

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. J. Scholz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# EFFEKTE DES OPIOIDS PETHIDIN AM $\alpha$ 2-ADRENOZEPTOR

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
MIRIAM CAROLIN BOLAY  
aus  
Münster

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mentlein

Tag der mündlichen

Prüfung: 29. September 2009

Zum Druck

genehmigt, Kiel,

den 29. September 2009

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi  
(Ausschussvorsitzender)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Adrenozeptoren	1
1.2 $\alpha$ 2-Adrenozeptoren	3
1.2.1 Struktur	3
1.2.2 Subtypen	4
1.2.3 Lokalisation und Physiologie	5
1.3 Rezeptorinteraktionen mit G-Proteinen	6
1.4 Aktivierung der MAP-Kinase durch $\alpha$ 2-Adrenozeptoren	8
1.5 $\alpha$ 2-Adrenozeptoren in der Pharmakotherapie	10
1.6 Opioide	12
1.6.1 Wirkung und Nutzung von Opioiden	13
1.6.2 Opioid-Rezeptoren	14
1.6.3 Arten von Opioiden	15
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien	17
2.1.1 Zelllinien und Zellkultur	17
2.1.2 Enzyme und Antikörper	18
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Puffer und Lösungen	19
2.1.5 Gelelektrophorese	21
2.1.6 Geräte	22
2.1.7 Sonstige Materialien	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 DNS-Plasmide	25
2.2.2 Zelltransfektion: Kalzium-Phosphat-Präzipitation	25
2.2.3 Zellvorbereitungen für die weiteren Versuche	26
2.2.3.1 Serumwechsel	26
2.2.3.2 Aktivierung und Lyse der Zellen	26
2.2.3.3 Proteinkonzentrationsmessung	27

2.2.4 SDS-PA-Gelelektrophorese und Wet-Blot	27
2.2.4.1 SDS-PAGE	27
2.2.4.2 Wet-Blot und Blocking der Membran	28
2.2.5 Phospho-MAP-Kinase-Antikörper	29
2.2.6 Fotoentwicklung	30
2.2.7 MAP-Kinase-Antikörper	30
2.2.8 Auswertung	30
2.2.9 Statistische Methoden	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1 Aktivierung der $\alpha 2$ -Adrenozeptoren mit dem Opioid Pethidin	32
3.2 Aktivierung des $\alpha 2B$ -Adrenozeptors durch UK14.304 und Pethidin	36
3.3 Aktivierung des $\alpha 2C$ -Adrenozeptors durch UK14.304 und Pethidin	38
<b>4. Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der gängigen Literatur	41
4.2.1 $\alpha 2$ -Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14.304	41
4.2.2 Agonistische Wirkung eines Opioids am $\alpha 2$ -Rezeptor	42
4.2.3 $\alpha 2$ -Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase bei gemeinsamer Applikation von UK14.304 und Dolantin	45
4.3 Limitationen dieser Arbeit	46
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>59</b>

# 1. Einleitung

Alpha2-Adrenozeptoren gewinnen im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass sich durch den Einsatz von  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten im Rahmen einer Narkose viele Vorteile während der perioperativen Phase ergeben. In der Folge einer zentralen Sympathikolyse kommt es zu verbesserter hämodynamischer Stabilität sowohl während der endotrachealen Intubation als auch während des chirurgischen Eingriffs und zu einem geringeren Bedarf an Anästhetika und Opioiden.

Darüber hinaus senken  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten wie Clonidin effektiv die Häufigkeit von postoperativem Kältezittern (Shivering) (Piper *et al.*, 2000).

Die genaue Wirkweise einer Narkose ist nach wie vor nicht vollständig bekannt. In der klinischen Anästhesie werden die einzelnen Komponenten der Narkose wie Hypnose, Analgesie und Muskelrelaxation durch die kombinierte Gabe unterschiedlicher Medikamentenklassen bewirkt. Mit der Entwicklung und dem Einsatz hochspezifischer  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten lässt sich die Gesamtmenge der während einer Narkose benötigten Medikamente reduzieren.

Neben den spezifischen  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten interagieren auch andere Substanzen mit dem  $\alpha 2$ -Adrenozeptor und bewirken möglicherweise einen Teil ihrer Effekte über diese Interaktion. Daher ist die Untersuchung potentieller Wechselwirkungen von Pharmaka am  $\alpha 2$ -Adrenozeptor von großem wissenschaftlichem Interesse.

## 1.1 Adrenorezeptoren

Adrenerge Rezeptoren sind membrangebundene Rezeptoren der endogenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die ein breites Spektrum verschiedener Antworten im sympathischen Nervensystem regulieren. Allen adrenergen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie in ihrer 3D-Struktur dem Modell des Rhodopsins mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen ähneln und an Guanin-Nukleotid-bindene Proteine (G-Proteine) gebunden sind (Suryanarayana *et al.* 1992, Kobilka 1992, Beck-Sickinger 1996, Baldwin 1997).

Adrenerge Rezeptoren wurden im Jahre 1948 durch Ahlquist erstmalig in die Subgruppen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren unterteilt (Ahlquist, 1948). Diese Einteilung beruhte auf der unterschiedlichen Affinität verschiedener Liganden sowie auf der unterschiedlichen Wirkung auf

glatte Muskulatur. So vermitteln  $\alpha$ -Adrenozeptoren eine Konstriktion,  $\beta$ -Adrenozeptoren eine Relaxation derselben.

Eine weitere Unterteilung in die Subklassen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren erfolgte durch Starke und Langer aufgrund ihrer unterschiedlichen anatomischen Lokalisation im Jahre 1974 (Starke *et al.*, 1974, Langer, 1974): Präsynaptische  $\alpha$ -Adrenozeptoren, welche die Freisetzung von Neurotransmittern regulieren, wurden dabei als  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren, postsynaptische  $\alpha$ -Adrenozeptoren als  $\alpha 1$ -Adrenozeptoren bezeichnet.

Mittlerweile ist bekannt, dass  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch vorhanden sind, so dass diese rein anatomische Klassifikation nicht mehr zutrifft (Starke, 1987, Docherty, 1998).

Die derzeitige pharmakologische Einteilung der  $\alpha$ -Adrenozeptoren basiert auf der Bindung selektiver Agonisten und Antagonisten:  $\alpha 1$ -Adrenozeptoren werden durch Phenylephrin aktiviert und durch niedrige Konzentrationen an Prazosin blockiert,  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren werden durch Clonidin aktiviert und durch niedrige Konzentrationen an Yohimbin inhibiert (Ruffolo *et al.*, 1991; Piascik *et al.*, 1996).

$\alpha 1$ -Adrenozeptoren finden sich sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem. Sie werden in die Subklassen  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ - und  $\alpha 1C$ -Adrenozeptor unterteilt. Ihre Aktivierung wirkt exzitatorisch: Über das G-Protein wird die Phospholipase C $\beta$  aktiviert, dies führt über die Second Messenger Inositoltriphosphat und Diacylglycerin zu einer Stimulation der intrazellulären Kalzium-Freisetzung (Löffler und Petrides, 2003).

Im zentralen Nervensystem sind die  $\alpha 1$ -Adrenozeptoren postsynaptisch lokalisiert. Im peripheren Nervensystem finden sie sich an den Effektororganen und vermitteln die Kontraktion von glatter Muskulatur. Dies führt zu einer Vasokonstriktion und zu einem erhöhten Sphinctertonus im Gastrointestinaltrakt und an der Harnblase.

$\alpha 1$ -Adrenozeptoren der vaskulären glatten Muskulatur werden ebenfalls postsynaptisch gefunden und durch Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt aktiviert. Des Weiteren vermitteln sie am Herzen einen positiv inotropen Effekt, das heißt sie steigern die Kontraktionskraft des Herzmuskels. In der Leber regulieren sie die Glykogenolyse und die Freisetzung von Kalium.

$\alpha 2$ -Adrenozeptoren wirken vornehmlich über ein inhibitorisches G-Protein. Auf ihre genaue Wirkweise wird noch eingegangen.

Alle drei Subtypen der  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta 1$ - bis  $\beta 3$ -Adrenozeptoren) führen über die Bindung an ein stimulierendes G-Protein und Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem

erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalt. Dieser aktiviert bestimmte Proteinkinasen, die ihrerseits über eine Aktivierungskaskade zum biologischen Effekt führen.

## 1.2 $\alpha$ 2-Adrenozeptoren

### 1.2.1 Struktur

Wie bereits beschrieben, gehören die  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie bestehen aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen. Die NH<sub>2</sub>-Gruppe liegt extrazellulär, die COOH-Gruppe befindet sich intrazellulär. Insgesamt entstehen dadurch drei intra- und extrazelluläre Schleifen. Diese bilden in ihrer räumlichen Struktur extrazelluläre Taschen, an welche die Liganden binden können.

Folgende Unterschiede finden sich bei den drei Subtypen der  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren:

Die extrazellulär liegende NH<sub>2</sub>-Gruppe ist bei den  $\alpha$ 2A- und  $\alpha$ 2C-Adrenozeptoren glykosyliert, während der  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor nicht glykosyliert ist (Lomasney *et al.*, 1990). Die Glykosylierung beeinflusst die Verteilung der Rezeptoren in der Zellmembran und spielt eine Rolle bei der Regulation der Expression der Rezeptoren. Sie hat jedoch keine Bedeutung für die Bindung von Liganden oder für andere funktionelle Eigenschaften der Rezeptoren.

Die Transmembrandomänen der verschiedenen Subtypen sind weitgehend identisch. Ein größerer Unterschied findet sich bei den intra- und extrazellulären Schleifen. Polymorphismen der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Adrenozeptoren sind beschrieben (Small *et al.*, 2003).

Die zweite und ein Teil der dritten intrazellulären Schleife sowie Teile des carboxyterminalen Segments interagieren mit dem G-Protein und sind somit in die Signaltransduktion und in die funktionellen Antworten involviert (Beck-Sickingler, 1996; Eason *et al.*, 1996).

Die dritte intrazelluläre Schleife ist die größte der  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren und wurde als Bindungspartner für zahlreiche Proteine beschrieben. Ein Polymorphismus führt zu einem unterschiedlichen Verhalten bezüglich der Bindung an G-Proteine, der Desensibilisierung der Rezeptoren und der G-Protein-vermittelten Phosphorylierung (Small and Liggett, 2001).

Diese Polymorphismen bedingen die variablen Effekte der therapeutisch genutzten Agonisten und somit auch ein unterschiedliches Nebenwirkungsspektrum. Beispielsweise führt die Deletion von vier Aminosäuren beim  $\alpha$ 2C-Adrenozeptor zu einer herabgesetzten Affinität der Agonist-Bindung (Small *et al.*, 2000) und die Deletion dreier Glutamat-Aminosäuren in der dritten intrazellulären Schleife des  $\alpha$ 2B-Adrenozeptors zu einer starken Abnahme der G-

Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK)-vermittelten Phosphorylierung des Rezeptors, so dass es in Folge nicht mehr zu einer Agonist-vermittelten Desensibilisierung kommt (Small *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Subtypen

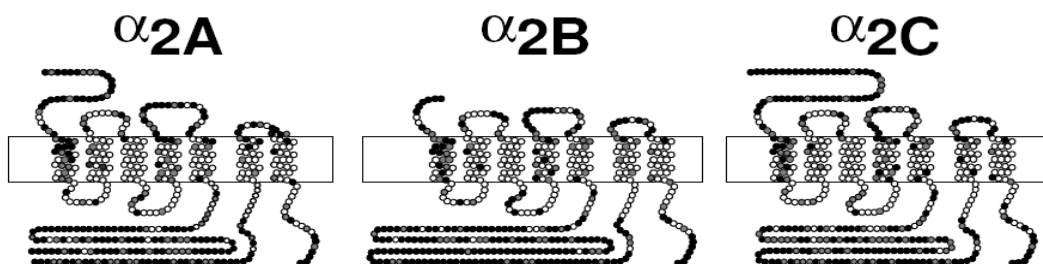
Beim Menschen sind drei Subtypen des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors bekannt. Sie wurden kloniert und entsprechend ihrer Genlokalisierung auf den Chromosomen 10, 2 und 4 als  $\alpha_2$ -C10,  $\alpha_2$ -C2 und  $\alpha_2$ -C4 bezeichnet (Lomasney *et al.*, 1990; Kobilka *et al.*, 1987; Lanier *et al.*, 1991).

Diese repräsentieren die pharmakologisch definierten Subtypen  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$  und  $\alpha_2C$  (Lomasney *et al.*, 1990). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass bei Ratten und Rindern ein vierter Subtyp des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors beschrieben wurde, der sich im Vergleich zum menschlichen  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor in der Affinität bestimmter Liganden unterscheidet (Lanier *et al.*, 1991; Michel *et al.*, 1989, Simonneaus *et al.*, 1991; MacKinnon *et al.*, 1994).

Wesentliche Differenz zwischen dem  $\alpha_2A$ - und dem  $\alpha_2D$ -Adrenozeptor-Subtyp ist die geringere Affinität des  $\alpha_2D$ -Adrenozeptors zu Yohimbin, dem klassischen  $\alpha_2$ -Antagonisten, im Vergleich zum humanen  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor. Diese kommt zustande durch den Austausch der Aminosäure Cystein mit Serin in der fünften Transmembrandomäne des Rezeptors (Link *et al.*, 1992; Blaxall *et al.*, 1993).

Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft die drei  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bei der Maus. Diese sind in hohem Maße homolog mit den menschlichen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren.

*Abbildung 1:  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren der Maus. Weiße Kreise bezeichnen Aminosäuren, die bei allen drei Subtypen identisch sind, graue Kreise bezeichnen Aminosäuren, die bei zwei Subtypen identisch sind, schwarze Kreise bezeichnen nicht konservierte Aminosäuren.*





### 1.2.3 Lokalisation und Physiologie

$\alpha$ 2-Adrenozeptoren finden sich im ZNS und in zahlreichen peripheren Organen, wo sie eine Vielzahl von Funktionen erfüllen.

Präsynaptisch lokalisierte  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren wirken als Autorezeptoren, das heißt, sie regulieren über negatives Feedback die Transmitterfreisetzung. Die Aktivierung dieser  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren führt zu einer verminderten Ausschüttung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt und somit zu einer Autohemmung. Dies kann durch drei verschiedene Mechanismen geschehen: Erstens durch die Inhibition von Kalziumkanälen mit nachfolgender Verhinderung der Entstehung eines Aktionspotentials, zweitens durch die Aktivierung von Kaliumkanälen mit nachfolgender Hyperpolarisation und drittens durch die direkte Beeinflussung des Proteinkomplexes, der Vesikel und Zellmembran bei der Verschmelzung miteinander verbindet (Miller, 1998).

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass nur  $\alpha$ 2A- und  $\alpha$ 2C-Adrenozeptoren als präsynaptische Autorezeptoren fungieren. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass dies auf alle drei Subtypen zutrifft (Trendelenburg *et al.*, 2003).

$\alpha$ 2-Adrenozeptoren in der Medulla oblongata des Gehirns beeinflussen Sympathikotonus, Blutdruck und Herzfrequenz. Bei Stimulation kommt es zu einer Reduktion aller drei Variablen. Therapeutisch wird dies bei der Verabreichung von Clonidin genutzt.

$\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten vermitteln ebenfalls über zentrale  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren Sedierung und Analgesie, was in der Anästhesie die Einsparung anderer Anästhetika und Analgetika ermöglicht.

Zu den peripheren Funktionen gehören die Motilitätsabnahme im Gastrointestinaltrakt, die Hemmung der Sekretion der Verdauungsdrüsen, die Hemmung der Insulinfreisetzung im Pankreas, die Lipolyse im Fettgewebe und die Förderung der Thrombozytenaggregation.

Im Einzelnen vermitteln die drei Subtypen des  $\alpha$ 2-Adrenozeptors folgende Funktionen:

Der  $\alpha$ 2A-Adrenozeptor ist im Wesentlichen verantwortlich für die in der Anästhesie gewünschten Effekte. Neben Anästhesie (Lahklani *et al.*, 1997), Analgesie (Lahklani *et al.*, 1997; Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997) und Sedation (Lahklani *et al.*, 1997; Hunter *et al.*, 1997; Sallinen *et al.*, 1997) vermittelt er zentrale Hypotension (MacMillan *et al.*, 1996), wirkt antiepileptogen (Janumpalli *et al.*, 1998) und inhibiert die Monoamin-Freisetzung und den Monoamin-Metabolismus im Gehirn (MacDonald *et al.*, 1997). Nachdem zunächst beschrieben wurde, dass  $\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten generell neuroprotektiv wirken (Werner

*et al.*, 1990; Hoffman *et al.*, 1991), ist mittlerweile gezeigt worden, dass dieser Effekt ebenfalls über den  $\alpha$ 2A-Adrenozeptor vermittelt wird (Ma *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2006).

Der  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor findet sich im ZNS nur im Thalamus, peripher ist er jedoch ubiquitär vorhanden (Nicholas *et al.*, 1993; Scheinin *et al.*, 1994; Winzer-Serhan *et al.*, 1997). Er induziert durch Vasokonstriktion die initiale Hypertension nach Applikation von  $\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten (Link *et al.*, 1996). Ebenso ist er verantwortlich für die Kochsalz-induzierte Hypertension (Makaritsis *et al.*, 1999) und spielt eventuell auch eine Rolle in der Reproduktion (Makaritsis *et al.*, 1999). Wie Takada *et al.* zeigten, ist der  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor ebenfalls wichtig für die Nozizeption (Takada *et al.*, 2002).

Der  $\alpha$ 2C-Adrenozeptor ist in die Temperaturregulation, den Dopamin-Metabolismus und die d-Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion involviert (Rohrer and Kobilka, 1998). Auch für diesen Rezeptor ist die antinozizeptive Funktion nachgewiesen (Fairbanks *et al.*, 2002).

Zudem besitzt er kardiovaskuläre Funktionen (MacDonald *et al.*, 1997) und spielt im Tiermodell eine Rolle bei den Stellreflexen und bei aggressivem Verhalten (Sallinen *et al.*, 1998a; Sallinen *et al.*, 1998b). Im Gegensatz zu den anderen zwei Subtypen befindet er sich nur zu einem geringen Anteil auf der Zellmembran, sondern überwiegend intrazellulär am Golgi-Apparat und am endoplasmatischen Retikulum (Daunt *et al.*, 1997).

### **1.3 Rezeptor-Interaktionen mit G-Proteinen**

Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) sind sowohl an der hormonellen als auch an der nicht-hormonellen Signaltransduktion im Organismus beteiligt und somit von großer Bedeutung. Sie kommen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, die sich durch das gebundene Guanin-Nukleotid unterscheiden. Im aktivierten Zustand sind sie mit Guanintriphosphat (GTP), im inaktiven Zustand mit Guanindiphosphat (GDP) beladen. Für die Überführung der aktiven in die inaktive Form ist GTPase-Aktivität nötig, die GTP in GDP und ein anorganisches Phosphat spaltet. Meist wird diese Aufgabe durch das G-Protein selbst übernommen, häufig ist jedoch ein Hilfsprotein, ein so genanntes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) nötig. Um die inaktive Form des G-Proteins in die aktive Form zu überführen ist zunächst die Lösung des GDP notwendig. Hieran sind Proteinfaktoren unterschiedlichster Art beteiligt, die allgemein als Guanin-Nukleotid-releasing-Proteins (GNRP) bezeichnet

werden. Guanin-Nukleotid-freie G-Proteine binden aufgrund ihrer hohen Affinität rasch GTP.

Bislang wurden mehr als 50 Subtypen der G-Proteine isoliert, die sich grob in drei Gruppen einteilen lassen:

- Translationsfaktoren mit ubiquitärem Vorkommen
- kleine G-Proteine, die zum Beispiel bei der Regulation von Wachstum und Differenzierungen benötigt werden
- heterotrimere G-Proteine, die vor allem durch heptahelicale Rezeptoren aktiviert

werden. Zu diesen gehören auch die hier interessierenden  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren.

Inaktive heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die  $\alpha$ -Untereinheit ist je nach G-Protein-Typ sehr unterschiedlich. Ihre Funktion ist im aktivierten Zustand die Bindung und Hydrolyse von GTP, im inaktiven Zustand die Bindung von GDP. Das  $\beta\gamma$ -Dimer ist bei allen G-Protein-Typen weitestgehend kongruent und ist auf der zytosplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert.

Durch Bindung eines entsprechenden Liganden wird der heptahelicale Rezeptor aktiviert und wirkt als GNRP, das heißt er bewirkt die Dissoziation des GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit, an die nachfolgend GTP bindet. Diese Konformationsänderung induziert die Freisetzung des  $\beta\gamma$ -Dimers und die Dissoziation des aktivierten Rezeptors. Die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert ihrerseits einen Second Messenger. Durch intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit kommt es zur langsamen Hydrolyse des GTP zu GDP und anorganischem Phosphat. Die nun erneut mit GDP-beladene  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert vom Second Messenger und verbindet sich wieder mit dem  $\beta\gamma$ -Dimer, so dass der inaktive Ausgangszustand wieder hergestellt ist.

Als direkte Folge der G-Protein-Aktivierung durch einen extrazellulären Botenstoff, den so genannten „First Messenger“, werden intrazelluläre Effektorsysteme, so genannte „Second Messenger“ aktiviert. Bei den G-Proteinen werden hierbei je nach vermitteltem Effekt Cyclasen-aktivierende ( $G_s$ ), Cyclasen-inhibierende G-Proteine mit den Untergruppen  $G_{i1}$ ,  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$  und  $G_0$  sowie Phospholipase C-aktivierende Proteine ( $G_q$ ) unterschieden. Die inhibitorischen G-Proteine sind Pertussis-Toxin-sensitiv.

Die Konfiguration der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors ist entscheidend dafür, an welches G-Protein das Signal weitergegeben wird.

Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor vermittelt seine Signale unter physiologischen Bedingungen weitgehend über die inhibitorischen G-Proteine. So zeigten Kurose *et al.* 1991, dass die  $\alpha_2A$ - und  $\alpha_2C$ -Adrenozeptoren ihre Signale zwar über die inhibitorischen G-Proteine, nicht aber über das stimulierende  $G_s$ -Protein vermitteln können (Kurose *et al.*, 1991).

Durch Inhibition der Adenylatcyclase über  $G_i$  kommt es zur Hemmung der Produktion von cAMP. Des Weiteren können hyperpolarisierende Kalium-Kanäle aktiviert und Kalzium-Kanäle inhibiert werden (Regan *et al.*, 1988; Limbird 1988). Außerdem kommt es zur Aktivierung der MAP-Kinase (Flordellis *et al.*, 1995; Della Rocca *et al.*, 1997), des Ras-Systems (Koch *et al.*, 1994) und der Phospholipase D (MacNulty *et al.*, 1992; Jinsi *et al.*, 1996). Dies führt über eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Verfügbarkeit zu einer Verminderung der Neurotransmitterausschüttung.

Durch Versuche an transfizierten Zelllinien zeigten Coupry *et al.*, dass der  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor eher an das  $G_0$ -Protein bindet, während die  $\alpha_2A$ - und  $\alpha_2B$ -Adrenozeptoren ihre Signale hauptsächlich über die  $G_i$ -Proteine vermitteln (Coupry *et al.*, 1992). Auch Chabre *et al.* kamen zu ähnlichen Resultaten. In der von ihnen durchgeführten Studie zeigten sie, dass der  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor vorzugsweise mit  $G_i$ -Proteinen interagiert und seine Signale nur zu geringerem Ausmaß auch über  $G_s$  und  $G_q$  vermittelt (Chabre *et al.*, 1994).

In anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass die  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren sehr wohl auch  $G_s$  aktivieren können (Eason and Liggett, 1993; Burt *et al.*, 1998). Die Aktivierung findet jedoch bei den drei Subtypen des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors unterschiedlich stark statt: So aktiviert der  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor  $G_s$  stärker als der  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor. Dieser wiederum fungiert als stärkerer Aktivator im Vergleich zum  $\alpha_2B$ -Adrenozeptor (Eason *et al.*, 1992b). Das Ausmaß der Aktivierung ist ebenfalls abhängig von der Art des Agonisten. Agonisten, die zu einer  $G_i$ -Aktivierung führen, können nicht unbedingt auch  $G_s$  aktivieren (Eason *et al.*, 1994).

Im Gegensatz hierzu unterschieden Pohjanoska *et al.* die Bindung an  $G_s$ -Proteine dahingehend, dass der  $\alpha_2B$ -Adrenozeptor sowohl über  $G_i$  als auch über  $G_s$ -Proteine wirkt, während die  $\alpha_2A$ - und  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor-Subtypen die Bindung an  $G_i$ -Proteine bevorzugen (Pohjanoska *et al.*, 1997). Die Verschiedenheit dieser Ergebnisse kann in einem unterschiedlichen Versuchsablauf bzw. -aufbau ihre Ursache haben oder darin begründet sein, dass unterschiedliche Agonisten verwendet wurden, um die G-Protein-Aktivierung zu messen.

#### **1.4 Aktivierung der MAP-Kinase durch $\alpha_2$ -Adrenozeptoren**

Als Voraussetzung für die Versuche zu dieser Arbeit stellt sich die Frage, ob  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren in der Lage sind, die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase als second messenger zu aktivieren und ob deren Aktivierung als Äquivalent für das Ausmaß der Bindung von verschiedenen Substanzen an den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor genommen werden kann.

Diese Fragestellung wurde in zahlreichen Studien bearbeitet, von denen einige nachfolgend kurz zusammengefasst werden, um zu belegen, dass es nach Aktivierung von  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung der MAP-Kinase kommt. Wie oben bereits beschrieben, gehören die  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Von diesen ist bekannt, dass sie die MAP-Kinase aktivieren (Faure *et al.*, 1994). 1995 zeigten Hawes *et al.*, dass die verschiedenen G-Protein-Subtypen die MAP-Kinase auf unterschiedlichem Wege stimulieren. So geschieht die  $G_i$ -vermittelte MAP-Kinase-Stimulation über die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, während  $G_q$ -Proteine die MAP-Kinase über die  $G\alpha$ -Untereinheit aktivieren (Hawes *et al.*, 1995). Auch wenn der Beginn des Wegs der MAP-Kinase-Aktivierung sehr unterschiedlich ist, resultieren die Protein-Interaktionen letztendlich in der Aktivierung des Proteins Ras und nachfolgender Signalweiterleitung über eine Raf-Kinase. Raf phosphoryliert die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, welche die MAP-Kinasen aktiviert. Der Oberbegriff der MAP-Kinasen steht für eine große Anzahl an Second Messenger-Systemen. Zu dieser Familie gehören bei den Säugern unter anderem:

- Extracellular Signal Regulated Kinase 1 und 2 (ERK1 und 2)
- zwei Isoformen der ERK 3
- ERK 4
- p38/HOG1
- p57 MAP-Kinasen
- Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs)

(Cobb *et al.*, 1995).

Alle Isoformen der MAP-Kinase phosphorylieren unterschiedliche Transkriptionsfaktoren im Zellkern, was die weite Verbreitung dieser Signaltransduktionskaskade erklärt (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

Della Rocca *et al.* zeigten 1997, dass der  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor die MAP-Kinase stimulieren kann. Von deren Unterformen werden die ERK1 und 2 durch den  $\alpha 2$ -Adrenozeptor aktiviert. Die Aktivierung findet über die Kalzium-abhängige Regulation von Protein-Tyrosin-Kinasen statt und ist abhängig von der Freisetzung freier  $\beta\gamma$ -Komplexe. Da der  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor seine Signale über ein  $G_i$ -Protein vermittelt, ist dieses kongruent mit den von Hawes *et al.* beschriebenen unterschiedlichen Wegen der MAP-Kinase-Stimulation durch die verschiedenen G-Protein-Typen (Della Rocca *et al.*, 1997).

In einer Zelllinie, die aus Zellen des proximalen Tubulus der Niere von Opossums abgeleitet ist, findet die Aktivierung der MAP-Kinase durch  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren unabhängig vom intrazellulären cAMP-Spiegel und der Proteinkinase C statt (Kribben *et al.*, 1997).

Eine Versuchsreihe zur  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-vermittelten Vasokonstriktion in der porcinen Vena palmaris lateralis zeigte, dass diese abhängig von der Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade ist, die einem Influx von extrazellulärem Kalzium und der Aktivierung der Src-Tyrosin-Kinasen nachgeschaltet ist. In derselben Studie wurde beschrieben, dass ERKs nur nach Phosphorylierung sowohl am Threonin- als auch am Thyrosinrest aktiviert werden (Roberts, 2001).

Eine weitere Studie von Bhattacharya zeigte ebenfalls, dass der Influx von extrazellulärem Kalzium eine Rolle für die Phosphorylierung der ERK2 spielt (Bhattacharya *et al.*, 2003).

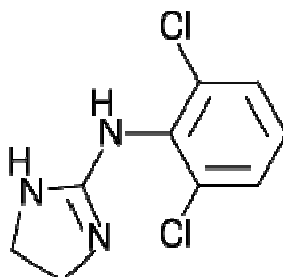
Zusammenfassend belegen zahlreiche Studien eindeutig, dass der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor die MAP-Kinase aktivieren kann. Daher kann das Ausmaß der MAP-Kinase-Phosphorylierung als Surrogatvariable für die Aktivierung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors genommen werden.

Bei Burt *et al.* ist die Aktivierung der p44-MAP-Kinase durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten beschrieben (Burt *et al.*, 1998). Zusätzlich zu einem Antikörper gegen die p44-MAP-Kinase wurde in der vorliegenden Studie ein Antikörper gegen die p42-MAP-Kinase verwendet. Diese beiden MAP-Kinasen entsprechen der ERK1 (p44-MAP-Kinase) und der ERK2 (p42-MAP-Kinase) (Faure *et al.*, 1994).

## 1.5 $\alpha_2$ -Adrenozeptoren in der Pharmakotherapie

Der erste bekannte  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist war das Anfang der 1960er Jahre durch den Pharmazeuten Helmut Stähle entwickelte Clonidin. Er veränderte die Struktur des Imidazolins durch Ersatz der  $\text{CH}_2$ -Brücke mit einer NH-Gruppe und Einfügung von Cl-Atomen in der 2- und 6-Position des Phenylrings mit der ursprünglichen Zielsetzung, einen peripher wirksamen  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten zu synthetisieren, der therapeutisch als Nasenschleimhaut-abschwellendes Mittel genutzt werden sollte.

Abbildung 2: Strukturformel des Clonidins.



Eher zufällig wurde entdeckt, dass eine andere Wirkung des Clonidins viel signifikanter war als der Nasenschleimhaut-abschwellende Effekt: Eine Sekretärin des Labors fiel nach Gebrauch der Nasentropfen im Rahmen eines grippalen Infekts in einen 24stündigen Schlaf und entwickelte neben arterieller Hypotension und Bradykardie auch einen trockenen Mund. Aufgrund dieser zufälligen Beobachtung wurde erstmals erkannt, dass sich  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren auch im zentralen Nervensystem finden.

1966 wurde Clonidin als erstes zentral wirkendes Antihypertonikum in die Pharmakotherapie eingeführt. Bei zügiger Injektion kommt es vor der Blutdruck- und Herzfrequenz senkenden Wirkung allerdings zu einem passageren Anstieg des Blutdrucks (Stähle, 2000).

Heute ist bekannt, dass der hypotensive Effekt von Clonidin nicht über  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren, sondern über Imidazolin-Rezeptoren vermittelt wird. Jedoch beruhen die spinal und supraspinal vermittelte Analgesie und Sedierung auf der Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren.

Zu den Indikationen von Clonidin zählt neben der Kombinationstherapie bei arterieller Hypertonie und dem Einsatz bei hypertensiven Krisen auch die Behandlung der Entzugssymptomatik bei Opioidabhängigen und des Delirium tremens bei Alkoholentzug. Hier ist die Dämpfung der vegetativen Symptomatik von zentraler Bedeutung.

Ferner findet Clonidin in der Schmerztherapie und Analgosedierung bei Intensivpatienten Anwendung. Weitere Indikationen sind die Therapie des postoperativen Muskelzitterns und die Migräne-Prophylaxe.

Chemisch ähnliche Abkömmlinge des Clonidins sind Dexmedetomidin, Guanafacin, Guanabenz und Moxonidin. Dexmedetomidin hat von diesen Wirkstoffen die höchste Selektivität für den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor. Die sympatholytische Wirkung dieser Agonisten kommt durch zentrale und periphere Aktivität zustande. Alle Substanzen sind sehr lipophil und passieren leicht die Blut-Hirn-Schranke. Eine selektive Wirkung auf die Subgruppen des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

$\alpha_2$ -Adrenonzeptor-Antagonisten wie zum Beispiel Yohimbin und Atipamezol haben sich in der Veterinärmedizin für die Beendigung einer Anästhesie durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten bewährt (Tranquilli und Maze, 1993), welche in diesem Fachgebiet vielfach zur Erzielung von Immobilisation, Sedation und Hypnose genutzt werden.  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Antagonisten bieten eine einfache und sichere Methode, diese Effekte zu beenden. Neben der Bindung an den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor vermittelt Yohimbin einen Teil seiner Effekte auch über den Imidazolin-Rezeptor. Rauwolscin ist ein noch selektiverer Antagonist als das Yohimbin, findet bisher aber nur in Tierversuchen Verwendung.

In der Humanmedizin gibt es bisher nur wenige Studien, die einen Vorteil dieser Effekte für den Menschen belegen. Daher finden  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Antagonisten bislang keine Verwendung in der Anästhesie. Allerdings werden in der Psychiatrie Pharmaka verwendet, die ihre Wirkung unter anderem durch antagonistische Wirkung am  $\alpha_2$ -Adrenozeptor vermitteln. Hier seien die tetrazyklischen Antidepressiva Maprotilin und Mianserin sowie aus der Gruppe der atypischen Antidepressiva Mirtazepin und Trazodon genannt.

Neben spezifischen Agonisten und Antagonisten binden noch weitere Substanzen an den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor, so zum Beispiel Etomidat, ein intravenöses Anästhetikum. Etomidat ist wie Clonidin ein Derivat des Imidazols. Seine agonistische Wirkung äußert sich hauptsächlich über einen Anstieg des Blutdrucks, der über den  $\alpha_2B$ -Adrenozeptor vermittelt wird. Dieser Effekt könnte ursächlich für die hämodynamische Stabilität der Patienten während einer durch Etomidat induzierten Narkose sein (Paris *et al.*, 2003).

In einer Studie aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität Kiel wurde auch für Remifentanil eine Bindung an den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor nachgewiesen. Dieser Effekt könnte für die analgetische Wirkung des Remifentanils mit verantwortlich sein (Höcker *et al.*, 2008).

## 1.6 Opioide

Zur Begriffsdefinition:

Natürliche Substanzen, die aus dem Opium extrahiert werden, nennt man Opiate. Opium ist der getrocknete Milchsaft unreifer Samenkapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L.), der zu den Mohngewächsen (*Papaveraceen*) gehört. Es enthält zahlreiche Alkaloide, zu welchen unter anderem das Morphinum als Hauptbestandteil und das Codein zählen.

Der Name „Opioide“ steht als Sammelbegriff für sämtliche halb- oder vollsynthetische Substanzen mit morphin-artigen Eigenschaften, die dem Körper zugeführt werden.



### 1.6.1 Wirkung und Nutzung von Opioiden

Opioide spielen im klinischen Alltag wegen ihrer analgetischen und sedierenden Wirkung eine wichtige Rolle in der Anästhesie und der Schmerztherapie.

Zu Narkosezwecken werden hauptsächlich die vier synthetisch hergestellten Opioide Alfentanil, Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanyl genutzt.

In der Schmerztherapie werden Opioide eingesetzt, da sie durch Bindung an die Rezeptoren für endogene Opioidpeptide die Schmerzfortleitung sowohl auf spinaler als auch auf supraspinaler Ebene verändern und somit als potente Analgetika wirken. Aufgrund ihres je nach Substanz mehr oder weniger stark ausgeprägten Abhängigkeitspotentials unterliegt ein großer Teil von ihnen den Bestimmungen des Betäubungsmittelgesetzes (BtmG).

Neben der schon erwähnten analgetischen und sedierenden Wirkung wirken Opioide auf zentraler Ebene euphorisierend, atemdepressiv, antitussiv, emetisch/antiemetisch, antidiuretisch und bewirken eine Miosis. Zu den peripheren Wirkungen gehören neben der Pyloruskonstriktion, der spastischen Obstipation durch Verzögerung der Darmpassage und der Tonuserhöhung in den Gallenwegen und der Harnblase auch die Dilatation der Blutgefäße und die Freisetzung von Histamin.

Aus diesen Wirkungen ergeben sich die Nebenwirkungen, welche die Therapiemöglichkeiten mit Opioiden einschränken. Die häufigste ist die chronische Obstipation, die mit Laxantien behandelt werden muss.

Bei Überdosierung mit Opioiden kommt es zur Opiat-Intoxikation mit der Symptom-Trias Atemdepression, Koma und Miosis. Diese ist mit dem Opioid-Antagonisten Naloxon therapierbar.

Theoretisch ist es möglich, durch vollständige Besetzung und Erregung aller Rezeptoren eine komplette Analgesie zu erreichen, praktisch ist dies wegen der Nebenwirkungen jedoch nicht durchführbar.

Die meisten Opiate wirken als  $\mu$ -Agonisten. Die klinisch relevanten Ausnahmen sind (Levo-) Methadon, das neben der Wirkung als  $\mu$ -Agonist auch als Antagonist am NMDA-Rezeptor (einem Glutamat-Rezeptor) wirkt, Buprenorphin, welches sowohl als  $\mu$ -Agonist, als auch als  $\kappa$ -Antagonist wirkt und Pentazocin, das im Gegensatz zum Buprenorphin als  $\mu$ -Antagonist und  $\kappa$ -Agonist wirkt.

## 1.6.2 Opioid-Rezeptoren

Opioide binden im Körper an eine Gruppe spezieller Rezeptoren, den Rezeptoren für die drei endogenen Morphine Endorphin, Enkephalin und Dynorphin. Diese sind endogene Opioidpeptide, die sich im Wesentlichen durch Vorkommen, Verteilung und Rezeptoraffinität unterscheiden. Die Rezeptoren gehören wie die  $\alpha$ -Adrenozeptoren zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen.

Bislang sind die fünf Rezeptortypen  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und der Orphan-Rezeptor (ORL = Opioid receptor like) bekannt. Die  $\mu$ -Rezeptoren gliedern sich weiter in die Subgruppen  $\mu$ 1- und  $\mu$ 2-Rezeptoren.

Die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Rezeptortypen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Funktionen des  $\varepsilon$ - und des Orphan-Rezeptors sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Der früher ebenfalls zu den Opioidrezeptoren gezählte  $\sigma$ -Rezeptor wird heute aufgrund neuerer Forschungen nicht mehr zu den Opioidrezeptoren, sondern als eigenständige Rezeptorgruppe gezählt. Verschiedene Antidepressiva und Neuroleptika wirken an den beiden Subtypen dieses Rezeptors agonistisch (Müller und Strobach, 2005).

*Tabelle 1: Opioid-Rezeptoren und ihre Funktionen*

Rezeptorsubtyp	Vermittelte Effekte	Wirkebene
$\mu$ 1	supraspinale/spinale Analgesie Euphorie Abhängigkeitspotential	supraspinal Hinterhorn
$\mu$ 2	spinale Analgesie Atemdepression	spinal
$\delta$	Schmerzverarbeitung Analgesie endokrine Regulationen Anxiolyse Verhaltensänderungen	spinal
$\kappa$	Analgesie Sedierung Abhängigkeitspotential Atemdepression psychomimetische Effekte	spinal

Wie schon erwähnt, gehören auch die Opioid-Rezeptoren zu der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Sie sind an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt. Durch Aktivierung der Rezeptoren wird also die Adenylatcyclase gehemmt, was eine nachfolgende Senkung der Aktivität der Proteinkinase A mit sich zieht, so dass es schlussendlich zur Hyperpolarisation der Zelle kommt.

Im Rückenmark finden sich Opioid-Rezeptoren vor allem im Hinterhorn, wo auch die Schmerzleitung lokalisiert ist. Des Weiteren werden sie im limbischen, autonomen und motorischen System gefunden.

### **1.6.3 Arten von Opioiden**

Die Klassifikation der Opioide beruht auf ihrer Affinität zu den verschiedenen Opioid-Rezeptoren. Aufgrund der Bindung an unterschiedliche Rezeptoren unterscheiden sie sich auch in ihren klinischen Effekten. Sie lassen sich in vier Gruppen einteilen: Die reinen Agonisten binden mit hoher Affinität an den  $\mu$ -Rezeptor und haben gleichzeitig eine hohe intrinsische Aktivität. Die intrinsische Aktivität stellt ein Maß für die Stärke des Effekts, der aus der Bindung einer Substanz an einen Rezeptor hervorgerufen wird, dar und beschreibt somit die relative Wirkstärke. Zum  $\kappa$ -Rezeptor haben die reinen Agonisten eine geringe Affinität.

Die gemischten Agonisten-Antagonisten haben eine hohe Affinität zum  $\mu$ -Rezeptor, aber nur eine sehr geringe intrinsische Aktivität. Sie wirken somit eher als  $\mu$ -Antagonisten. Auf den  $\kappa$ -Rezeptor wirken sie als Agonisten, da sowohl Affinität als auch intrinsische Aktivität hoch sind.

Zu der Gruppe der Partialagonisten gehören diejenigen Opioide, die im Vergleich zu Morphin eine höhere Affinität zum, aber geringere intrinsische Aktivität am  $\mu$ -Rezeptor haben.

Die reinen Antagonisten wirken an allen Opioid-Rezeptoren als kompetitive Antagonisten. Sie werden beispielsweise zur Therapie der schon erwähnten Opioid-Intoxikation genutzt.

Bei der klinischen Anwendung ist es wichtig, Substanzen der Untergruppen nicht abwechselnd oder gemischt zu geben.

In der Schmerztherapie ist auch eine weitere Unterteilung nach Stärke der Wirkung in Bezug auf Morphin als Referenzsubstanz gebräuchlich: Unterschieden werden potentere Opioide wie z.B. Fentanyl und Hydromorphon, äquipotente Opioide wie Oxycodon und Piritramid

und weniger potente Opioide wie Pethidin, Codein und Tramadol. Diese werden therapeutisch nach dem WHO-Stufenschema zur Schmerztherapie genutzt.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Frage, ob Opioide an  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren binden können und somit eventuell einen Teil ihrer Effekte über diese Rezeptorengruppe vermitteln. Auch soll gezeigt werden, ob es bei dieser Bindung Subtyp-spezifische Präferenzen gibt.

Zu diesem Zweck wurden Aktivierungsstudien mit dem Opioid Pethidin an transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt und die dadurch hervorgerufene Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) gemessen.

Versuchsaufbau und –ablauf sind im Folgenden beschrieben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien und Zellkultur

Die für die Transfektion verwendeten HEK293 Zellen (Human Embryonal Kidney Cells) stammten von DSMZ in Heidelberg, Deutschland.

Die Zellen wurden in dem Nährmedium DMEM mit 10% FBS und 2% Penicillin und Streptomycin im Inkubator bei 37° C, 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### Nährmedium

DMEM (Dulbeccos minimum essential medium) mit High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin mit Sodium Pyruvat	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
FBS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

#### Nährmedium nach dem Serumwechsel

DMEM + 0,5% FBS + 2% Penicillin/Streptomycin

### 2.1.2 Enzyme und Antikörper

#### Antikörperkit

Antikörper-Kit	Cell Signalling Technologies, Beverly, MA, USA
1. A Antikörper gegen Phospho-MAP-Kinase	
B Anti-Rabbit-AK mit HRP (Horseradish-Peroxidase)	
2. A AK gegen MAP-Kinase	
B Anti-Rabbit-AK mit HRP	

### 2.1.3 Chemikalien

Pethidin	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane)	Carl Roth GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH
Triton X 100 $C_{33}H_{60}O_{10}$	Carl Roth GmbH
0,5M EDTA-Lösung	Carl Roth GmbH
Dinatriumsalz Dihydrat $2Na\ 2H_2O$	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH

3% Acrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Merck KGaA
Roti-Quant universal Kit	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth GmbH
Bovines Serumalbumin (BSA) (Albumin Fraktion V Protease frei)	Carl Roth GmbH
Instant-Magermilchpulver	DE-VAU-GE Gesundkostwerk GmbH, Lüneburg, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
5-Bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalinamin (UK14.304)	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Glycerol	Carl Roth GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
N,N-bis(2-Hydroxyrthyl)-2 Aminorthanesulfonisäure (BES)	Merck KGaA
Bromophenol blau oder Phenol rot	Sigma-Aldrich

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

##### 0,1 M Tris-Puffer

121,14 g Tris

Aqua dest. ad 1 l

pH 7,5

##### 0,1 M Glycin-Puffer

7,507 g Glycin

Aqua dest. ad 1 l

pH 2,5

TBST

6,057 g Tris  
5 ml 0,5M EDTA  
20,25 g NaCl  
2,5 ml Tween 20  
Aqua dest. ad 2,5l  
pH 7,5

SDS-Laufpuffer

12,2 g Tris  
57,6g Glycin  
4g SDS  
Aqua dest. ad 4l  
pH ca. 8,3

Transferpuffer

3,03g 25mM Tris  
14,4g 192 mM Glycin  
Aqua dest. ad 1l  
pH 8,3

Blocking-Lösung

2% Milchpulver (= 2g)  
0,3% BSA (= 0,3g)  
100 ml TBST 0,05%

Gelpuffer I

45,42 g Tris  
1 g SDS  
Aqua dest. ad 250ml  
pH 8,8 (ggf. mit HCl titrieren)

Gelpuffer II

15,14 g Tris  
1 g SDS  
Aqua dest. ad 250ml  
pH 6,8

Phosphate Buffer Saline (PBS)

8 g NaCl  
0,2g KCl  
1,78g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Aqua dest. ad 1l  
pH 7,4

PBS+CaCl<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub>

PBS  
1,0 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM CaCl<sub>2</sub>



1x MAP-SDS-Ladepuffer

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)  
 2% w/v SDS  
 10% Glycerol  
 50 mM DTT  
 0,01 w/v Bromophenol blau oder Phenol rot

Lyse-Puffer

50 mM TRIS  
 100 mM NaCl  
 2 mM EDTA  
 1% Triton-X-100

2 x BES

50 mM N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminethanesulfonsäure (BES)  
 200 mM NaCl  
 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 80 ml H<sub>2</sub>O  
 pH 6,95  
 steril filtrieren

Alle Lösungen wurden mit sterilem entionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage Ultra Clear SG GmbH, Barsbüttel, Deutschland angesetzt.

**2.1.5 Gelelektrophorese**

	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5%
Gelpuffer I	2,6 ml	
Gelpuffer II		2,6 ml
Acrylamid	2,5 ml	1,13 ml
H <sub>2</sub> O	4,81 ml	6,19 ml
APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl

## Marker für die Gelelektrophorese

Fermentas Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
--	---

### 2.1.6 Geräte:

#### 1. Zelllabor:

Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Kendro, Hanau, Deutschland
MS 1 Minishaker	IKA Works, Wilmington, NY, USA
Bench Hera Safe	Kendro
Wasserbad P-D	Industriegesellschaft mbH, Prüfgerätwerk Dresden, Deutschland
Mikroskop Leica	DMIL Microsystems Wetzlar GmbH, Deutschland
Neubauerkammer improved	Neubauer, Marienfeld, Deutschland

Unter der Bench wurde mit 95% Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> gearbeitet.

#### 2. Labor

Proteinkonzentrationsmesser: Thermo Spectronic Genesys 10 uv	Thermo, Bremen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer und Wetblotkammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Stuart Orbital Incubator S150	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Elektrophorese Laufaufsatz Power Pac1000	Bio-Rad
Thermostat plus	Eppendorf
Brutschrank Heraeus	Kendro
Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank	Liebherr-International AG

Zentrifuge Sorvall Super T21	Kendro
Zentrifuge Biofuge fresco Heraeus	Kendro
Pipetten	Eppendorf
Scanner Power Look 3	UMAX, Willich, Deutschland
Kamera ray test	Isotopenmessgerät GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Aida Software	Raytest, Straubenhardt, Deutschland

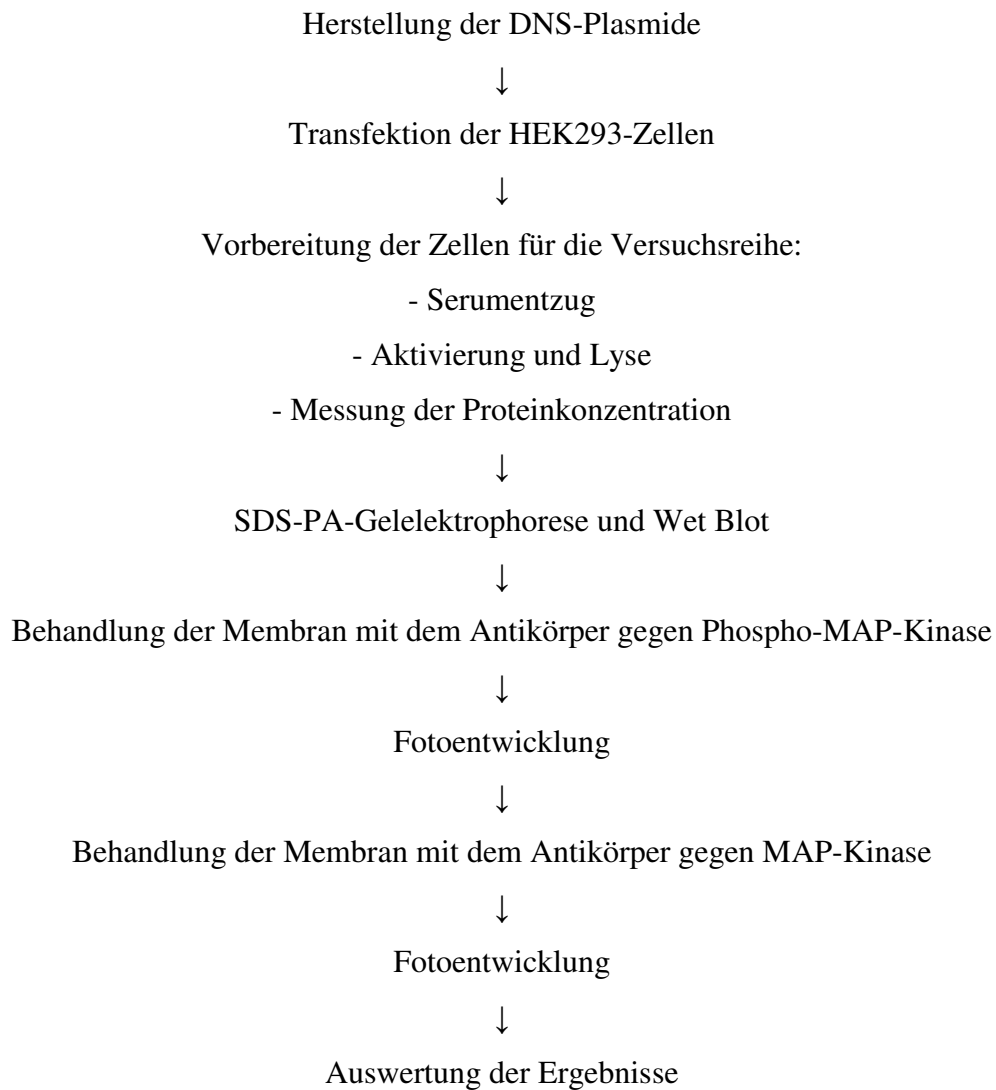
### 2.1.7 Sonstige Materialien

Cellstar Gewebekulturflaschen 250 ml, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Petrischalen 94/16mm für Gewebekulturen Qualität TC	Greiner Bio-One
Whatman-Filterpapier 17CHR	Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England
Nitrocellulosemembran Parablott 45µm	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
12 well-Platten Nunclon Surface	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
ECLplus-Solution A und B für die Fotoentwicklung	Amersham Biosciences
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
AGFA CP1000	Mortsel, Belgien

## 2.2 Methoden

### Übersicht über den Versuchsablauf

Zum besseren Verständnis dient diese Übersicht über den Versuchsablauf:



### 2.2.1 DNS- Plasmide

Die Plasmide, welche die humanen  $\alpha$ 2-Adrenozeptorgene ( $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C) und die Transfektionskontrolle GFP kodieren, wurden von Herrn Dr. Bernd Weber zur Verfügung gestellt. Alle Gene waren im eukaryontischen Expressionsvektor pCMV-Tag4A (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) kloniert und wurden nach erfolgreicher DNS-Sequenzverifizierung verwendet.

### 2.2.2 Zelltransfektion: Kalzium-Phosphat-Präzipitation

In der Vorbereitung wurden 24 Stunden vor der Transfektion 120 000 Zellen pro well auf einer 12 well-Platte ausgesät und mit 1 ml Nährmedium bei 37°C inkubiert.

Die Transfektion lief in folgenden Schritten ab:

1. Mischen von 10  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  und 1  $\mu$ g DNS und Auffüllen dieses Gemischs mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100  $\mu$ l
2. tropfenweises Pipettieren der DNS in 100  $\mu$ l BES(2x) auf dem Vortex bei 200 Umdrehungen/Minute
3. zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur
4. tropfenweises Zufügen des DNS-Reaktionsgemischs zu dem Nährmedium der Zellen unter leichtem Schütteln
5. Inkubation der 12 well-Platten über Nacht bei 37°C

Die Zellen wurden mit fünf unterschiedlichen DNS nach folgendem Schema transfiziert:

1. pCMV-Tag 4A
2. pCMV-Tag +  $\alpha$ 2A
3. pCMV-Tag +  $\alpha$ 2B
4. pCMV-Tag +  $\alpha$ 2C
5. GFP als Transfektionskontrolle

Die Transfektionsrate der Transfektionskontrolle wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

### 2.2.3 Zellvorbereitung für die weiteren Versuche

#### 2.2.3.1 Serumwechsel

Ziel des Serumwechsels war es, die Zellen auszuhungern. Dazu wurde ca. 32 Stunden nach der Transfektion das Nährmedium der 12 well-Platte abgesaugt und durch Nährmedium mit 0,5% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin ersetzt. Durch dieses Vorgehen kam es zur Synchronisation des Zellzyklus und damit zu einer Verstärkung der später zu beobachtenden Effekte.

#### 2.2.3.2 Aktivierung und Lyse der Zellen

Die Weiterbehandlung der Zellen mit dem Ziel der Aktivierung des  $\alpha 2$ -Adrenozeptors erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Zu diesem Zweck wurden 20  $\mu$ l des  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten UK14.304 mit 180  $\mu$ l PBS gemischt und von dieser Mischung je 10  $\mu$ l pro well (entspricht 10  $\mu$ M UK14.304 pro well) in das Zellmedium gegeben. Der Agonist wirkte unterschiedlich lang auf die Zellen ein. Die genauen Zeiten sind im Abschnitt „Ergebnisse“ dargestellt. Nach anschließender sofortiger Ernte wurden die Zellen auf Eis gekühlt, um die Aktivierung zu beenden.

Unter weiterer Eiskühlung wurde der Flüssigkeitsüberstand nach Zentrifugation bei 2.000 U/min und 4°C für 5 Minuten abpipettiert.

Der Zusatz von 60  $\mu$ l 1 x MAP-SDS-Ladepuffer zu den verbleibenden Zellen bewirkte eine Lyse der Zellen. Anschließend wurde die Mischung gut resuspendiert und für 5 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben.

Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei 95°C und einer zweiten Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 13.000 U/min wurden die lysierten Proben bei -20°C eingefroren.

Für die zweite und dritte Versuchsreihe wurde den Zellen das Opioid Pethidin bzw. Pethidin und UK14.304 gemeinsam zugefügt. Wiederum wurde eine 10  $\mu$ M-Lösung des  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten UK14.304 in PBS verwendet. Pethidin wurde als 10  $\mu$ M- bzw. 50  $\mu$ M-Lösung zugegeben.

Nach der vorher festgelegten Einwirkzeit wurden die Zellen wiederum geerntet und im Folgenden wie oben beschrieben verfahren.

### 2.2.3.3 Proteinkonzentrationsmessung

Nach Auftauen der Proben auf Eis und nachfolgender Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min für fünf Minuten wurde das Zell-Pellet verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen pipettiert.

Zum Messen der Proteinkonzentration wurden jeweils 15 ml Reagenz 1 und 2 von Roti-Quant gemischt und leicht geschüttelt. 15 µl jeder Probe und 1 ml der Reagenzienlösung wurden gemischt und die Proteinkonzentrationen gegen einen Leerwert, bestehend aus 1 ml Reagenzienlösung, bei 492 nm gemessen.

Nach Berechnung der Proteinkonzentrationen wurden entsprechend gleiche Konzentrationen an Protein in neue Eppendorf-Röhrchen pipettiert und jede Probe mit 5 µl SDS-Loading-Puffer aufgefüllt.

## **2.2.4 SDS-PA-Gelelektrophorese und Wet-Blot**

### 2.2.4.1 SDS-PAGE

Durch die Gelelektrophorese werden die Proteine der vorher durch Hitze zerstörten Zellen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Das stark negativ geladene SDS bindet an die Proteine und maskiert deren Ladungen, so dass diese entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell in dem Polyacrylamid-Gel zur Anode wandern. Kleine Proteine wandern hierbei schneller als große.

Für die Elektrophorese wurde ein 10%iges Trenngel und darauf ein 4,5%iges Sammelgel zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen.

Die Proben wurden für 10 Minuten bei 70°C aufgewärmt, der Marker Fermentas Page Ruler auf Eis aufgetaut.

Nach dem Zusammenbauen der Laufkammer wurde diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt und das Gel mit je 10 µl der Proben und 3 µl des Markers beladen. Die Laufzeit betrug circa zwei Stunden bei einer Spannung von 120 Volt und Raumtemperatur.

### 2.2.4.2 Wet-Blot und Blocking der Membran

Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Wet-Blot von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

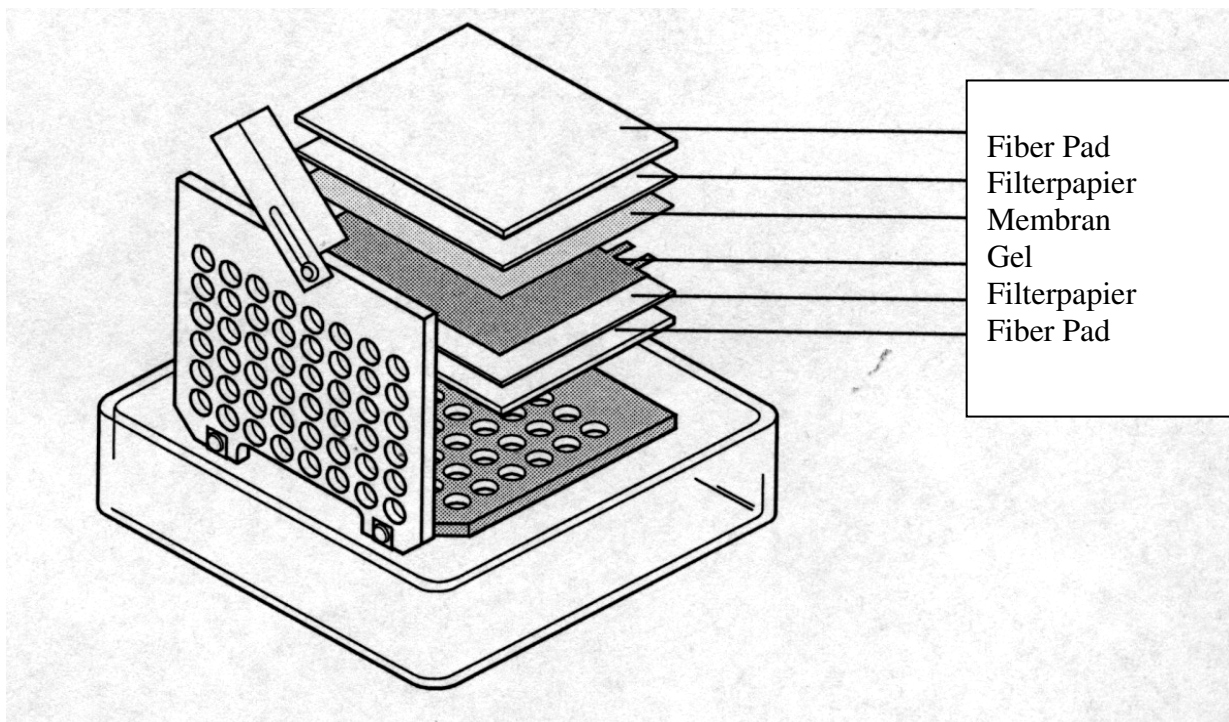
Dazu war es notwendig, Membran und Filterpapier auf die Größe des Gels zurechtzuschneiden und kurz in Transferpuffer zu legen.

Der Blot wurde luftblasenfrei in folgender Reihenfolge zusammengebaut:

- Kathode
- Fiber Pad
- Filterpapier
- Nitrocellulosemembran
- Gel
- Filterpapier
- Fiber Pad
- Anode

Der Aufbau wird noch einmal in Abbildung 3 verdeutlicht:

*Abbildung 3: Aufbau des Wet Blots*





Er kam gemeinsam mit einem Eisblock in einen mit Transferpuffer gefüllten Lösungstank. So fand der Proteintransfer über Nacht bei einer Temperatur von 4°C und einer Spannung von 25 Volt statt.

Um unspezifische freie Bindungsstellen zu blocken, wurde die Membran am nächsten Tag in Blocking-Lösung gelegt. Diese konnte über Nacht bei 4°C einwirken.

Somit wurde sichergestellt, dass der später zugegebene Antikörper nur an die MAP-Kinase und nicht auch an freie Bindungsstellen der Membran binden konnte.

Ziel der nachfolgenden Behandlung der Membran mit Antikörpern war es festzustellen, wie groß der Anteil an aktivierter phosphorylierter MAP-Kinase am Anteil der totalen MAP-Kinase ist.

### **2.2.5 Phospho-MAP-Kinase-Antikörper**

Die Membran wurde mit 3 ml Blocking-Flüssigkeit und 3 µl Phospho-MAP-Kinase-Antikörper (entsprechend einer Verdünnung von 1:1000) in Frischhaltefolie eingeschweißt. Der Antikörper konnte etwa 24 Stunden bei 4°C einwirken.

Am darauffolgenden Tag wurde der Blot drei Mal in TBST mit einer jeweiligen Einwirkzeit von fünf Minuten gewaschen, um den Antikörper wieder zu entfernen.

Nach erneutem einstündigem Blocken freier Bindungsstellen bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln im Stuart Orbital Incubator wurde die Membran in 10 ml Blocking-Flüssigkeit gelegt. Dieser wurde in einer 1:1000-Verdünnung der Anti-Rabbit-Antikörper mit Horseradish-Peroxidase zugefügt. Die Einwirkzeit dieses zweiten Antikörpers betrug eine Stunde bei Raumtemperatur – erneut im Stuart Orbital Incubator.

Danach wurde die Membran wie zuvor drei Mal in TBST gewaschen.

### **2.2.6 Fotoentwicklung**

Für die Fotoentwicklung wurden in der Dunkelkammer ECLplus-Lösungen A und B in einem Verhältnis von 40:1 gemischt (1.000  $\mu$ l und 25  $\mu$ l) und die Membran für fünf Minuten in diesem Lösungsgemisch inkubiert. Daraufhin wurde der Hyperfilm ECL zur Belichtung gemeinsam mit der Membran für 5 Minuten in eine Fotokassette gelegt und nachfolgend das Foto entwickelt.

Nach der Fotoentwicklung wurde die Membran zunächst drei Mal in 0,1 M Glycin-Puffer (pH 2,5) mit einer jeweiligen Einwirkzeit von 5 Minuten, dann drei Mal in 0,1 M TRIS-Puffer (pH 7,5) mit einer Einwirkzeit von je 15 Minuten gewaschen, um den Antikörper von der Membran zu lösen.

Es folgte ein weiteres Blocking über Nacht bei 4°C.

### **2.2.7 MAP-Kinase-Antikörper**

Für den MAP-Kinase-Antikörper wurde verfahren wie bereits für den Phospho-MAP-Kinase-Antikörper beschrieben.

Die Membran wurde mit 3 ml Blocking-Flüssigkeit und dem MAP-Kinase-Antikörper in einer 1:1000-Verdünnung eingeschweißt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal in TBST gewaschen, erneut eine Stunde geblockt und eine Stunde mit dem Anti-Rabbit-Antikörper mit HRP in einer 1:1000-Verdünnung behandelt.

Nach weiterem dreimaligem Waschen in TBST wurde wiederum ein Foto entwickelt.

### **2.2.8 Auswertung**

Die entwickelten Fotos wurden mit dem Scanner Power Look 3 von Umax eingescannt und die Filmschwärzung mit dem Software-Programm Aida Software densitometrisch quantifiziert.

### 2.2.9 Statistische Methoden

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde der t-Test angewendet, um die Signifikanz der Ergebnisse aufzuzeigen. Hierfür wurde das Software-Programm Graph Pad Prism, Version 4.03 für Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) verwendet.

Als Referenzwert wurde der Anstieg der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung bei jeweils nicht-stimulierten Zellen genommen. Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 0,05$ , bzw.  $\alpha = 0,01$  festgesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Aktivierung der $\alpha 2$ -Adrenozeptoren mit dem Opioid Pethidin

In einem ersten Versuchsschritt wurde die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase durch die drei  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Subtypen  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  und  $\alpha 2C$  bei HEK293-Zellen nach Zugabe von 10  $\mu M$  des unspezifischen  $\alpha 2$ -Agonisten UK14.304 nach dreiminütiger Einwirkzeit gemessen. In vorhergehenden Versuchen im Labor hatte sich gezeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14.304 nach dreiminütiger Einwirkdauer auf den  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor maximal ist. Dieser Wert findet sich auch in der einschlägigen Fachliteratur und wurde daher für den Versuch ausgewählt.

Nachfolgend wurde der gleiche Versuch mit dem Opioid Pethidin durchgeführt. Es wurden 10  $\mu M$  und 50  $\mu M$  Pethidin verwendet, die wiederum drei Minuten auf die Zellen einwirkten, und die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase gemessen.

Die Versuche wurden jeweils vier Mal durchgeführt und der Durchschnittswert der Aktivierung ermittelt.

Die Ergebnisse der Versuche zeigen die Tabellen 2 bis 4:

*Tabelle 2: Prozentuale Angabe der  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase durch Zugabe von UK14.304 und Pethidin nach dreiminütiger Einwirkdauer.*

Plasmid		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Durchschnittswert
$\alpha 2A$	+ 10 $\mu M$ UK14.304	206,1%	194,8%	290,4%	167,1%	<b>214,6%</b>
$\alpha 2A$	+ 10 $\mu M$ Pethidin	2,8%	4,8%	- 36,3%	- 13,4%	<b>- 10,5%</b>
$\alpha 2A$	+ 50 $\mu M$ Pethidin	- 30,8%	- 17,1%	- 15,0%	- 7,0%	<b>- 17,5%</b>

Die Aktivierung der MAP-Kinase wurde durch Bindung von UK14.304 an den  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor auf einen Durchschnittswert von 214,6% gesteigert. Bei der Einwirkung von Pethidin schwankte die Aktivierung um den Nullwert.

*Tabelle 3: Prozentuale Angabe der  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase durch Zugabe von UK14.304 und Pethidin nach dreiminütiger Einwirkdauer.*

Plasmid		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Durchschnittswert
$\alpha 2B$	+ 10 $\mu$ M UK14.304	27,0%	154,5%	72,6%	86,5%	<b>85,2%</b>
$\alpha 2B$	+ 10 $\mu$ M Pethidin	15,3%	43,3%	88,2%	69,9%	<b>54,2%</b>
$\alpha 2B$	+ 50 $\mu$ M Pethidin	83,4%	112,1%	107,2%	48,0%	<b>87,4%</b>

Der  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor vermittelte bei der Einwirkung sowohl von UK14.304 als auch von Pethidin eine Aktivitätssteigerung der MAP-Kinase.

*Tabelle 4: Prozentuale Angabe der  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase durch Zugabe von UK14.304 und Pethidin nach dreiminütiger Einwirkdauer.*

Plasmid		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Durchschnittswert
$\alpha 2C$	+ 10 $\mu$ M UK14.304	- 8,5%	7,0%	- 16,5%	103,0%	<b>21,3%</b>
$\alpha 2C$	+ 10 $\mu$ M Pethidin	- 20,2%	49,9%	- 10,0%	48,1%	<b>17,0%</b>
$\alpha 2C$	+ 50 $\mu$ M Pethidin	3,4%	61,2%	2,7%	33,0%	<b>25,1%</b>

Bei der durch den  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase sowohl durch UK14.304 als auch durch Pethidin kam es in diesen Versuchen zu einer breiten Streuung der Ergebnisse. Im Durchschnittswert ergab sich eine leicht erhöhte Aktivierung. Aufgrund der Streuung lässt sich dieser jedoch nur eingeschränkt verwerten.

Um eine Aussage über die Signifikanz der Aktivierung der MAP-Kinase treffen zu können, wurde anschließend der t-Test durchgeführt. Als Referenzwert wurde jeweils die Aktivierung der nicht-stimulierten Zellen genommen.

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den Abbildungen 4 bis 6 dargestellt.

Abbildung 4: Ergebnisse des *t*-Tests der  $\alpha_2A$ -Adrenozeptor-vermittelten prozentualen Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14.304 und Pethidin.

\* *p*-Wert < 0,001

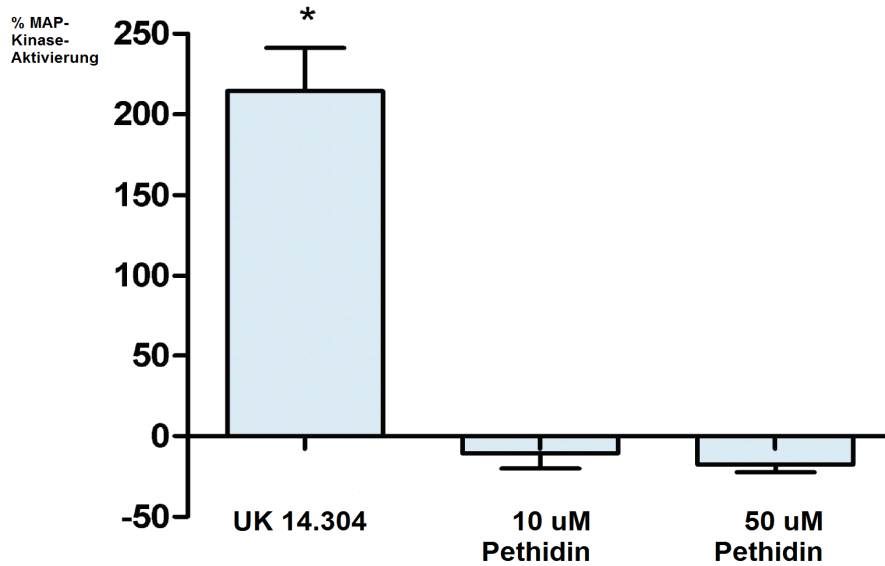


Abbildung 5: Ergebnisse des *t*-Tests der  $\alpha_2B$ -Adrenozeptor-vermittelten prozentualen Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14.304 und Pethidin.

\* *p*-Wert < 0,05, \*\* *p*-Wert < 0,01

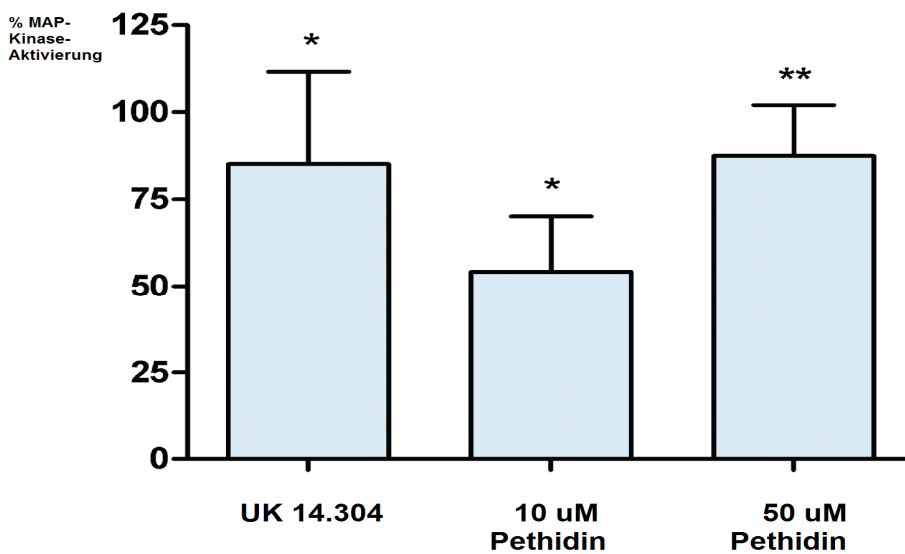
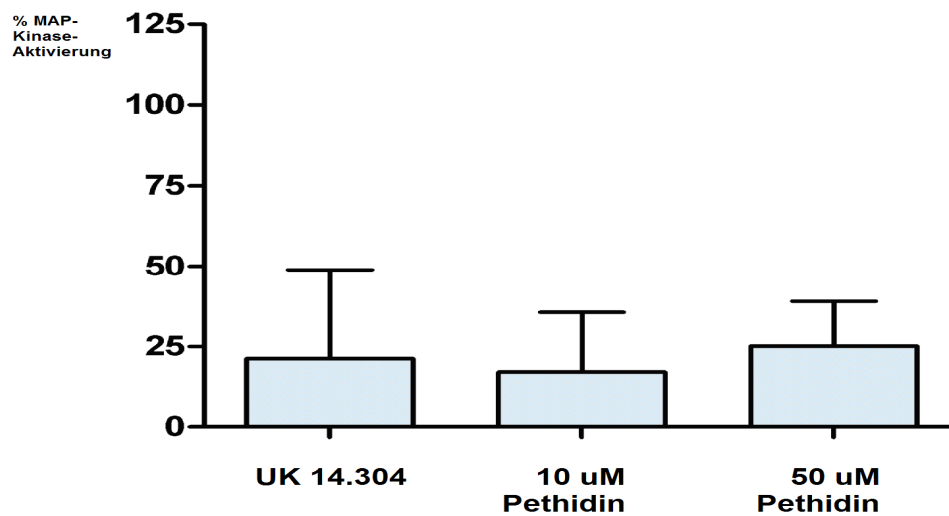


Abbildung 6: Ergebnisse des t-Tests der  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor-vermittelten prozentualen Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14 304 und Pethidin.



Für den Rezeptor  $\alpha_2A$  zeigte sich bei der Prüfung der Signifikanz mittels des t-Tests eine signifikante Zunahme der Aktivierung nur für den bekannten  $\alpha_2$ -Rezeptor-Agonisten UK14.304 (p-Wert < 0,001). Die Zugabe des Opioids Pethidin führte in den Versuchen zu keiner signifikanten Aktivierung.

Die Zunahme der MAP-Kinase-Aktivierung bei dem Rezeptorsubtypen  $\alpha_2B$  war sowohl bei Zugabe von UK14.304 (p-Wert < 0,05) als auch bei Zugabe von 10  $\mu$ M (p-Wert < 0,05) und 50  $\mu$ M Pethidin (p-Wert < 0,01) signifikant.

Bei dem Rezeptor-Subtyp  $\alpha_2C$  kam es in den Versuchen weder durch UK14.304 noch durch Pethidin zu einer signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase.

### 3.2 Aktivierung des $\alpha 2B$ -Adrenozeptors durch UK14.304 und Pethidin

Im folgenden Versuch wurde in einem ersten Schritt die  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase durch 10  $\mu\text{M}$  UK14.304 im zeitlichen Verlauf mit Messungen der Aktivierung nach 15 sec., 30 sec., 1 min. und 2 min. dargestellt.

Im zweiten Schritt wurden bei einer einminütigen Einwirkdauer die Aktivierung durch 10  $\mu\text{M}$  UK14.304 gemeinsam mit 10 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Pethidin gemessen.

Zudem wurden bei einminütiger Einwirkdauer 10 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Pethidin zu dem Rezeptor gegeben und die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase gemessen.

Die Versuche wurden jeweils drei Mal durchgeführt und der Durchschnittswert der Aktivierung ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5:

*Tabelle 5: Prozentuale Angabe der Aktivierung des  $\alpha 2B$ -Rezeptors durch alleinige bzw. gemeinsame Gabe von UK14.304 und Pethidin bei unterschiedlich langer Einwirkdauer.*

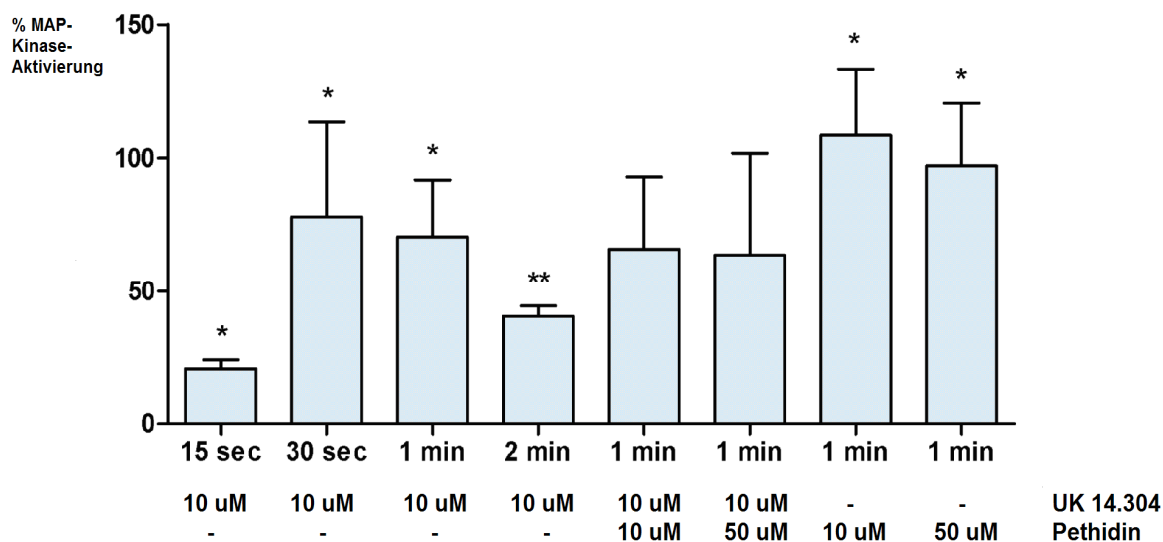
Zeit	UK 14.304	Pethidin	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Durchschnittswert
15 sec.	10 $\mu\text{M}$		14,1%	21,3%	26,3%	<b>20,6%</b>
30 sec.	10 $\mu\text{M}$		145,9%	25,4%	62,5%	<b>77,9%</b>
1 min.	10 $\mu\text{M}$		41,1%	58,4%	111,8%	<b>70,4%</b>
2 min.	10 $\mu\text{M}$		45,4%	32,8%	43,1%	<b>40,4%</b>
1 min.	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	38,7%	39,1%	119,7%	<b>65,8%</b>
1 min.	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	- 0,6%	58,9%	131,9%	<b>63,4%</b>
1 min.		10 $\mu\text{M}$	59,7%	126,1%	139,7%	<b>108,5%</b>
1 min.		50 $\mu\text{M}$	66,2%	11,7%	143,2%	<b>97,0%</b>

Um die Signifikanz der Ergebnisse zu ermitteln, wurde wiederum der t-Test durchgeführt. Der Referenzwert war auch hier die Zunahme der MAP-Kinase-Aktivität bei nicht-stimulierten Zellen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 7.



Abbildung 7: Prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase durch den  $\alpha_2B$ -Adrenozeptor bei Zugabe von UK14.304 und Pethidin und statistische Signifikanz im t-Test.

\*  $p$ -Wert  $< 0,05$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$



Die MAP-Kinase wurde durch Zugabe von UK14.304 im zeitlichen Verlauf signifikant aktiviert ( $p$ -Werte  $< 0,05$  für die Messungen mit 15 sec., 30 sec. und 1 min. Einwirkdauer,  $p$ -Wert  $< 0,01$  bei zweiminütiger Einwirkdauer).

Gemeinsame Gabe von 10  $\mu$ M UK14.304 und 10  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Pethidin führten im Gegensatz zur alleinigen Gabe von 10  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Pethidin ( $p$ -Werte je  $< 0,05$ ) bei gleicher Einwirkdauer zu keiner signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase.

### 3.3 Aktivierung des $\alpha 2C$ -Adrenozeptors durch UK14.304 und Pethidin

Der im vorherigen Abschnitt beschriebene Versuch wurde mit dem Rezeptorsubtyp  $\alpha 2C$  wiederholt.

Zunächst wurde die Aktivierung des  $\alpha 2C$ -Rezeptors durch UK14.304 im zeitlichen Verlauf gemessen. Die Messungen fanden wiederum nach 15 sec., 30 sec., 1 min. und 2 min. statt.

Nachfolgend wurde die Aktivierung nach einminütiger Einwirkdauer bei gemeinsamer Zugabe von 10  $\mu$ M UK14.304 und 10  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Pethidin gemessen.

Im dritten Teil des Versuchs wurde die Aktivierung durch alleinige Gabe von 10  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Pethidin bei ebenfalls einminütiger Einwirkzeit gemessen.

Die Ergebnisse der drei Versuche und die ermittelten Durchschnittswerte sind in Tabelle 6 dargestellt:

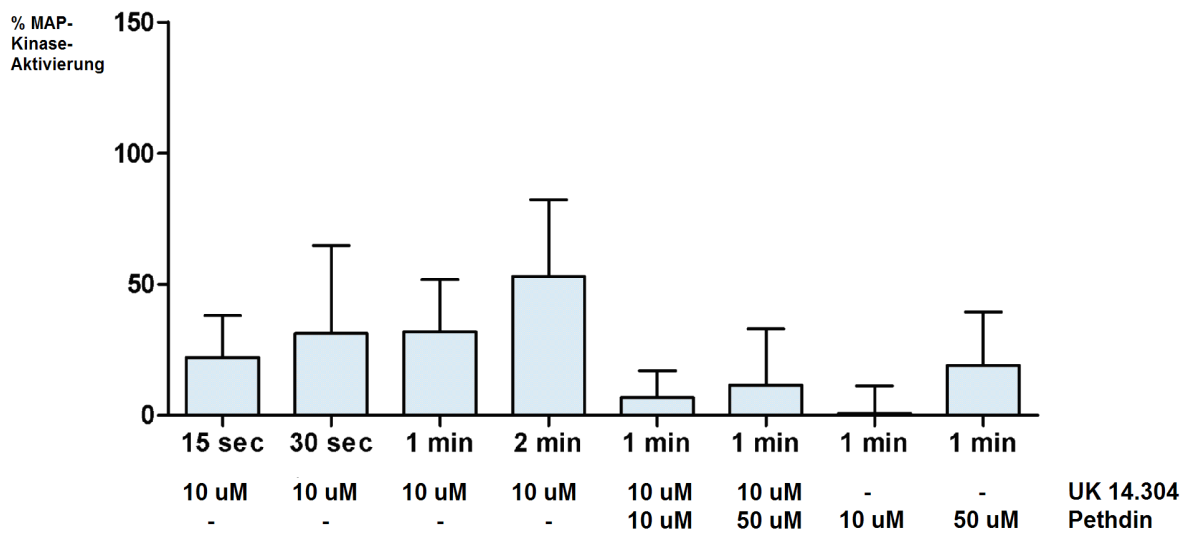
*Tabelle 6: Prozentuale Angabe der Aktivierung des  $\alpha 2C$ -Rezeptors durch alleinige bzw. gemeinsame Gabe von UK14.304 und Pethidin bei unterschiedlich langer Einwirkzeit.*

Zeit	UK 14.304	Pethidin	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Durchschnittswert
15 sec.	10 $\mu$ M		2,9%	53,7%	9,1%	<b>21,9%</b>
30 sec.	10 $\mu$ M		- 5,0%	98,7%	- 0,1%	<b>31,2%</b>
1 min.	10 $\mu$ M		68,6%	25,9%	1,0%	<b>31,9%</b>
2 min.	10 $\mu$ M		108,9%	41,8%	8,0%	<b>52,9%</b>
1 min.	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	- 55%	26,8%	- 0,7%	<b>6,9%</b>
1 min.	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	- 14,1%	54,1%	- 5,6%	<b>11,4%</b>
1 min.		10 $\mu$ M	- 14,4%	21,0%	- 4,4%	<b>0,7%</b>
1 min.		50 $\mu$ M	- 5,5%	59,4%	3,1%	<b>19,0%</b>

Zur Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der t-Test durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase und die Ergebnisse des t-Tests.

Abbildung 8: Prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase durch den  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor bei Zugabe von UK14.304 und Pethidin und statistische Signifikanz im t-Test.



Bei der Messung der  $\alpha_2C$ -Adrenozeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase ergab sich in keinem der Fälle ein statistisch signifikantes Ergebnis. Weder UK14.304 noch Pethidin noch die gemeinsame Gabe der beiden Substanzen führten zu einer signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase.

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob Opioide neben der Bindung an ihre eigenen spezifischen Opioidrezeptoren auch an die drei Subtypen des  $\alpha$ 2-Adrenorezeptors  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C binden und somit eventuell einen Teil ihrer Effekte über diese Rezeptoren vermitteln.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass das Opioid Pethidin in HEK293-Zellen an den  $\alpha$ 2B-Adrenorezeptor bindet und diese Bindung zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führt.

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um einen Vergleichswert für die  $\alpha$ 2-Adrenorezeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase durch das Opioid Pethidin zu erhalten, wurde in einem ersten Schritt die Aktivierung der MAP-Kinase durch den bekannten Subtyp-unspezifischen  $\alpha$ 2-Adrenorezeptor-Agonisten UK14.304 gemessen. Hierzu wirkten je 10  $\mu$ M UK14.304 drei Minuten lang auf mit Plasmiden für die drei Rezeptorsubtypen  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C transfizierte HEK293-Zellen ein. Nachfolgend wurde die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase bestimmt. In den Versuchen ergab sich bei den mit dem  $\alpha$ 2A-Adrenorezeptor transfizierten Zellen mit durchschnittlich 214,6% eine deutliche Aktivierung der MAP-Kinase ( $p < 0,001$ ). Die  $\alpha$ 2B-Adrenorezeptor-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung unterschied sich mit durchschnittlich 85,2% ebenfalls signifikant von den Kontrollwerten ( $p < 0,05$ ). Mit einer durchschnittlichen Aktivierung von 21,3% konnte keine signifikante  $\alpha$ 2C-Adrenorezeptor-vermittelte Aktivierung gemessen werden.

Im zweiten Schritt wirkten 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Pethidin je drei Minuten auf die mit den Rezeptorsubtypen transfizierten Zellen ein. Die nachfolgend gemessene prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase war in den durchgeführten Versuchen nur im Falle des  $\alpha$ 2B-Adrenorezeptors im t-Test positiv. Hier kam es sowohl bei Zugabe von 10  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ) als auch bei Zugabe von 50  $\mu$ M Pethidin ( $p < 0,01$ ) zu einer statistisch signifikanten Aktivierung. Für den  $\alpha$ 2A-Adrenorezeptor konnte keine statistisch signifikante Aktivierung der MAP-Kinase durch Pethidin gemessen werden. Die Bindung an den  $\alpha$ 2C-Adrenorezeptor führte zwar zu einer Aktivitätssteigerung der MAP-Kinase, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

In den folgenden beiden Versuchen wurde zunächst die MAP-Kinase-Aktivierung durch die Rezeptor-Subtypen  $\alpha 2B$  und  $\alpha 2C$  bei gemeinsamer Gabe von UK14.304 und Pethidin gemessen. In beiden Fällen konnte keine signifikante Aktivierung der MAP-Kinase nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Aktivierung der MAP-Kinase bei nur einminütiger Einwirkdauer von 10  $\mu M$  und 50  $\mu M$  Pethidin gemessen. Hierbei kam es wiederum bei dem  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor zu einem signifikanten Anstieg der MAP-Kinase-Aktivierung ( $p < 0,05$ ), während bei dem  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor keine signifikante Veränderung gemessen wurde.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur**

### **4.2.1 $\alpha 2$ -Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase durch UK14.304**

Um einen Vergleichswert für die später zu messende prozentuale Aktivierung der  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase zu haben, wurde zunächst die Aktivierung durch Zugabe von 10  $\mu M$  des bekannten Subtyp-unspezifischen  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten UK14.304 gemessen.

Für den  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor wurde eine dreiminütige Einwirkdauer gewählt. Dieser Wert hatte sich in vorangegangenen Versuchen im Labor als Zeitpunkt der maximalen Aktivierung der MAP-Kinase gezeigt. Wie zu erwarten, konnte eine statistisch signifikante Zunahme in der Aktivierung der MAP-Kinase gemessen werden.

DeGraff *et al.* beschrieben eine maximale Aktivierung der p42/p44-MAP-Kinase zwischen der fünften und dreißigsten Minute nach Zugabe von 10  $\mu M$  UK14.304 (DeGraff *et al.*, 1999). In dieser Studie wurde die MAP-Kinase-Aktivierung allerdings in fünfminütigen Abständen gemessen. Somit wurde keine Aussage über die Aktivierung nach drei Minuten gemacht.

Da die Schnelligkeit der maximalen MAP-Kinase-Aktivierung vom verwendeten Zelltyp abhängt, könnte das leicht verzögerte Maximum der Aktivierung bei DeGraff *et al.* durch die Verwendung von COS-1-Zellen begründet sein. In der vorliegenden Arbeit wurden anstelle der COS-1-Zellen HEK293-Zellen verwendet.

Weiterhin spielen die Transfektionsrate und das verwendete Expressionsplasmid eine Rolle.

Um die UK14.304-vermittelte Aktivierungszunahme der MAP-Kinase der drei  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren miteinander vergleichen zu können, wurde als erster Schritt auch bei den Adrenozeptoren  $\alpha 2B$  und  $\alpha 2C$  eine dreiminütige Einwirkdauer des Agonisten gewählt. Im

nächsten Versuchsschritt wurde die Einwirkdauer zwischen 15 sec. und 2 min. variiert, um den prozentualen Anstieg der MAP-Kinase-Aktivierung im zeitlichen Verlauf darzustellen.

Unabhängig von der Einwirkdauer von UK14.304 vermittelte der  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor eine statistisch signifikante Zunahme der MAP-Kinase-Aktivierung mit einem Maximum nach drei Minuten. Die durchschnittliche Aktivierung lag allerdings stets unter den Ergebnissen der durchschnittlichen  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor-vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung. Die Ursache hierfür könnte sein, dass UK14.304 mit einer höheren Potenz an den  $\alpha 2A$ - als an den  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor bindet (Jansson *et al.*, 1999).

Da UK14.304 allerdings als Subtyp-unspezifischer  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonist gilt, liegt die Ursache der geringeren Aktivierung wohl eher in zell-spezifischen Eigenschaften oder in Unterschieden der Transfektionsrate der Zellen mit den verschiedenen Rezeptorsubtypen. Es ist nicht auszuschließen, dass der  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor in geringerer Anzahl als der  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor exprimiert wurde.

Auch durch Bindung von UK14.304 an den  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor kam es im zeitlichen Verlauf durchschnittlich zu einer leichten Zunahme der vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung. Das Maximum lag hier bei zwei Minuten. Obwohl UK14.304 die MAP-Kinase eigentlich auch über den  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor aktivieren müsste, waren die gemittelten Ergebnisse in den durchgeführten Versuchen statistisch nicht signifikant.

#### **4.2.2 Agonistische Wirkung eines Opioids am $\alpha 2$ -Rezeptor**

Paris *et al.* untersuchten 2003 die Frage, ob das i.v.-Anästhetikum Etomidat aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten auch mit den  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren interagiert. Sie konnten zeigen, dass Etomidat neben der Bindung an weitere Rezeptoren auch als  $\alpha 2$ -Agonist wirkt. Dies zeigt sich *in vivo* hauptsächlich in dem über den  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor-vermittelten Anstieg des Blutdrucks. Dies könnte der Grund für die kardio-vaskuläre Stabilität der Patienten nach Narkoseinduktion mit Etomidat sein (Paris *et al.*, 2003).

Da mit Etomidat ein nicht  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-spezifischer Wirkstoff einen Teil seiner Effekte über die  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren hervorruft, stellt sich die Frage, ob auch weitere Stoffe dazu in der Lage sind. Bekannt ist, dass sich Opiode und  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten teilweise in ihrer Wirkung ergänzen. Ossipov *et al.* beschrieben 1990 einen synergistischen bzw. in

Abhängigkeit von der Art der Verabreichung der Substanzen einen additiven Effekt von Clonidin und Opiaten in der Antinozizeption (Ossipov *et al.*, 1990). Auch die gleichzeitige Aktivierung von Opioid-Rezeptoren und  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren in spinalen Neuronen von Mäusen führt zu einer synergistischen Antinozizeption (Roerig, 1995).

In der Anästhesie findet dieser synergistische Effekt von  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten und Opioiden Anwendung. Allerdings sind die genauen Mechanismen dieses Synergismus bislang weitgehend unbekannt. Sie genau zu kennen, ist jedoch von Bedeutung, um spezifische Narkotika mit geringeren Nebenwirkungen entwickeln zu können.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Opioide ebenfalls als Agonisten an den  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Subtypen wirken und die MAP-Kinase aktivieren können. Um eine Aussage hierüber treffen zu können, wurde das bereits oben beschriebene Experiment mit dem Opioid Pethidin an Stelle von UK14.304 durchgeführt. Pethidin bindet eigentlich an den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor und wird klinisch als Analgetikum verwendet.

Nach einer dreiminütigen Einwirkdauer von 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Pethidin auf HEK 293-Zellen, die zuvor mit den Adrenozeptoren  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  und  $\alpha 2C$  transfiziert worden waren, wurde wiederum die prozentuale Aktivierung der MAP-Kinase gemessen.

Der  $\alpha 2A$ -Adrenozeptor wurde in den durchgeführten Versuchen nicht signifikant durch Pethidin aktiviert. Im Vergleich zu dem gemessenen Referenzwert kam es in diesen Versuchen sogar zu einem Abfall der Aktivierung der MAP-Kinase um durchschnittlich 10,5% bei 10  $\mu$ M Pethidin und um 17,5% bei 50  $\mu$ M Pethidin. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weiterführende Versuche mit einminütiger Einwirkdauer von Pethidin und gemeinsamer Gabe von UK14.304 und Pethidin mit diesem Rezeptorsubtyp nicht durchgeführt.

Auch die Zugabe von Pethidin zum  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor führte zu keiner signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase. Zwar konnte im Gegensatz zum Referenzwert eine leichte Steigerung der Aktivität um durchschnittlich 17,0% bei der Zugabe von 10  $\mu$ M Pethidin und um 25,1% bei 50  $\mu$ M Pethidin gemessen werden, diese war jedoch im t-Test statistisch nicht signifikant. Aufgrund dieses geringen Anstiegs der MAP-Kinase-Aktivierung ließ sich nicht ausschließen, dass das Maximum der Aktivierung des  $\alpha 2C$ -Adrenozeptors durch Pethidin im zeitlichen Verlauf früher erfolgt. Daher wurde nachfolgend noch die  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung nach einminütiger Einwirkdauer von 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Pethidin gemessen. Auch diese Ergebnisse waren trotz geringer Zunahme der Aktivierung im Mittelwert statistisch nicht signifikant.

DeGraff *et al.* (1999) zeigten in ihrer Studie prozentual ein vergleichbares Ausmaß der MAP-Kinase-Aktivierung durch alle drei Subtypen des  $\alpha 2$ -Adrenozeptors. Es liegt somit nahe, dass diese auch durch den  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor aktiviert wird (DeGraff *et al.*, 1999). Daher ist davon auszugehen, dass unsere Versuche für die Interaktion am  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor nicht repräsentativ sind. Ursachen hierfür könnten wiederum die mangelnde Expression des Plasmids, bzw. die verwendete Zelllinie sein. Daher kann noch keine definitive Aussage darüber getroffen werden, wie Pethidin auf den  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor wirkt.

Bei dem  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor konnte eine durchschnittliche Zunahme der Aktivierung der MAP-Kinase um 54,2% bei Zugabe von 10  $\mu$ M Pethidin und um 87,4% bei Zugabe von 50  $\mu$ M Pethidin gemessen werden. Beide Ergebnisse erwiesen sich im t-Test als statistisch signifikant ( $p < 0,05$  für 10  $\mu$ M Pethidin,  $p < 0,01$  für 50  $\mu$ M Pethidin). Auch bei einminütiger Einwirkdauer von 10  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Pethidin kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der MAP-Kinase-Aktivierung ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen insgesamt mit denen von Takada *et al.* (2002) überein. In seiner Studie wurde die agonistische Wirkung von Meperidin auf die  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren in COS-7-Zellen anhand der nachfolgenden Senkung des Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) intrazellulär bestimmt. Takada konnte zeigen, dass Meperidin in klinischen Dosierungen ein potenter Agonist an den  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren mit höchster Affinität für den  $\alpha 2B$ -Adrenozeptor-Subtyp ist (Takada *et al.*, 2002). Allerdings ist zu beachten, dass cAMP ein ubiquitärer Second Messenger ist. Das Absinken des intrazellulären Spiegels kann somit auch auf anderen Mechanismen beruhen und muss nicht spezifisch für die Aktivierung von  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren sein. Außerdem ist bekannt, dass die Modulation des cAMP-Spiegels in Abhängigkeit des Subtyps der  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren und des an den Rezeptor bindenden Liganden unterschiedlich stark stattfindet (Rudling *et al.*, 2000). Somit erlaubt das Ausmaß des Absinkens des cAMP-Spiegels keine allgemeine Aussage über die Affinität des Liganden an den Rezeptor.

In den letzten Jahren hat sich der MAP-Kinase-Assay als Standardmethode für die Darstellung von  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-vermittelten intrazellulären Prozessen etabliert. Daher wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit verwendet. Ziel war nachzuweisen, dass die agonistische Wirkung des Opioids Pethidin tatsächlich durch  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren und nicht durch andere Rezeptoren vermittelt wird.



### 4.2.3 $\alpha$ 2-Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase bei gemeinsamer Applikation von UK14.304 und Pethidin

Zuletzt stellt sich die Frage nach der MAP-Kinase-Aktivierung bei gemeinsamer Zugabe von UK14.304 und Pethidin. Um hierzu eine Aussage treffen zu können, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. In dieser wurde die durch die Adrenozeptor-Subtypen  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase nach gemeinsamer Applikation von je 10  $\mu$ M UK14.304 und 10  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Pethidin bei einer einminütigen Einwirkdauer gemessen. Auch hier wurden mehrere Wiederholungen des Versuchsprotokolls durchgeführt.

Die gewählte einminütige Einwirkdauer begründet sich darin, dass die Wirkstoffkonzentration durch die gemeinsame Zugabe von UK14.304 und Pethidin insgesamt höher war, als in den zuvor durchgeführten Experimenten. Somit kann man erwarten, dass es schneller zu einer maximalen Aktivierung der MAP-Kinase kommt.

Weder bei Aktivierung des  $\alpha$ 2B-Adrenozeptors noch bei Aktivierung des  $\alpha$ 2C-Adrenozeptors konnten statistisch signifikante Ergebnisse gemessen werden. Die Erklärung hierfür kann zum einen sein, dass eventuell eine höhere Anzahl an Experimenten notwendig gewesen wäre, um statistische Unterschiede zu detektieren. Zum anderen kann aber auch wegen der gleichzeitigen Zugabe von UK14.304 und Pethidin die sehr hohe Konzentration an Agonisten zu einer Überaktivierung und damit einer nachfolgenden Verminderung der über den Rezeptor vermittelten Signalantwort geführt haben.

Für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zu denen die  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren gehören, sind drei Wege beschrieben, wie dies möglich sein kann: Zum einen kommt es durch Stimulation zur sogenannten Desensibilisierung von Rezeptoren. Dies bedeutet, dass sie nach initialer Aktivierung ihre Fähigkeit, auf Agonisten zu antworten, verlieren und refraktär werden. Ebenso kann durch Endozytose einzelner Rezeptoren oder durch das Herunterregulieren der gesamten zellulären Rezeptoranzahl ihre Anzahl auf der Zelloberfläche abnehmen (Krupnick *et al.*, 1998; Ferguson, 2001).

Die Desensibilisierung ist auch speziell für die  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren als ein Weg der Rezeptorregulation beschrieben worden. Hier zeigen sich jedoch Subtyp-abhängige Unterschiede: So ist das Ausmaß der Desensibilisierung bei den  $\alpha$ 2A- und  $\alpha$ 2B-Adrenozeptoren größer als bei den  $\alpha$ 2C-Adrenozeptoren (Eason and Liggett, 1992a, 1993).

Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, dass UK14.304 als spezifischer  $\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonist stärker an die Rezeptoren bindet als das Opioid Pethidin. In der Abbildung 7 zeigt sich bei gemeinsamer Gabe von UK14.304 und Pethidin eine fast gleich starke Aktivierung

wie bei der alleinigen Gabe von UK14.304. Dies lässt darauf schließen, dass in dieser Versuchsreihe aufgrund der stärkeren Bindung nur die Aktivierung des Rezeptors durch UK14.304 gemessen wurde und die Signifikanz knapp verfehlt wurde.

### **4.3 Limitationen dieser Arbeit**

Auch wenn diese Arbeit wie oben diskutiert zu vergleichbaren Ergebnissen wie andere Studien führte, sollen ihre Limitationen nicht unerwähnt bleiben.

Der Hauptkritikpunkt liegt sicherlich in der Anzahl der durchgeführten Experimente. Mit jeweils drei bzw. vier Wiederholungen jeder Versuchsreihe ist es schwierig, einen aussagekräftigen Mittelwert der Ergebnisse zu bilden. Die Schwankungen der Ergebnisse wären bei häufigeren Wiederholungen voraussichtlich geringer ausgefallen und es hätte sich eine deutlichere Tendenz des Durchschnittswerts, vor allem bei den Versuchen zum  $\alpha 2C$ -Adrenozeptor, gezeigt.

Zweitens kann es im Rahmen der Versuchsdurchführung zu unterschiedlichen Transfektionsraten gekommen sein. Zwar wurden die Transfektionsraten der Transfektionskontrollen jeweils fluoreszenzmikroskopisch überprüft, dies ist jedoch eine subjektive Beurteilung. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass sich die Transfektionsraten der einzelnen Versuche unterschieden haben, was die Schwankungen der Ergebnisse erklären könnte.

Drittens kann der Serum-Entzug, der zu einer Synchronisation der Zellzyklen und somit zu einer Verstärkung der zu beobachtenden Effekte hätte führen sollen, nicht ausreichend gewesen sein – entweder, weil die zeitliche Dauer von 24 Stunden zu kurz war oder, weil auch das „Hungermedium“ noch 0,5% FBS enthielt.

Als letzten Punkt lässt sich kritisieren, dass zusätzlich zu den gemessenen Aktivierungen der MAP-Kinase durch Pethidin und UK14.304 kein Kontrollwert wie zum Beispiel die Aktivierung der MAP-Kinase durch NaCl gemessen wurde.

## 5. Zusammenfassung

Den drei Subtypen der  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren kommt eine Schlüsselrolle bei der Steuerung zahlreicher zentraler und peripherer Prozesse zu. Sie greifen in eine Vielzahl von Neurotransmittersystemen und Stoffwechselwegen ein, von denen einige in dieser Arbeit genannt sind.

$\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten werden im klinischen Alltag in der Anästhesiologie häufig eingesetzt, da sie eine Reihe an Vorteilen aufweisen. Sie verbessern unter anderem die hämodynamische Stabilität in der perioperativen Phase und während der endotrachealen Intubation, vermitteln Analgesie, Sedation und Anxiolyse, vermindern das Risiko des Auftretens von postoperativem Muskelzittern und senken postoperativ den Bedarf an Opioiden. Dieser Synergismus lässt vermuten, dass eine Interaktion zwischen  $\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten und Opioiden besteht. Aus früheren Studien ist bekannt, dass das Anästhetikum Etomidat einen Teil seiner Effekte über die  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren vermittelt.

In dieser Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob Pethidin als ein Vertreter der Opioiden ebenfalls in der Lage ist, an  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren zu binden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den drei Subtypen des  $\alpha$ 2-Adrenozeptors  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C transfiziert und die Aktivierung der MAP-Kinase durch diese Rezeptoren nach Bindung des bekannten  $\alpha$ 2-Adrenozeptor-Agonisten UK14.304 als Referenzwert, nach Bindung des Opioids Pethidin allein und nach gemeinsamer Zugabe von UK14.304 und Pethidin gemessen.

Wie zu erwarten führte die Zugabe von UK14.304 bei  $\alpha$ 2A- und  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor-exprimierenden Zellen zu einer im t-Test signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase. Für den  $\alpha$ 2C-Adrenozeptor konnte zwar eine Zunahme der Aktivierung gemessen werden, welche statistisch jedoch nicht signifikant war.

Die alleinige Gabe von Pethidin zum  $\alpha$ 2A-Adrenozeptor führte bei dreiminütiger Einwirkdauer im Vergleich zu UK14.304 zu keiner messbaren Aktivierung. Daher wurden keine weiteren Versuche mit diesem Rezeptor-Subtyp durchgeführt.

Die Bindung von Pethidin an den  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor führte zu einem signifikanten Anstieg der Aktivierung der MAP-Kinase, also zu der Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs über diesen Rezeptor. Dies legt nahe, dass Pethidin auch *in vivo* einen Teil seiner Effekte über den  $\alpha$ 2B-Adrenozeptor vermittelt.

Auch konnte eine Bindung an den  $\alpha$ 2C-Adrenozeptor nachgewiesen werden, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei gemeinsamer Gabe von UK14.304 und Pethidin zu den Adrenozeptoren  $\alpha$ 2B und  $\alpha$ 2C wurde ebenfalls eine Aktivierung der MAP-Kinase gemessen. Da diese jedoch in etwa dem

Ausmaß der Aktivierung bei alleiniger Gabe von UK14.304 entsprach, ist zu vermuten, dass UK14.304 mit höherer Affinität an den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor bindet und daher nur dieser Effekt gemessen wurde.

Auch für Morphin ist nachgewiesen, dass es mit höherer Affinität an den  $\alpha_{2B}$ - als an den  $\alpha_{2A}$ - und den  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor bindet. Daher stellt sich die Frage, ob dies für alle klinisch genutzten Opioide zutrifft. Ein anderer Punkt, der weiterer Forschung bedarf, ist die Frage, welche Wirkung der Opioide durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelt wird. Insbesondere ist von Interesse, ob die analgetische Wirkung, bei der ein synergistischer Effekt von Opioid-Rezeptoren und dem  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor beschrieben ist, oder die Verhinderung des postoperativen Zitterns betroffen sind.

Die detaillierte Kenntnis dieser Interaktionen, sowohl zwischen Opioiden und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren als auch zwischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren und weiteren Substanzen bzw. Neurotransmittersystemen, kann dazu führen, dass zukünftig noch nebenwirkungsärmere Medikamente entwickelt werden können, die dem Wohl der Patienten zugute kommen und das heutzutage schon geringe Risiko einer Narkose noch weiter senken.

## Literaturverzeichnis

Ahlquist, R.P. (1948): A study of the adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology*, 153, 586-600

Baldwin, J.M., Schertler, G.F.X., Unger, V.M. (1997): An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *Journal of Molecular Biology*, 272, 144-164

Beck-Sickinger, A.G. (1996): Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *Drug Discovery Today*, 1, 502-513.

Bhattacharya, B., Roberts, R.E. (2003): Enhancement of  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated vasoconstriction by the thromboxane-mimetic U46619 in the porcine isolated ear artery: role of the ERK–MAP kinase signal transduction cascade. *British Journal of Pharmacology*, 139, 156–162

Blaxall, H.S., Heck, D.A., Bylund, D.B. (1993): Molecular determinants of the alpha2D-adrenergic receptor subtype. *Life Sciences*, 53, 255-259

Burt, A.R., Sautel, M., Wilson, M.A., Rees, S., Wise, A., Milligan, G. (1998): Agonist occupation of an  $\alpha_2A$ -adrenoreceptor-Gi1a fusion protein results in activation of both receptor-linked and endogenous Gi proteins: Comparisons of their contributions to GTPase activity and signal transduction and analysis of receptor-G protein activation stoichiometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 10367–10375

Chabre, O., Conklin, B.R., Brandon, S., Bourne, H.R., Limbird, L.E. (1994): Coupling of the  $\alpha_2A$ -adrenergic receptor to multiple G-proteins: A simple approach for estimating receptor-G-protein coupling efficiency in a transient expression system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 5730-5734

Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995): How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.*, 270, 14843-14846

Coupry, I., Duzic, E., Downing, S., Lanier, S.M. (1992): Factors determining the specificity of signal transduction by guanine nucleotide-binding protein-coupled receptors. II. Preferential coupling of the  $\alpha_2C$ -adrenergic receptor to the guanine nucleotide-binding protein, Go. *J. Biol. Chem.*, 267, 9852–9857

Daunt, D. A., Hurt, C., Hein, L., Kallio, J., Feng, F., Kobilka, B. K. (1997): Subtype-specific Intracellular Trafficking of  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptors. *Mol. Pharmacol.*, 51, 711–720

DeGraff, J.L., Gagnon, A.W., Benovic, J.L., Orsini M.J. (1999): Role of arrestins in endocytosis and signaling of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 11253-11259

Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D.K., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997): Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-Mediated pathways on Calcium/Calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 19125–19132

Docherty, J.R. (1998): Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 361, 1-15

Eason, M. G., Liggett, S. B. (1992a): Subtype-selective desensitization of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, 267, 25473–25479

Eason, M.G., Kurose, H., Holt, B.D., Raymond, J.R., Liggett, S.B. (1992b): Simultaneous coupling of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects: subtype-selective coupling of  $\alpha_2C_{10}$ ,  $\alpha_2C_4$ , and  $\alpha_2C_2$  adrenergic receptors to Gi and Gs. *J. Biol. Chem.*, 267, 15795–15801

Eason, M.G., Liggett, S.B. (1993): Functional  $\alpha_2$ -adrenergic receptor-Gs coupling undergoes agonist-promoted desensitization in a subtype-selective manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 318 –323

Eason, M.G., Jacinto, M.T., Liggett, S.B. (1994): Contribution of ligand structure to activation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype coupling to Gs. *Mol. Pharmacol.*, 45, 696–702

Eason, M.G., Liggett, S.B. (1996): Chimeric mutagenesis of putative G-protein coupled domains of the adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12826-12832

Fairbanks, C.A., Stone, L.S., Kitto, K.F., Nguyen, H.O., Posthumus, I.J., Wilcox, G.L. (2002):  $\alpha_2$ -adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300, 282–290

Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Bourne, H.R. (1994): cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem.*, 269(11), 7851-4

Ferguson, S.S. (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signalling. *Pharmacol. Rev.*, 53, 1–24

Flordellis, C.S., Berguerand, M., Gouache, P., Barbu, V., Gavras, H., Handy, D.E., Bereziat, G., Masliah, J. (1995): Alpha2 adrenergic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells activate differentially mitogen-activated protein kinase by a p21ras independent pathway. *J Biol Chem*, 270, 3491-3494

Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995): Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 17148-17153

Höcker, J., Weber, B., Tonner, P.H., Scholz, J., Brand, P.A., Ohnesorge, H., Bein, B. (2008): Meperidine, remifentanyl and tramadol but not sufentanyl interact with alpha(2)-adrenoceptors in alpha(2A)-, alpha(2B)- and alpha(2C)-adrenoceptor knock out mice brain. *Eur J Pharmacol.*; 582(1-3):70-7

Hoffman, W.E., Cheng, M.A., Thomas, C. et al. (1991): Clonidine decreases plasma catecholamines and improves outcome from incomplete ischemia in the rat. *Anesth Analg*, 73, 460–4

Hunter, J.C., Fontana, D.J., Hedley, L.R., Jasper, J.R., Lewis, R., Link, R.E., Secchi, R., Sutton, J., Eglen, R.M. (1997): Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol*, 122, 1339–1344

Janumpalli, S., Butler, L.S., MacMillan, L.B., Limbird, L.E., McNamara, J.G. (1998): A point mutation (D79N) of the  $\alpha$ 2A adrenergic receptor abolishes the antiepileptogenic action of endogenous norepinephrine. *J Neurosci*, 18, 2004–2008

Jansson, C.C., Pohjanoska, K., Lang, J., Wurster, S., Savola, J.M., Scheinin, M. (1999): Alpha2-adrenoceptor agonists stimulate high affinity GTPase activity in a subtype-selective manner. *Eur J Pharmacology*, 374(1), 137-46

Jinsi, A., Paradise, J., Deth, R.C. (1996): A tyrosine kinase regulates alpha-adrenoceptor-stimulated contraction and phospholipase D activation in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 302, 183–190

Kobilka, B.K., Matusi, H., Kobilka, T.S., et al. (1987): Cloning, sequencing and expression of the gene coding for human platelet alpha2-adrenergic receptor. *Science*, 238, 650-656

Kobilka, B.K. (1992): Adrenergic receptors as models for G-protein-coupled receptors. *Annual Review Neuroscience*, 15, 87-114

Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., Lefkowitz, R.J. (1994): Direct evidence that Gi-receptor coupled stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 12706–12710

Kribben, A., Herget-Rosenthal, S., Lange, B., Erdbrugger, W., Philipp, T., Michel, M.C. (1997):  $\alpha$ 2-Adrenoceptors in opossum kidney cells couple to stimulation of mitogen-activated protein kinase independently of adenylyl cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 356, 225 - 232

Krupnick, J.G., Benovic, J.L. (1998): The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 289–319



Kurose, H., Regan J.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991): Functional interactions of recombinant  $\alpha_2$  adrenergic receptor subtypes and G proteins in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 30, 3335–3341

Lakhlani, P.P., Macmillan, L.B., Guo, T.Z., McCool, B.A., Lovinger, D.M., Maze, M., Limbird, L.E. (1997): Substitution of a mutant  $\alpha_2$ -adrenergic receptor via hit and run gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 9950–9955

Langer, S.Z. (1974): Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochemical Pharmacology*, 23, 1793-1800

Lanier, S.M., Downing, S., Duzic, E., Homca, C.J. (1991): Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the  $\alpha_2$ - adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 10470-10478

Limbird, L.E. (1988): Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J.*, 2, 2686–2695

Link, R., Daunt, D., Brash, G., et al. (1992): Cloning of two mouse genes encoding  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in mouse  $\alpha_2$ -C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Molecular Pharmacology*, 42, 16-27

Link, R.E., Desai, K., Hein, L., Stevens, M.E., Chruscinski, A., Bernstein, D., Barsh, G.S., Kobilka, B.K. (1996): Cardiovascular regulation in mice lacking subtypes b and c. *Science*, 273, 803-5

Löffler und Petrides (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer Verlag Berlin, S.803

Lomasney, J.W., Lorenz, W., Allen, L.F., et al. (1990): Expansion of the alpha2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha2-adrenergic subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87, 5094-5098

Ma, D., Hossain, M., Rajakumaraswamy, N., Arshad, M., Sanders, R.D., Franks, N.P., Maze, M. (2004): Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2A-adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol.*, 502(1-2), 87-97

MacDonald, E., Kobilka, B.K., Scheinin, M. (1997): Gene targeting—homing in on alpha 2-adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 211–219

MacKinnon, A.C., Spedding, M., Brown, C.M. (1994): alpha2-Adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15, 119-123

MacMillan, L.B., Hein, L., Smith, M.S., Piascik, M.T., Limbird, L.E. (1996): Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science (Wash DC)*, 273, 801–803

MacNulty, E.E., McClue, S.J., Carr, I.C., Jess, T., Wakelam, M.J., Milligan G. (1992): Alpha 2-C10 adrenergic receptors expressed in rat 1 fibroblasts can regulate both adenylylclase and phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine by interacting with pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem*, 267, 2149-2156

Makaritsis, K.P., Handy, D.E., Johns, C., Kobilka, B., Gavras, I., Gavras, H. (1999): Role of the alpha2B-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension*, 33, 14–17

Michel, A., Loury, D.N., Whiting, R.L. (1989): Differences between the alpha2-adrenoceptor in rat submaxillary gland and the alpha2A- and alpha2B-adrenoceptors subtypes. *British Journal of Pharmacology*, 98, 890-897

Millan, M.J., Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Cussac, D., Lejeune, F., Nicolas, J.P., Cogé, F., Galizzi, J.P., Boutin, J.A., Rivet, J.M., Dekeyne, A., Gobert, A. (2000): Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha(2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)(1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D(2) and D(3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. *Synapse*, 35(2), 79-95

Miller, R.J. (1998): Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 201-227

Müller, Norbert, Strobach, Dorothea (2005): Depressionen – Krankheitsbilder und Theorie, Govi-Verlag Eschborn, S.53

Nicholas, A.P., Pieribone, V., Hökfelt, T. (1993): Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol*, 328, 575–594

Ossipov, M.H., Harris, S., Lloyd, P., Messineo, E. (1990): An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of systemically and intrathecally administered combinations of clonidine and opiates. *J Pharmacol Exp Ther.*, 255(3), 1107-16

Paris, A., Phillip, M., Tonner, P.H., Steinfath, M., Lohse, M., Scholz, J., Hein, L. (2003): Activation of  $\alpha$ 2b-adrenoceptors mediates the cardiovascular effects of etomidate. *Anesthesiology*, 99, 889-95

Paris, A., Mantz, J., Tonner, P.H., Hein, L., Brede, M., Gressens, P. (2006): The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the  $\alpha$ 2A-adrenoceptor subtype. *Anesth Analg*, 102, 456 –61

Piascik, M.T., Soltis, E.E., Piascik, M.M., MacMillan, L.B. (1996): alpha-Adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacology and Therapeutics*, 72, 215-241

Piper, S.N., Maleck, W.H., Boldt, J., Suttner, S.W., Schmidt, C.C., Reich, D.G.P. (2000): A comparison of urapidil, clonidine, meperidine and placebo in preventing postanesthetic shivering. *Anesthesia and Analgesia*, 90, 954-957

Pohjanoksa, K., Jansson, C.C., Luomala, K., Marjamäki, A., Savola, J.M., Scheinin, M. (1997): Alpha2-adrenoceptor regulation of adenylyl cyclase in CHO cells: dependence on receptor density, receptor subtype and current activity of adenylyl cyclase. *Eur J Pharmacol.*, 335(1), 53-63.

Regan, J.W., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.S., et al. (1988): Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha2-adrenergic receptor subtype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85, 6301-6305

Roberts, R.E. (2001): Role of the extracellular signal-regulated kinase (Erk) signal transduction cascade in  $\alpha_2$  adrenoceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein. *British Journal of Pharmacology*, 133, 859-866

Roerig, S.C. (1995): Decreased spinal morphine/clonidine antinociceptive synergism in morphine-tolerant mice. *Life Sci.*, 56(5), PL115-22

Rohrer, D.K., Kobilka, B.K. (1998): Insights from in vivo modification of adrenergic receptor gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38, 351-373

Rudling, J.E., Richardson, J., Evans, P.D. (2000): A comparison of agonist-specific coupling of cloned human  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *British Journal of Pharmacology*, 131, 933-941

Ruffolo, R.R., Nichols, A.J. Jr., Stadel, J.M., Hiebel, J.P. (1991): Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacological Reviews*, 43, 475-505

Sallinen, J., Link, R.E., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kulatunga, M., Sjöholm, B., MacDonald, E., Pelto-Huikko, M., Leino, T., Barsh, G.S., et al. (1997): Genetic alteration of  $\alpha_2C$ -adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonspecific  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist. *Mol Pharmacol*, 51, 36-46

Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B.K., Scheinin, M. (1998a): Adrenergic alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci*, 18, 3035–3042

Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B.K., Scheinin, M. (1998b): D-amphetamine and L-5-hydroxytryptophan-induced behaviours in mice with genetically-altered expression of the alpha2C-adrenergic receptor subtype. *Neuroscience*, 86, 959–965

Scheinin, M., Lomasney, J.W., Hayden-Hixson, D.M., Schambra, U.B., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Freneau Jr, R.T. (1994): Distribution of a2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 21, 133–149

Simonneaus, V., Ebadi, M., Bylund, D.B. (1991): Identification and characterization of the alpha2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Molecular Pharmacology*, 40, 235-241

Small, K.M., Forbes, S.L., Rahman, F.F., Bridges, K.M., Liggett, S.B. (2000): A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human a2C-adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 23059–23064

Small, K.M., Brown, K.M., Forbes, S.L., Liggett, S.B. (2001): Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the a2B-adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 4917–4922

Small, K.M., Liggett, S.B. (2001): Identification and functional characterization of alpha(2)-adrenoceptor polymorphisms. *Trends Pharmacol Sci.*, 22(9), 471-7

Small, K.M., McGraw, D.W., Liggett, S.B. (2003): Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 43, 381-411

Stähle, H. (2000): A historical perspective: development of clonidine. In: van Aken, H., Scholz, J., Tonner, P.H. (Hrsg.) *Baillière's Clinical Anaesthesiology*, Bd. 14, 2. 237-246  
London, Großbritannien

Starke, K., Endo, T., Taube, H.D. (1974): Relative pre- and postsynaptic potencies of alpha-adrenoceptor agonist in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 291, 55-78

Starke, K. (1987): Presynaptic alpha-adrenoceptors. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 107, 73-146

Suryanarayana, S., von Zastrow, M., Kobilka, B.K. (1992): Identification of intramolecular interactions in adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 21991-21994

Takada, K., Clark, D.J., Davies, F., Tonner, P.H., Krause, T.K.W., Bertaccini, E., Maze, M. (2002): Meperidine exerts agonist activity at the  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtype. *Anesthesiology*, 96, 1420-6

Trendelenburg, A.U., Philipp, M., Meyer, A., Klebroff, W., Hein, L., Starke, K. (2003): All three alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 368, 504-512

Tranquilli, W.J., Maze, M. (1993): Clinical pharmacology and use of  $\alpha_2$ -adrenergic agonists in veterinary anaesthesia. *Anaesthetic Pharmacology Review*, 1, 297-309

Werner, C., Hoffman, W.E., Thomas, C., et al. (1990): Ganglionic blockade improves neurologic outcome from incomplete ischemia in rats: Partial reversal by exogenous catecholamines. *Anesthesiology*, 73, 923-9

Winzer-Serhan, U.H., Leslie, F.M. (1997): Alpha 2B adrenoceptor mRNA expression during rat brain development. *Brain Res Dev Brain Res*, 100, 90-100

---

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2 Aminorthanesulfonsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
COS-1-Zellen	Fibroblastenähnliche Zellen, die durch Transformation von CV-1 Nierenzellen der Affenart <i>Cercopithecus aethiops</i> hergestellt wurden
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FBS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanindiphosphat
GMRP	Guanin-Nucleotide-releasing Protein
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindenes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanintriphosphat
HEK293-Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen
HRP	Horseradish-Peroxidase
i.v.	intravenös
JNK	Jun N-terminale Kinase
l	Liter
M	molar (mol/l)
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

PBS	Phosphate Buffered Saline
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
sec.	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UK14.304	5-Bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalinamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar



# Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Jens Scholz für die Möglichkeit, an der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin zu promovieren.

Herrn PD Dr. Berthold Bein als „Doktorvater“ für die freundliche und gute Betreuung in der Endphase der Arbeit.

Herrn Dr. Bernd Weber für die sehr gute und hilfsbereite Unterstützung während der Arbeitsphase im Labor der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin und für das geduldige Beantworten meiner Fragen während der Erstellung der Arbeit.

Frau Cornelia Rodde für die Einführung in die unterschiedlichen Arbeitsmethoden, vor allem in den Umgang mit Zellkulturen.

Frau Margret Betz für ihr offenes Ohr.

Meiner Kommilitonin Frau Anne Riehemann, die zur selben Zeit an ihrer Dissertation im Labor der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin gearbeitet hat, für ihre aufmunternden Worte und ihre moralische Unterstützung.