzung überprüft. Sowohl Neuropeptid FF 1 μ M als auch dNPA 1

Ergebnisse

μM konnten die stimulierte Tritiumfreisetzung nicht beeinflussen, während Sulproston $0,1 \mu\text{M}$ und der δ -Opioidrezeptor Agonist DPDPE $1 \mu\text{M}$ die stimulierte Tritiumfreisetzung um jeweils $73 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$) und $39 \pm 2 \%$ ($p < 0,05$) inhibierten (Abbildungen 28 und 30).

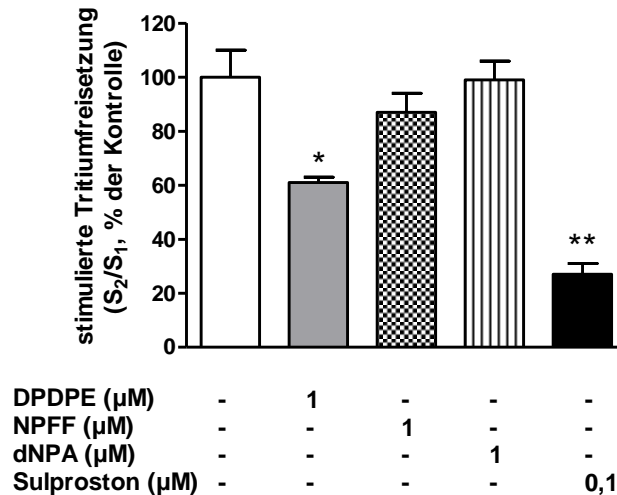


Abbildung 28: Einfluss von DPDPE, NPFF, dNPA und Sulproston auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung im $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Vorhof der Maus. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

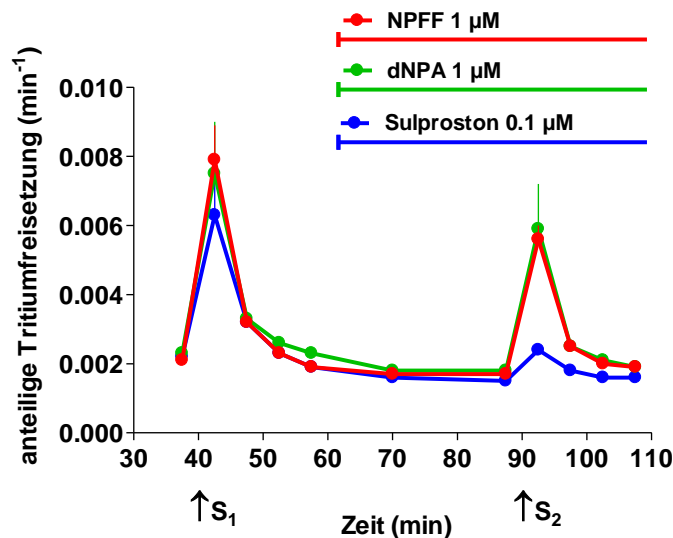


Abbildung 29: Einfluss von Neuropeptid FF, dNPA und Sulproston (Zugabe nach der 62. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung im $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Vorhof der Maus. Elektrische Reize (3 Hz; 200 mA; 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 4 Experimenten. Die Kontrollkurve ist aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden.

In den Interaktionsexperimenten hatte die Anwesenheit von NPFF $0,32 \mu\text{M}$ oder dNPA $0,32 \mu\text{M}$ keine Auswirkung auf den Hemmeffekt von DPDPE $1 \mu\text{M}$ auf die stimulierte Tritiumfreisetzung. Die Zugabe des δ -Opioidrezeptor Antagonisten Naltrindol $0,001 \mu\text{M}$

zum Superfusionsmedium konnte die Wirkung von DPDPE 1 μM jedoch nahezu aufheben (Abbildung 30).

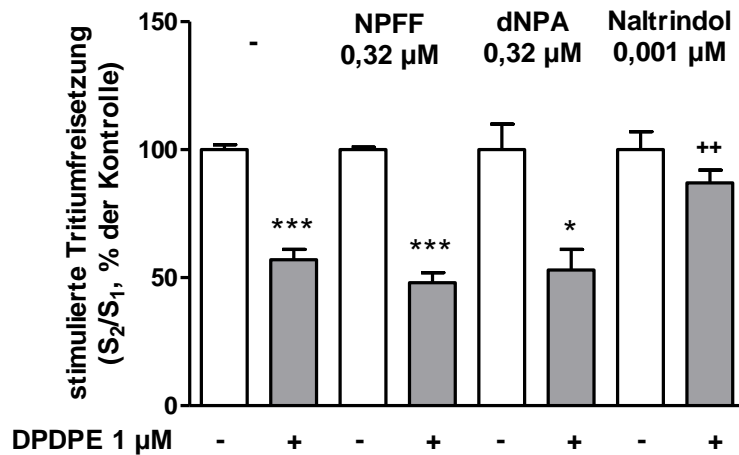


Abbildung 30: Einfluss von DPDPE auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung im $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Vorhof der Maus und Interaktion mit NPFF, dNPA und Naltrindol. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ** $p < 0,01$ im Vergleich zum Effekt von DPDPE ohne Naltrindol.

Superfusionsexperimente an Großhirnrindenschnitten der Maus konnten ebenfalls keinen Effekt von NPFF 1 μM und dNPA 1 μM auf die stimulierte Tritiumfreisetzung aufzeigen. Jedoch konnten auch hier die Positivkontrollen Sulproston 0,1 μM und der μ -Opioidrezeptor-Agonist DAMGO 1 μM die stimulierte Tritiumfreisetzung um jeweils $85 \pm 3\%$ und $71 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) reduzieren (Abbildung 31 und 32).

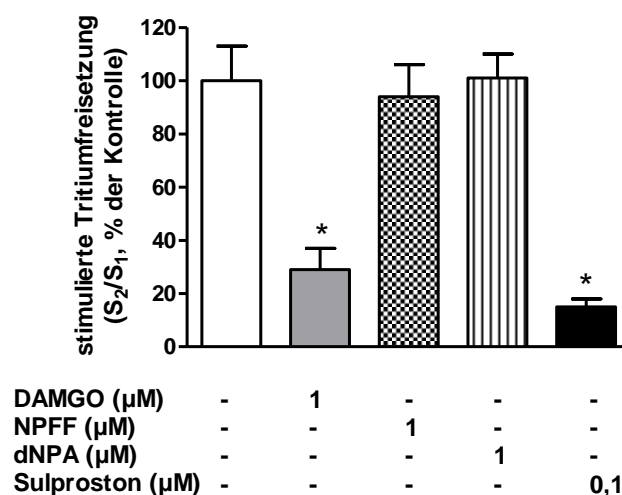


Abbildung 31: Einfluss von DAMGO, NPFF, dNPA und Sulproston auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Großhirnschnitten der Maus. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

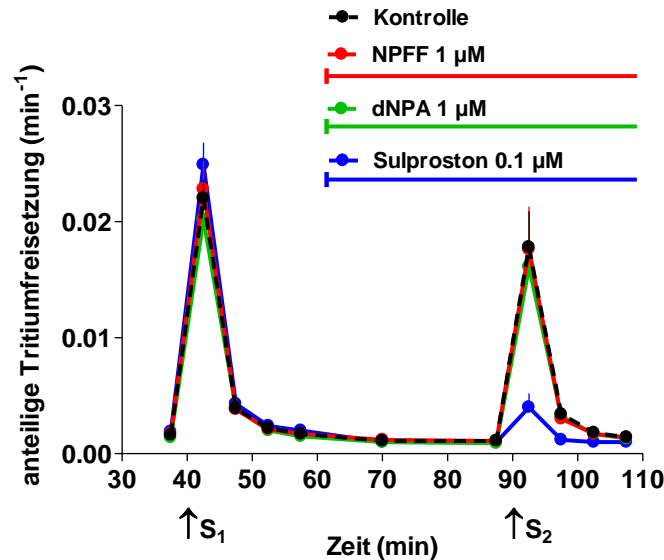


Abbildung 32: Einfluss von Neuropeptid FF, dNPA und Sulproston (Zugabe nach 62. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung in [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Großhirnrinden-Schnitten der Maus. Elektrische Reize (0,3 Hz; 50 mA; 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten, Mittelwert und SEM aus 3-4 Experimenten.

2.3 Effekt von Interleukin-1 β

Das Protein Interleukin-1 β unterscheidet sich von den zuvor untersuchten Neuropeptiden in vielerlei Hinsicht: es besitzt ein höheres Molekulargewicht, es wirkt als Zytokin und die Aktivierung des entsprechenden Rezeptors, IL-1RI, regt andere Signaltransduktionswege an (Dinarello 2009). IL-1 β und Prostaglandine der E-Serie, zu denen Sulproston zählt, besitzen nicht nur beide proinflammatorische Eigenschaften, sondern üben beide eine hemmende Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung aus (Exner und Schlicker 1995, Günther et al. 2010, Song et al. 2006).

Zunächst sollte untersucht werden, ob Interleukin-1 β die stimulierte Tritiumfreisetzung in [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten Schnitten der Großhirnrinde der Maus beeinflusst. Zusätzlich wurde der dann gefundene hemmende Effekt von Interleukin-1 β mit dem Effekt von Sulproston verglichen. Die Versuchsreihe wurde an Großhirnrindenschnitten der Maus durchgeführt, da Sulproston hier in früheren Versuchen einen ausgeprägteren Effekt auf die Tritiumfreisetzung hervorgerufen hat als bei der Ratte (Exner und Schlicker 1995). Die Tritiumfreisetzung wurde hier nicht nur nach 40 (S₁) und 90 min (S₂) bestimmt, sondern zusätzlich nach 140 (S₃) und 190 min (S₄). Interleukin-1 β war in den Superfusionsversuchen von der 77. Minute bis zur 110. Minute im Medium enthalten, also auch während des zweiten Reizes, S₂, nicht aber während S₁, S₃ und S₄. Der Hemmeffekt von Interleukin-1 β 0,3

Ergebnisse

nM auf die Tritiumabgabe nahm allmählich zu. Während Interleukin-1 β im Medium vorhanden war (S_2/S_1), sowie 30 Minuten danach (S_3/S_1), tendierte es zu einer Hemmung der Noradrenalinfreisetzung. Der Effekt wurde jedoch erst 80 Minuten nach seiner Abwesenheit (S_4/S_1) signifikant ($p < 0,05$). Interleukin-1 β 0,3 nM erreichte eine Hemmung um $35 \pm 10 \%$ ($p < 0,05$). Sulproston erreichte eine etwa gleich starke Hemmung um $44 \pm 8 \%$ ($p < 0,01$), der entscheidende Unterschied zu Interleukin-1 β besteht jedoch im zeitlichen Verlauf. Der Hemmeffekt von Sulproston trat direkt nach Zugabe des Pharmakons auf (S_2/S_1), bildete sich jedoch rasch zurück und war 30 Minuten nach seiner Entfernung aus dem Medium (S_3/S_1) nicht mehr nachweisbar (Abbildung 33).

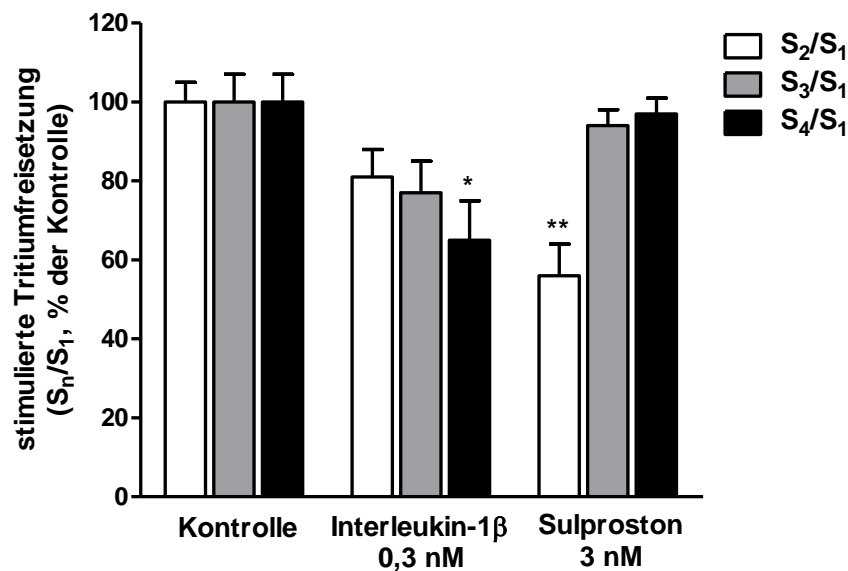


Abbildung 33: Vergleich der Wirkung von Interleukin-1 β und Sulproston auf die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung in [^3H]-Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Großhirnschnitten der Maus. Die Tritiumfreisetzung wurde nach 40, 90, 140 und 190 min (S_1 - S_4) stimuliert und ist dargestellt als Quotient der Tritiumfreisetzung hervorgerufen durch S_n und S_1 (S_n/S_1). Die Pharmaka waren jeweils von der 77. bis 110. min im Medium enthalten. Mittelwert und SEM von 7 (Interleukin-1 β) und 4 (Sulproston) Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Die Darstellung des Verlaufs der anteiligen Tritiumfreisetzung verdeutlicht noch einmal den zeitabhängigen, sich allmählich entwickelnden Effekt von Interleukin-1 β auf die Noradrenalinfreisetzung (Abbildung 34).

Ergebnisse

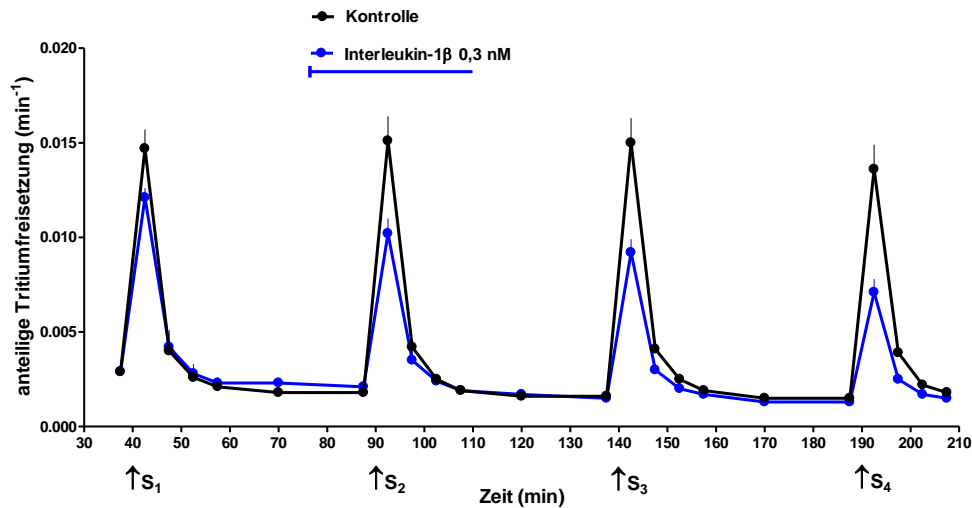


Abbildung 34: Einfluss von Interleukin-1 β (Zugabe von der 77. bis 110. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung in [^3H]-Noradrenalin-vorinkubierten in superfundierten Großhirnrinden-Schnitten der Maus. Elektrische Reize (0,3 Hz; 50 mA; 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S₁), 90 (S₂), 140 (S₃) und 190 (S₄) Minuten, Mittelwert und SEM von 3-4 Experimenten.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Interleukin-1 β basiert auf der Wirkung, die das Peptid 80 Minuten nach Entfernung des Pharmakons aus dem Medium zeigte (S₄/S₁). Interleukin-1 β 0,006 nM wies keinen Effekt auf die stimulierte Tritiumfreisetzung auf, eine zehnfach höhere Konzentration zeigte eine Tendenz zur Hemmung, und eine weitere Erhöhung der Konzentration um das Fünffache auf 0,3 nM bewirkte schließlich eine signifikante Hemmung der Tritiumfreisetzung (Abbildung 35 und Abbildung 33, sechste Säule von links).

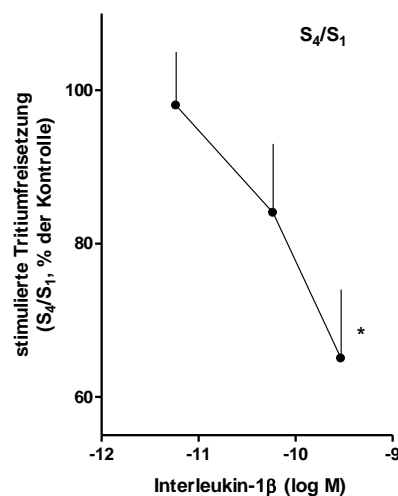


Abbildung 35: Konzentrationsabhängiger Effekt von Interleukin-1 β auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (S₄/S₁) in [^3H]-Noradrenalin-vorinkubierten superfundierten Großhirnschnitten der Maus. Mittelwert und SEM von 7-8 Experimenten. *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

3 Untersuchungen an anderen Rezeptoren

3.1 Suche nach einem funktionellen Modell für den EP₃-Rezeptor

In unserer Arbeitsgruppe wurde mittels Superfusionsexperimenten gezeigt, dass die durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) hervorgerufene Hemmung der Noradrenalin- und Serotoninfreisetzung durch den präsynaptischen EP₃-Rezeptor vermittelt wird. Diese inhibitorische Wirkung von PGE₂ wurde durch den kompetitiven EP₃-Rezeptor-Antagonisten L-826,266 antagonisiert (Günther et al. 2010). Da EP₃-Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt sind, sollte ein [³⁵S]-GTPγS-Bindungsmodell mit dem EP_{1/3}-Rezeptor-Agonisten Sulproston entwickelt werden. Dieses Modell sollte dann dazu dienen, den Antagonismus von L-826,266 genauer zu charakterisieren.

Sulproston beeinflusste die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung weder in Maus-Hippokampusmembran (Abbildung 36A), noch in Meerschwein-Hippokampusmembran (Abbildung 36B). WIN 55,212-2 als Positivkontrolle stimulierte die [³⁵S]-GTPγS Bindung. Die maximale Stimulation war mit 326 ± 20 % ausgeprägter in Meerschwein- als in Maus-Hippokampusmembran (193 ± 7 %), wobei die pEC₅₀ Werte mit 6,9 ± 0,1 bzw. 7,1 ± 0,1 nahezu identisch waren.

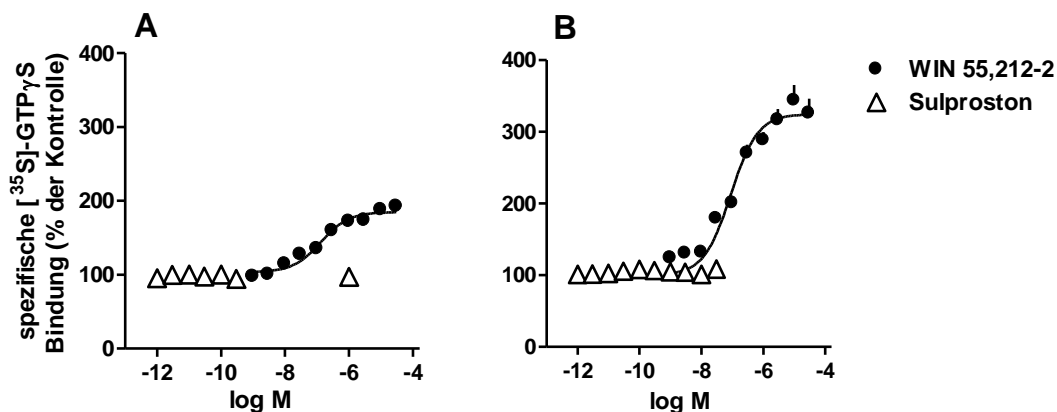


Abbildung 36: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den Einfluss von WIN 55,212-2 und Sulproston auf die spezifische [³⁵S]-GTPγS Bindung (0,05 nM) an Maus- (A) und an Meerschwein-Hippokampusmembran (B). Mittelwert und SEM von 2-4 (A) und 4-5 (B) Experimenten. Unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μM GTPγS): 10 ± 1% (A) und 31 ± 4% (B).

Ferner wurde die Affinität von Sulproston am CB₁-Rezeptor in Meerschwein-Großhirnrindenmembran mit Verdrängungsstudien bestimmt (gleiches Modell wie in Abbildung 16). Die Affinität von Sulproston war mit einem pK_i von <4,5 sehr gering, die höchste Konzentration von 32 μM hemmte die Bindung von [³H]-Rimonabant um 37 ± 6 %.

3.2 Analyse der Histamin-H₄-Rezeptor mRNA-Expression

Es ist bekannt, dass der H₄-Rezeptor in Geweben des hämatopoetischen und Immunsystems exprimiert wird und eine proinflammatorische Funktion ausübt. Zu einer möglichen präsynaptischen Lokalisation ist bisher wenig bekannt und die Angaben zur Expression im Gehirn sind widersprüchlich, der Rezeptor konnte dort von einigen Autoren nicht nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel A.1.6). Aus diesem Grunde wurden murines und humanes Großhirnrindengewebe mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von H₄-Rezeptor mRNA untersucht. Abbildung 37 zeigt repräsentative Banden als Beispiel einer von mehreren getrennt durchgeführten RT-PCR Analysen für die PCR-Produkte vom H₄-Rezeptor und von GAPDH als Positivkontrolle im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel. Sowohl in der Großhirnrinde der Maus als auch des Menschen konnte jeweils eine spezifische Bande von 207 und 907 Basenpaaren für den H₄-Rezeptor detektiert werden. Die RT-PCR aus Milzgewebe der Maus diente als Positivkontrolle. Hieraus schlussfolgernd wird der H₄-Rezeptor mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl im Großhirnrindengewebe des Menschen als auch in der Maus exprimiert, da dort entsprechende mRNA nachgewiesen werden konnte.

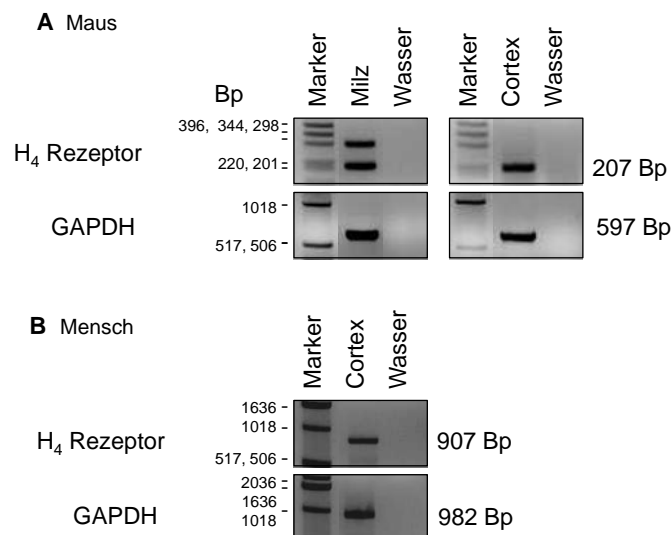


Abbildung 37: Repräsentative Agarosegele der RT-PCR Analyse für die mRNA Expression des H₄-Rezeptors und GAPDH (als Positivkontrolle). Gesamt-RNA aus der Milz und der Großhirnrinde von der Maus (A) und der Großhirnrinde vom Menschen (B) wurde isoliert und eine RT-PCR mit spezifischen Primern für den H₄-Rezeptor und GAPDH durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA als Template DEPC-H₂O in der PCR eingesetzt. Zusätzlich ist der Marker als interner Längenstandard zu sehen.

D. Diskussion

1 Methodische Vorbemerkungen

Die hier vorgelegte Arbeit beruht auf fünf verschiedenen Methoden, nämlich Superfusionsstudien, konventionellen Radioligandbindungsstudien mit einem tritiierten Radioliganden, [³⁵S]-GTP γ S-Bindungsstudien, Proteindetektionsversuchen mit Western Blots und Versuchen zur mRNA-Detektion mithilfe der RT-PCR. Zu den drei erstgenannten Verfahren sind einige methodische Vorbemerkungen notwendig.

1.1 Versuchsbedingungen in der Superfusion

Die Methode der Superfusion wird dazu angewendet, den Einfluss von präsynaptischen Mechanismen auf die Neurotransmitterfreisetzung zu untersuchen (Starke 1977). Diese wird z.B. durch Substanzen, die an präsynaptisch lokalisierten Rezeptoren angreifen, moduliert.

Die Detektion der Transmitter geschieht szintillometrisch. Dazu wird das zu untersuchende Gewebe mit exogen zugeführtem, radioaktiv markiertem Transmitter oder radioaktiv markiertem Präkursor des Transmitters mittels Inkubation beladen. Seine Freisetzung kann entweder durch chemische oder durch elektrische Stimulation ausgelöst werden. Die kontinuierliche Umspülung des Gewebes mit physiologischer Lösung und das Auffangen der Lösung (des Superfusats) garantiert eine quantitative Bestimmung der Radioaktivität. Da der radioaktiv markierte Transmitter dabei das gleiche chemische Verhalten aufweist wie sein nicht markiertes Analogon, repräsentiert die gemessene Radioaktivität den freigesetzten Transmitter. In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Noradrenalinfreisetzung im noradrenergen System des Gehirns und im sympathischen Nervensystem [³H]-Noradrenalin eingesetzt. Dies wird über den neuronalen Noradrenalin-Transporter in die Zelle aufgenommen, in Vesikeln gespeichert und nach entsprechender Stimulation als solches exozytotisch freigesetzt. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen besteht die stimulierte Tritiumfreisetzung zu 90 % aus nicht metabolisiertem [³H]-Noradrenalin (Baumann und Maitre 1977). Die basale, nicht stimulierte Tritiumfreisetzung hingegen besteht aus Metaboliten des [³H]-Noradrenalins. Der primäre interessierende Parameter ist jedoch die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung. Wird die basale Freisetzung durch ein Pharmakon massiv erhöht, so beeinträchtigt dies die Berechnung der stimulierten

Tritiumfreisetzung. Daher wurde der Einfluss von allen in dieser Arbeit verwendeten Pharmaka auf die basale Tritiumfreisetzung untersucht. Diese beeinflussten die basale Tritiumfreisetzung jedoch nicht. Die basale Tritiumfreisetzung ist der Vollständigkeit halber in den Tabellen 7, 8, 9 und 10 angegeben.

Ein Sonderfall liegt bei den Versuchen an den Retina-Scheiben des Meerschweins vor. Hier wird [³H]-Noradrenalin in Ermangelung noradrenerger Zellen und aufgrund seiner hohen Affinität zum Dopamin-Transporter in dopaminerge Zellen aufgenommen. Die freigesetzte Tritiummenge ist hier folglich ein Maß für die Dopaminfreisetzung (Schlicker et al. 1996). Grundsätzlich könnte man für diesen Versuchstyp auch [³H]-Dopamin verwenden (und das wurde in einem Teil der Versuche von Schlicker et al. (1996) auch gemacht), aber [³H]-Noradrenalin hat sich besonders bewährt, da hier eine kleinere Streuung der Versuchsergebnisse erzielt werden konnte.

Anders als beim noradrenergen System, wurden die Gewebepräparate zur Bestimmung der Acetylcholinfreisetzung in cholinergen zentralen Neuronen mit dem Präkursor [³H]-Cholin vorinkubiert. Dieses wird, im Gegensatz zu Acetylcholin, durch einen aktiven, Natrium-Gradienten angetriebenen Transport über den sogenannten High-Affinity-Choline-Uptake (HACU) in cholinerge Nervenendigungen aufgenommen (Kuhar und Murrin 1978). Dort wird es unter Spaltung von Acetyl-Coenzym A zu [³H]-Acetylcholin acetyliert und in Vesikeln der Nervenendigungen gespeichert. Nach elektrischer Stimulation erfolgt die Exozytose in den synaptischen Spalt. Freigesetztes [³H]-Acetylcholin wird in Abwesenheit eines Acetylcholinesterase-Inhibitors sofort in seine Ausgangssubstrate [³H]-Cholin und Acetat gespalten (Richardson und Szerb 1974).

Elektrische Stimulation (die hier als Reizverfahren verwendet wurde) bewirkt die Weiterleitung von Aktionspotentialen entlang der Axone in die Nervenendigungen, führt dort zu einem Calcium-Einstrom und schließlich zur Exozytose der Neurotransmitter aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt. Der Entzug von Calciumionen sowie die Tetrodotoxin-vermittelte Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle, über welche das Aktionspotential fortgeleitet wird, unterbindet die Freisetzung des Transmitters. In unserer Arbeitsgruppe wurde repräsentativ für alle in dieser Arbeit untersuchten Versuchsmodelle gezeigt, dass die exozytotische Transmitterfreisetzung Calcium-abhängig und Tetrodotoxin-sensitiv war und somit mit der physiologischen Transmitterfreisetzung vergleichbar ist.

Diese quasi-physiologische Transmitterfreisetzung wurde für folgende verwendete Versuchsmodelle beschrieben: cholinerges System im Hippokampus (Kathmann et al. 2001), noradrenerges System in der Großhirnrinde (Schlicker et al. 1992), im Hypothalamus (Schulte et al. 2011b), im Hippokampus (Schlicker et al. 1997) sowie im Vorhof der Maus (Günther et al. 2010). Für das Versuchsmodell an der Retina des Meerschweins wurde die quasi-physiologische Transmitterfreisetzung von Kurz (2008) gezeigt.

Die Qualität der Ergebnisse hängt zum einen von der freigesetzten Tritiummenge und zum anderen von einer guten Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung ab. Durch die richtige Wahl der Parameter für den elektrischen Reiz und der Calciumkonzentration im Superfusionsmedium für jedes einzelne Versuchsmodell können beide Faktoren optimiert werden. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz und der Calciumkonzentration hat zwar eine höhere Tritiumfreisetzung zur Folge, andererseits bewirkt es eine Abnahme der Modulierbarkeit und ist somit nicht in jedem Fall erstrebenswert (Starke 1977). Andererseits führte an den Versuchen am Vorhof der Maus eine niedrige Calciumkonzentration von 1,625 mM aufgrund einer sehr niedrigen stimulierten Tritiumfreisetzung oft zu nicht auswertbaren Ergebnissen, so dass hier eine erhöhte Calciumkonzentration von 3,25 mM eingesetzt wurde. In dieser Arbeit wurden an insgesamt fünf verschiedenen Geweben von zwei Tierarten Superfusionsversuche durchgeführt. Die Versuchsbedingungen in den einzelnen Versuchsreihen sind in Kapitel B.2.1.1 aufgeführt. Zum Teil wurden sie in dieser Arbeit, zum Teil in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe optimiert (im Einzelnen waren dies: Maus Hippokampus: Kathmann et al. (2001); Maus Hypothalamus: Schulte et al. (2011b); Maus Großhirnrinde: Schlicker et al. (1992); Maus Vorhof: Kurz et al. (2008); Meerschwein Retina: Schlicker et al. (1996)).

Die detektierbare Menge des Neurotransmitters wird auf zweierlei Weise durch ihn selbst beeinflusst. Zum einen wird der freigesetzte Neurotransmitter über einen aktiven Transporter wieder in die Nervenendigung aufgenommen, und zum anderen hemmt er über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch die Aktivierung präsynaptischer Autorezeptoren seine eigene weitere Freisetzung. Beide Mechanismen führen zu einer verringerten Konzentration des zu messenden Neurotransmitters im synaptischen Spalt. Um diese Effekte auszuschließen, wurden dem Superfusionsmedium Hilfspharmaka zugesetzt. Im Falle von Versuchen mit [³H]-Noradrenalin diente Desipramin als Hemmstoff des

Noradrenalin-Transporters (NAT) und Rauwolscin als Antagonist am α_2 -Autorezeptor. Auch eine theoretisch denkbare Wechselwirkung der zu untersuchenden Pharmaka mit dem NAT oder dem α_2 -Autorezeptor wird durch die Hilfspharmaka unterbunden. Hinzu kommt, dass das Ausmaß der Hemmung der Noradrenalinfreisetzung durch Aktivierung von Heterorezeptoren bei gleichzeitiger Blockade des Autorezeptors verstärkt ist (Schlicker und Göthert, 1998). Eine Ausnahme bilden die Versuche an der Retina des Meerschweins, in der die Blockade des NAT und α_2 -Autorezeptors hinfällig ist, weil dort noradrenerge Zellen fehlen (Schlicker et al. 1996). Im Falle von Versuchen mit [^3H]-Cholin wurde die Wiederaufnahme von [^3H]-Cholin in cholinerge Nervenendigungen durch den Zusatz eines Hemmstoffes des High-Affinity-Choline-Uptake, Hemicholinium-3, verhindert. Auf die routinemäßige Zugabe von AF-DX 384 als Hemmstoff des muskarinischen M_2 -Autorezeptors wurde verzichtet, da seine Eigenwirkung untersucht wurde.

1.2 Bindungsstudien

In dieser Arbeit wurden zwei Arten von Bindungsstudien durchgeführt: konventionelle Radioligandbindungsstudien und [^{35}S]-GTP γ S-Bindungsstudien (funktionelles Bindungsmodell).

Mittels konventioneller Radioligandbindungsstudien lassen sich Erkenntnisse über die Affinität von Liganden zu einem bestimmten Rezeptor und die Zahl bzw. die Dichte der entsprechenden Bindungsstellen in der Gewebepräparation gewinnen. Für die Verdrängungsstudien am CB_1 -Rezeptor wurde als radioaktiv markierter Ligand die Substanz [^3H]-Rimonabant gewählt. Diese besitzt im Vergleich zum natürlichen Cannabinoid Δ^9 -THC den Vorteil einer wesentlich höheren Affinität und Selektivität zum CB_1 -Rezeptor bei gleichzeitig geringerer Lipophilie. Diese Eigenschaften sind für die Anwendung der Filtrationstechnik bedeutsam, da eine hohe Affinität meist mit einer langsamen Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes einhergeht (Bylund und Yamamura 1990) und eine geringere Lipophilie in der Regel eine geringere unspezifische Bindung (z.B. an Membranlipide) zur Folge hat. Weiterhin sollte sich nach einer bestimmten Inkubationszeit ein Sättigungsgleichgewicht der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung einstellen. Während der Filtration wird dieses Gleichgewicht zerstört, so dass der Trennvorgang mithilfe des Harvesters möglichst schnell erfolgen muss. Die CB_1 -Rezeptordichte im Meerschwein-

Diskussion

Hippokampus (B_{\max} : 2340 ± 424 fmol/mg) und die Affinität von Rimonabant am CB₁-Rezeptor (K_D : $2,12 \pm 0,56$ nM) wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe (Schultheiss et al. 2005) mittels Sättigungsbindungen ermittelt, so dass in dieser Arbeit auf die Werte zurückgegriffen werden konnte.

Die [³⁵S]-GTP γ S Bindung untersucht das Ausmaß der G-Protein Aktivierung, ausgelöst durch die Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Sie stellt somit ein funktionelles Modell dar, welches den ersten Schritt in der Signaltransduktion nach der Rezeptoraktivierung durch einen Liganden detektiert. Mithilfe der [³⁵S]-GTP γ S Bindung können Liganden differenziert werden in Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten, ferner lassen sich ihre pharmakologischen Parameter wie die relative Effizienz und Potenz bestimmen (Strange 2010).

Die Methode erfordert die Anwesenheit von GDP, Magnesium- und Natriumionen, um die basale Bindung möglichst gering zu halten und die Agonist-stimulierte Bindung zu maximieren. Die optimalen Konzentrationen wurden dem Protokoll von Breivogel et al. (1998) entnommen.

Die Membransuspension für die [³⁵S]-GTP γ S Bindung enthält neben den zu untersuchenden Rezeptoren noch eine Reihe weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die ihrerseits auch G-Proteine aktivieren können und somit eine hohe basale Bindung hervorrufen. Dies wurde von Moore et al. (2000) für die Cannabinoid-stimulierte [³⁵S]-GTP γ S-Bindung in einer Autoradiographiestudie im Hippokampus der Ratte gezeigt, in der der maximale Effekt von WIN 55,212-2 durch die Aktivierung von A₁-Rezeptoren abgeschwächt wurde. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Aktivierung von G_{i/o}-Protein gekoppelten A₁-Rezeptoren durch endogenes Adenosin in der Membransuspension auf die [³⁵S]-GTP γ S Bindung untersucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die basale Bindung durch vorherige Spaltung von Adenosin durch eine Inkubation der Membransuspension mit Adenosindesaminase reduziert wurde. Die Vorbehandlung mit Adenosindesaminase limitierte durch die Senkung der basalen Bindung das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen und führte zu einer Erhöhung der spezifischen [³⁵S]-GTP γ S Bindung um 45 %. Dieser Wert liegt in der Größenordnung des in der Autoradiographiestudie von Moore et al. (2000) gefundenen Wertes von 42 %. Im Allgemeinen sind [³⁵S]-GTP γ S Bindungen experimentell besser durchführbar für die reichlich vorhandenen G_{i/o}-Protein

gekoppelten Rezeptoren, als für die an andere G-Proteine gekoppelten Rezeptor-Familien (Harrison und Traynor 2003).

2 Untersuchungen am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor

2.1 Untersuchungen zu O-2050 und zum endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor

Rimonabant ruft in vielen experimentellen Modellen einen Effekt hervor, der dem eines CB-Rezeptor Agonisten entgegengesetzt ist. Beispielsweise wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Noradrenalinfreisetzung im Hippokampus des Meerschweins durch einen CB₁-Rezeptor Agonisten gehemmt wurde, während der inverse Agonist Rimonabant eine Steigerung der Noradrenalinfreisetzung bewirkte (Schlicker et al. 1997). Dieser fazilitatorische Effekt von Rimonabant könnte entweder auf der Stabilisierung des Rezeptors in seinem inaktiven Zustand oder auf der kompetitiven Hemmung der tonischen Aktivierung des Rezeptors durch Endocannabinoide beruhen (Howlett et al. 2011). Für beide Erklärungen gibt es unterstützende Befunde (Schlicker und Kathmann 2001). Zur weiteren Analyse des zu Grunde liegenden Mechanismus sollte in dieser Arbeit ein vermeintlich neutraler Antagonist charakterisiert werden. Die Suche nach einem neutralen Antagonisten war bisher erfolglos (siehe auch Kapitel C.1.1.2). Dies ist nicht verwunderlich, da sich Antagonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sechs mal häufiger invers agonistisch als neutral verhalten (Kenakin 2004). Gardner und Mallet (2006) publizierten die Substanz O-2050, ein Analogon von Δ^8 -Tetrahydrocannabinol mit einer Sulfonamid-Seitenkette, als neutralen Antagonisten, der in Ratten die Nahrungsaufnahme verminderte. Zunächst wurde die Affinität von O-2050 am CB₁-Rezeptor im Meerschwein-Hippokampus bestimmt. O-2050 besitzt mit einem pK_i von 6,8 eine Affinität am CB₁-Rezeptor, die um eine log-Stufe geringer ist als die von Rimonabant. Dies spiegelt sich in der antagonistischen Potenz gegenüber dem CB-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 wieder, die auch in unserer Arbeitsgruppe mittels Superfusionsstudien bestimmt wurde. Rimonabant und O-2050 antagonisierten die durch WIN 55,212-2 hervorgerufene Hemmung der Noradrenalinfreisetzung im Meerschwein-Hippokampus. Auch hier zeigte sich zwischen Rimonabant mit einem pA₂ von 8,2 und O-2050 mit einem pA₂ von 7,3 ein Unterschied von einer log-Stufe.

Der hier in einer Membransuspension des Meerschwein-Hippokampus ermittelte K_i-Wert von 158 nM ist um ein Vielfaches höher, als der in der Literatur beschriebene K_i-Wert von

Diskussion

2,5-3,4 nM (Bertalovitz et al. 2010, Canals und Milligan 2008, Wiley et al. 2011), der in transfizierten HEK293 Zellen und in einer Membransuspension aus dem Kleinhirn der Ratte bestimmt wurde. Allerdings lag auch der K_i -Wert von 21 nM für Rimonabant höher, als in der Literatur und früher in unserer Arbeitsgruppe beschrieben (K_i : 2 nM) (Rinaldi-Carmona et al. 1995, Schultheiss et al. 2005).

Weiterhin sollte die intrinsische Aktivität von O-2050 bestimmt werden. Ein neutraler Antagonist bindet an den Rezeptor, ohne ihn zu aktivieren und dadurch intrazelluläre Signalwege anzuschalten. In [35 S]-GTP γ S Bindungsstudien können sich Endocannabinoide nicht anhäufen und somit wäre ein hemmender Effekt von O-2050 als inverser Agonismus und ein fehlender Effekt als neutraler Antagonismus zu deuten. Erwartungsgemäß (Sim-Selley et al. 2001) hemmte der inverse CB $_1$ -Rezeptor Agonist Rimonabant die [35 S]-GTP γ S Bindung auch in unserem Modell, wohingegen der CB $_1$ -Rezeptor Agonist WIN 55,212-2 die [35 S]-GTP γ S Bindung stimulierte. Der Antagonist O-2050 zeigte in [35 S]-GTP γ S Bindungen jedoch keine intrinsische Aktivität und veränderte die basale [35 S]-GTP γ S Bindung nicht, was auf einen neutralen Antagonismus hindeutet. Weitere grundlegende Kriterien für einen neutralen Antagonisten sind neben seiner Affinität am entsprechenden Rezeptor das Aufheben der Effekte eines Agonisten und eines inversen Antagonisten (Pertwee 2005a). Aus diesem Grund wurde die Wechselwirkung von O-2050 mit dem Agonisten WIN 55,212-2 und dem inversen Agonisten Rimonabant in [35 S]-GTP γ S Bindungen untersucht. Wie schon zuvor in den Superfusionsexperimenten beobachtet, wurde auch hier der von WIN 55,212-2 hervorgerufene Effekt durch O-2050 abgeschwächt. Interessanterweise schwächte O-2050 die hemmende Wirkung von Rimonabant auf die [35 S]-GTP γ S Bindung jedoch nicht ab, sondern verstärkte sie sogar in Konzentrationen ab 0,1 μ M. Diese Beobachtung spricht gegen einen neutralen Antagonismus von O-2050. Allerdings könnte es sein, dass der Antagonismus von O-2050 am CB $_1$ -Rezeptor gegenüber Rimonabant von anderen unspezifischen Wirkungen überlagert wird. Im Gegensatz zu unseren Befunden berichteten Canals und Milligan (2008), dass O-2050 sowohl die Wirkung von WIN 55,212-2 als auch diejenige von Rimonabant aufheben konnte. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, da sie die [35 S]-GTP γ S Bindungen in transfizierten HEK293 Zellen und nicht in einer Membransuspension aus nativem Gewebe durchgeführt haben.

Diskussion

In der Literatur gibt es weitere Hinweise dafür, dass O-2050 ein neutraler CB-Rezeptor Antagonist ist. Beispielsweise beeinflusste O-2050 nicht das Ausmaß der elektrisch induzierten Kontraktion im Vas deferens der Maus und im Präparat aus Plexus myentericus und Längsmuskelschicht des Meerschwein-Dünndarms (Pertwee 2005a), antagonisierte jedoch die Wirkung von WIN 55,212-2. Wiley et al. (2011) bezweifeln jedoch, dass O-2050 abschließend als neutraler Antagonist bezeichnet werden kann, da es die Forskolin-induzierte cAMP Bildung hemmte und diesbezüglich eine intrinsische Aktivität von etwa 0,5 im Vergleich zum vollen CB-Rezeptor Agonisten CP55,940 zeigte. Weiterhin widersprechen die Ergebnisse von *in vivo* Untersuchungen mit O-2050 einem neutralen Antagonismus, da die Substanz die Wirkungen von Δ^9 -THC nicht antagonisieren konnte (Wiley et al. 2011).

In unserer Arbeitsgruppe wurde schließlich der Effekt des in unseren Händen neutralen CB₁-Rezeptor Antagonisten O-2050 auf die Noradrenalinfreisetzung im Hippokampus des Meerschweins untersucht und mit dem Effekt von Rimonabant verglichen. Ein neutraler Antagonist würde die Noradrenalinfreisetzung nur durch eine kompetitive Verdrängung von Endocannabinoiden in der Biophase des Rezeptors erhöhen, da er, im Gegensatz zu einem inversen Agonisten, nicht in der Lage ist, die Spontanaktivität von CB₁-Rezeptoren zu beeinflussen. Erwartungsgemäß steigerte Rimonabant in den Konzentrationen 0.1 und 1 μ M die Noradrenalinfreisetzung um jeweils 32 % und 39 %. O-2050 wurde aufgrund seiner zehnfach geringeren Affinität und Potenz in einer zehnfach größeren Konzentration eingesetzt. O-2050 imitierte den Effekt von Rimonabant in einer Konzentration von 10 μ M, indem es die Noradrenalinfreisetzung um 22 % steigerte. Diese Befunde sprechen dafür, dass der fazilitatorische Effekt zumindest teilweise auf der Unterbrechung einer tonischen Hemmung der Transmitterfreisetzung durch Endocannabinoide und nicht auf der inversagonistischen Wirkung von Rimonabant beruht (Schulte et al. 2011a).

Rimonabant ist nicht nur als prototypischer inverser CB₁-Rezeptor-Agonist für wissenschaftliche Untersuchungen interessant, sondern wurde unter dem Namen Acomplia® in Europa als Appetitzügler vermarktet, der neben einer Gewichtsreduktion auch zu einer Abnahme metabolischer Risikofaktoren (u. a. Reduktion der Triglyceride und der Blutzuckerwerte, Zunahme von HDL) führte (Patel und Pathak 2007). Im Jahr 2008 ordnete die europäische Zulassungsbehörde EMA das Ruhen der Zulassung an, da unter der Therapie mit Rimonabant vermehrt schwere psychiatrische Nebenwirkungen wie

Depressionen und Angstzustände, bis hin zu Suiziden registriert worden waren. Neutrale CB₁-Rezeptor Antagonisten könnten gegenüber inversen CB₁-Rezeptor Agonisten ein geringeres Nebenwirkungspotential bergen. Im Gegensatz zu inversen Agonisten entfalten neutrale Antagonisten ihre Wirkung erst bei einer erhöhten Endocannabinoidkonzentration, die in adipösen Menschen gezeigt wurde (Engeli et al. 2005). Tatsächlich unterdrückten die neutralen Antagonisten AM4113 und AM6545 die Nahrungsaufnahme in Ratten, ohne jedoch Anzeichen einer Nausea zu induzieren, welche als charakteristische Nebenwirkung von Rimonabant gilt (Cluny et al. 2010, Sink et al. 2008).

2.2 Charakterisierung von Virodhamin

Es ist bekannt, dass Endocannabinoide ihre Wirkung teilweise über Umwandlungsprodukte, zum Beispiel Prostaglandine, entfalten (Grainger und Boachie-Ansah 2001, van Dross 2009). Das gilt auch für das Endocannabinoid Virodhamin, das die menschliche Pulmonalarterie nicht nur durch einen atypischen Cannabinoid-Rezeptor (den noch nicht klonierten endothelialen Cannabinoid-Rezeptor), sondern zusätzlich durch ein Prostacyclin oder ein verwandtes Produkt relaxiert (Kozłowska et al. 2008). In unserer Arbeitsgruppe wurde nun überprüft, ob Virodhamin auch in ein Prostaglandin der E-Serie umgewandelt wird. Virodhamin könnte sich wirksam in der Therapie der pulmonalen Hypertonie erweisen, da es zwei relaxierende Mechanismen an der Pulmonalarterie aufweist. Die Umwandlung in ein Prostaglandin der E-Serie wäre hier zusätzlich von Vorteil, da dieses die Noradrenalinfreisetzung in den pulmonalen Gefäßen über einen präsynaptischen Rezeptor hemmen könnte. In der Pulmonalarterie der Maus und in sechs weiteren zentralen und peripheren Geweben beeinflusste Virodhamin die Noradrenalinfreisetzung jedoch nicht, während das Prostaglandin E-Analogon Sulproston eine sehr starke Hemmung hervorrief; so konnte die Umwandlung in ein Prostaglandin der E-Serie ausgeschlossen werden (Günther et al. 2010). Die untersuchten Gewebe exprimieren keine funktionellen CB₁-Rezeptoren. Dies hätte die Untersuchung gestört, da sich Virodhamin, zumindest unter bestimmten Versuchsbedingungen, an CB₁-Rezeptoren als partieller Agonist verhält (Porter et al. 2002, Ryberg et al. 2007, diese Arbeit).

In der [³⁵S]-GTPγS Bindung in Maus-Hippokampusmembranen zeigte Virodhamin eine sehr geringe intrinsische Aktivität von 0,24 verglichen mit dem vollen Agonisten WIN 55,212-2

am CB₁-Rezeptor; im höheren Konzentrationsbereich verhielt sich Virodhamin als neutraler Antagonist. Die Affinität von Virodhamin an CB₁-Rezeptoren wurde an Meerschwein-Großhirnrindenmembran untersucht, damit Vergleiche mit anderen CB-Rezeptor Liganden, deren Affinität ebenfalls in unserem Labor bestimmt wurde, durchgeführt werden konnten (Schultheiss et al. 2005). Der pK_i-Wert für Virodhamin betrug 5,30. Dieser Wert stimmt mit Literaturwerten überein, die zwischen 5,53 und 5,76 liegen (Porter et al. 2002, Ryberg et al. 2007, Steffens et al. 2005). Die Befunde müssen auch vor dem Hintergrund unserer Suche nach einem neutralen CB₁-Rezeptor-Antagonisten gesehen werden. Die erzielten Ergebnisse (neutraler Antagonismus nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich plus insgesamt niedrige Affinität zum CB₁-Rezeptor) lassen Virodhamin nicht als brauchbaren neutralen CB₁-Rezeptor-Antagonisten erscheinen.

2.3 Charakterisierung von N-Oleylglycin

Das Lipid N-Oleylglycin wurde in Humanplasma gefunden, und nun stellte sich die Frage, ob es ähnlich wie viele andere Fettsäureamide, zum Beispiel sein Metabolit Oleamid (Leggett et al. 2004), auch eine Affinität und Wirkung am CB₁-Rezeptor aufweist. Verdrängungsstudien mit dem Radioliganden [³H]-Rimonabant ergaben nur eine sehr geringe Affinität von N-Oleylglycin am CB₁-Rezeptor. Zur Untersuchung einer möglichen agonistischen Wirksamkeit wurde das Superfusionsmodell an der Retina des Meerschweins gewählt. N-Oleylglycin konnte die Transmitterfreisetzung hier jedoch nicht beeinflussen, während der als Positivkontrolle dienende Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2 eine Hemmung hervorrief. Auch eine antagonistische Wirkung gegenüber WIN 55,212-2 wurde nicht beobachtet; die Anwesenheit von N-Oleylglycin hatte keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt von WIN 55,212-2 auf die Transmitterfreisetzung. Zusammengefasst bedeutet dies, dass endogenes N-Oleylglycin aufgrund seiner fehlenden Affinität und Wirksamkeit am CB₁-Rezeptor wohl nicht als Endocannabinoid klassifiziert werden kann. Allerdings müsste noch die Wirkung am CB₂-Rezeptor untersucht werden, bevor man zu einer definitiven Wertung kommt.

Die Bedeutung von N-Oleylglycin als endogener Mediator ist noch nicht geklärt, obschon bekannt ist, dass N-Acylaminosäuren und hier insbesondere die Glycinkonjugate eine Rolle in der Entgiftung und Ausscheidung von körperfremden Carboxylaten spielen. Hierbei

handelt es sich jedoch meist um kurzkettige Fettsäuren (Farrell und Merkler 2008). Es gibt jedoch neuere Hinweise darauf, dass N-Fettacylglycine nicht bloß nur einfache Intermediate im primären Fettsäureamid-Signalweg sind, sondern dass sie auch eine eigenständige Funktion als intrazellulärer Botenstoff besitzen. So führte eine intraperitoneale Injektion von N-Oleylglycin in Ratten zu einer ausgeprägten Hypothermie und einer verringerten lokomotorischen Aktivität; diese Wirkungen wurden unabhängig von der Umwandlung von N-Oleylglycin in das entsprechende Fettsäureamid Oleamid hervorgerufen (Chaturvedi et al. 2006).

2.4 Interaktion des präsynaptischen CB₁-Rezeptors mit dem muskarinischen Autorezeptor

In unserer Arbeitsgruppe wurde herausgefunden, dass die über den M₂-Autorezeptor vermittelte Hemmung der Acetylcholinfreisetzung im Hippokampus der CB₁-Knockout Maus, verglichen zur Wildtyp-Maus, verstärkt war. Weitere Experimente im Hippokampus der Ratte zeigten, dass die M₂-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch Rimonabant gesteigert wurde. Zusammengefasst bedeutet dies, dass der Effekt des präsynaptischen muskarinischen Autorezeptors verstärkt ist, wenn der präsynaptische CB₁-Heterorezeptor gleichzeitig pharmakologisch blockiert wird oder genetisch ausgeschaltet ist (Schulte und Schlicker 2010).

Eine naheliegende Erklärung für den verstärkten Effekt eines muskarinischen Rezeptor Agonisten im Hippokampus der CB₁-Knockout Maus wäre eine erhöhte Dichte des muskarinischen Autorezeptors, der im Hippokampus vom M₂-Subtyp ist (Zhang et al. 2002a). Aus diesem Grund wurde die Expression von M₂-Rezeptoren mit der Western Blot Technik bestimmt. Damit die Untersuchung auf präsynaptisches Gewebe fokussiert werden konnte, wurden Synaptosomen, isolierte präsynaptische Nervenendigungen (Raiteri und Raiteri 2000), anstelle von intaktem Gewebe verwendet. Allerdings konnte kein Unterschied in der Expression von M₂-Rezeptoren zwischen der CB₁-Knockout Maus und der Wildtyp Maus festgestellt werden.

Die Ursache für die verstärkte M₂-Rezeptor-Funktion könnte auch in einer veränderten Signaltransduktion, die dem M₂-Rezeptor nachgeschaltet ist, bei den CB₁-Knockout Mäusen liegen. Unterschiedliche präsynaptische Rezeptoren auf einer Axonendigung greifen

wahrscheinlich auf ein gemeinsames Reservoir an G-Proteinen zurück (Schlicker und Göthert 1998). Folglich ist der Effekt eines inhibitorischen Rezeptors vermindert, wenn zuvor ein anderer inhibitorischer Rezeptor aktiviert wurde, der an die gleichen G-Proteine koppelt. Im Falle der genetischen Ablation eines Rezeptors bedeutet dies, dass alle G-Proteine für den anderen präsynaptischen inhibitorischen Rezeptor verfügbar wären. Die Expression der $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Proteine wurde in Synaptosomen der CB₁-Knockout Maus und der Wildtyp Maus verglichen. Dazu wurde ein Antikörper gegen alle drei Subtypen des $G\alpha_i$ -Proteins und ein Antikörper gegen das $G\alpha_o$ -Protein verwendet. Tatsächlich konnte eine erhöhte Expression von $G\alpha_i$ - und $G\alpha_o$ -Protein in der CB₁-Knockout Maus festgestellt werden. Dieser Unterschied ist gering und nur für das $G\alpha_o$ -Protein signifikant. Diese eher enttäuschenden Ergebnisse schließen eine Beteiligung der G-Proteine am verstärkten Effekt des M₂-Rezeptors in der CB₁-Knockout Maus nicht aus, da zusätzlich eine Umverteilung der G-Proteine zwischen Lipid Rafts und Non-Raft-Fraktionen in der Plasmamembran auftreten kann (Zhang und Rasenick 2010), die einer Bestimmung in Synaptosomen entgeht. G-Proteine, die sich in der Non-Raft-Fraktion der Plasmamembran befinden, führen beispielsweise leichter zu einer Stimulation der Adenylatzyklase.

Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe auch zeigen, dass der Effekt des M₂-Rezeptor Agonisten Oxotremorin in Anwesenheit des potenten CB-Rezeptor Agonisten WIN 55,212-2 vermindert war (unveröffentlichte Daten). Dies bedeutet im Umkehrschluss zur pharmakologischen Blockade durch Rimonabant oder zur genetischen Ausschaltung, dass eine gleichzeitige pharmakologische Aktivierung des präsynaptischen CB₁-Heterorezeptors eine Abschwächung des M₂-Autorezeptor-vermittelten Effekts bewirkt.

In dieser Arbeit sollte weiterhin überprüft werden, ob die Funktion des M₂-Autorezeptors auch durch eine gleichzeitige verstärkte Aktivierung des präsynaptischen CB₁-Heterorezeptors durch ein endogenes Cannabinoid abgeschwächt wird. Dazu wurden Superfusionsversuche mit FAAH-Knockout-Mäusen durchgeführt, die das Anandamid-abbauende Enzym FAAH nicht exprimieren (Cravatt et al. 2001). Im Gehirn dieser Mäuse wurde eine 15-fach erhöhte Konzentration des Endocannabinoids Anandamid gemessen. Die genetische Ablation der FAAH beeinträchtigte weder die Potenz des muskarinischen Rezeptor Agonisten Oxotremorin, noch die des M_{2/4}-Rezeptor Antagonisten AF-DX 384 in Superfusionsstudien. Auch die maximale Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch

Oxotremorin war im Hippokampus der FAAH-Knockout-Maus und in der Wildtyp-Maus gleich stark ausgeprägt. Dies änderte sich auch nicht in Anwesenheit des muskarinischen Rezeptor Antagonisten AF-DX 384. Grund könnte sein, dass die Anandamid Konzentration in cholinergen Synapsen nicht ausreichend erhöht ist, um eine effektive Aktivierung des CB₁-Rezeptors zu gewährleisten. Eine andere Erklärung könnte sein, dass aufgrund einer erhöhten Anandamid Konzentration im synaptischen Spalt eine Herunterregulierung der präsynaptischen CB₁-Rezeptoren stattfindet. Agonist-induzierte Internalisierung von Rezeptoren ist ein wichtiger Kompensationsmechanismus gegenüber überdurchschnittlich starken Reizen (Coutts et al. 2001). Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass eine erhöhte Konzentration von Anandamid im Hippokampus von FAAH-Knockout Mäusen durch eine verringerte Konzentration eines anderen Endocannabinoids, z.B. 2-AG, kompensiert wird (Maccarone et al. 2008).

Die Veränderung der Funktion präsynaptischer Rezeptoren in CB₁-Rezeptor-Knockout-Mäusen wurde von unserer Arbeitsgruppe noch in größerer Breite untersucht (unveröffentlichte Daten). So trat ein verstärkter maximaler inhibitorischer Effekt auf die Acetylcholinfreisetzung auch bei einem anderen präsynaptischen inhibitorischen Rezeptor auf cholinergen Neuronen im Hippokampus auf: Der inhibitorische Effekt von DPDPE am δ -Opioidrezeptor in der CB₁-Knockout Maus war nämlich gesteigert. Ebenso war der Effekt der verstärkten Wirkung nicht auf cholinerge zentrale Neurone beschränkt, sondern wurde auch in einem sympathisch innervierten peripheren Gewebe beobachtet. Im Samenleiter der CB₁-Knockout Maus rief Oxotremorin eine stärkere Hemmung der Noradrenalinfreisetzung hervor als in der Wildtyp Maus. Es konnte verifiziert werden, dass die Effekte CB₁-Rezeptor spezifisch sind, da sie in Neuronen, die keiner Modulation durch präsynaptische CB₁-Rezeptoren unterliegen, nicht auftraten. Die aufgezeigten Rezeptorinteraktionen können von praktischer Bedeutung sein und mögliche pharmakodynamische Arzneimittelinteraktionen zwischen CB-Rezeptor Agonisten (Δ^9 -THC oder Nabilon) und muskarinischen Rezeptor Agonisten (z.B. Carbachol) erklären.

3 Untersuchungen an Peptid-Rezeptoren

3.1 Einfluss von Neuropeptiden auf die Transmitterfreisetzung

Neuropeptid W ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt (Singh und Davenport 2006). Ein inhibitorischer Einfluss von Neuropeptid W auf die Noradrenalinfreisetzung liegt nahe, da NPW der endogene Ligand an zwei $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren (NPBW₁ und NPBW₂) ist. Weiterhin ist bekannt, dass ein anderes Neuropeptid, das Neuropeptid Y, welches ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme spielt, die Noradrenalinfreisetzung in verschiedenen Geweben über die Aktivierung von $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Y_2 -Rezeptoren hemmt (Schlicker und Kathmann 2008). Da die Nahrungsaufnahme über den Hypothalamus reguliert wird, wurde unter anderem dieses Gewebe für die Experimente gewählt. In dieser Arbeit konnte eine Modulation der Noradrenalinfreisetzung jedoch weder im Hypothalamus noch im Hippokampus, der ebenfalls untersucht wurde, festgestellt werden. Die verwendete Konzentration von 1 μ M war adäquat, da NPW in dieser Konzentration die Bindung von [¹²⁵I]-NPW in der Amygdala der Ratte fast vollständig inhibierte (Singh et al. 2004). Der EP_{1/3}-Rezeptor Agonist Sulproston als Positivkontrolle hemmte die Noradrenalinfreisetzung wie erwartet in beiden Hirnregionen (Günther et al. 2010).

Neuropeptid FF übt einen modulatorischen Effekt auf Opioid-Rezeptor vermittelte Wirkungen aus, der häufig inhibitorischer Natur ist (Mollereau et al. 2005b). Der NPFF₂-Rezeptor ist, ebenso wie die drei Opioid-Rezeptorsubtypen μ , δ und κ , an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt (Alexander et al. 2008). Daher ist es plausibel, dass NPFF und der NPFF₂-Rezeptor Agonist dNPA (Roussin et al. 2005) ihrerseits auch die Neurotransmitterfreisetzung hemmen. In den Experimenten am Vorhof der Maus, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, hemmte der δ -Opioidrezeptor Agonist DPDPE wie erwartet die Noradrenalinfreisetzung (Trendelenburg et al. 2000), wohingegen NPFF und dNPA keinen Effekt hervorriefen. Auch in der Großhirnrinde der Maus war kein Effekt detektierbar. Interessanterweise wurde in der Literatur eine Hemmung der Freisetzung eines anderen Neurotransmitters, GABA, durch die Aktivierung von präsynaptischen Rezeptoren durch NPFF im Hypothalamus beschrieben (Jhamandas et al. 2007).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beeinflussung des Effekts des δ -Opioidrezeptor Agonisten DPDPE durch Neuropeptid FF und dNPA untersucht. Eine solche Interaktion ist nicht abwegig, da NPFF, wie oben erläutert wurde, als Modulator der endogenen Opioid-Wirkung gilt. So wurde gezeigt, dass NPFF₁- und NPFF₂-Rezeptoren in isolierten Neuronen das Ausmaß der Inhibition des depolarisationsinduzierten Calciumeinstroms durch Opioidrezeptor Agonisten hemmen (Roumy et al. 2003). In Nagern übte eine intrazerebrovaskuläre Verabreichung von NPFF einen anti-opioiden Effekt aus, indem es die analgetische Potenz von Morphin im Tail-Flick Test (einem Schmerzmodell) verminderte. Im Gegensatz dazu führte eine intrathekale Injektion in Ratten zu einer erhöhten Schmerztoleranz und einer Verstärkung der Morphin-induzierten Analgesie, die vermutlich durch einen funktionellen Antagonismus von NPFF am δ -Opioid Autorezeptor vermittelt wird (Roussin et al. 2005). Eine Wechselwirkung zwischen Opioid-Rezeptoren und NPFF-Rezeptoren ist auch im Herzen denkbar und könnte zumindest zum Teil den Catecholamin-abhängigen Effekt von NPFF auf den Blutdruck und die Herzfrequenz in anaesthesierten Ratten erklären (Allard et al. 1995, Huang et al. 2000). NPFF und seine entsprechenden Rezeptoren, der NPFF₁- und der NPFF₂-Rezeptor, sowie δ -Opioidrezeptoren wurden im Herzen der Ratte und der Maus mittels Immunhistochemie oder funktionell nachgewiesen (Allard et al. 1995, Schlicker und Kathmann 2008). Beide Neuropeptide modulierten die Wirkung von DPDPE im Vorhof der Maus jedoch nicht, wohingegen der δ -Opioidrezeptor Antagonist Naltrindol dem Effekt von DPDPE entgegenwirkte und dessen hemmende Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung wie erwartet abschwächte (Trendelenburg et al. 2000).

In diesen Versuchsreihen war die Konzentration von NPFF ausreichend hoch gewählt, um eine Aktivierung von NPFF₁- und NPFF₂-Rezeptoren zu garantieren. Die Konzentration des K_D -Wertes von Neuropeptid FF am NPFF₁-Rezeptor (K_D : 1,13 nM) sowie am NPFF₂-Rezeptor (K_D : 0,37 nM) wurden um ein Vielfaches überschritten (Bonini et al. 2000). Auch dNPA wurde in Konzentrationen eingesetzt, die angemessen waren, um den NPFF₂-Rezeptor zu aktivieren. dNPA weist mit einem K_D -Wert von 0,027 nM eine sehr hohe Affinität am NPFF₂-Rezeptor auf (Roussin et al. 2005).

3.2 Einfluss von Interleukin-1 β auf die Neurotransmitterfreisetzung

In den Superfusionsexperimenten mit den Neuropeptiden waren diese kurz vor und während der zweiten Stimulationsperiode (S_2) anwesend. In den Experimenten mit Interleukin-1 β gab es im Unterschied dazu zwei zusätzliche Stimulationsperioden (S_3 und S_4), die jeweils 30 und 80 Minuten nach dem Entzug des Zytokins aus dem Superfusionsmedium appliziert wurden. Der Grund dafür ist, dass in einigen Studien der Effekt von Interleukin-1 β erst mit einiger Verzögerung zu beobachten war (Bognar et al. 1994, Hurst und Collins 1993). Tatsächlich zeigte sich der Effekt von Interleukin-1 β auch in unseren Experimenten in der Großhirnrinde der Maus erst, als das Pharmakon nicht mehr im Superfusionsmedium anwesend war. Die stimulierte Noradrenalinfreisetzung aus Interleukin-1 β -exponierten Großhirnrindenschnitten der Maus nahm während der Reizperioden stetig ab, signifikant wurde der Effekt jedoch erst in der vierten Reizperiode, in der die Hemmung 35 % betrug. Im Gegensatz dazu hemmte Sulproston, das als Referenzpharmakon eingesetzt wurde und über die Aktivierung des EP $_3$ -Rezeptors wirkt, die Noradrenalinfreisetzung bereits in der zweiten Stimulationsperiode, also prompt nach Einleitung des Pharmakons ins Superfusionsmedium. Schon während der nächsten Stimulationsperiode (S_3), in Abwesenheit des Pharmakons, konnte der Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Der Effekt von Interleukin-1 β war nicht nur zeitabhängig, sondern auch konzentrationsabhängig. Eine signifikante Hemmung der Noradrenalinfreisetzung um 35 % konnte in einer Konzentration von 0,3 nM erzielt werden. Diese Konzentration liegt in der gleichen Größenordnung wie die Affinität des hier verwendeten humanen Interleukin-1 β für den murinen IL-1RI Rezeptor (Dinarello 1996).

Andere Arbeitsgruppen berichteten ebenfalls einen hemmenden Effekt von Interleukin-1 β auf die Noradrenalinfreisetzung. Bognar et al. (1994) untersuchten diesen Effekt in der Milz der Ratte und Hurst und Collins (1993) im Plexus myentericus der Ratte, wobei sich der Effekt hier als biphasisch herausstellte (Hemmeffekt nach 15 und 90 min Inkubation mit Interleukin-1 β). Die intrazerebrovaskuläre Injektion von Interleukin-1 β führte in Ratten zu einer verringerten NoradrenalinKonzentration im Hippokampus und in der Amygdala (Song et al. 2006). Im Gegensatz dazu fanden Rosmaninho-Salgado et al. (2007) einen fazilitatorischen Effekt von Interleukin-1 β auf die Noradrenalinfreisetzung aus murinen chromaffinen Zellen. Ebenfalls eine Steigerung beobachteten Tsumori et al. (1998) im

Hypothalamus der Ratte. Ein inhibitorischer Einfluss von Interleukin-1 β auf die Noradrenalinfreisetzung in der Großhirnrinde wird in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben.

Der Unterschied im zeitlichen Verlauf der Wirkung von Sulproston und Interleukin-1 β auf die Hemmung der Noradrenalinfreisetzung, insbesondere der mit Verzögerung auftretende Effekt von Interleukin-1 β , stimmt mit der Tatsache überein, dass die Signaltransduktion nach Aktivierung des Interleukin-1-Rezeptors viel langsamer abläuft als zum Beispiel nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Dinarello 2009). Es ist denkbar, dass Interleukin-1 β einen Effekt auf die Proteinbiosynthese ausübt und somit eine verzögerte Hemmung der Noradrenalinfreisetzung hervorruft. An dieser Stelle sind weitere Experimente geplant, um den zu Grunde liegenden Mechanismus und die Übertragbarkeit auf andere Neurotransmitter aufzuklären. Der Mechanismus ist von Bedeutung, da eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung im Gehirn affektive Begleiteffekte während eines inflammatorischen Zustandes, unter anderem Angst, erklären könnte. Während einer systemischen Inflammation gebildetes Interleukin-1 β überwindet die Blut-Hirn-Schranke durch einen aktiven Transport (Quan und Banks 2007). Weiterhin wurden erhöhte Interleukin-1 β Konzentrationen im Gehirn mit psychiatrischen Störungen wie Depression und Schizophrenie in Verbindung gebracht (Söderlund et al. 2009, Song et al. 2006). Eine durch Interleukin-1 β hervorgerufene Erniedrigung der NoradrenalinKonzentration ist im Einklang mit der Schildkraut-Hypothese der Depression, die eine Erschöpfung an Noradrenalin als ursächlich ansieht (Schildkraut 1965).

4 Untersuchungen an anderen Rezeptoren

4.1 Suche nach einem funktionellen Modell für den EP₃-Rezeptor

Wie schon erwähnt wurde, haben wir in der Vergangenheit wiederholt freisetzungshemmende Prostaglandin-EP₃-Rezeptoren identifiziert (Schlicker et al. 1987, Exner und Schlicker 1995). Diese Studien wurden dadurch erschwert, dass ein geeigneter Antagonist, L-826,266, erst spät verfügbar wurde (Juteau et al. 2001). Diese Substanz wurde von uns (Günther et al. 2010) als kompetitiver EP₃-Antagonist charakterisiert. Allerdings sind die Superfusionsstudien an Hirnschnitten nicht geeignet, zu unterscheiden, ob die Substanz ein inverser Agonist oder neutraler Antagonist ist. So ergab sich die Idee, neben

der Superfusionsmethode ein weiteres funktionelles Modell für den EP₃-Rezeptor zu etablieren. Eine Steigerung der [³⁵S]-GTPγS Bindung durch den EP₃-Rezeptor Agonisten Sulproston konnte jedoch in einer Membransuspension des Maus-Hippokampus und Meerschwein-Hippokampus nicht erzielt werden. Interessanterweise zeigten sich in der maximalen Steigerung der [³⁵S]-GTPγS Bindung durch WIN 55,212-2, das als Positivkontrolle diente, Speziesunterschiede. Der Maximaleffekt war in der Meerschweinmembran um ca. 120 % stärker ausgeprägt als in der Mausmembran. Die [³⁵S]-GTPγS Bindung für Prostanoiden wurde in Membranpräparationen des Gehirns bisher nicht untersucht. In einem anderen Modell fanden Fong et al. (1998) eine Zunahme der [³⁵S]-GTPγS Bindung durch das Prostacyclin-Analogon Iloprost an transfizierten HEK 293 Zellen. Ein Agonist an Thromboxan (TXA₂)-Rezeptoren steigerte in humanen Thrombozyten-Membranen die [³⁵S]-GTPγS Bindung (Djellas et al. 1999). Weiterhin konnte ein EP₃-Rezeptor Agonist die [³⁵S]-GTPγS Bindung im Zeitverlauf nur in G_s-Protein-rekonstituierten, nicht jedoch in G_o-Protein-rekonstituierten transfizierten CHO Zellen stimulieren (Negishi et al. 1993).

4.2 Analyse der Histamin-H₄-Rezeptor mRNA Expression

Der H₃- und der H₄-Rezeptor unterscheiden sich untereinander und vom H₁- und H₂-Rezeptor durch ein lokal und zellulär begrenztes Expressionsmuster. Der H₄-Rezeptor wird in Geweben des hämatopoetischen und Immunsystems exprimiert und übt dort eine proinflammatorische Funktion aus. Dies äußert sich etwa in der chemotaktischen Wirkung auf eosinophile Leukozyten sowie der Steigerung der Interleukin-16-Sekretion aus T-Lymphozyten (Kiss und Keserü 2009). Dagegen ist der H₃-Rezeptor präsynaptisch im zentralen und peripheren Nervensystem lokalisiert und führt zur Hemmung der Freisetzung des entsprechenden Neurotransmitters. Für den erst seit 2000 bekannten H₄-Rezeptor ist zur möglichen präsynaptischen Lokalisation bisher wenig bekannt und die Angaben zur Expression im Gehirn sind widersprüchlich, der Rezeptor konnte dort von einigen Autoren nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel A.1.6). Eine präsynaptische Lokalisation auf zentralen Neuronen ist plausibel, zumal dieser Rezeptor wie der H₃-Rezeptor G_{i/o}-Protein gekoppelt ist (Alexander et al. 2008) und viele G_{i/o}-Protein gekoppelte Rezeptoren unter anderem als präsynaptisch inhibitorische Rezeptoren fungieren (Kubista und Boehm 2006). Die Detektion des H₄-Rezeptors mittels RT-PCR erscheint aufgrund einer sehr geringen

Expression in vielen Geweben schwierig. Zudem scheint die Expression durch entzündliche Stimuli reguliert zu sein. Da unumstritten ist, dass der H₄-Rezeptor peripher in der Milz exprimiert wird, wurde dieses Gewebe als Positivkontrolle gewählt (Nakamura et al. 2000). Die Analyse von humanem und murinem Großhirnrindengewebe mithilfe der RT-PCR belegte eine Expression von H₄-Rezeptor mRNA in beiden Spezies. Diese Befunde schaffen die Grundlage für die weitere Untersuchung der Funktion des zentralen H₄-Rezeptors. Mithilfe von Superfusionsstudien soll untersucht werden, ob der H₄-Rezeptor in der Großhirnrinde präsynaptisch lokalisiert ist und ebenso wie der H₃ Rezeptor an der Regulierung der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt ist. In einer elektrophysiologischen Studie wurde eine H₄-Rezeptor-vermittelte Beeinflussung von Neuronen nachgewiesen, allerdings ist eine präsynaptische Lokalisation auf glutamatergen Neuronen nach dieser Studie sehr unwahrscheinlich (Connelly et al. 2009). Ein präsynaptisches Vorkommen an anderen Neuronen-Typen ist aber nach wie vor denkbar.

Im Jahr 2003 wurde der erste selektive H₄-Rezeptor-Antagonist, JNJ-7777120, publiziert und im Jahr 2010 schaffte es der erste H₄-Rezeptor Antagonist in die klinische Testung. Das Aminopyrimidin UR-63325 befindet sich momentan in einer Phase-II-Studie und wird auf seine Wirksamkeit bei Asthma und allergischer Rhinitis geprüft (Sander und Stark 2011). Hier ist möglicherweise auch eine Kombination mit einem H₁-Rezeptor Antagonisten sinnvoll. Während H₁-Rezeptor Antagonisten die allergische Sofortreaktion hemmen, wirken H₄-Rezeptor Antagonisten vorwiegend in der Spätphase, indem sie die Ausschüttung verschiedener Interleukine und anderer Entzündungsmediatoren regulieren. In einem Mausmodell für akutes Asthma konnte diese synergistische Wirkung bereits belegt werden (Thurmond et al. 2008). Die Suche nach selektiven H₄-Rezeptor Agonisten läuft ebenfalls auf Hochtouren. Hier ist allerdings eine Nutzung für therapeutische Zwecke bisher nicht absehbar.

E. Zusammenfassung

Die Freisetzung von Überträgerstoffen (Transmittern) kann durch Rezeptoren gehemmt werden, die häufig direkt an den entsprechenden Nervenendigungen, also präsynaptisch lokalisiert sind. Prominentes Beispiel ist der präsynaptische Cannabinoid-CB₁-Rezeptor, der an inhibitorische G-Proteine koppelt und die Freisetzung verschiedenster Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem hemmt.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit dem endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor und seiner Wechselwirkung mit anderen präsynaptischen Rezeptoren. Der inverse CB₁-Rezeptor Agonist Rimonabant steigert die Neurotransmitterfreisetzung. Zur Klärung der Frage, ob dieser endogene Tonus auf einer konstitutiven Aktivität der CB₁-Rezeptoren beruht oder durch den Antagonismus von Rimonabant gegenüber akkumulierenden Endocannabinoiden erklärt werden kann, wird ein neutraler Antagonist benötigt. Zunächst wurde die Affinität der Substanz O-2050, die in der Literatur als neutraler Antagonist beschrieben wurde, am CB₁-Rezeptor mit Radioligandbindungsstudien bestimmt. Sein neutraler Antagonismus konnte schließlich durch die Abwesenheit einer intrinsischen Aktivität in [³⁵S]-GTPγS Bindungsstudien bestätigt werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit sollte sich auf die Untersuchung der Wechselwirkung des CB₁-Rezeptors mit anderen präsynaptischen Rezeptoren beziehen. Durch vorherige Aktivierung des CB₁-Rezeptors wird der inhibitorische Effekt des präsynaptischen M₂-Autorezeptors auf die Neurotransmitterfreisetzung abgeschwächt. Umgekehrt ist die Funktion des präsynaptischen M₂-Autorezeptors verstärkt, wenn zuvor der CB₁-Rezeptor pharmakologisch blockiert oder genetisch ausgeschaltet wird. Mithilfe der Western Blot Technik wurde untersucht, ob bei der CB₁-Knockout-Maus eine veränderte Proteinexpression im Hippokampus besteht. Die Expression des M₂-Rezeptors in der CB₁-Knockout-Maus unterschied sich jedoch nicht von derjenigen in der Wildtyp Maus. Als nachgeschalteter Signaltransduktionsweg wurde die Expression von Gα_i- und Gα_o-Proteinen analysiert. Es ergab sich eine leicht verstärkte Expression von beiden G-Proteinen, die jedoch nur im Falle von Gα_o statistisch signifikant war. Der leichte Unterschied könnte möglicherweise die verstärkte M₂-Autorezeptor-Funktion bei der CB₁-Knockout-Maus erklären. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Funktion des M₂-Rezeptors auch in

FAAH-Knockout-Mäusen beeinträchtigt ist, bei denen es zu einer verstärkten Aktivierung des CB₁-Rezeptors durch eine erhöhte Konzentration des endogenen Cannabinoids Anandamid kommt. Allerdings war in FAAH-Knockout-Mäusen das Ausmaß der M₂-Rezeptor-vermittelten Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung nicht verändert.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der Wirkung von Neuropeptiden und von Interleukin-1 β auf die Neurotransmitterfreisetzung. Modulierende Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung sind für viele niedermolekulare Substanzen und für Peptide wie Opioide und Neuropeptid Y gezeigt worden, jedoch existieren kaum Befunde für weitere Peptide. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Neuropeptid W auf die Noradrenalinfreisetzung im Hippokampus und im Hypothalamus der Maus in Superfusionsstudien untersucht. Neuropeptid W modulierte die Neurotransmitterfreisetzung jedoch nicht. Als weiteres Neuropeptid wurde Neuropeptid FF auf eine mögliche freisetzungsmulierende Eigenschaft auf die Noradrenalinfreisetzung in der Großhirnrinde und im Vorhof der Maus getestet. Auch diese Substanz zeigte keinen Einfluss. Weiterhin wurde eine Wechselwirkung des Neuropeptid FF₂-Rezeptors mit dem Opioid-Rezeptor untersucht, da in der Literatur eine Modulation Opioid-Rezeptor-vermittelter Effekte durch Neuropeptid FF mehrfach beschrieben wurde. In unserem Testsystem beeinflusste Neuropeptid FF die Wirkung des δ -Opioidrezeptor Agonisten DPDPE jedoch nicht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Zytokins Interleukin-1 β auf die Neurotransmitterfreisetzung untersucht. Interleukin-1 β hemmte die Noradrenalinfreisetzung, wobei der inhibitorische Effekt interessanterweise erst mit Zeitverzögerung auftrat. Als Ursache wird ein Effekt auf die Proteinbiosynthese angenommen. In allen drei Versuchsserien wurde Sulproston als Referenzpharmakon mitgeführt und führte erwartetermaßen zur Hemmung der Noradrenalinfreisetzung. In den Versuchen zur Identifizierung der Wirkung von Interleukin-1 β zeigte Sulproston im Gegensatz zu letzterem eine augenblicklich einsetzende und sich rasch zurückbildende Hemmung.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit sollte die Analyse der zentralen Expression des Histamin-H₄-Rezeptors sein. Der bereits Anfang der 90er Jahre postulierte H₄-Rezeptor wurde 2000 als Homolog des H₃-Rezeptors kloniert. Im Gegensatz zum H₃-Rezeptor, dessen Funktion als Modulator der Neurotransmitterfreisetzung gut belegt ist, ist zur präsynaptischen

Zusammenfassung

Lokalisation des H₄-Rezeptors wenig bekannt. Da auch die Angaben zur zentralen Lokalisation in der Literatur widersprüchlich sind, wurde in dieser Arbeit die Expression des H₄-Rezeptors mittels RT-PCR in der Großhirnrinde des Menschen und in der Maus untersucht und konnte in der Tat bestätigt werden. Dieser Befund dient als Grundlage für die weitere Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Neurotransmitterfreisetzung durch den H₄-Rezeptor in Superfusionsstudien. Ein inhibitorischer Effekt ist nicht abwegig, da der H₄-Rezeptor, ebenso wie der H₃-Rezeptor, an G_{i/o}-Proteine koppelt.

Ein letzter Aspekt dieser Arbeit ergab sich im Rahmen eines anderen Projektes in unserer Arbeitsgruppe. Mittels Superfusionsstudien konnte gezeigt werden, dass die durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) hervorgerufene Hemmung der Noradrenalin- und Serotoninfreisetzung durch den präsynaptischen EP₃-Rezeptor vermittelt wird. Der kompetitive EP₃-Rezeptor-Antagonist L-826,266 schwächte diese inhibitorische Wirkung von PGE₂ ab. Um seinen Antagonismus näher zu charakterisieren, sollte für den G_{i/o}-Protein-gekoppelten EP₃-Rezeptor ein [³⁵S]-GTPγS Bindungsmodell entwickelt werden. Der EP_{1/3}-Rezeptor-Agonist Sulproston beeinflusste die [³⁵S]-GTPγS-Bindung in Hippokampus-Membranen von Maus und Meerschweinchen jedoch nicht, während der Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2, der als Positivkontrolle mitgeführt wurde, wie erwartet eine ausgeprägte Steigerung der Bindung bewirkte.

F. Literaturverzeichnis

- Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ und Kuner R (2007) Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* **10**(7):870-879.
- Aktories K, Förstermann U, Hofman F, Starke K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer Verlag (München), 10. Auflage
- Alexander SP, Mathie A und Peters JA (2008) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 2**:S1-209.
- Allard M, Labrousche S, Nosjean A und Laguzzi R (1995) Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPPF in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **274**(1):577-583.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* **58**(4):315-348.
- Arunlakshana O und Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* **14**(1):48-58.
- Bab I und Zimmer A (2008) Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol* **153**(2):182-188.
- Baker JR, Cardinal K, Bober C, Taylor MM und Samson WK (2003) Neuropeptide W acts in brain to control prolactin, corticosterone, and growth hormone release. *Endocrinology* **144**(7):2816-2821.
- Ballet S, Mauborgne A, Gouarderes C, Bourgoin AS, Zajac JM, Hamon M und Cesselin F (1999) The neuropeptide FF analogue, 1DME, enhances in vivo met-enkephalin release from the rat spinal cord. *Neuropharmacology* **38**(9):1317-1324.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR und McKean DJ (1996) Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* **59**(2):61-83.
- Baumann PA und Maitre L (1977) Blockade of presynaptic alpha-receptors and of amine uptake in the rat brain by the antidepressant mianserine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **300**(1):31-37.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J und Kunos G (2005) Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* **106**(2):133-145.

- Bertalovitz AC, Ahn KH und Kendall DA (2010) Ligand binding sensitivity of the extracellular loop two of the cannabinoid receptor 1. *Drug Dev Res* **71**(7):404-411.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L und Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* **351 Pt 3**:817-824.
- Boehm S und Kubista H (2002) Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev* **54**(1):43-99.
- Bognar IT, Albrecht SA, Farasaty M, Schmitt E, Seidel G und Fuder H (1994) Effects of human recombinant interleukins on stimulation-evoked noradrenaline overflow from the rat perfused spleen. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **349**(5):497-502.
- Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, Smith KE, Tamm JA, Boteju LW, Lakhani PP, Raddatz R, Yao WJ, Ogozalek KL, Boyle N, Kouranova EV, Quan Y, Vaysse PJ, Wetzel JM, Branchek TA, Gerald C und Borowsky B (2000) Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* **275**(50):39324-39331.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Breivogel CS, Selley DE und Childers SR (1998) Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [35S]GTPgammaS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *J Biol Chem* **273**(27):16865-16873.
- Brezillon S, Lannoy V, Franssen JD, Le Poul E, Dupriez V, Lucchetti J, Detheux M und Parmentier M (2003) Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* **278**(2):776-783.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* **152**(5):567-575.
- Brown DA und Sihra TS (2008) Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol* **184**:207-260.
- Bylund DB und Yamamura HI (1990) Methods for Receptor Binding. *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis* (Yamamura HI, Enna SJ & Kuhar MJ Hrsg) S.1-35, Raven Press, New York
- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J und Marciano-Cabral F (2008) CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* **153**(2):240-251.

- Canals M und Milligan G (2008) Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed Mu opioid receptors. *J Biol Chem* **283**(17):11424-11434.
- Caulfield MP und Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**(2):279-290.
- Chaturvedi S, Driscoll WJ, Elliot BM, Faraday MM, Grunberg NE und Mueller GP (2006) In vivo evidence that N-oleoylglycine acts independently of its conversion to oleamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **81**(3-4):136-149.
- Cheng Y und Prusoff WH (1973): Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**(23):3099-3108.
- Cluny NL, Vemuri VK, Chambers AP, Limebeer CL, Bedard H, Wood JT, Lutz B, Zimmer A, Parker LA, Makriyannis A und Sharkey KA (2010) A novel peripherally restricted cannabinoid receptor antagonist, AM6545, reduces food intake and body weight, but does not cause malaise, in rodents. *Br J Pharmacol* **161**(3):629-642.
- Coge F, Guenin SP, Rique H, Boutin JA und Galizzi JP (2001) Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **284**(2):301-309.
- Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G und Chazot PL (2009) The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol* **157**(1):55-63.
- Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG und Irving AJ (2001) Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* **21**(7):2425-2433.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**(6604):83-7.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR und Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci* **98**(16):9371-9376.
- Curtin F und Schulz P (1998) Multiple correlations and Bonferroni's correction. *Biol Psychiatry* **44**(8):775-777.
- Demuth DG und Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* **78**(6):549-563.

- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A und Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**(5090):1946-1949.
- Di Marzo V, Bifulco M und De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* **3**(9):771-784.
- Di Marzo V, De Petrocellis L und Bisogno T (2005) The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* **168**:147-185.
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**(6):2095-2147.
- Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**:519-550.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S und Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci* **99**(16):10819-10824.
- Djellas Y, Manganello JM, Antonakis K und Le Breton GC (1999) Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. *J Biol Chem* **274**(20):14325-14330.
- Dockray GJ (2004) The expanding family of -RFamide peptides und their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* **89**(3):229-235.
- Domenici MR, Azad SC, Marsicano G, Schierloh A, Wotjak CT, Dodt HU, Zieglgansberger W, Lutz B und Rammes G (2006) Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* **26**(21):5794-5799.
- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, Panula P und Leurs R (2001) Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol* **59**(1):1-8.
- Elsohly MA und Slade D (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* **78**(5):539-548.
- Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM und Jordan J (2005) Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* **54**(10):2838-2843.
- Exner HJ und Schlicker E (1995) Prostanoid receptors of the EP3 subtype mediate the inhibitory effect of prostaglandin E2 on noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **351**(1):46-52.

- Farrell EK und Merkler DJ (2008) Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. *Drug Discov Today* **13**(13-14):558-568.
- Fastbom J, Pazos A, Probst A und Palacios JM (1987) Adenosine A1 receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* **22**(3):827-839.
- Feuerstein TJ (2008) Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Handb Exp Pharmacol* **184**:289-338.
- Fiskerstrand T, H'Mida-Ben Brahim D, Johansson S, M'Zahem A, Haukanes BI, Drouot N, Zimmermann J, Cole AJ, Vedeler C, Bredrup C, Assoum M, Tazir M, Klockgether T, Hamri A, Steen VM, Boman H, Bindoff LA, Koenig M und Knappskog PM (2010) Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am J Hum Genet* **87**(3):410-417.
- Fong CW, Bahia DS, Rees S und Milligan G (1998) Selective activation of a chimeric Gi1/Gs G protein alpha subunit by the human IP prostanoid receptor: analysis using agonist stimulation of high affinity GTPase activity and [35S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding. *Mol Pharmacol* **54**(2):249-257.
- Fuder H und Muscholl E (1995) Heteroreceptor-mediated modulation of noradrenaline and acetylcholine release from peripheral nerves. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **126**:265-412.
- Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Yano T, Hinuma S, Kitada C, Asami T, Mori M, Fujisawa Y und Fujino M (2002) Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* **277**(37):34010-34016.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M. (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci.* **19**(10):2682-92.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G und Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* **232**(1):54-61.
- Gaoni Y und Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**(8):1646-1647.
- Gardner A und Mallet PE (2006) Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor 'silent antagonist'. *Eur J Pharmacol* **530**(1-2):103-106.

- Giaroni C, Somaini L, Marino F, Cosentino M, Senaldi A, De Ponti F, Lecchini S und Frigo G (1999) Modulation of enteric cholinergic neurons by hetero- and autoreceptors: cooperation among inhibitory inputs. *Life Sci* **65**(8):813-821.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM und Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci* **100**(7):4269-4274.
- Gouardères C, Quelven I, Mollereau C, Mazarguil H, Rice SQ und Zajac JM (2002) Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [(125I)EYF as selective radioligands. *Neuroscience* **115**(2):349-361.
- Gouardères C, Mazarguil H, Mollereau C, Chartrel N, Leprince J, Vaudry H und Zajac JM (2007) Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTPgammaS binding. *Neuropharmacology* **52**(2):376-386.
- Grainger J und Boachie-Ansah G (2001) Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* **134**(5):1003-1012.
- Gray EG und Whittaker VP (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* **96**:79-88.
- Günther J, Schulte K, Wenzel D, Malinowska B und Schlicker E (2010) Prostaglandins of the E series inhibit monoamine release via EP3 receptors: proof with the competitive EP3 receptor antagonist L-826,266. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**(1):21-31.
- Guo J und Ikeda SR (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* **65**(3):665-674.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I und Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci* **98**(7):3662-3665.
- Harrison C und Traynor JR (2003) The [35S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **74**(4):489-508.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T und Kano M (2007) Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* **13**(2):127-137.

- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR und Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* **11**(2):563-583.
- Howlett AC (1985) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* **27**(4):429-436.
- Howlett AC, Reggio PH, Childers SR, Hampson RE, Ulloa NM und Deutsch DG (2011) Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* **163**(7):1329-1343.
- Huang EY, Li JY, Tan PP, Wong CH und Chen JC (2000) The cardiovascular effects of PFRFamide and PFR(Tic)amide, a possible agonist and antagonist of neuropeptide FF (NPFF). *Peptides* **21**(2):205-210.
- Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Hyatt SM, Seltzman HH, Zhong M, Song ZH, Nie J, Lewis D und Reggio PH (2002) N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-p yrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol* **62**(6):1274-1287.
- Hurst S und Collins SM (1993) Interleukin-1 beta modulation of norepinephrine release from rat myenteric nerves. *Am J Physiol* **264**(1 Pt 1):G30-35.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME und Kunos G (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* **118**(8):2023-2028.
- Ishii M, Fei H und Friedman JM (2003) Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proc Natl Acad Sci* **100**(18):10540-10545.
- Jhamandas JH, Simonin F, Bourguignon JJ und Harris KH (2007) Neuropeptide FF and neuropeptide VF inhibit GABAergic neurotransmission in parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(5):R1872-1880.
- Juteau H, Gareau Y, Labelle M, Sturino CF, Sawyer N, Tremblay N, Lamontagne S, Carriere MC, Denis D und Metters KM (2001) Structure-activity relationship of cinnamic acylsulfonamide analogues on the human EP3 prostanoid receptor. *Bioorg Med Chem* **9**(8):1977-1984.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M und Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* **89**(1):309-380.

- Kathmann M, Weber B und Schlicker E (2001) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**(1):50-56.
- Kelly MA, Beuckmann CT, Williams SC, Sinton CM, Motoike T, Richardson JA, Hammer RE, Garry MG und Yanagisawa M (2005) Neuropeptide B-deficient mice demonstrate hyperalgesia in response to inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci* **102**(28):9942-9947.
- Kenakin T (2004) Efficacy as Vector: the Relative Prevalence and Paucity of Inverse Agonism. *Mol Pharmacol* **65**(1):2-11.
- Kersante F, Mollereau C, Zajac JM und Roumy M (2006) Anti-opioid activities of NPPF1 receptors in a SH-SY5Y model. *Peptides* **27**(5):980-989.
- Kiss R und Keserü GM (2009) Histamine H4 receptor ligands and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat* **19**(2):119-135.
- Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudanski J und Malinowska B (2008) Virodhamine relaxes the human pulmonary artery through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. *Br J Pharmacol* **155**(7):1034-1042.
- Kubista H und Boehm S (2006) Molecular mechanisms underlying the modulation of exocytotic noradrenaline release via presynaptic receptors. *Pharmacol Ther* **112**(1):213-242.
- Kuhar MJ und Murrin LC (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J Neurochem* **30**(1):15-21.
- Kurz CM, Gottschalk C, Schlicker E und Kathmann M (2008) Identification of a presynaptic cannabinoid CB1 receptor in the guinea-pig atrium and sequencing of the guinea-pig CB1 receptor. *J Physiol Pharmacol* **59**(1):3-15.
- Kurz CM (2008) Wirkungen von Cannabinoiden über Cannabinoid-CB1-Rezeptoren und andere Mechanismen. Dissertation, Universität Bonn.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.
- Langer SZ (2008) Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int* **52**(1-2):26-30.
- Lazareno S (1999) Measurement of agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding to cell membranes. *Methods Mol Biol* **106**:231-245.

- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W und Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**(5400):401-404.
- Lee DK, Nguyen T, Porter CA, Cheng R, George SR und O'Dowd BF (1999) Two related G protein-coupled receptors: the distribution of GPR7 in rat brain and the absence of GPR8 in rodents. *Brain Res Mol Brain Res* **71**(1):96-103.
- Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* **16**(3):89-97.
- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM und Kendall DA (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* **141**(2):253-262.
- Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortas G und Di Marzo V (2004) Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J* **380**(Pt 1):265-272.
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N and Lovenberg TW (2001) Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* **59**(3):420-426.
- Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prosperetti C, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Cravatt BF und Centonze D (2008) Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* **11**(2):152-159.
- Mackie K und Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci* **89**(9):3825-3829.
- Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, Long JZ, Li W, Xu C, Moller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF und Stella N (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* **13**(8):951-957.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V und Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**(6897):530-534.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C und Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**(5642):84-88.

- Martin BR, Compton DR, Little PJ, Martin TJ und Beardsley PM (1987) Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. *NIDA Res Monogr* **79**:108-122.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC und Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**(6284):561-564.
- Mazzocchi G, Rebuffat P, Ziolkowska A, Rossi GP, Malendowicz LK, Nussdorfer GG (2005) G protein receptors 7 and 8 are expressed in human adrenocortical cells, and their endogenous ligands neuropeptides B and w enhance cortisol secretion by activating adenylate cyclase- and phospholipase C-dependent signaling cascades. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(6):3466-71.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR und et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **50**(1):83-90.
- MohanKumar SM und MohanKumar PS (2002) Effects of interleukin-1 beta on the steroid-induced luteinizing hormone surge: role of norepinephrine in the medial preoptic area. *Brain Res Bull* **58**(4):405-409.
- Mollereau C, Mazarguil H, Zajac JM und Roumy M (2005a) Neuropeptide FF (NPFF) analogs functionally antagonize opioid activities in NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* **67**(3):965-975.
- Mollereau C, Roumy M und Zajac JM (2005b) Opioid-modulating peptides: mechanisms of action. *Curr Top Med Chem* **5**(3):341-355.
- Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, During M, Klugmann M, Wolfel B, Dodt HU, Zieglgansberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G und Lutz B (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* **51**(4):455-466.
- Moore RJ, Xiao R, Sim-Selley LJ und Childers SR (2000) Agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in brain modulation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology* **39**(2):282-289.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC und Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* **408**(6814):860-864.

- Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE, Jr., Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M und Monsma FJ, Jr. (2001) Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **296**(3):1058-1066.
- Moulédous L, Barthas F und Zajac JM (2010) Opposite control of body temperature by NPPF1 and NPPF2 receptors in mice. *Neuropeptides* **44**(5):453-456.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-273.
- Munro S, Thomas KL und Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**(6441):61-65.
- Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M und Tanaka K (2000) Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2):615-620.
- Negishi M, Namba T, Sugimoto Y, Irie A, Katada T, Narumiya S und Ichikawa A (1993) Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP3C with Gs and G(o). Stimulation of Gs and inhibition of G(o). *J Biol Chem* **268**(35):26067-26070.
- Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL und O'Dowd BF (2001) Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* **59**(3):427-433.
- O'Dowd BF, Scheideler MA, Nguyen T, Cheng R, Rasmussen JS, Marchese A, Zastawny R, Heng HH, Tsui LC, Shi X und et al. (1995) The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain. *Genomics* **28**(1):84-91.
- Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y und Matsumoto S (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **275**(47):36781-36786.
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **83**(2):101-130.
- Oldham WM und Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1):60-71.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B und Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* **27**(1):73-100.

- Parnet P, Kelley KW, Bluthé RM und Dantzer R (2002) Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *J Neuroimmunol* **125**(1-2):5-14.
- Patel PN und Pathak R (2007) Rimonabant: a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. *Am J Health Syst Pharm* **64**(5):481-489.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**(2):129-180.
- Pertwee RG (2005a) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* **76**(12):1307-1324.
- Pertwee (2005b) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* **168**:1-51.
- Pertwee RG (2008) Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* **13**(2):147-159.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* **4**(11):873-884.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB und Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3):1020-1024.
- Quan N und Banks WA (2007) Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun* **21**(6):727-735.
- Raiteri M (2001) Presynaptic autoreceptors. *J Neurochem* **78**(4):673-675.
- Raiteri L, Raiteri M. (2000) Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochem Res* **25**(9-10):1265-74.
- Reimann W, Steinhauer HB, Hedler L, Starke K und Hertting G (1981) Effect of prostaglandins D2, E2 and F2alpha on catecholamine release from slices of rat and rabbit brain. *Eur J Pharmacol* **69**(4):421-427.
- Richardson IW und Szerb JC (1974) The release of labelled acetylcholine and choline from cerebral cortical slices stimulated electrically. *Br J Pharmacol* **52**(4):499-507.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC und Le Fur G (1995) Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* **56**(23-24):1941-1947.

- Rosmaninho-Salgado J, Alvaro AR, Grouzmann E, Duarte EP und Cavadas C (2007) Neuropeptide Y regulates catecholamine release evoked by interleukin-1beta in mouse chromaffin cells. *Peptides* **28**(2):310-314.
- Roumy M, Garnier M und Zajac JM (2003) Neuropeptide FF receptors 1 and 2 exert an anti-opioid activity in acutely dissociated rat dorsal raphe and periventricular hypothalamic neurones. *Neurosci Lett* **348**(3):159-162.
- Roussin A, Serre F, Gouarderes C, Mazarguil H, Roumy M, Mollereau C und Zajac JM (2005) Anti-analgesia of a selective NPFF2 agonist depends on opioid activity. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(1):197-203.
- Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R und Pani L (2003) Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1):363-370.
- Russell JA, Douglas AJ und Brunton PJ (2008) Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **1148**:428-438.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T und Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* **152**(7):1092-1101.
- Saito TH, Nakane R, Akazome Y, Abe H und Oka Y (2010) Electrophysiological analysis of the inhibitory effects of FMRFamide-like peptides on the pacemaker activity of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurophysiol* **104**(6):3518-3529.
- Sander K und Stark H (2011) Neue Generationen von Antihistaminika. *Pharmazeutische Zeitung* (32):20-29.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* **122**(5):509-522.
- Schlicker E und Göthert M (1998) Interactions between the presynaptic alpha2-autoreceptor and presynaptic inhibitory heteroreceptors on noradrenergic neurones. *Brain Res Bull* **47**(2):129-132.
- Schlicker E und Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**(11):565-572.
- Schlicker E und Kathmann M (2008) Presynaptic neuropeptide receptors. *Handb Exp Pharmacol* **184**:409-434.

- Schlicker E, Fink K und Göthert M (1987) Influence of eicosanoids on serotonin release in the rat brain: inhibition by prostaglandins E1 and E2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **335**(6):646-651.
- Schlicker E, Behling A, Lummen G und Göthert M (1992) Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**(4):489-493.
- Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M und Göthert M (1994) Modulation of neurotransmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam Clin Pharmacol* **8**(2):128-137.
- Schlicker E, Timm J und Göthert M (1996) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**(6):791-795.
- Schlicker E, Timm J, Zentner J und Göthert M (1997) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**(5):583-589.
- Schulte K und Schlicker E (2010) Influence of increased activation, of blockade and of lack of cannabinoid CB1 receptors on muscarinic autoreceptor function in rodent hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**(Suppl.1): 16.
- Schulte K, Jergas B und Schlicker E (2011a) Evidence that the facilitatory effect of the inverse CB₁ receptor agonist rimonabant on noradrenaline release in the guinea pig hippocampus is related to the interruption of a tonical inhibition of noradrenaline release caused by endocannabinoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **383**(Suppl.1): 21.
- Schulte K, Kumar M, Zajac JM und Schlicker E (2011b) Noradrenaline release in rodent tissues is inhibited by interleukin-1beta but is not affected by urotensin II, MCH, NPW and NPFF. *Pharmacol Rep* **63**(1):102-111.
- Schultheiss T, Flau K, Kathmann M, Göthert M und Schlicker E (2005) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in guinea-pig vessels, but not in rat and mouse aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**(2):139-146.
- Seifert R und Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**(5):381-416.
- Shakirzyanova AV, Bukharaeva EA, Nikolsky EE und Giniatullin RA (2006) Negative cross-talk between presynaptic adenosine and acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* **24**(1):105-115.

- Shimomura Y, Harada M, Goto M, Sugo T, Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Asami T, Kitada C, Mori M, Onda H und Fujino M (2002) Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* **277**(39):35826-35832.
- Sim-Selley LJ, Brunk LK und Selley DE (2001) Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain. *Eur J Pharmacol* **414**(2-3):135-143.
- Singh G und Davenport AP (2006) Neuropeptide B and W: neurotransmitters in an emerging G-protein-coupled receptor system. *Br J Pharmacol* **148**(8):1033-1041.
- Singh G, Maguire JJ, Kuc RE, Fidock M und Davenport AP (2004) Identification and cellular localisation of NPW1 (GPR7) receptors for the novel neuropeptide W-23 by [125I]-NPW radioligand binding and immunocytochemistry. *Brain Res* **1017**(1-2):222-226.
- Sink KS, McLaughlin PJ, Wood JA, Brown C, Fan P, Vemuri VK, Peng Y, Olszewska T, Thakur GA, Makriyannis A, Parker LA und Salamone JD (2008) The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology* **33**(4):946-955.
- Söderlund J, Schroder J, Nordin C, Samuelsson M, Walther-Jallow L, Karlsson H, Erhardt S und Engberg G (2009) Activation of brain interleukin-1beta in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **14**(12):1069-1071.
- Song C, Horrobin DF und Leonard BE (2006) The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. *Pharmacopsychiatry* **39**(3):88-99.
- Starke K (1977) Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **77**:1-124.
- Steffens M, Zentner J, Honegger J und Feuerstein TJ (2005) Binding affinity and agonist activity of putative endogenous cannabinoids at the human neocortical CB1 receptor. *Biochem Pharmacol* **69**(1):169-178.
- Steiner H, Bonner TI, Zimmer AM, Kitai ST und Zimmer A (1999) Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* **96**(10):5786-5790.
- Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, Hsieh GC, Esbenshade TA, Brioni JD und Bitner RS (2009) Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res* **1250**:41-48.

- Strange PG (2010) Use of the GTPgammaS ([³⁵S]GTPgammaS and Eu-GTPgammaS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **161**(6):1238-1249.
- Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**:509-547.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Nakane S, Kondo H, Waku K, Ishima Y, Watanabe K und Yamamoto I (1997) Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells. *J Biochem* **122**(4):890-895.
- Szabo B und Schlicker E (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* **168**:327-365.
- Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O'Dowd BF, Sakurai T und Yanagisawa M (2003) Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci* **100**(10):6251-6256.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K und Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* **65**(3):320-327.
- Thurmond RL, Gelfand EW und Dunford PJ (2008) The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* **7**(1):41-53.
- Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L und Starke K (2000) Modulation of (3)H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues. *Br J Pharmacol* **130**(2):321-330.
- Trendelenburg AU, Meyer A, Wess J und Starke K (2005) Distinct mixtures of muscarinic receptor subtypes mediate inhibition of noradrenaline release in different mouse peripheral tissues, as studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* **145**(8):1153-1159.
- Tsumori C, Shibasaki T, Hotta M, Takeuchi K, Yamauchi N, Imaki T, Wakabayashi I und Demura H (1998) Interleukin-1beta administered intracerebroventricularly stimulates the release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus via prostaglandin in the rat. *Endocr J* **45**(1):127-130.
- Twitchell W, Brown S und Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **78**(1):43-50.

- Valverde O, Karsak M und Zimmer A (2005) Analysis of the endocannabinoid system by using CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Handb Exp Pharmacol* **168**:117-145.
- Van Diepen H, Schlicker E, Michel MC (2008) Prejunctional effects of the cannabinoid receptor inverse agonist rimonabant (SR141716A). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **378**(4):345-569.
- Van Dross RT (2009) Metabolism of anandamide by COX-2 is necessary for endocannabinoid-induced cell death in tumorigenic keratinocytes. *Mol Carcinog* **48**(8):724-732.
- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* **10**(1):69-99.
- Wettschureck N und Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**(4):1159-1204.
- Wiley JL, Breivogel CS, Mahadevan A, Pertwee RG, Cascio MG, Bolognini D, Huffman JW, Walentiny DM, Vann RE, Razdan RK und Martin BR (2011) Structural and pharmacological analysis of O-2050, a putative neutral cannabinoid CB(1) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **651**(1-3):96-105.
- Willoughby KA, Moore SF, Martin BR und Ellis EF (1997) The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **282**(1):243-247.
- Yang HY, Fratta W, Majane EA und Costa E (1985) Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci* **82**(22):7757-7761.
- Zhang L und Rasenick MM (2010) Chronic treatment with escitalopram but not R-citalopram translocates Galpha(s) from lipid raft domains and potentiates adenylyl cyclase: a 5-hydroxytryptamine transporter-independent action of this antidepressant compound. *J Pharmacol Exp Ther* **332**(3):977-984.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI und Wess J (2002a) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* **22**(5):1709-1717.
- Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS und Wess J (2002b) Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci* **22**(15):6347-6352.
- Zhou H, Meyer A, Starke K, Gomeza J, Wess J und Trendelenburg AU (2002) Heterogeneity of release-inhibiting muscarinic autoreceptors in heart atria and urinary bladder: a study with M(2)- and M(4)-receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(2):112-122.

Literaturverzeichnis

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M und Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* **96**(10):5780-5785.

G. Eigene Veröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

1 Originalarbeiten

Schulte K, Steingrüber N, Jergas B, Redmer A, Kurz CM, Buchalla R, Lutz B, Zimmer A und Schlicker E (2011) Cannabinoid CB₁ receptor activation, blockade or ablation affects the function of the muscarinic auto- and heteroreceptor. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Schulte K, Kumar M, Zajac JM und Schlicker E (2011) Noradrenaline release in rodent tissues is inhibited by interleukin-1beta but is not affected by urotensin II, MCH, NPW and NPPF. *Pharmacol Rep* **63**(1):102-111.

Günther J, Schulte K, Wenzel D, Malinowska B und Schlicker E (2010) Prostaglandins of the E series inhibit monoamine release via EP3 receptors: proof with the competitive EP3 receptor antagonist L-826,266. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**(1):21-31.

2 Kongressbeiträge (Vorträge und Posterpräsentationen)

Schulte K und Schlicker E (2011) Simultaneous activation of the presynaptic cannabinoid CB₁ receptor attenuates the function of the presynaptic muscarine M₂ receptor and the δ opioid receptor.
EURON and THEME joint PhD meeting, Bad Honnef 2011

Schulte K, Jergas B und Schlicker E (2011) Evidence that the facilitatory effect of the inverse CB₁ receptor agonist rimonabant on noradrenaline release in the guinea pig hippocampus is related to the interruption of a tonical inhibition of noradrenaline release caused by endocannabinoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **383** (Suppl. 1):21.
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 77. Jahrestagung, Frankfurt am Main 2011.

Schlicker E und Schulte K (2010) The muscarine receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the rat hippocampus is increased by CB₁ receptor blockade and deficiency.
Cannabinoid Workshop: The Endocannabinoid System: from Physiology to Pathophysiology, Bonn 2010.

Eigene Veröffentlichungen

Schulte K und Schlicker E (2010) Influence of increased activation, of blockade and of lack of cannabinoid CB₁ receptors on muscarinic autoreceptor function in rodent hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381 (Suppl. 1)**:16.
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 51. Jahrestagung, Mainz 2010.

Schlicker E, Kumar M, Schulte K und Zajac JM (2010) Noradrenaline release is inhibited by interleukin-1 β but not affected by NPFF, NPW, MCH and urotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381 (Suppl. 1)**:15.
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 51. Jahrestagung, Mainz 2010.

Günther J, Schulte K, Kurz CM und Schlicker E (2009) The EP₃ receptor is involved in the inhibitory effect of prostaglandins of the E series on monoamine release in rat tissues: proof with L-826,266. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379 (Suppl. 1)**:16.
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 50. Jahrestagung, Mainz 2009.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Kirsten Schulte, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorgelegte Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Oktober 2011

Kirsten Schulte

Danksagung

Lebenslauf