

**Wirkungen von Cannabinoiden über Cannabinoid-CB₁-
Rezeptoren und andere Mechanismen**

Dissertation

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

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christina Maria Kurz

aus Karlsruhe

Bonn 2008

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Schlicker

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2008

Erscheinungsjahr 2008

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

% (m/V)	Masse in Volumen-Prozent
% (V/V)	Volumenprozent
[³⁵ S]	Isotop des Schwefels mit der Atommasse 35
[³ H]	Tritium (Isotop des Wasserstoffs mit der Atommasse 3)
[x]	Konzentration eines Stoffes x
°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
5-HT	Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin)
5-HT _x	Serotonin-Rezeptor vom Subtyp x
A	Ampere
A	Republik Österreich
Abn-CBD	abnormales Cannabidiol
AChR	Acetylcholin-Rezeptoren
AEA	Anandamid (Arachidonylethanolamid)
AF-DX	AF-DX 384
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AR	Adrenozeptor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
Bed.	Bedingungen
B _{ges}	Gesamtbindung des Radioliganden
B _{max}	maximale Anzahl an Bindungsstellen
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
B _x	x-ter basaler Efflux
bzw.	beziehungsweise
c	centi- (10 ⁻²)
C	Cystein
ca.	circa
CAN	Kanada
CB	Cannabinoid
CBD	Cannabidiol
CB _x (-R)	Cannabinoid-Rezeptor vom Subtyp x
CC	Großhirnrinde (Cerebraler Cortex)

cDNA	DNA, die aus mRNA revers transkribiert wurde (complementary DNA)
CH	Schweizerische Eidgenossenschaft
CP	CP 55,940
D	Asparaginsäure
D	Bundesrepublik Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Konzentration eines Agonisten, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft
Eco RI	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamintetraacetic acid)
EP _x	Prostaglandin E-Rezeptor vom Subtyp x
ES	extrazelluläre Schleife
et al.	und andere Autoren (et alii)
f	femto- (10 ⁻¹⁵)
F	Französische Republik
F	Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Glycin
GABA	γ-Aminobuttersäure (gamma-aminobutyric acid)
Glu	Glutamat
gp	Meerschweinchen- (guinea pig)
GPR	„verwaister Rezeptor“: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der aufgrund konservierter Sequenzen in Genbank-Recherchen gefunden wurde, für den aber noch kein Ligand bekannt ist (orphan G-protein-coupled receptor)
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTPγS	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
h	Mensch- (human)
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hind III	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenza</i>
H _x	Histamin-Rezeptor vom Subtyp x
Hz	Hertz
I	Inhibitor
I	Isoleucin
I	Italienische Republik

i.p.	intra-peritoneal (in den Bauchraum)
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, der ein 50%ige Hemmung bewirkt
Ink.	Inkubation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
k	kilo- (10 ³)
K	Lysin
K _D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
K _i	Verdrängungskonstante
k _{off}	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante
k _{on}	Assoziations-Geschwindigkeitskonstante
KH	Krebs-Henseleit
Konz.	Konzentration
l	Liter
L	(freier) Ligand
L	Leucin
L 266	L 826266
LB	Nährmedium für Bakterien (lysogeny broth)
log	dekadischer Logarithmus
m	Meter
m	milli- (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MAX	Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors
Me	Methyl
mGlu-R	metatroper Glutamat-Rezeptor
MH	Methylhistamin
min	Minute
MIN	Radioligandbindung in Anwesenheit einer hohen Inhibitor-Konzentration
mol	Mol
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Meerschweinchen
M _x	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp x
n	Anzahl der Messwerte
n	nano- (10 ⁻⁹)
n.b.	nicht bekannt
n.s.	nicht signifikant
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalin-Transporter

NCBI	National Center for Biotechnology Information
n _H	Hill-Koeffizient
NL	Niederlande
NMDA	Glutamat-Rezeptor
Oxo	Oxotremorin
p	negativer dekadischer Logarithmus einer Konzentration
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p	pico- (10 ⁻¹²)
P	Pentobarbital
P2-Pellet	Zweites Pellet einer graduellen Zentrifugation
pA ₂	negativer dekadische Logarithmus der Antagonistenkonzentration, bei der die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten um den Faktor 2 verschoben wird.
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEI	Polyethylenimin
Pentob.	Pentobarbital
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pGEM®4z	Klonierungsvektor
Ph	Pharmakon
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (potentia Hydrogenii)
PNK	Polynukleotidkinase
PPAR _x	PPAR-Rezeptor vom Subtyp x (peroxisome proliferator-activated receptor)
R	Rezeptor
Rau.	Rauwolschin
RL	rezeptorgebundener Radioligand
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s	Standardabweichung
S	Serin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SF	Superfusion
S-Gal®	3,4-Cyclohexenoesucletin β-D-galactopyranosid
SL	Samenleiter
Sma I	Restriktionsenzym aus <i>Serratia marcescens</i>
SOC	Nährmedium für Bakterien (Super Optimal broth with Catabolite repression)
sog.	sogenannt

SuRE/Cut	Handelsmarke eines vorgefertigten Puffers für die enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren von Roche, Mannheim
S _x	x.te Reizperiode
T	Threonin
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
THC	Tetrahydrocannabinol
TMD	Transmembranäre Domäne
TP	Thromboxan A ₂ -Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV _x	Vanilloid-Rezeptor (vanilloid transient receptor potential channel) vom Subtyp x
TS	Tris-NaCl-Puffer (Tris-saline)
TTX	Tetrodotoxin
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	Umdrehungen
U	Unit
U	Urethan
u. A.	unter Anderem
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
unspez.	unspezifisch
Ureth.	Urethan
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
VCHSR	5-(4-chlorophenyl)-3-[(E)-2-cyclohexylethenyl]-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol
W	Tryptophan
WIN-2	WIN 55,212-2
WIN-3	WIN 55,212-3
x	„dose ratio“: Quotient aus EC ₅₀ -Werten eines Agonisten in An- und Abwesenheit eines Antagonisten
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
Y	Tyrosin
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
α _x -AR	alpha-Adrenozeptor vom Subtyp x
β _x -AR	beta-Adrenozeptor vom Subtyp x

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		I
Inhaltsverzeichnis		VI
A. Einleitung		1
1	Präsynaptische Rezeptoren	1
1.1	Adrenozeptoren	2
1.2	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	3
1.3	Histamin-Rezeptoren	3
1.4	Prostanoid-Rezeptoren	3
1.5	Cannabinoid-Rezeptoren	5
2	Ziele dieser Arbeit	9
B. Material und Methoden		10
1	Material	10
1.1	Arbeitsgeräte	10
1.2	Verbrauchsmaterial	11
1.3	Chemikalien	11
1.4	Radiochemikalien	13
1.5	Enzyme und Kits für die Molekularbiologie	13
1.6	Strukturformeln	14
1.7	Puffer und Lösungen	15
1.8	Tiere	17
1.9	Datenbanken und Computer-Software	18
2	Methoden	19
2.1	Superfusion	19
2.2	Radioligandbindungsstudien	22
2.3	Molekularbiologie	27
2.4	Statistik	32
C. Ergebnisse		33
1	Untersuchungen am Cannabinoid CB ₁ -Rezeptor	33
1.1	Identifizierung von CB ₁ - und anderen präsynaptischen Rezeptoren	33

1.2	Sequenzierung des CB ₁ -Rezeptors des Meerschweinchens.....	56
2	Untersuchungen an anderen Rezeptoren.....	58
2.1	Effekt von Abn-CBD an präsynaptischen Rezeptoren	58
2.2	Affinität von Endocannabinoiden am Thromboxan-Rezeptor.....	60
D.	Diskussion	62
1	Methodische Vorbemerkungen	62
1.1	Versuchsbedingungen in der Superfusion	62
1.2	Bindungsstudien	64
1.3	Molekularbiologie.....	65
2	Identifizierung von präsynaptischen Rezeptoren in zwei verschiedenen Meerschweinchengeweben.....	67
3	Einfluss von Urethan und Pentobarbital auf Aktivität und Affinität verschiedener Pharmaka an ihrem Rezeptors.....	71
4	Untersuchungen zum endogenen Tonus am CB ₁ -Rezeptor.....	75
5	Untersuchungen zur retrograden Informationsübertragung am CB ₁ -Rezeptor.....	77
6	Sequenzierung des CB ₁ -Rezeptors des Meerschweinchens.....	79
7	Effekt von Abn-CBD an präsynaptischen Rezeptoren	81
8	Affinität von Endocannabinoiden am Thromboxan-Rezeptor.....	82
E.	Zusammenfassung.....	84
F.	Literaturverzeichnis	87
G.	Eigene Veröffentlichungen.....	100
1	Originalarbeiten	100
2	Kongressbeiträge (Vorträge und Posterpräsentationen).....	100
Danksagung		101
Lebenslauf		102

A. Einleitung

1 Präsynaptische Rezeptoren

Kommunikation zwischen Neuronen erfolgt im Wesentlichen über Synapsen durch die Freisetzung von Neurotransmittern aus dem präsynaptischen Neuron und die Wirkung dieser am postsynaptischen Neuron. Das Ausmaß und die Wirkung der Neurotransmitterfreisetzung kann von einer Reihe von Faktoren beeinflusst werden. Hier spielen vor allem präsynaptische Rezeptoren eine große Rolle. Wenn der ausgeschüttete Neurotransmitter einen präsynaptischen Rezeptor aktiviert und dies zu einer Verringerung oder Erhöhung seiner weiteren Freisetzung führt, ist das ein so genanntes Feedback am Autorezeptor oder homosynaptische Interaktion. Ein Beispiel hierfür ist die Inhibition der Noradrenalin-Ausschüttung nach Aktivierung von präsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren durch Noradrenalin (Abbildung 1A). Das Gegenstück hierzu bildet die heterosynaptische Interaktion, bei der ein anderer Neurotransmitter als der gerade freigesetzte oder ein Hormon mittels präsynaptischer Heterorezeptoren die weitere Ausschüttung beeinflusst (Miller 1998). Prominentes Beispiel hierfür ist die Inhibition der Noradrenalin-Ausschüttung nach Aktivierung von präsynaptischen CB₁-Rezeptoren durch Endocannabinoide, die in der Postsynapse gebildet wurden (Abbildung 1B).

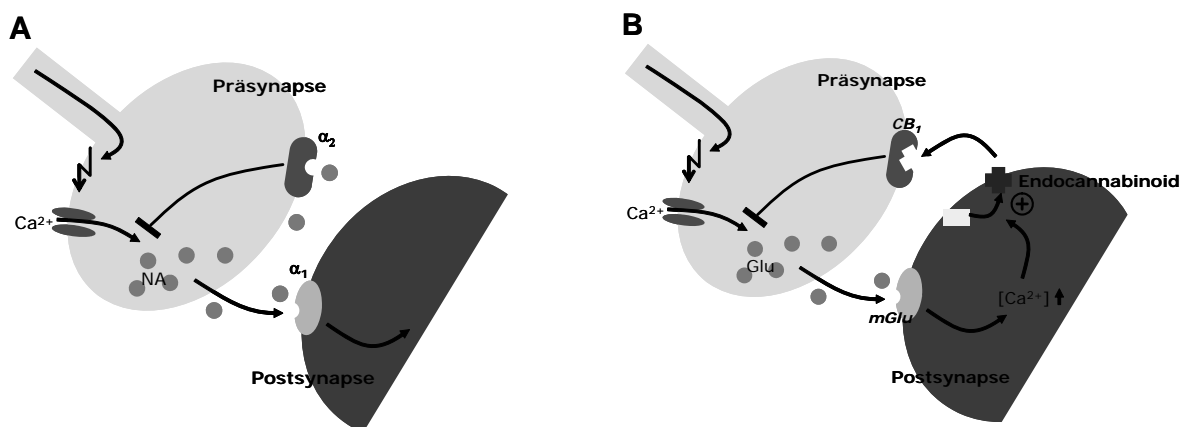


Abbildung 1: Zwei Beispiele für eine präsynaptische Modulation der Neurotransmitterausschüttung. A: Die Ausschüttung von Noradrenalin (NA) bewirkt neben einer Wirkung an der Postsynapse an α_1 -Rezeptoren auch eine Aktivierung des α_2 -Autorezeptors, der die weitere Noradrenalin-Ausschüttung hemmt. B: Die Ausschüttung von Glutamat (Glu) bewirkt nach einer Aktivierung des postsynaptischen Glutamat-Rezeptors (mGlu) eine Freisetzung von Endocannabinoiden, die wiederum durch Aktivierung des präsynaptischen Heterorezeptors CB₁ die weitere Glutamatfreisetzung hemmen.

Der physiologische Sinn dieser verschiedenen Möglichkeiten der präsynaptischen Modulation liegt in ihrem Beitrag zur präzisen Steuerung von Ausmaß und Zeitverlauf des Informationsflusses zwischen Neuronen. Präsynaptische Rezeptoren können aber auch das Ziel pharmakologischer Interaktion sein. Im Folgenden werden verschiedene Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, besonders im Hinblick auf ihre präsynaptische Funktion näher beschrieben.

1.1 Adrenozeptoren

Adrenozeptoren (AR) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und werden durch ihre endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin aktiviert. Sie können weiter unterteilt werden in α - und β -AR, die jeweils wieder verschiedene Subtypen aufweisen. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl selektiver Agonisten und Antagonisten an den verschiedenen Subtypen.

Tabelle 1: Auswahl selektiver Agonisten und Antagonisten an Adrenozeptor-Subtypen (n.b. - nicht bekannt). Nach *Alexander et al. 2008*.

Rezeptor-Subtyp	Agonisten		Antagonisten	
α_{1A}	Phenylephrin, Methoxamin, Cirazolin	A61603, Dabuzalgron	Prazosin, Corynanthin	Tamsulosin, KMD3213
α_{1B}		n.b.		n.b.
α_{1C}		n.b.		BMY7378
α_{2A}	UK14304, BHT920	Oxymetazolin	Rauwolscin, Yohimbin	BRL44408
α_{2B}		n.b.		ARC239, Prazosin, Imiloxan
α_{2C}		n.b.		ARC239, Prazosin
β_1	Isoprenalin	Amoterol, RO363	Propranolol, Cyanopindolol	CGP20712A, Betaxolol, Atenolol
β_2		Procaterol, Salmeterol, Formoterol		ICI118551
β_3		BRL37344, CL316243, CGP12177A		SR59230A, L748328

α_1 -AR sind $G_{q/11}$ -gekoppelt und vor allem für ihre kardiovaskulären Funktionen bekannt, werden aber auch im ZNS exprimiert. Sie sind wahrscheinlich nicht präsynaptisch lokalisiert und haben so keinen Einfluss auf präsynaptische Modulationen. Dagegen ist die Rolle des α_2 -Rezeptors, der $G_{i/o}$ -gekoppelt ist, in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung lange be-

kannt. Als homosynaptischer Feedback-Rezeptor reguliert er die Ausschüttung von Noradrenalin in adrenergen Neuronen (siehe auch Abbildung 1). Unter den β -AR wird vor allem der β_2 -Subtyp präsynaptisch exprimiert und kann auf sympathischen Neuronen die Noradrenalinfreisetzung erhöhen (*Gilsbach und Hein 2008*).

1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (AChR) können in fünf Subtypen M_1 - M_5 unterteilt werden. Alle sind G-Protein gekoppelt und haben als endogenen Liganden das Acetylcholin. Vor allem die M_2 - und M_4 -Subtypen spielen eine wichtige Rolle in der präsynaptischen Modulation der Acetylcholinfreisetzung, aber auch der Noradrenalinfreisetzung (*Gilsbach und Hein 2008*). Dabei wirken sie vor allem inhibitorisch auf die Neurotransmitterfreisetzung, wie u. A. Studien in Knock-out-Maus-Modellen zeigen konnten (*Trendelenburg et al. 2003*).

1.3 Histamin-Rezeptoren

Bis heute sind vier Histamin-Rezeptoren bekannt (H_1 - H_4), die alle den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen sind (*Alexander et al. 2008*). Man ist sich nur beim H_3 -Subtyp sicher, dass er präsynaptisch vorkommt und dort auch eine große Rolle in der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung spielt (*Feuerstein 2008*). Er wirkt dabei meist hemmend auf die Freisetzung nicht nur seines homogenen endogenen Liganden Histamin, sondern auch als Heterorezeptor auf die Freisetzung diverser anderer Neurotransmitter, wie Noradrenalin, Serotonin, Dopamin, Acetylcholin, GABA, Glutamat und andere. Für alle H-Rezeptorsubtypen stehen relativ spezifische Agonisten und Antagonisten für experimentelle Arbeiten zur Verfügung.

1.4 Prostanoid-Rezeptoren

Die Nomenklatur der Prostanoid-Rezeptoren ergibt sich aus dem Namen des physiologischen Liganden, der an den entsprechenden Rezeptor bevorzugt bindet. Es gibt allerdings auch eine nicht zu unterschätzende Affinität jedes Liganden zu den anderen Prostanoid-Rezeptoren.

Die physiologischen Liganden, Prostanoiden genannt, sind oxygenierte Fettsäuren und werden weiter nach ihren chemischen Merkmalen unterteilt. So werden vor allem Prostaglandine PG (mit einem Cyclopentanring) und Thromboxane T (mit einem Cyclohexanring) unterschieden. Der nächstfolgende Buchstabe A bis I bezieht sich auf eine Klassifizierung aufgrund von

Modifizierungen des Kohlenstoffringes und die tiefgestellte Nummer auf die Anzahl der Doppelbindungen.

Alle Prostanoid-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und spielen vor allem eine Rolle in Entzündungsprozessen, Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion bzw. -relaxation (*Bos et al. 2004*).

1.4.1 Die Prostaglandin E-Rezeptoren EP

Die Prostaglandin E Rezeptoren EP₁₋₄ binden alle PGE₂ und lösen ganz verschiedene nachgeschaltete Reaktionen aus. Im Bezug auf präsynaptische Interaktionen scheint vor allem der EP₃-Rezeptor von Bedeutung zu sein, der in verschiedenen Modellen durch seine Aktivierung eine inhibitorische Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung hatte (*Boehm und Kubista 2002*). Nach *Alexander et al. 2008* stehen für alle Rezeptor-Subtypen selektive Agonisten zur Verfügung (z.B. Butaprost für den EP₂-R oder Sulproston für den EP₃-R), es gibt jedoch bisher keinen selektiven EP₂-R-Antagonisten und erst seit kurzem EP₃-Antagonisten (L798106 und L826266, *Juteau et al. 2001*).

1.4.2 Der Thromboxan A₂-Rezeptor TP

Von den verschiedenen bekannten Thromboxanen hat das TXA₂ die größte physiologische Bedeutung, die anderen Derivate sind wahrscheinlich nur Metabolite oder Extraktionsartefakte. Es ist nur ein Prostanoid-Rezeptor nach seiner hohen Affinität zu TXA₂ benannt, der Thromboxan A₂-Rezeptor TP. Dieser ist allerdings von großer Bedeutung für die Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion. Er wird im Wesentlichen auf Thrombozyten exprimiert, aber die Bedeutung im ZNS und in anderen Geweben wird in letzter Zeit vermehrt untersucht (*Huang et al. 2004*). Zur präsynaptischen Modulation gibt es nur sehr wenige und widersprüchliche Veröffentlichungen (*Boehm und Kubista 2002*), es konnte bisher nur in zwei Modellen ein Einfluss auf die Noradrenalinfreisetzung festgestellt werden. Es sind sowohl selektive Agonisten (u.a. U46619 und I-BOP) als auch Antagonisten (u.a. SQ29548 und BMS180291) bekannt (*Alexander et al. 2008*).

1.5 Cannabinoid-Rezeptoren

Cannabinoid-Rezeptoren (CB-R) wurden nach ihrer Affinität zu Inhaltsstoffen der Hanfpflanze Cannabis benannt. Diese Nomenklatur ist insofern etwas ungenau, da man heute weiß, dass (1) diese Inhaltsstoffe auch an anderen Rezeptoren aktiv sein können und (2) auch andere Substanzen, endogene oder synthetische, an Cannabinoid-Rezeptoren wirken.

Bis heute wurden zwei Subtypen des Cannabinoid-Rezeptors, CB₁ und CB₂, identifiziert. Beide sind G_{i/o}-gekoppelt. Als dritter möglicher Kandidat gilt GPR55, der Affinität zu verschiedenen Cannabinoiden zeigt und erst vor kurzem kloniert wurde (*Ryberg et al. 2007*).

Der CB₁-Rezeptor wurde 1990 von *Matsuda et al.* kloniert und wird vor allem auf zentralen und peripheren Neuronen exprimiert, und zwar meistens präsynaptisch. Die Aktivierung des präsynaptischen Rezeptors führt zu einer Hemmung der Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, u.a. Noradrenalin, Acetylcholin, Dopamin, GABA, 5-HT und Glutamat (*Schlicker und Kathmann 2001*). Die unterschiedliche Rezeptordichte im ZNS korrespondiert mit dem Ausmaß der physiologischen Effekte von Rezeptorliganden, vor allem in den Bereichen Erinnerung und Kognition, motorische Kontrolle und Analgesie (*Pertwee 2008a*). Das Verteilungsmuster der CB₁-Expression unterscheidet sich auch zwischen verschiedenen Spezies, zum Beispiel werden im Ratten-Kleinhirn mehr CB₁-R gefunden als im humanen, was den im Vergleich zum Menschen deutlicheren Effekt von Rezeptoragonisten auf die motorische Funktion in Ratten erklärt (*Herkenham et al. 1990*).

Der vor allem in Zellen des Immunsystems lokalisierte CB₂-Rezeptor wurde 1993 beschrieben (*Munro et al. 1993*). Er spielt wahrscheinlich keine Rolle bei der präsynaptischen Modulation der Transmitterfreisetzung, sondern hat einen Einfluss auf die Ausschüttung von Zytokinen aus Immunzellen.

Die physiologische Rolle der Cannabinoid-Rezeptoren wurde spätestens seit der Entdeckung der endogenen Liganden durch *Devane et al. 1992* verstärkt untersucht. Und obwohl immer klarer wird, dass die Bedeutung nicht zu gering eingestuft werden kann, ist die gesamte Tragweite aller Zusammenhänge, auch mit anderen physiologischen Regelkreisen, noch lange nicht erfasst. Deshalb soll im Folgenden noch etwas näher auf die verschiedenen Cannabinoide und das körpereigene Endocannabinoidsystem eingegangen werden.

1.5.1 Cannabinoide

Man kann im Wesentlichen drei Gruppen von Cannabinoiden unterscheiden: Inhaltsstoffe der Cannabis-Pflanze, synthetische Liganden von Cannabinoid-Rezeptoren und die körpereigenen, so genannten Endocannabinoide.

Die Inhaltsstoffe der Cannabispflanze werden auch als „natürliche“ Cannabinoide bezeichnet und enthalten alle ein tricyclisches Dibenzopyran-Grundgerüst oder eine davon abgeleitete Struktur. Abbildung 2 zeigt drei der wichtigsten natürlichen Cannabinoide, wobei besonders das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) wegen seiner psychotropen Wirkung bekannt ist, die über zentrale CB₁-Rezeptoren vermittelt wird, obwohl THC gar keine so hohe Affinität und intrinsische Aktivität an Cannabinoid-Rezeptoren besitzt. Cannabidiol hat keine psychoaktive Wirkung und auch keine große Affinität zu den beiden bekannten Cannabinoid-Rezeptoren. Der molekulare Wirkungsmechanismus seiner entzündungshemmenden und schmerzlindernden Wirkung ist umstritten (*Pertwee 2008b*).

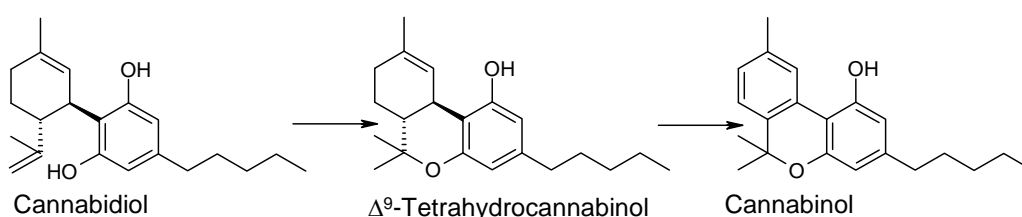


Abbildung 2: Strukturformeln einiger natürlicher Cannabinoide

Für die pharmakologische Charakterisierung der Cannabinoid-Rezeptoren wurden bald Substanzen gefunden, die eine höhere Affinität, Aktivität und Subtypenspezifität besitzen und zudem eine bessere Wasserlöslichkeit als das sehr lipophile THC bieten.

Diese Gruppe der „synthetischen“ Cannabinoide ist chemisch sehr heterogen aufgebaut. Ausgehend von der THC-Struktur wurden unter anderem CP 55,940 und HU-210 als Agonisten, O-2050 als Antagonist synthetisiert. Der sehr oft verwendete Agonist WIN 55,212-2 sowie einige CB₂-selektive Liganden wie AM-630 und JHW-015 weisen als gemeinsame Grundstruktur ein Indolgerüst auf. Pyrazolderivate sind die subtypenspezifischen Antagonisten Rimonabant (SR 141716), NESS 0327 und AM-281 (CB₁) sowie SR 144528 (CB₂) (*Pertwee 2008a*). Strukturformeln finden sich in Kapitel B.1.6.

Als Endocannabinoide werden körpereigene Substanzen bezeichnet, die über CB-Rezeptoren wirken. Einige Vertreter sind in Abbildung 3 dargestellt. Endocannabinoide sind keine

klassischen Neurotransmitter, da sie nicht vesikulär gespeichert werden, sondern bei Bedarf in der Zellmembran aus Lipiden wie Arachidonsäure synthetisiert werden.

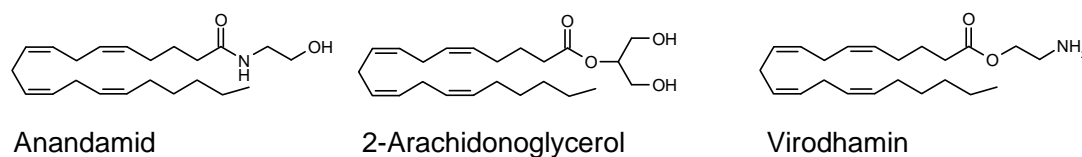


Abbildung 3: Strukturformeln einiger Endocannabinoide

Vor allem die natürlichen und endogenen Cannabinoide, aber auch einige synthetische, sind nicht sehr spezifisch für die CB-Rezeptoren, zum Beispiel hat Anandamid Affinität zu einer Reihe von anderen Rezeptoren wie den Vanilloid-Rezeptor TRPV1, TRPV4, GPR55, 5-HT₃ und den Glycin-Rezeptor. THC dagegen wirkt unter Anderem an PPAR γ , GPR55 und 5-HT₃ (*Pertwee 2008a*). Dies ist vor allem für den therapeutischen Einsatz von Cannabinoiden, zum Beispiel von Agonisten zur Analgesie und Appetitsteigerung und von Antagonisten zur Gewichtsreduktion und Raucherentwöhnung, relevant. Durch die unspezifische Aktivität an anderen als am gewünschten Rezeptor lassen sich nämlich Nebenwirkungen vorhersagen und erklären. Umgekehrt verringert sich prinzipiell das Nebenwirkungspotential potentieller neuer Wirkstoffe mit einer erhöhten Selektivität.

1.5.2 Endocannabinoid-System

Unter dem Endocannabinoid-System versteht man das Zusammenspiel von Endocannabinoiden mit Cannabinoid- und anderen Rezeptoren sowie die Enzyme und Mechanismen, die für die Synthese und den Abbau der Endocannabinoide notwendig sind. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass das Endocannabinoidsystem an weit mehr körpereigenen Prozessen beteiligt ist, als man das zu Beginn der Cannabinoid-Forschung aus den Wirkungen von Cannabis glauben ableiten zu können. Unter anderem fand man eine Funktion bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme, Motorik, Gedächtnis- und Erinnerungsleistung, Schmerzwahrnehmung, in Entzündungsprozessen und verschiedenen Stoffwechselprozessen.

Ein wesentlicher Meilenstein in der Endocannabinoid-Forschung war 2001 die Entdeckung ihrer Eigenschaft als retrograde Transmitter, die von drei Arbeitsgruppen zeitgleich publiziert wurde (*Kreitzer und Regehr 2001; Ohno-Shosaku et al. 2001; Wilson und Nicoll 2001*). Man hatte schon länger nach dem genauen Mechanismus der so genannten DSI/DSE (Depolarisation-induced suppression of inhibition/excitation) gesucht, dem Phänomen, dass nach

Depolarisation des präsynaptischen Neurons für einige Zeit trotz weiterer Stimulation keine Aktivierung der Postsynapse mehr stattfindet. Es war außerdem bekannt, dass dies durch eine Inhibierung der Neurotransmitterfreisetzung zustande kam und diese durch einen von der Postsynapse freigesetzten retrograden Transmitter vermittelt sein musste. Die drei Arbeitsgruppen konnten zunächst zeigen, dass DSI/DSE durch vorherige Gabe von CB₁-Antagonisten verhindert wurde und dann auch die freigesetzten Endocannabinoide nachweisen. Später wurden auch genauere molekulare Mechanismen aufgeklärt: vor allem durch eine erhöhte Calciumkonzentration und/oder Rezeptor-vermittelt wird die Endocannabinoid-Produktion und -Freisetzung gesteuert (*Hashimoto et al. 2007*). Abbildung 1B zeigt einen solchen Rezeptor-vermittelten Regelkreis.

Immer noch ungeklärt ist eine weitere zentrale Frage der Endocannabinoid-Forschung, nämlich warum die vorhandenen Antagonisten, die eher inverse Agonisten sind, in den meisten Modellen eine dem Agonisten entgegengesetzte Wirkung auslösen. Dies lässt sich prinzipiell auf zweierlei Weise erklären. Es könnte sein, dass die Cannabinoid-Rezeptoren erstens durch Endocannabinoide aktiviert werden oder zweitens eine Rezeptoraktivität ohne die Anwesenheit eines Liganden besitzen (*Pertwee 2005a*). Eine solche Spontanaktivität ist von anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren bekannt (*Lefkowitz et al. 1993*) und wird mit dem ternären-Komplex-Modell beschrieben (*Samama et al. 1993; Leff 1995*). Beim Vorhandensein von Endocannabinoiden verdrängt der inverse Agonist die endogenen Agonisten, und bei Vorliegen einer Spontanaktivität stört er nur das Gleichgewicht der endogenen Aktivierung. Beides führt zu einer erhöhten Neurotransmitterfreisetzung, einmal weil die inhibitorische Wirkung der Endocannabinoide aufgehoben wird, und im anderen Fall durch das zum inaktiven Zustand verschobene Gleichgewicht. Mit Hilfe eines neutralen Antagonisten ließe sich zwischen den beiden Modellen besser unterscheiden, da man bei Vorliegen der Spontanaktivität keine Verschiebung des Gleichgewichts und somit auch keinen Einfluss auf die Neurotransmitterfreisetzung erwarten würde.

2 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene ungeklärte Aspekte des CB₁-Rezeptors und der Wirkung von Cannabinoiden weiter untersucht werden:

- Identifizierung von präsynaptischen CB₁-Rezeptoren im Meerschweinchen, um die Basis für weitere experimentelle Arbeiten zu schaffen, im Besonderen in Geweben, bei denen in Maus und Ratte keine CB₁-Rezeptoren nachgewiesen sind.
- Klonierung und Sequenzierung des Meerschweinchen-CB₁-Rezeptors.
- Pharmakologische Charakterisierung eines neuen CB₁-Liganden (NESS 0327) und im Falle der Bestätigung seiner Eigenschaft als neutraler Antagonist weitere Untersuchungen zum endogenen Tonus an CB₁-Rezeptoren.
- Untersuchung, ob die Aktivierung von postsynaptischen α_1 -Adrenozeptoren zur Endocannabinoidbildung und zur nachfolgenden CB₁-Rezeptor-vermittelten retrograden Hemmung der Transmitterfreisetzung in einem peripheren Gewebe führt.
- Untersuchung einer möglichen (präsynaptischen) Wirkung des Cannabinoids Abn-CBD auf die Transmitterfreisetzung.
- Untersuchung einer möglichen Affinität von Endocannabinoiden an Thromboxan A₂-Rezeptoren

Außerdem ergab sich im Rahmen der Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit einer polnischen Arbeitsgruppe, die *in vivo*-Versuche an anästhetisierten Tieren durchführt, die Frage nach einer möglichen Beeinflussung des Narkosemittels auf die Versuchsergebnisse. Dazu sollte während dieser Arbeit ein möglicher molekularer Mechanismus in *in vitro*-Versuchen untersucht werden.

Es sollten molekularbiologische (Klonierung und Sequenzierung) und pharmakologische Methoden (Superfusionsstudien und Radioligandbindungsstudien) Anwendung finden.

B. Material und Methoden

1 Material

1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage Sartorius 2004 MPG, Sartorius, Göttingen, D
Brutschrank BE 500, Memmert, Schwabach, D
Cell Harvester IH 120, Inotech, Wohlen, CH
Dispensetten 2 ml, 5 ml, Brand, Wertheim, D
Flachbett-Elektrophoresegelelektrodenkammern, Eigenbau der Institutswerkstatt
Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA, Beckman Coulter, Fullerton, USA
Fraktionssammler Multirac 2111, LKB, Freiburg, D
Guillotine, Eigenbau der Institutswerkstatt
Homogenisator Potter-Elvehjem Braun 853302/4, B.Braun, Melsungen, D
Kühlzentrifuge Typ J2-21, Beckman, München, D
Laborwaage L610D, Sartorius, Göttingen, D
Magnetrührer Combimag RCO, IKA, Staufen i. Br., D
Magnetrührer MR 82, Heidolph, München, D
Mikroskop IMT2-RFL, Olympus, Hamburg, D
Multipette Nr. 4710, Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim, D
pH/Redox Elektrode, VWR, Darmstadt D
pH-Meter pH 211, Hanna Instruments, Kehl a. Rh., D
Pipetten Eppendorf Reference: 0,5-10 µl, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten Eppendorf Research: 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf, Hamburg, D
Präparierbesteck, Everhards, Meckenheim, D
Rollerpumpe, Eigenbau der Institutswerkstatt
Spannungsquelle PowerPac 3000, Bio-Rad, Hercules, USA
Spektralphotometer Typ DU®-64, Beckman, München, D
Stimulator 215/II, Hugo Sachs, March-Hugstetten, D
Superfusionsanlage, Eigenbau der Institutswerkstatt
Thermostat Typ MD, Julabo, Seelbach, D
Thermostat Typ MS, MGW, Lauda-Königshofen, D
Tischzentrifuge Typ 5415C, Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschall-Homogenisator Labsonic 1510, B. Braun, Melsungen, D
UV-Beleuchtungstisch Gel Doc XR, Bio-Rad, Hercules, USA

Vakuump Controller IH 195, Inotech, Wohlen, CH
Vortex Mixer Reax 2000, Heidolph, München, D
Wasserbad Typ 1083, GFL, Burgwedel, D
Wasserbad und Schüttler 4010, Köttermann, Hänigsen, D

1.2 Verbrauchsmaterial

Bakterienfilter 0,2 µm, Supor Acrodisc 25, Gelman Sciences, Ann Arbor, USA
Faltenfilter 597¹/₂, Schleicher & Schuell, Dassel, D
Filter GF/C Nr. 1822915, Whatman, Maidstone, UK
Küvetten 67.741, Sarstedt, Nümbrecht, D
Laborflaschen Duran®, Schott, Mainz, D
Mini Poly-Q-Vials® Nr. 592928, Beckman, München, D
Multipetten-Spitzen Combitips®, Eppendorf, Hamburg, D
Parafilm PM-956, Pechiney Plastic Packaging, Chigaco, USA
Pasteurpipetten 150 mm, Brand, Wertheim, D
Petrischalen 94x16 mm, Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen, steril mit Filter, Axygen, Union City, USA
Reaktionsgefäße 710075 2,0 ml, Biozym, Hess. Oldendorf, D
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg, D
S-Monovetten® 9 ml und –Kanülen, Sarstedt, Nümbrecht, D
Standzylinder Blaubrand®, Brand, Wertheim, D
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml, Greiner Bio-One, Kremsmünster, A

1.3 Chemikalien

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

2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Abn-CBD, Tocris, Ellisville, USA
AF-DX 384, Thomae, Biberach an der Riss, D
Agarose, Bio-Rad, Hercules, USA
AM-281, Tocris, Ellisville, USA
Ampicillin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Anandamid (Arachidonylethanolamid), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
BSA (Rinderserumalbumin), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Calciumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, D
Carbogen (95% O₂, 5% CO₂), Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim, D
Chloroform, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Clonidin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Coomassie-Brillantblau G 250, Serva, Heidelberg, D
CP 55,940, Tocris, Ellisville, USA
D(+)-Glucose, AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Desipramin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DMSO (Dimethylsulfoxid), Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol absolut, KMF Laborchemie, Lohmar, D
Ethidiumbromid 10mg/ml, Bio-Rad, Hercules, USA
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, D
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonsäure), Carl Roth, Karlsruhe, D
Histamin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
ICI 118.551, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Imetit, Prof. H. Timmerman, Vrije Universiteit, Amsterdam, NL
Isopropanol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Kaliumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, D
L 826266, Merck Frosst, Kirkland, CAN
L(-)-Noradrenalin, Hoechst AG, Frankfurt, D
L(+)-Ascorbinsäure, Merck KGaA, Darmstadt, D
LB-Medium, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Magnesiumsulfat, Merck KGaA, Darmstadt, D
Methoxamin, Wellcome, London, UK
Natriumchlorid, KMF Laborchemie, Lohmar, D
Natrium-EDTA, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat, KMF Laborchemie, Lohmar, D
NESS 0327, synthetisiert und freundlich überlassen von Dr. L. Pani, INN, Selargius, I
O-2050, Tocris, Ellisville, USA
ortho-Phosphorsäure 85%, Merck KGaA, Darmstadt, D
Oxotremorin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Pentobarbital, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Polyethylenimin 50% (m/V), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
POPOP (1,4-Di-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol), Acros Organics, New Jersey, USA
PPO (2,5-Diphenyloxazol), Acros Organics, New Jersey, USA
Prazosin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Procaterol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Prostaglandin E₂, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
R(-)-Methanandamid, Biotrend, Köln, D
R(-)-Phenylephrin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
R(+)-WIN-55,212-2, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Rauwolscin, Carl Roth, Karlsruhe, D
Rimonabant (SR 141716A), Sanofi Recherche, Montpellier, F
R- α -Methylhistamin, synthetisiert und freundlich überlassen von Prof. Schunack, FU, Berlin, D
S(-)-WIN-55,212-3, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Saccharose, Merck KGaA, Darmstadt, D
Salzsäure 1 M, KMF Laborchemie, Lohmar, D
S-Gal®/LB Agar Blend, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
SOC-Medium, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Soluene®- 500 (0,5 M quarternäres Ammoniumhydroxid in Toluol), Perkin-Elmer Boston, USA
SQ 29,548, Biomol, Hamburg, D
Sulproston, Bayer-Schering Pharma, Berlin, D
Tetrodotoxin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Toluol, Merck KGaA, Darmstadt, D
Tris-Base, Trizma®, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Tris-HCl, Trizma®, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Trypanblau, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
U 46,619, Biomol, Hamburg, D
Urethan, Merck KGaA, Darmstadt, D

1.4 Radiochemikalien

[³H]-Noradrenalin (spezifische Aktivität: 53 Ci/mmol) PerkinElmer, Boston, USA
[³H]-Rauwolscin (spezifische Aktivität: 73 Ci/mmol) PerkinElmer, Boston, USA,
[³H]-N- α -Methylhistamin (spezifische Aktivität: 70,4 Ci/mmol) PerkinElmer, Boston, USA
[³H]-Rimonabant (spezifische Aktivität: 44 Ci/mmol) Amersham, Little Chalfont, UK
[³H]-SQ 29,548 (spezifische Aktivität: 43,6 Ci/mmol) PerkinElmer, Boston, USA

1.5 Enzyme und Kits für die Molekularbiologie

AMV Reverse Transcriptase 20 U/ μ l und 5x Puffer, Roche, Mannheim, D
ATP Lithium 100 mM, Roche, Mannheim, D
DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche, Mannheim, D
dNTPack PCR Grade Nucleotide Mix 10 mM, Roche, Mannheim, D
E. coli JM109 competent cells, Promega, Mannheim, D
Expand HighFidelity^{PLUS} PCR System, Roche, Mannheim, D

pGEM®-4z, Promega, Mannheim, D

PNK 10 U/μl, und 10x Puffer, Roche, Mannheim, D

Primer I: humaner CB₁ sense 24-mer 5'-ACT GAG GTT ATG AAG TCG ATC CTA-3' (Position 140-163 der hCB₁-Sequenz nach GenBank X54937), MWG Biotech, Ebersberg, D

Primer II: humaner CB₁ antisense 24-mer 5'-AGG GAG GCA TCA GGC TCA CAG AGC-3' (Position 1559-1582 der hCB₁-Sequenz nach GenBank X54937), MWG Biotech, Ebersberg, D

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, D

Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit, Bio-Rad, Hercules, USA

Random Hexaprimer p(dN)₆, Roche, Mannheim, D

Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (rAPid Alkaline Phosphatase 1 U/μl und 10x Puffer, T4 DNA Ligase, 5 U/μl und 2x Puffer), Roche, Mannheim, D

Restriktionsenzyme: Sma I, Eco RI, Hind III und SuRE/Cut Buffer A, B, Roche, Mannheim, D

RNAse A, Roche, Mannheim, D

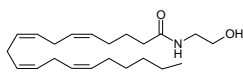
RNAse Inhibitor 40 U/μl, Roche, Mannheim, D

T4 DNA Polymerase 1 U/μl und 5x Puffer, Roche, Mannheim, D

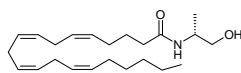
TriPure® Isolation Reagent, Roche, Mannheim, D

1.6 Strukturformeln

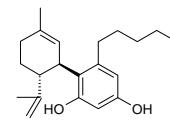
Cannabinoide:



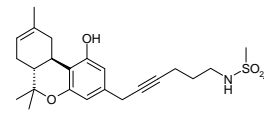
Anandamid



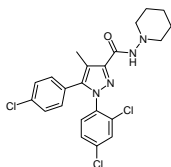
Methanandamid



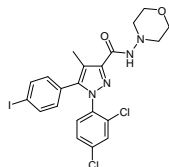
Abn-CBD



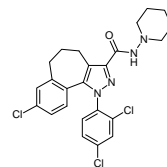
O-2050



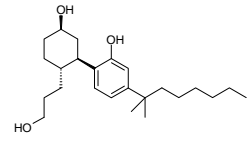
Rimonabant



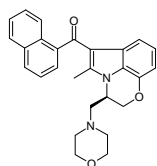
AM-281



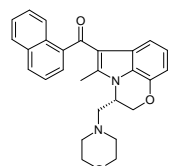
NESS 0327



CP 55,940

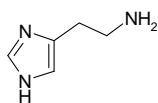


WIN 55,212-2

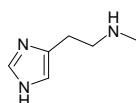


WIN 55,212-3

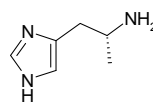
Histamin-Rezeptor-Liganden:



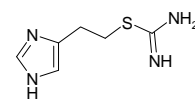
Histamin



N-α-Methylhistamin

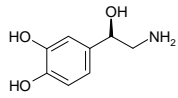


R-α-Methylhistamin

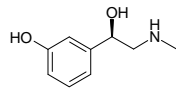


Imetit

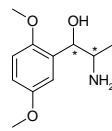
Adrenozeptor-Liganden:



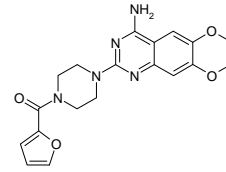
Noradrenalin



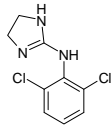
Phenylephrin



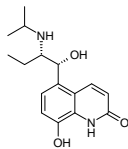
Methoxamin



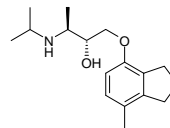
Prazosin



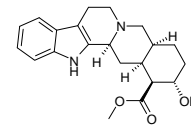
Clonidin



Procaterol

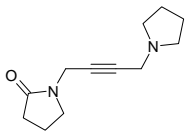


ICI 118.551

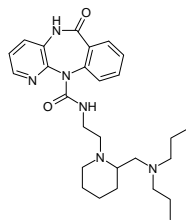


Rauwolscin

Muscarin-Rezeptor-Liganden:

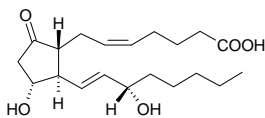


Oxotremorin

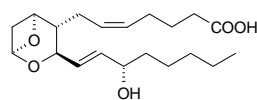


AF-DX 384

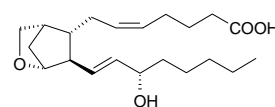
Prostanoid-Rezeptor-Liganden



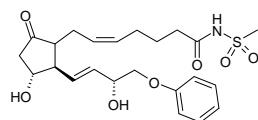
Prostaglandin E2



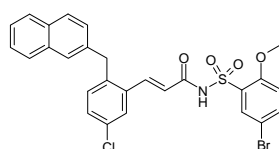
Thromboxan A2



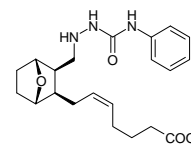
U 46,619



Sulproston



L 826266



SQ 29,548

1.7 Puffer und Lösungen

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

1.7.1.1 modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung für die Superfusion (KH)

118 mM NaCl

23 mM NaHCO₃

4,8 mM KCl

1,2 mM KH₂PO₄

1,2 mM MgSO₄
 10 mM Glucose
 0,06 mM Ascorbinsäure
 0,03 mM Na₂EDTA
 1,3 oder 1,625 oder 3,25 mM CaCl₂

1.7.1.2 TE-Puffer für die Molekularbiologie

50 mM Tris-Base
 5 mM Na₂EDTA
 pH 7,5 wird mit HCl bei Raumtemperatur eingestellt.

1.7.1.3 TE-Puffer und TE-Waschpuffer für Bindungsstudien

50 mM Tris
 5 mM Na₂EDTA

(Der pH wird dabei nicht durch Zugabe von HCl oder NaOH eingestellt, sondern mit Hilfe von Tris-Tabellen (Tabelle 2) ein geeigneter Anteil von Tris-HCl und Tris-Base ermittelt, bei dem der Puffer bei der Inkubationstemperatur des Versuchs einen pH von 7,4 - 7,5 erreicht.)

Tabelle 2: Tris-Tabelle zur Ermittlung der Einwaagen von Säure und Base zur Einstellung eines pH von 7,4-7,5 bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

Inkubations- Temperatur	pH bei 20°C	Einwaage Tris (g) pro Liter	
		Tris-HCl	Tris-Base
4°C (Waschpuffer)	7,34	7,02	0,67
23°C	7,47	6,85	0,80
25°C	7,55	6,61	0,70
30°C	7,76	6,06	1,39

1.7.1.4 Thrombozytenpuffer

145 mM NaCl
 10 mM HEPES
 500 mM Na₂HPO₄
 10 mM KCl
 4 mM MgCl₂
 10 mM Glucose
 0,3 % BSA

1.7.1.5 TS-Puffer für Bindungsstudien

50 mM Tris-Base

154 mM NaCl

pH 7,5 wird mit HCl bei Raumtemperatur eingestellt.

1.7.1.6 Tris-Saccharose-Puffer für die Membranaufbereitung

10,27 % Saccharose, in TE-Puffer

1.7.1.7 Bradford-Stammlösung

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250

50 ml Ethanol 50 % (V/V)

100 ml Phosphorsäure 85%

Aqua dem. ad 250 ml

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

1.7.1.8 Bradford-Arbeitslösung

1 Volumenteil Bradford-Stammlösung

16 Volumenteile Aqua dem.

durch einen Faltenfilter filtriert, bei Bedarf frisch hergestellt.

1.7.1.9 Szintillationscocktail I (mit hoher Wasseraufnahmekapazität)

Lumagel® Safe, Lumac LSC, Groningen, NL

1.7.1.10 Szintillationscocktail II (mit geringer Wasseraufnahmekapazität)

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

1.8 Tiere

Männliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen (180 - 1070 g), männliche NMRI Mäuse (24 - 50 g)
und männliche Wistar Ratten (220 – 410 g), Charles River Laboratories, Sulzfeld, D.

1.9 Datenbanken und Computer-Software

GATCViewer™ (GATC Biotech AG, Konstanz)

GeneDoc 2.6.001 (NRBCS, Pittsburgh, USA)

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

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

Microsoft Office 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

NCBI BLAST und GenBank (NCBI, Bethesda, USA)

2 Methoden

2.1 Superfusion

2.1.1 Versuchsanordnung

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

- Großhirnrinde: Die Rinde wird von den anderen Hirnteilen getrennt, in Schichten von 0,3 mm Dicke geschnitten und diese zu Scheiben von 3 mm Durchmesser gestanzt.
- Retina: Linse und Glaskörper werden aus dem Auge entfernt und die Retina herausgelöst. Es werden Scheiben von 3 mm Durchmesser gestanzt.
- Niere: Die Nierenkapsel und das Mark wird entfernt und die Nierenrinde mit einem Skalpell in Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten.
- Samenleiter: Der Samenleiter wird von anhaftendem Bindegewebe befreit und in ca. 2 mm lange Stücke geschnitten.
- Vorhof: Das Herz wird auf Höhe der Vorhöfe aufgeschnitten und die Vorhofwände herausgeschnitten und in Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten.
- Aorta: Die Aorta wird von anhaftendem Bindegewebe befreit und in ca. 1 mm breite Ringe geschnitten.

Die Gewebestücke wurden anschließend 30 oder 60 Minuten bei 37°C in KH unter Zusatz von 25 nM [³H]-Noradrenalin unter ständiger Zufuhr von Carbogen inkubiert.

Anschließend wurden sie in den Superfusionskammern auf Polypropylnetzen zwischen zwei Platinelektroden platziert und die Superfusion gestartet.

Das Superfusionsmedium enthielt als Hilfspharmakon Desipramin 1 µM (außer bei Versuchen an der Retina) und in einigen Fällen Rauwolscin 1 µM (siehe Tabelle 3 und die entsprechenden Kapitel). Die Superfusion erfolgte bei 37°C mit einem Durchlauf von 1 ml/min unter ständiger Begasung mit Carbogen.

Die Tritiumabgabe wurde durch zwei 2-minütige Reizperioden (S₁ und S₂) durch Rechteckimpulse stimuliert. Die genauen Stimulationsparameter, der Zeitpunkt der Stimulation und

die Gesamtversuchsdauer unterschieden sich in einzelnen Versuchsreihen und können Tabelle 3 entnommen werden.

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

Ab der 5. Minute vor S₁ wurde das Superfusat kontinuierlich in 5-Minuten-Fractionen gesammelt und mit 1,2 Volumenanteilen Szintillationscocktail I gemischt.

Nach Versuchsende wurden die Gewebestücke in 0,5 ml Soluene® aufgelöst und mit 5 ml Szintillationscocktail II versetzt. Die Bestimmung des Tritiumgehalts der Superfusate und Gewebeproben erfolgte durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler.

Tabelle 3: Versuchsbedingungen in den verschiedenen Versuchsreihen. Abkürzungen: Ink. - Dauer der Inkubation mit [³H]-Noradrenalin; Rau. - Rauwolschin-Konzentration; SF - Dauer der Superfusion; Reiz-Bed. - Stimulationsparameter; Ph. - Zugabe des Pharmakons; Ca²⁺-Konz. - Calciumkonzentration im Superfusionsmedium; MS - Meerschweinchen; CC - Großhirnrinde.

Spezies	Gewebe	Ink. (min)	Rau. (µM)	SF (min)	Reiz ab min	Reiz-Bed. (Hz; mA; ms)	Ph. (ab min)	Ca ²⁺ -Konz. (mM)	Kapitel C.
Maus	Aorta	60	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	2.1
	CC	60	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	0,3; 50; 2	62	1,30	1.1.3.2, 2.1
			0,1						1.1.3.2
			-						1.1.3.2
Samenleiter	30	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	1.1.3.2, 1.1.4	
MS	Vorhof	30	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	1.1.1, 1.1.2.1, 2.1
			-					1,63	1.1.2.1
			-					3,25	1.1.2.1
	Niere	60	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	1.1.1, 1.1.2.2, 2.1
			-						1.1.2.2
Retina	60	-	120	S ₁ : 60; S ₂ : 100	3; 50; 2	82	1,30	1.1.1, 1.1.4	
Samenleiter	60	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	1.1.1, 1.1.5	
Ratte	Samenleiter	60	1	110	S ₁ : 40; S ₂ : 90	3; 200; 2	62	3,25	2.1

2.1.2 Versuchsauswertung

2.1.2.1 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung

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

Der basale Efflux, d.h. die ohne Stimulation gemessene Tritiumabgabe wurde in den Sammelperioden vor dem Pharmakonwechsel (B_1) und vor S_2 (B_2) bestimmt. Der Quotient B_2/B_1 ist somit ein Maß für den Einfluss einer beim Pharmakonwechsel eingeleiteten Substanz auf die basale Tritiumfreisetzung.

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

Zur Quantifizierung der Pharmakoneffekte wurde der Quotient aus S_1 und S_2 mit dem entsprechenden Quotienten der Kontrolle verglichen. Zusätzlich wird in Studien, in denen das zu untersuchende Pharmakon von Beginn der Superfusion anwesend war, S_1 mit dem entsprechenden Wert der Kontrolle verglichen.

2.1.2.2 Berechnung pharmakologischer Wirkstärken

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

Die Wirkstärke eines Antagonisten wird mit dem pA_2 -Wert charakterisiert. Er ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration, bei der die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten um den Faktor zwei nach rechts verschoben wird (*Arunlakshana und Schild 1959*). Zur Berechnung dient Gleichung 1:

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

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

Streng genommen müsste man bei den meisten in dieser Arbeit gezeigten pA₂-Werten von „scheinbaren pA₂-Werten“ sprechen, da nur eine oder zwei statt mindestens drei Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten untersucht wurden. Der Übersichtlichkeit halber wurde aber auf diese Differenzierung verzichtet.

2.2 Radioligandbindungsstudien

2.2.1 Theoretische Grundlagen

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



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

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

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

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

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

Zur experimentellen Bestimmung von K_D und B_{max} dienen Sättigungsbindungen, in denen die Interaktion eines Rezeptors mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden untersucht wird. Nach Gleichgewichtseinstellung wird die Gesamtbindung als Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung gemessen. Die unspezifische Bindung des Radioliganden wird in Anwesenheit eines im Überschuss zugesetzten unmarkierten Liganden bestimmt, der an die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor wie der Radioligand bindet und somit diesen aus der Rezeptorbindung verdrängt, und von der Gesamtbindung abgezogen.

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

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

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

Die Affinität eines unmarkierten Liganden, der um die gleiche Rezeptorbindungsstelle wie der Radioligand konkurriert (kompetitive Interaktion), wird mit Hilfe von Kompetitionsexperimenten bestimmt. Dabei wird die konstant gehaltene Radioligandkonzentration mit aufsteigenden Konzentrationen des nicht markierten Liganden, auch Inhibitor oder Kompetitor genannt, versetzt. Mit steigender Konzentration des Inhibitors wird der Radioligand zunehmend aus seiner Rezeptorbindung verdrängt. Wird die gemessene spezifische Bindung des Radioliganden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Inhibitors aufgetragen, resultiert ein sigmoider Kurvenverlauf, der mit der Hill-Gleichung beschrieben wird:

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

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

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

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

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

wobei: [L] Konzentration des Radioliganden

2.2.2 Versuchsanordnung

2.2.2.1 Membranpräparation und Proteinbestimmung

Zur Präparation von Proteinsuspension von Großhirnrindenmembran für die Versuche an CB₁-, α₂-, und H₃-Rezeptoren (Kapitel C.1.1.3.1) wurden männliche Wistar Ratten dekapitiert, das Hirn entnommen und die Großhirnrinde (Kortizes) sofort präpariert. Je zwei Kortizes wurden in ein tariertes Becherglas, gefüllt mit 25 ml Tris-Saccharose-Puffer, überführt und ausgewogen. Die Kortizes wurden dann mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators mit 10 Hüben bei 1200 U/min eine Minute lang homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 5 ml Tris-Saccharose-Puffer nachgespült und 10 Minuten mit 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 25 Minuten mit 25000 x g erneut zentrifugiert. Das erhaltene P2-Pellet wurde zweimal in je 10 ml TE-Puffer resuspendiert und anschließend 10 Minuten mit 25000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in TE-Puffer erneut mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators mit 10 Hüben bei 1200 U/min und eine Minute lang homogenisiert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinsuspension, falls notwendig, mit dem TE-Puffer auf die benötigte Proteinkonzentration verdünnt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Präparation von gewaschenen Thrombozyten für die Versuche an TP-Rezeptoren (Kapitel C.2.2) wurden männliche Wistar-Ratten durch Überdosierung mit 120 mg/kg Pentobarbital i.p. getötet und Blut durch Punktion der Vena cava in mit K₂EDTA-Lösung gefüllte Zentrifugenröhrchen gesammelt (Endkonzentration EDTA: 1,2-2 mg/ml Blut). Die benötigten Kanülen wurden zuvor mit Na-Heparin gespült, um eine unmittelbare Gerinnung zu verhindern. Die Röhrchen wurden sofort 20 Minuten lang bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet (bestehend aus Thrombozyten) wurde vorsichtig in Thrombozytenpuffer resuspendiert und noch einmal 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal in TS-Puffer wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde in TS-Puffer suspendiert, nach Bestimmung der Proteinkonzentration auf eine Konzentration von 50 – 80 µg/100 µl verdünnt und sofort für die Bindungsstudien verwendet. Die Anzahl der Thrombozyten wurde

mit einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau 0,15 % bestimmt (90 – 150 Mio Thrombozyten/100 μ l). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (*Bradford 1976*) wurden 0,15 ml der zu untersuchenden Proteinlösung mit 2 ml der Bradford-Arbeitslösung versetzt und innerhalb von 30 Minuten photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die im Konzentrationsbereich von 1 bis 15 μ g Protein mit BSA als Standard aufgenommen wurde. Der Leerwert wurde mit 0,15 ml Aqua dem. bestimmt.

2.2.2.2 Sättigungsbindung

Die Sättigungsbindung wurde nur für [3 H]-SQ 29,548 an Ratten-Thrombozyten bestimmt, da für die drei weiteren hier untersuchten Radioliganden entsprechende Experimente in unserem Labor bereits in der Vergangenheit durchgeführt worden waren (siehe Kapitel C.1.1.3.1).

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

50 μ l [3 H]-SQ 29,548 in acht Konzentrationen (0,15; 0,3; 0,75; 1,5; 3; 7,5; 15 und 30 nM)

50 μ l unmarkiertes SQ 29,548 50 μ M (unspezifische Bindung) oder TS-Puffer (Gesamtbindung)

300 μ l TS-Puffer

100 μ l Proteinhomogenat

Die Reaktion startete durch Zugabe des Proteinhomogenats. Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf mit 0,3% Polyethylenimin vorbehandelte GF/C-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 ml TS-Puffer. Die einzelnen Filter wurden jeweils in Szintillationsvials überführt und mit 4 ml Szintillationscocktail I (Lumagel® Safe) versetzt. Die Proben wurden dann mindestens 12 Stunden lang geschüttelt und anschließend die Radioaktivität der aufgelösten Filter durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Außerdem wurde zur Berechnung des Umrechnungsfaktors von dpm in fmol/mg eine Dreifachbestimmung von je 10 μ l der Radioligand-Arbeitslösung in 4 ml Szintillationscocktail I gemessen.

2.2.2.3 Verdrängungsbindung

Verdrängungsstudien wurden mit allen vier Radioliganden durchgeführt. Tabelle 4 zeigt die jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Puffer wurden nach Inkubationstemperatur ausgewählt, die Proteinmenge je nach Anzahl der Bindungsstellen (siehe Tabelle 10). Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen wie folgt zusammengesetzt (alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im 500 µl Reaktionsansatz und alle Substanzen wurden im entsprechenden Puffer (siehe Tabelle 2 und Tabelle 4) gelöst und verdünnt):

50 µl Radioligand

50 µl unspezifische Bindung oder Puffer oder Kompetitor

300 µl Puffer

100 µl Proteinhomogenat

Die Reaktion startete durch Zugabe des Proteinhomogenats. Die Proben wurden inkubiert und anschließend mit Hilfe des Inotech Cell-Harvesters auf mit 0,3% Polyethylenimin vorbehandelte GF/C-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschriffe mit je 2 ml Waschpuffer. Die einzelnen Filter wurden jeweils in Szintillationsvials überführt und mit 4 ml Szintillationscocktail I versetzt. Die Proben wurden dann mindestens 12 Stunden lang geschüttelt und anschließend die Radioaktivität der aufgelösten Filter durch einen Flüssigkeitszintillationszähler gemessen.

Tabelle 4: Versuchsbedingungen der Kompetitionsbindungen. Abkürzungen: Konz. - Konzentration, Unspez. Bind. - Kompetitor zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, Ink. - Inkubation, temp. - Temperatur, CC - Großhirnrindenmembran, MH - Methylhistamin, NA - Noradrenalin. Ureth. - Urethan, Pentob. - Pentobarbital, AEA - Anandamid, Me-AEA - Methanandamid.

Rezeptor	Protein (Konz. in µg/100 µl)	Radioligand (Konz.)	Unspez. Bind. (Konz.)	Kompetitoren	Ink.-dauer	Ink.-temp.
CB ₁	CC (40-80)	[³ H]-Rimona-bant (0,5 nM)	CP 55,940 (3 µM)	AM-281, O-2050, Ureth., Pentob.	60 min	25°C
α ₂	CC (200-300)	[³ H]-Rauwolscin (1 nM)	NA (100 µM)	Rauwolscin, Ureth., Pentob.	30 min	23°C
H ₃	CC (200-300)	[³ H]-N-α-MH (0,2 nM)	R-α-MH (2 µM)	Imetit, Ureth., Pentob.	40 min	30°C
TP	Thrombozyten (40-80)	[³ H]-SQ 29,548 (3 nM)	SQ 29,548 (50 µM)	U46,619, AEA, Me-AEA, Ethanol	30 min	20°C

2.2.3 Versuchsauswertung

Alle Bindungsstudien wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 ausgewertet. Dazu wurden die Werte für die unspezifische Bindung von den erhaltenen Werten für die Gesamtbinding abgezogen. Im Falle der Sättigungsbindung wurden die dpm-Werte in fmol/mg umgerechnet, bei Konkurrenzexperimenten in Prozent der maximalen Bindung (Kontrollwert ohne Kompetitor) umgerechnet. Mit diesen Werten wurde dann eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Zu den mathematischen Grundlagen siehe 2.2.1.

Zur Berechnung von Parametern wie K_D oder IC_{50} wurden die Versuche einzeln ausgewertet und Mittelwert und SEM von n Versuchen gebildet. Für die Abbildungen wurden von jedem Versuch die Mittelwerte der einzelnen Punkte verwendet und neu regressiert.

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus Meerschweinchen Hippocampus

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des TriPure®-Kits nach Angaben des Herstellers. Im Einzelnen wurde ein männliches Dunkin-Hartley-Meerschweinchen durch Dekapitation getötet, das Hirn entnommen und der Hippocampus herauspräpariert. Dieser wurde sofort mit 1 ml TriPure® versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Nach Versetzen mit 200 μ l Chloroform und 15 Minuten Zentrifugation bei 12000 x g wurde die obere wässrige Phase, die die gelöste RNA und Proteine enthält, abpipettiert und mit 500 μ l Isopropanol gemischt. Die so gefällte RNA wurde zu einem Pellet abzentrifugiert (15 Minuten 12000 x g), noch einmal mit 1 ml Ethanol 70% (V/V) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde mit 30 μ l sterilem Aqua dem. aufgenommen und direkt der Reversen Transkription unterzogen oder bei -80°C gelagert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

2.3.2 Reverse Transkription der Gesamt-RNA zu cDNA

Zur Umschreibung der erhaltenen RNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase des Avian-Myeloblastosis-Virus (AMV-RT) benutzt. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus je:

10 μ l RNA

1 μ l Random Hexaprimer

1,6 μ l dNTP Mix 10 mM

1 µl AMV RT
1 µl RNase Inhibitor
10 µl AMV RT 5xPuffer
25,4 µl Aqua dem. steril

wurde 90 Minuten bei 42°C inkubiert, anschließend eventuell noch enthaltene RNA mit 5 µl RNase A 0,2 % verdaut und direkt der PCR unterzogen oder bei -80°C gelagert.

2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA mit Hilfe einer temperaturstabilen Polymerase. In dieser Arbeit wurde das Expand High Fidelity^{PLUS} System verwendet, das neben einer Taq-Polymerase Proofreading-Enzyme enthält, die zufällige Basenaustausche der Polymerase korrigieren und so für ein sehr zuverlässiges PCR-Produkt sorgen.

Der Reaktionsansatz, bestehend aus:

1 µl cDNA
je 0,5 µl Primer I und II
1 µl dNTP Mix 10 mM
10 µl Expand High Fidelity^{PLUS} 5x Puffer
0,5 µl Expand High Fidelity^{PLUS} Enzymmischung 5 U/µl
36,5 µl Aqua dem. steril

wurde in 35 Zyklen amplifiziert (1 Zyklus besteht aus einer Minute Denaturierung bei 94°C, einer Minute Primerhybridisierung bei 54°C und 90 Sekunden Amplifikation bei 72°C) und weiter zur DNA-Isolation verwendet.

2.3.4 DNA-Isolation

Zur Isolation des amplifizierten DNA-Stücks wurde das erhaltene PCR-Produktgemisch zunächst in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch nach Größe getrennt (1,5 h bei 130 V). Das Gel enthielt zur Visualisierung von DNA im UV-Licht Ethidiumbromid und einen Längensstandard (DNA Molecular Weight Marker XIV) zur Größenbestimmung. Unter UV-Licht wurden Banden bei der gewünschten Länge von ca 1,5 kBp ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits aufgereinigt. Dazu wird die DNA in einem Puffer mit hohem Salzgehalt gefällt und an einer Silikamembran gebunden. In mehreren Waschschrritten wird die

DNA von anhaftendem Agarosegel gereinigt und anschließend wieder in sterilem Wasser gelöst und von der Membran eluiert.

2.3.5 Ligation

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor ligieren zu können, müssen die jeweiligen Enden der DNA-Stränge zueinander passen. Dazu wurde zunächst die Vektor-DNA mit Hilfe des Restriktionszyms SmaI geschnitten und anschließend dephosphoryliert. SmaI schneidet den verwendeten Vektor pGEM®-4Z einmal und mit glatten Enden. Im Einzelnen wurde der Restriktionsverdau bei 37°C für 1,5 h durchgeführt:

2,5 µl pGEM4z

0,75 µl SmaI

1 µl SuRE/Cut A 10x Puffer

5,75 µl Aqua dem. steril

und die Dephosphorylierung nach Anweisungen des Rapid DNA Dephos & Ligation Kits 10 Minuten bei 37°C:

3 µl SmaI-geschnittener pGEM4z

2 µl rAPid Alkaline Phosphatase 10x Puffer

1 µl rAPid Alkaline Phosphatase 1 U/µl

15 µl Aqua dem. steril

Anschließend wurde die aufgereinigte DNA, die nach der PCR noch 3'-überhängenden Enden besitzt, mit Hilfe der T4 DNA Polymerase zu glatten Enden „aufgefüllt“ und phosphoryliert. Im Einzelnen wurden:

20 µl aufgereinigte DNA

1 µl T4 DNA Polymerase

6 µl T4 DNA Polymerase 5x Puffer

2 µl dNTPs

1 µl Aqua dem. steril

40 Minuten bei 37°C inkubiert und direkt versetzt mit:

1 µl PNK

4 µl PNK 10x Puffer

4 µl ATP Lithium 10 mM

1 µl Aqua dem. steril

und wieder 40 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamyl von den Enzymen getrennt, mit Chloroform gewaschen, und mit Natriumacetat/Ethanol gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert und das Pellet noch einmal mit Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die wieder in Wasser gelöste DNA kann dann zur Ligation mit dem geschnittenen Vektor verwendet werden:

15 µl DNA

1 µl SmaI-geschnittener und dephosphorylierter pGEM4z

2 µl T4 DNA Ligase

4 µl DNA Dilution 5x Puffer

20 µl T4 DNA Ligase 2x Puffer

Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur kann das Reaktionsgemisch direkt zur Transformation verwendet werden.

2.3.6 Transformation

Zur Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli*-Bakterien wurden 100 µl der Bakterien-suspension mit 1 µl Mercaptoethanol 10% auf Eis vorbereitet und nach Zugabe von 10 µl des Plasmids 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Hitzeschocktransformation für 45 Sekunden bei 42°C. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde der Suspension 900 µl SOC-Medium zugegeben und 60 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Von der erhaltenen Bakterien-suspension wurden je einmal 100 µl und einmal 250 µl auf S-Gal®-LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht ca. 15-18 Stunden inkubiert. Der verwendete Vektor pGEM®-4z besitzt unter anderem ein Ampicillin-Resistenz-Gen, so dass auf dem Ampicillin-Agar nur Bakterien wachsen, denen erfolgreich ein Plasmid transformiert wurde. Zusätzlich befindet sich ein lacZΔM15-Gen auf dem Plasmid, das β-Galactosidase produziert, welche mit dem im Agar enthaltenen IPTG und S-Gal® eine Blaufärbung der Kolonie bewirkt. Dies ist allerdings nur bei einem intakten Plasmid möglich, da die Sma I-Schnittstelle, in die das gewünschte DNA-Fragment ligiert werden soll, innerhalb dieses lacZΔM15-Gens liegt. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation bildet sich also keine β-Galactosidase, und damit entstehen weiße Bakterienkolonien, die jeweils von einem Klon abstammen.

2.3.7 Mini-Prep

Um erfolgreich ligierte Plasmide in ausreichender Menge zu vermehren, wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und in je 4 ml LB-Ampicillin-Medium bei 37°C unter leichtem Schütteln über Nacht ca. 15-18 Stunden inkubiert.

Aus der so erhaltenen Bakteriensuspension muss das Plasmid mit Hilfe des Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kits aufgereinigt werden. Dazu wurden die Bakterien aus 2 ml Suspension durch 30 Sekunden Zentrifugation bei 12000 x g pelletiert und in 200 µl Puffer wieder suspendiert. Dann wurden die Bakterien durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer aufgebrochen und die freigesetzten Proteine durch Zugabe von 250 µl Präzipitationspuffer gefällt. Das Präzipitat wurde durch 5 Minuten Zentrifugation bei 12000 x g vom Überstand getrennt, in dem sich die gelöste Plasmid-DNA befindet. Diese wird nun an eine Silikonmatrix gebunden und kann so mehrmals mit Puffer gewaschen werden und schließlich mit Wasser wieder gelöst und eluiert werden.

2.3.8 Restriktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob das erhaltene Plasmid tatsächlich das gewünschte DNA-Fragment ligiert hat, wurde eine Restriktionsanalyse des Plasmids durchgeführt. Dazu wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet, die den Vektor je einmal schneiden und zwar am Anfang und Ende der Klonierungsregion. So erhält man nach Trennung mittels Elektrophorese zwei Fragmente, eines in der Größe des DNA-Fragments, eines in der Größe des Plasmids.

Im Einzelnen wurden:

7 µl Miniprep-Eluat

je 0,5 µl Eco RI und Hind III

1 µl SuRE/Cut B 10x Puffer

1 µl Aqua dem. steril

im Wasserbad bei 37°C 90 Minuten inkubiert und in einem 1,3 % Agarosegel 1 Stunde bei 100 V getrennt. Unter UV-Licht wurden Klone ausgewählt, die das gewünschte Restriktionsmuster zeigen und das übrige Miniprep-Eluat zur Sequenzierung verwendet.

2.3.9 Sequenzierung

Die Plasmide wurden bei der Firma GATC Biotech AG, ausgehend von den Promotern SP6 und T7, welche sich am Anfang und Ende der Klonierungsregion befinden, mit Hilfe der Sanger-Methode sequenziert. Die erhaltene Basenabfolge wurde online mit dem NCBI BLAST Programm in eine Aminosäuresequenz übersetzt und mit in der NCBI GenBank gespeicherten Sequenzen von CB₁-Rezeptoren anderer Spezies verglichen.

2.4 Statistik

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

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

wobei: x_i Einzelmesswerte; n Anzahl der Messwerte

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

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

Der Standardfehler des Mittelwertes SEM errechnet sich wie folgt:

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

Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte unter Verwendung des Student's t-Tests für ungepaarte Datensätze mit vergleichbarer Standardabweichung, und des Student's t-Tests mit Welch-Korrektur für ungepaarte Datensätze mit unterschiedlicher Standardabweichung. Die Standardabweichungen wurden mit dem F-Test verglichen.

Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war. Dabei wurden folgende Visualisierungen verwendet: $0,05 > p \geq 0,01$: *; $0,01 > p \geq 0,001$: **; $p < 0,001$: ***. Wurden mehrere Versuchswerte mit der gleichen Kontrolle verglichen, wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit p der Bonferroni Korrektur unterzogen (Curtin und Schulz 1998).

C. Ergebnisse

1 Untersuchungen am Cannabinoid CB₁-Rezeptor

1.1 Identifizierung von CB₁- und anderen präsynaptischen Rezeptoren

1.1.1 Voraussetzungen zur Verwendbarkeit der Superfusionsmethode

Bei allen zur Superfusion verwendeten Gewebetypen wurde zunächst untersucht, ob die elektrische Reizung durch von außen angelegte Elektroden dem quasi-physiologischen Zustand, also der Reizweiterleitung durch Änderung des Membranpotentials und anschließender Neurotransmitterfreisetzung, entspricht.

Dazu wurde vor Beginn des 2. Reizes entweder mit 1 μ M Tetrodotoxin, einem Inhibitor des neuronalen spannungsabhängigen Natriumkanals, superfundiert oder der Superfusionsflüssigkeit alle Calciumionen entzogen.

Abbildung 4 zeigt beispielhaft den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung von [³H]-Noradrenalin im Nierenrindengewebe des Meerschweinchens.

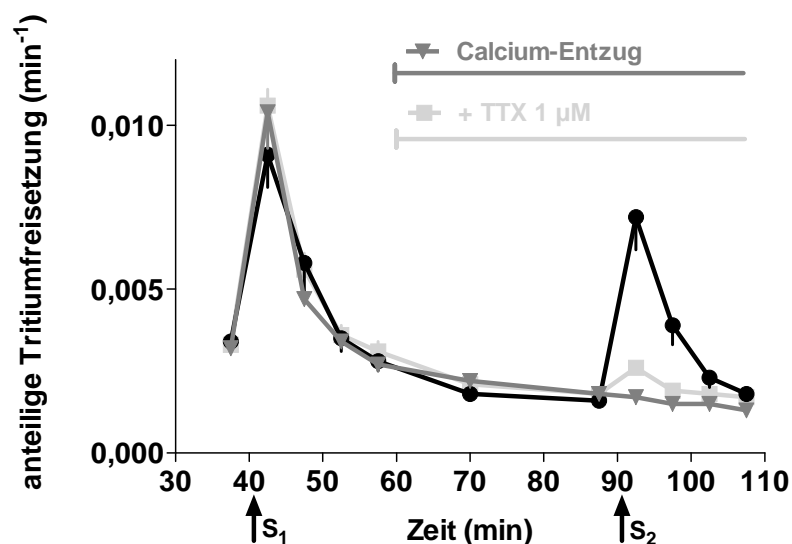


Abbildung 4: Anteilige Tritiumfreisetzung ([³H]-Noradrenalin) über die Zeit in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten, Änderungen im Superfusionsmedium (Zugabe von 1 μ M Tetrodotoxin (TTX); Calciumentzug) nach 62 Minuten. Mittelwert und SEM von 6 Experimenten.

Im Vergleich zur Kontrolle erfolgte in den so behandelten Versuchsreihen nach dem zweiten Reiz eine fast vollständige Hemmung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in allen anderen Geweben erhalten; eine Übersicht über die Quotienten der stimulierten Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) im Vergleich zur Kontrolle in allen Meerschweinchengeweben gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Stimulierte Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) in Prozent der Kontrolle von superfundierten Geweben des Meerschweinchens. Mittelwert \pm SEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Gewebe	S_2/S_1 (Prozent der Kontrolle)		S_2/S_1 (Kontrolle) siehe:
	Tetrodotoxin 1 μ M	Calcium-freies Medium	
Atrium (n=6)	6,7 \pm 4,0 (***)	4,4 \pm 1,7 (***)	Tabelle 6
Niere (n=6)	9,7 \pm 2,5 (***)	1,5 \pm 0,9 (***)	Tabelle 8
Retina (n=4-7)	4,1 \pm 1,3 (**)	0,9 \pm 0,9 (***)	Tabelle 12
Vas deferens (n=4)	6,0 \pm 1,2 (***)	0,3 \pm 0,3 (***)	Tabelle 14

Weiterhin wurde vor der Auswertung überprüft, ob sich die basale Tritiumfreisetzung oder die prozentuale Tritiummenge in der ersten Stimulationsperiode durch verwendete Pharmaka im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant ändert. Die Ergebnisse sind tabellarisch zu Beginn der jeweiligen Kapitel aufgeführt.

1.1.2 Identifizierung von präsynaptischen Rezeptoren in zwei verschiedenen Meerschweinchengeweben

Zur Identifikation von präsynaptischen Rezeptoren wurden in der Literatur vorwiegend Gewebe von Ratten und Mäusen verwendet. In unserer Arbeitsgruppe hat sich die Verwendung von Meerschweinchen zum Nachweis von präsynaptischen CB₁-Rezeptoren als gut geeignet gezeigt. Es wurden sogar präsynaptische CB₁-Rezeptoren in Meerschweinchengeweben gefunden, die man zuvor in Ratten und Mäusen nicht nachweisen konnte (*Szabo und Schlicker 2005*)

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Meerschweinchengeweben (Vorhof siehe 1.1.2.1 und Niere siehe 1.1.2.2) nach präsynaptischen Cannabinoid CB₁-Rezeptoren, die einen Einfluss auf die Noradrenalinfreisetzung haben, gesucht werden. Zu Vergleichszwecken wurde auch nach ausgewählten andere präsynaptischen Rezeptoren gesucht.

1.1.2.1 Vorhof

Zur Bestimmung der passenden Versuchsbedingungen wurden Kontrollversuche mit zwei verschiedenen Calciumkonzentrationen und dem Zusatz des α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten Rauwolscin im Superfusionsmedium durchgeführt. Tabelle 6 zeigt den Vergleich der basalen Tritiumfreisetzung (B_1) und der stimulierten Tritiumfreisetzung (S_1 , S_2/S_1) in den Kontrollexperimenten mit verschiedenen Zusätzen. Der Basalwert war nur in den Versuchen mit 0,1 μ M Rimonabant (einem inversen Agonisten am CB_1 Rezeptor) statistisch signifikant erniedrigt.

Tabelle 6: Einfluss von verschiedenen Bedingungen auf die Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in superfundiertem Meerschweinchenvorhofgewebe. Zusatz von Antagonisten oder Erniedrigung der Calcium-Konzentration jeweils von Beginn der Superfusion an. Mittelwert \pm SEM aus n Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (3,25 mM Calcium, 1 μ M Rauwolscin).

Bedingungen			B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
Calcium-Konz.	Rauwolscin	Zusatz				
3,25 mM	1 μ M	-	0,27 \pm 0,01	3,31 \pm 0,18	0,60 \pm 0,03	54-134
3,25 mM	1 μ M	Rimonabant 0,1 μ M	0,19 \pm 0,02 (*)	4,73 \pm 0,44 (**)	0,63 \pm 0,06	8
3,25 mM	1 μ M	Rimonabant 0,032 μ M	0,32 \pm 0,03	3,87 \pm 0,33	0,50 \pm 0,04	12
3,25 mM	1 μ M	AF-DX 384 0,1 μ M	0,25 \pm 0,03	3,62 \pm 0,45	0,61 \pm 0,04	15
3,25 mM	-	-	0,26 \pm 0,02	1,22 \pm 0,11 (***)	0,82 \pm 0,09	24
1,63 mM	1 μ M	-	0,28 \pm 0,02	2,09 \pm 0,21 (**)	0,51 \pm 0,07	10

Die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung war hingegen in mehreren Versuchsbedingungen von der Kontrolle verschieden. Dies kann man auch im Verlauf der Tritiumfreisetzung (Abbildung 5) erkennen. Dabei zeigte Rimonabant 0,1 μ M eine statistisch signifikante Erhöhung der stimulierten Tritiumfreisetzung. Die Erniedrigung der Calciumkonzentration hin zum fast physiologischen Wert von 1,63 mM und die Abwesenheit von Rauwolscin hingegen erniedrigten die Tritiumfreisetzung derart, dass eine sinnvolle Auswertung schwierig wurde.

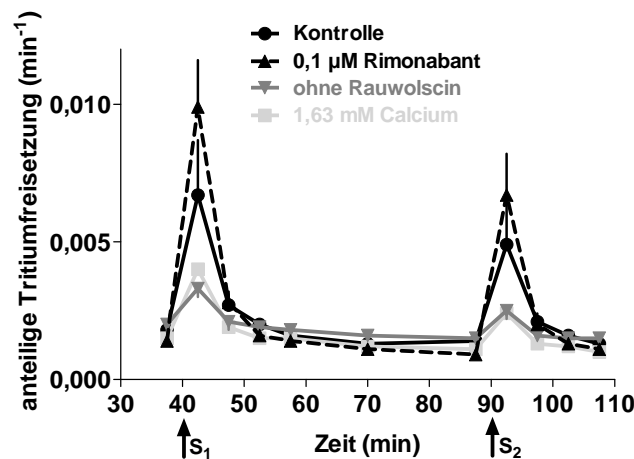


Abbildung 5: Einfluss von verschiedenen Bedingungen auf den Verlauf der Tritiumfreisetzung (^3H -Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchenvorhofgewebe. Die verschiedenen Bedingungen (Rimonabant $0,1 \mu\text{M}$, ohne Rauwolscin, Calciumkonzentration halbiert) wurden jeweils von Beginn der Superfusion an implementiert. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 3-6 Experimenten.

Zur Identifizierung von präsynaptischen CB_1 -Rezeptoren wurde der CB -Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2 eingesetzt. WIN 55,212-2 reduzierte die stimulierte Tritiumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle unter den drei Bedingungen (Abbildung 6). Im Rauwolscin-freien Medium war dies jedoch nicht statistisch signifikant, bei der niedrigeren Calciumkonzentration war der Effekt etwas deutlicher ausgeprägt als bei der höheren; der Unterschied zwischen den beiden Bedingungen war jedoch nicht signifikant.

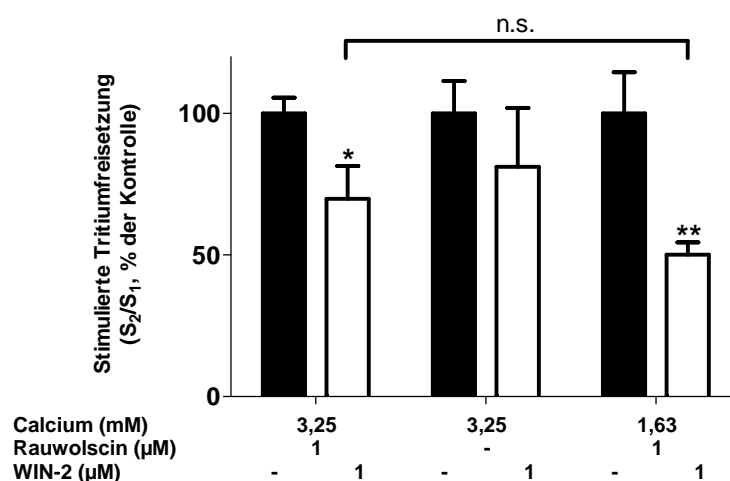


Abbildung 6: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundiertem Meerschweinchenvorhofgewebe. Calcium und Rauwolscin waren im Superfusionsmedium in den angegebenen Konzentrationen von Beginn an, WIN 55,212-2 (WIN-2) unter den verschiedenen Bedingungen ab der 62. Minute enthalten. Mittelwert und SEM aus 5-7 Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Da man bei hoher Calciumkonzentration immer noch einen deutlichen Effekt sehen konnte und durch die wesentlichen höheren S_1 -Werte (siehe Tabelle 6) die Auswertung erheblich erleichtert war, wurden diese Bedingungen für die restlichen Versuche am Meerschweinchen-Vorhof verwendet.

Um zu Vergleichszwecken noch weitere präsynaptische Rezeptoren in diesem Gewebe nachzuweisen, wurde die Änderung der stimulierten Tritiumfreisetzung nach Zusatz des jeweiligen Agonisten zum Superfusionsmedium bestimmt. Abbildung 7 zeigt beispielhaft den Verlauf der Tritiumfreisetzung von je einer Konzentration dreier Rezeptoragonisten (WIN 55,212-2 (WIN-2) an Cannabinoid-Rezeptoren, Oxotremorin an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor, Prostaglandin E₂ an EP-Rezeptoren) im Vergleich zur Kontrolle.

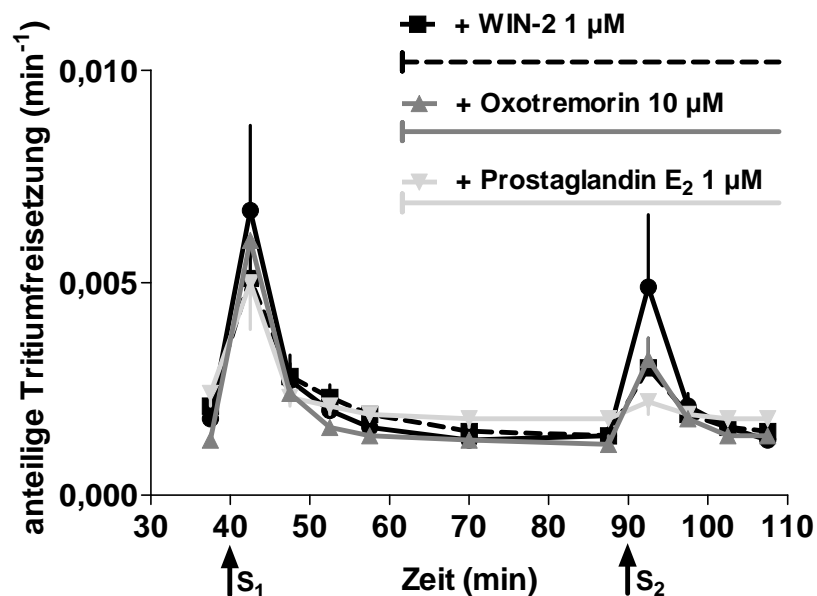


Abbildung 7: Einfluss von verschiedenen Pharmaka (ab 62. Minute) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ($[^3\text{H}]$ -Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchenvorhofgewebe. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 3-6 Experimenten.

In Abbildung 8 sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die drei Agonisten bezüglich ihrer Effekte auf die stimulierte Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) aufgetragen.

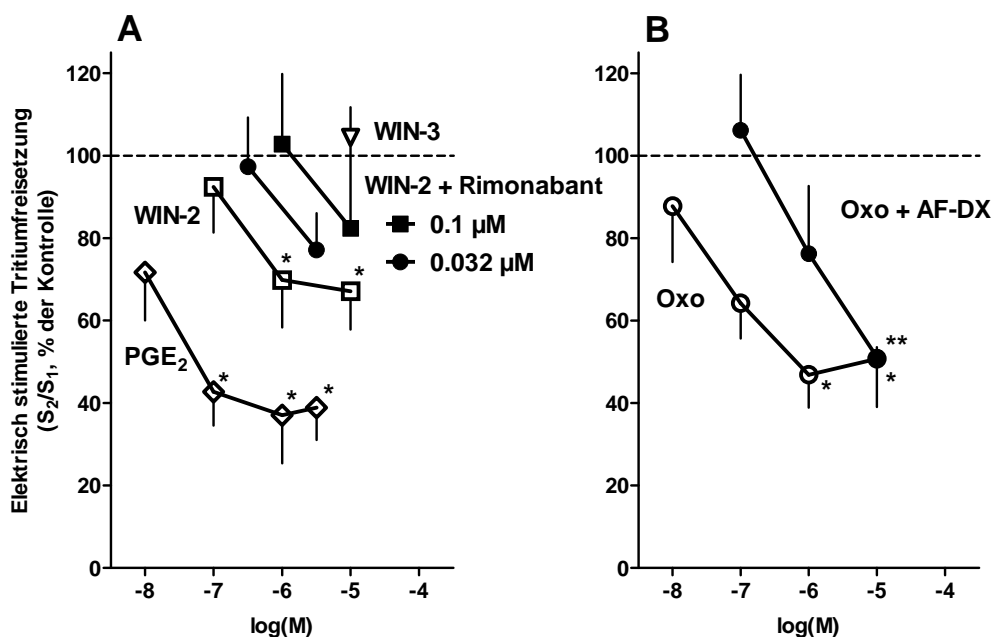


Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Effekt von verschiedenen Rezeptoragonisten (ab 62. Minute) auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundiertem Meerschweinchenvorhofgewebe (A: WIN 55,212-2 (WIN-2); WIN 55,212-3 (WIN-3); Prostaglandin E₂ (PGE₂). B: Oxotremorin (Oxo)) und Interaktion mit antagonistischen Pharmaka (von Beginn zugegeben; A: WIN-2 mit Rimonabant in zwei Konzentrationen; B Oxotremorin mit AF-DX 384 0,1 µM (AF-DX)). Mittelwert und SEM aus 3-10 Experimenten. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

WIN 55,212-2 führte zu einer Hemmung der Freisetzung um maximal 35 %. Die Konzentrations-Wirkungskurve konnte mit zwei Konzentrationen des Antagonisten Rimonabant rechtsverschoben werden (pA₂ siehe Tabelle 7). Zum Vergleich konnte mit dem inaktiven Enantiomer WIN 55,212-3 auch in hoher Dosierung von 10 µM kein Effekt erzielt werden (Abbildung 8A).

Tabelle 7: Agonistische (pIC₅₀) und antagonistische (pA₂) Potenz sowie Maximaleffekt der eingesetzten Pharmaka bezüglich ihrer Wirkung auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung ([³H]-Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchen-Vorhofgewebe.

Agonist	Maximaler Effekt in der höchsten eingesetzten Konzentration (%)	pIC ₅₀	pA ₂ des jeweiligen Antagonisten
WIN 55,212-2	35	6,6	8,3 (Rimonabant)
Oxotremorin	55	7,3	8,5 (AF-DX 384)
Prostaglandin E ₂	65	7,7	-

Sowohl Prostaglandin E₂ (Abbildung 8A) als auch Oxotremorin konnten die Tritiumfreisetzung statistisch signifikant hemmen (um maximal 65 % bzw. 55 %). Dabei ließ sich die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxotremorin mit dem M_{2/4}-Antagonisten AF-DX 384 0,1 µM rechtsverschieben (Abbildung 8B, Tabelle 7).

1.1.2.2 Nierenrinde

Die Versuche an Stücken der Nierenrinde wurden in sehr ähnlicher Weise wie jene an Vorhofgewebe durchgeführt, wobei allerdings zusätzlich einige orientierende Experimente zum Vorkommen von präsynaptischen α- und β-Adrenzeptoren erfolgten. Dies erschien deshalb sinnvoll, da bisher keine Befunde zur präsynaptischen Modulierung der Noradrenalinfreisetzung in der Niere des Meerschweinchens in der Literatur beschrieben wurden. Tabelle 8 zeigt, dass es bei der basalen Tritiumfreisetzung B₁ zu signifikanten Unterschieden zur Kontrolle bzw. zu den Kontrollen anderer Versuchsreihen kam.

Tabelle 8: Einfluss von verschiedenen Bedingungen auf die Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S₂/S₁) in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe. Die verschiedenen Bedingungen wurden jeweils von Beginn der Superfusion an implementiert. Mittelwert ± SEM aus n Experimenten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Rau – Rauwolschin).

Versuchsreihe	Bedingungen		B ₁ (%)	S ₁ (%)	S ₂ /S ₁	n
	Rau.	Zusatz				
Adrenozeptoren	-	-	0,21 ± 0,01	1,90 ± 0,11	0,85 ± 0,05	5-17
	1 µM	-	0,25 ± 0,01 (*)	3,61 ± 0,21 (***)	0,77 ± 0,03	5-11
	-	ICI 118.551 0,32 µM	0,32 ± 0,02 (**)	2,21 ± 0,12	1,05 ± 0,04	9-22
Andere präsynapt. Rezeptoren	1 µM	-	0,50 ± 0,01	3,27 ± 0,18	0,98 ± 0,02	5-25
		AF-DX 384 0,01 µM	0,66 ± 0,03 (***)	4,19 ± 0,57	0,93 ± 0,10	5-22
		AF-DX 384 0,1 µM	0,42 ± 0,02	3,63 ± 0,26	0,98 ± 0,10	5-22
		AF-DX 384 1 µM	0,62 ± 0,03 (***)	3,97 ± 0,51	1,08 ± 0,12	5-25
TTX/ Calcium	1 µM	-	0,31 ± 0,02	4,99 ± 0,38	0,93 ± 0,08	6-18

- Versuche an α - und β -Adrenozeptoren

Um die Natur der Adrenozeptoren (AR) in der Meerschweinchenniere zu charakterisieren, wurden Superfusionsversuche mit verschiedenen, zum Teil subtypenspezifischen Pharmaka durchgeführt. Theoretisch führt die Aktivierung des präsynaptischen α_2 -AR durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer Verringerung der Noradrenalin-Freisetzung. Dementsprechend konnte durch eine Blockade des α_2 -AR durch den spezifischen Antagonisten Rauwolscin von Beginn der Superfusion an die Menge an freigesetztem [3 H]-Noradrenalin erhöht werden. Dies führte zu einer signifikanten Erhöhung der stimulierten Tritiumfreisetzung (Tabelle 8), was man auch bei der Darstellung des Verlaufs der anteiligen Tritiumfreisetzung gut erkennen kann (Abbildung 9).

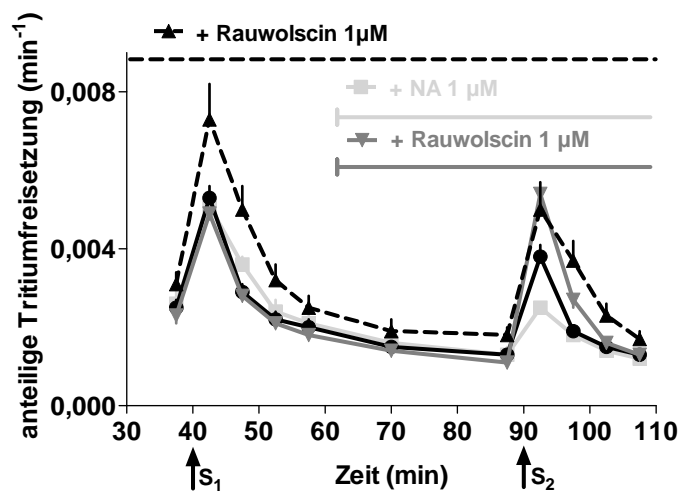


Abbildung 9: Einfluss von Noradrenalin (NA, 1 μ M, Zugabe ab 62. Min) und des α_2 -AR-Antagonisten Rauwolscin (1 μ M, Zugabe ab 62. Min (grau) oder von Beginn an (gestrichelt)) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung (3 H]-Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 5-6 Experimenten.

Wurde Rauwolscin dem Medium vor dem 2. Reiz zugesetzt, verdoppelte sich die stimulierte Tritiumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9 & Abbildung 10).

Den gegenteiligen Effekt konnte man durch Zugabe von Noradrenalin 1 μ M vor dem 2. Reiz erzielen. Diese Wirkung konnte wiederum durch die vorherige Gabe des Antagonisten Rauwolscin aufgehoben werden (Abbildung 10).

Die Aktivierung des präsynaptischen β_2 -Rezeptors führte zu einer erhöhten Noradrenalinfreisetzung. In unseren Versuchen erhöhte sich durch Zugabe des selektiven β_2 -Agonisten Procerol vor dem 2. Reiz die stimulierte Tritiumfreisetzung signifikant aufgehoben um ca. 40 %.

Dieser Effekt konnte mit der Gabe des β_2 -Antagonisten ICI 118.551 verringert, aber nicht vollständig aufgehoben werden, wobei ICI 118.551 keinen Eigeneffekt auf die stimulierte, aber auf die basale Tritiumfreisetzung aufwies (Tabelle 8).

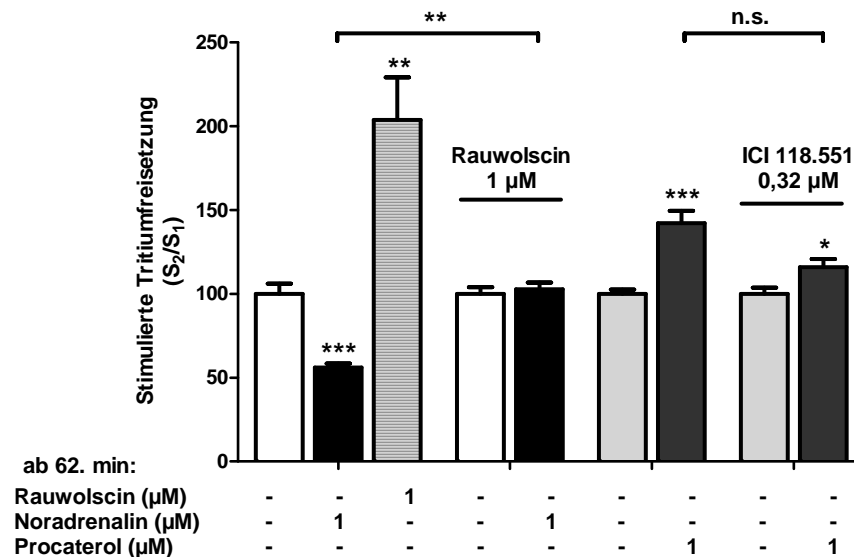


Abbildung 10: Effekt von verschiedenen AR-Agonisten (unselektiv: Noradrenalin 1 μ M, β_2 : Procaterol 1 μ M) und einem α_2 -Antagonisten (Rauwolscin 1 μ M; je ab 62. Min) auf die elektrisch stimulierten Tritiumfreigabe in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe und Interaktion mit antagonistischen Pharmaka (α_2 : Rauwolscin 1 μ M, β_2 : ICI 118.551 0,32 μ M; während der gesamten Superfusion im Medium enthalten). Mittelwert + SEM aus 4-12 Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

- **Versuche an anderen präsynaptischen Rezeptoren**

Analog zu den Versuchen am Meerschweinchenvorhof wurde auch in der Nierenrinde die Wirkung von Agonisten an verschiedenen präsynaptischen Heterorezeptoren auf die stimulierte Tritiumfreigabe untersucht.

Beispielhaft für den Verlauf der Superfusion ist in Abbildung 11 die Zeit-Effekt-Kurve der anteiligen Tritiumfreisetzung der Kontrolle und zweier Versuchsreihen (WIN-55,212-2 1 μ M und Oxotremorin 1 μ M) gezeigt.

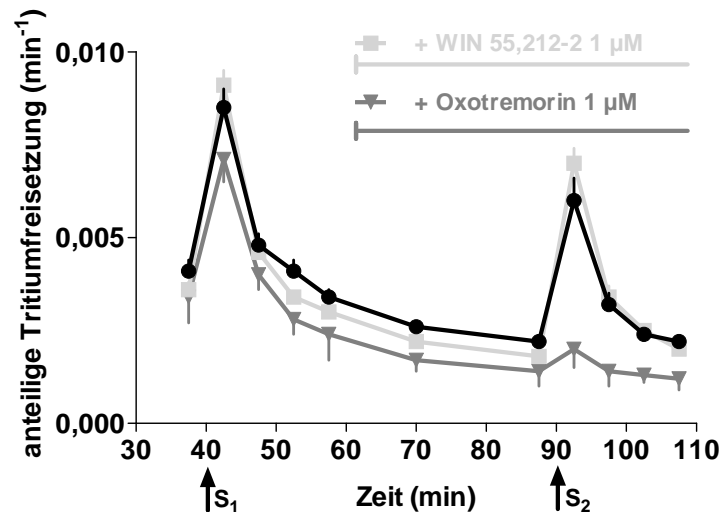


Abbildung 11: Einfluss von WIN 55,212-2 1 μM und Oxotremorin 1 μM (ab 62. Minute) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ($[\text{^3H}]$ -Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 3-8 Experimenten.

Die beiden CB_1 -Agonisten WIN-55,212-2 und CP-55,940 konnten dabei keinen Effekt erzielen (Abbildung 11 & Abbildung 12A), wobei der Wert „WIN-2 1 μM “ auf eine sehr hohe Anzahl von Versuchen zurückgeht und der Wert „WIN-2 10 μM “ zwar eine gewisse Tendenz zur Hemmung der Tritiumfreigabe zeigte, diese aber nicht statistisch signifikant wurde.

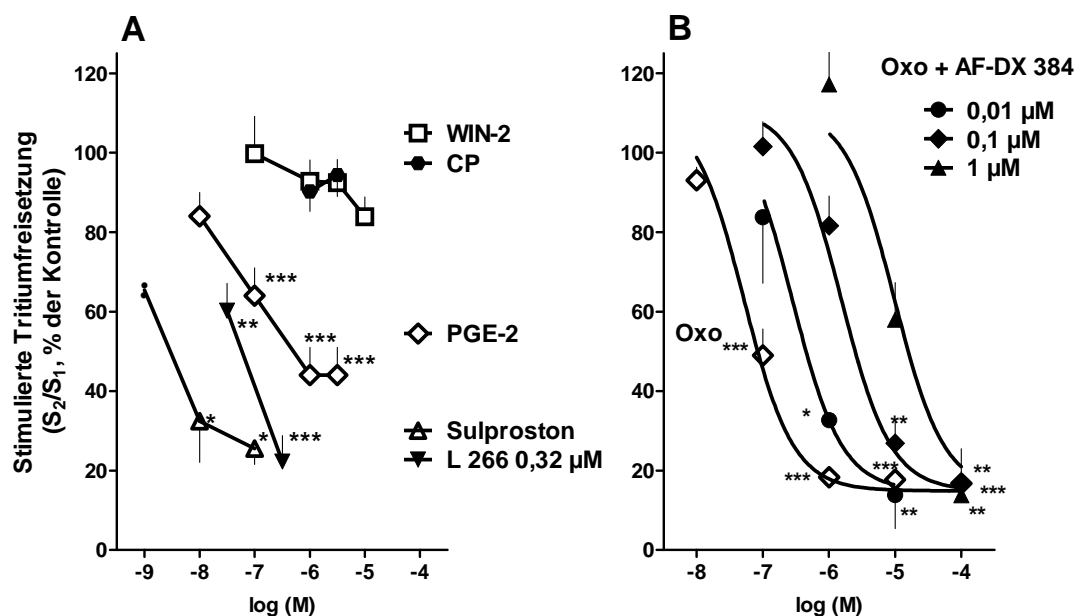


Abbildung 12: Konzentrationsabhängiger Effekt von verschiedenen Rezeptoragonisten (ab 62. min) auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe. Es wurden die Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 (WIN-2) und CP 55,940 (CP), Prostaglandin E_2 (PGE_2) und sein Analogon Sulproston sowie Oxotremorin (Oxo) untersucht. Ferner wurde die

Wechselwirkung von Sulproston mit dem EP₃-Antagonisten L 826266 (L 266) und die Wechselwirkung von Oxotremorin mit dem M_{2/4}-Rezeptor-Antagonisten AF-DX 384 untersucht; der Antagonist war jeweils von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten. Mittelwert und SEM aus 3-13 (bzw 23 für WIN-2 1 µM) Experimenten. Der Mittelwert von Sulproston 1 nM beruht auf zwei Werten, die als solche gekennzeichnet sind. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

Prostaglandin E₂ (Abbildung 12A) konnte die Tritiumfreisetzung in ähnlicher Potenz wie im Meerschweinchenvorhof inhibieren (Tabelle 9). Das Prostaglandin E₂-Analogon Sulproston hemmte die Tritiumfreisetzung ebenfalls und zeigte dabei sogar noch eine höhere Potenz als PGE₂ selbst (Abbildung 12A & Tabelle 9). Der höhere Maximaleffekt von Sulproston verglichen mit PGE₂ ist wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass diese Serie auf Geweben beruht, die von wenigen Tieren stammen, bei denen dieser EP₃-Rezeptor-Agonist offenbar eine besonders starke Hemmung hervorrief; leider wurden hier aus logistischen Gründen keine parallelen Versuche mit PGE₂ durchgeführt. Allerdings wurde in diesen Versuchen die Interaktion mit dem EP₃-Rezeptor-Antagonisten L 826266 untersucht, die einen pA₂-Wert von 7,8 ergab (Abbildung 12A & Tabelle 9)

Tabelle 9: Agonistische (pIC₅₀) und antagonistische (pA₂) Potenz sowie Maximaleffekt der eingesetzten Pharmaka auf die induzierte Tritiumfreisetzung ([³H]-Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchennierenrindengewebe.

Agonist	Maximaler Effekt in der höchsten eingesetzten Konzentration (%)	pIC₅₀	pA₂ des jeweiligen Antagonisten
Oxotremorin	85	7,3	8,7 (AF-DX 384)
Prostaglandin E ₂	55	7,1	-
Sulproston	80	8,8	7,8 (L 826266)

Oxotremorin zeigte einen stärkeren Maximaleffekt als im Vorhof; hier wurde die Wechselwirkung mit mehreren Konzentrationen des M_{2/4}-Antagonisten AF-DX 384 untersucht. Abbildung 13 zeigt den so erhaltenen Schild-Plot mit einem pA₂-Wert von 8,7 und einer Steigung von -0,9, was auf einen kompetitiven Antagonismus hinweist.

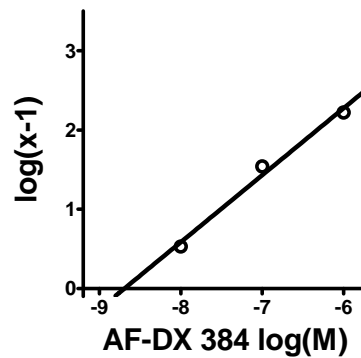


Abbildung 13: Schild-Plot der Wirkung des Antagonisten AF-DX 384 auf die Wirkung des Agonisten Oxotremorin. Aufgetragen ist die AF-DX 384-Konzentration gegen den Logarithmus von $x-1$. x (sog. dose ratio) ist der Quotient der beiden Konzentrationen von Oxotremorin, die einen halbmaximalen Effekt in An- und Abwesenheit von AF-DX 384 hervorrufen.

1.1.3 Einfluss von Urethan und Pentobarbital auf Wirkung und Affinität verschiedener Pharmaka an ihren Rezeptoren

Obwohl man bei in vivo Tierversuchen erwartet, dass die Wahl des Anästhetikums keinen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hat, konnte gezeigt werden, dass im Falle von Urethan und Pentobarbital ein Unterschied in der kardiovaskulären Wirkung verschiedener Pharmaka besteht (*Armstrong et al. 1982*). Da der Mechanismus dieser Interaktion völlig unbekannt ist, sollte in dieser Arbeit an drei Rezeptoren eine mögliche Affinität von Pentobarbital und Urethan mittels Radioligandbindungsstudien und eine mögliche Eigenwirkung oder Interaktion mit Agonisten mittels Superfusionsstudien untersucht werden. Es wurden drei (auch präsynaptisch exprimierte) Rezeptoren ausgewählt, bei denen in vivo der jeweilige Agonist einen kardiovaskulären Effekt zeigt, der bei der Verwendung von Urethan als Anästhetikum schwächer ausgeprägt ist als unter Pentobarbital.

1.1.3.1 Affinität von Urethan und Pentobarbital am CB_1 , α_2 - und H_3 -Rezeptoren

Für alle drei Rezeptoren wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit Radioligandbindungsstudien durchgeführt und die Ergebnisse veröffentlicht (Tabelle 10). Die dort ermittelten K_D -Werte wurden zur Berechnung der geeigneten Radioligandkonzentration und der IC_{50} aus dem pK_i Wert herangezogen.

Tabelle 10: Sättigungsbindungskonstanten K_D , Anzahl der Bindungsstellen B_{max} und Hill-Koeffizienten n_H in Radioligandbindungsstudien an drei Rezeptoren in Ratten-Großhirnrindenmembran.

Rezeptor	Radioligand	K_D (nM)	B_{max}	(n_H)	Veröffentlichung
CB ₁	[³ H]-Rimonabant	1,55 ± 0,10	0,51 ± 0,03 pmol/mg	eins	<i>Kathmann et al. 1999</i>
α ₂	[³ H]-Rauwolscin	1,2 ± 0,2	42,7 ± 0,9 fmol/mg	eins	<i>Schlicker et al. 1994b</i>
H ₃	[³ H]-N-α-Methylhistamin	0,70 ± 0,03	97,7 ± 5,7 fmol/mg	eins	<i>Kathmann et al. 1993</i>

In Radioligandbindungsstudien mit dem Tritium-markierten CB₁-Rezeptor-Antagonisten [³H]-Rimonabant konnte AM-281 als Positivkontrolle den Radioliganden mit einem pK_i von $7,5 \pm 0,1$ (IC_{50} : $70,4 \pm 14,5$ nM) vom CB₁-Rezeptor verdrängen. Auch der relativ neu entdeckte Rezeptor-Antagonist O-2050 zeigte eine gute Affinität am Rezeptor (pK_i : $7,2 \pm 0,1$; IC_{50} : $131,4 \pm 36,5$ nM). Urethan zeigte bis zur maximalen Konzentration von 10 mM keine signifikante Affinität. Pentobarbital konnte in der höchsten Konzentration von 1 mM die Bindung des Radioliganden um 40% hemmen ($p < 0,01$) (Abbildung 14).

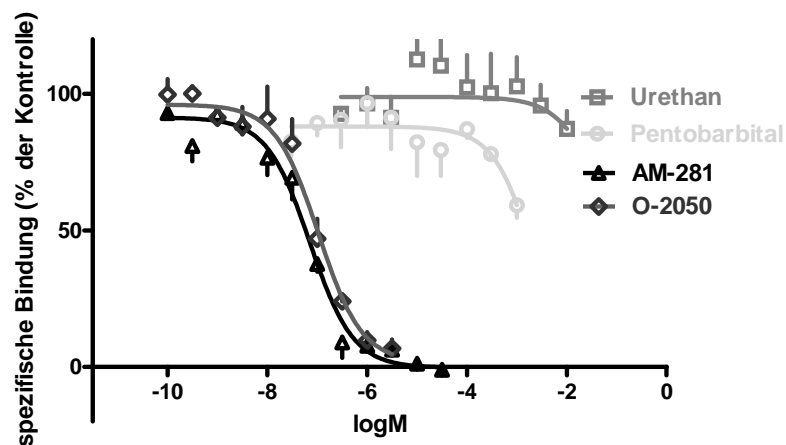


Abbildung 14: Einfluss von AM-281, O-2050, Urethan und Pentobarbital auf die spezifische [³H]-Rimonabant-Bindung (0,5 nM) an Ratten-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 4 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: 83 ± 2 µg; unspezifische Bindung (3 µM CP 55,940): 46 ± 1 %.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, zeigten Urethan und Pentobarbital keinen Einfluss auf die [³H]-Rauwolscin-Bindung (α₂-AR). Unmarkiertes Rauwolscin als Positivkontrolle verdrängte den Radioliganden mit einem pK_i von $8,5 \pm 0,2$ (IC_{50} : $7,7 \pm 2,5$ nM).

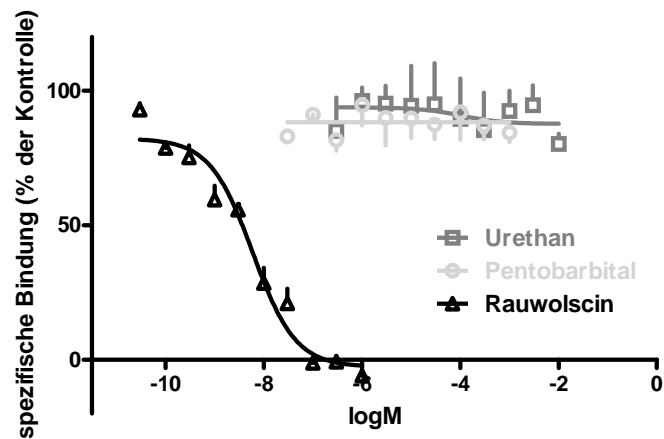


Abbildung 15: Einfluss von Rauwolscin, Urethan und Pentobarbital auf die spezifische [^3H]-Rauwolscin-Bindung (1 nM) an Ratten-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 3-4 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: $247 \pm 3 \mu\text{g}$; unspezifische Bindung (100 μM Noradrenalin): $17 \pm 1 \%$.

Auch am H_3 -Rezeptor konnte keine Affinität der beiden Anästhetika gezeigt werden. Hingegen konnte der H_3 -Rezeptor-Agonist Imetit den Radioliganden [^3H]-N- α -Methylhistamin hochaffin mit einem pK_i von $9,5 \pm 0,1$ (IC_{50} : $0,5 \pm 0,1 \text{ nM}$) verdrängen (Abbildung 16).

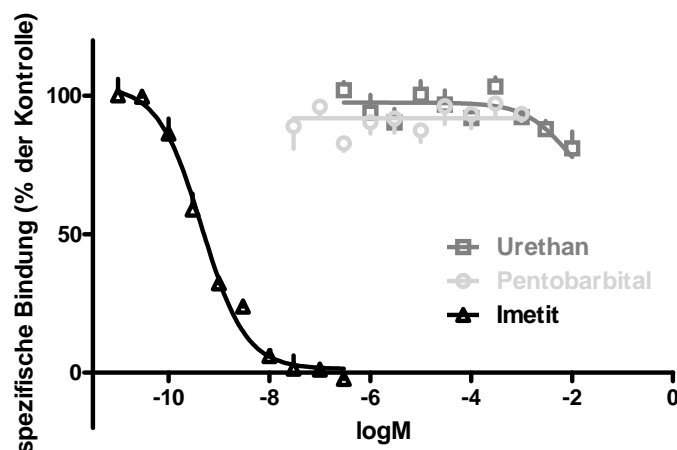


Abbildung 16: Einfluss von Imetit, Urethan und Pentobarbital auf die spezifische [^3H]-N- α -Methylhistamin-Bindung (0,2 nM) an Ratten-Großhirnrindenmembran. Mittelwert und SEM von 3-4 Experimenten. Eingesetzte Proteinmenge: $193 \pm 11 \mu\text{g}$; unspezifische Bindung (2 μM R- α -Methylhistamin): $22 \pm 1 \%$.

1.1.3.2 Aktivität und Interaktion an präsynaptischen Rezeptoren

Analog zu den Bindungsexperimenten sollte an den drei präsynaptischen Rezeptoren eine Eigenwirkung von Urethan und Pentobarbital oder eine Interaktion mit den jeweiligen Agonisten mittels Superfusionsstudien untersucht werden.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die wichtigsten Parameter der jeweiligen Kontrollversuche von verschiedenen Versuchsreihen. Bereits hier erkennt man eine gewisse Eigenwirkung von Pentobarbital.

Tabelle 11: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in superfundierten Großhirnrindenschnitten (4 Versuchsreihen) und Samenleiterstücken (Versuchsreihe „WIN 55,212-2“) der Maus. Urethan (U.) oder Pentobarbital (P.) war jeweils von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten. Mittelwert \pm SEM aus n Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Zur Beachtung: Bei den Versuchsreihen „Urethan“ und „Pentobarbital“ war das jeweilige Anästhetikum nicht im Medium enthalten; es handelt sich hierbei lediglich um die beiden Kontrollserien zu den in Abbildung 18 gezeigten Befunden.

Versuchsreihe	Bedingung		B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
	Rauwolschin	Zusatz				
Urethan	-	-	$0,33 \pm 0,01$	$2,85 \pm 0,20$	$0,86 \pm 0,09$	6
Pentobarbital	-	-	$0,38 \pm 0,02$	$3,87 \pm 0,17$	$1,04 \pm 0,04$	17
Histamin	1 μ M	-	$0,36 \pm 0,01$	$10,73 \pm 0,45$	$1,06 \pm 0,03$	10
	1 μ M	U. 10 mM	$0,34 \pm 0,01$	$10,69 \pm 0,38$	$1,07 \pm 0,01$	10
Clonidin	0,1 μ M	-	$0,37 \pm 0,02$	$8,78 \pm 0,35$	$0,98 \pm 0,05$	8
	0,1 μ M	U. 10 mM	$0,34 \pm 0,01$	$8,52 \pm 0,26$	$1,00 \pm 0,02$	10
	-	-	$0,28 \pm 0,02$	$3,09 \pm 0,12$	$1,13 \pm 0,04$	33-79
	-	U. 10 mM	$0,28 \pm 0,01$	$3,24 \pm 0,09$	$1,12 \pm 0,07$	19
	-	P. 0,32 mM	$0,33 \pm 0,02$ (*)	$3,47 \pm 0,13$	$1,08 \pm 0,02$	8
	-	P. 1 mM	$0,27 \pm 0,07$	$2,15 \pm 0,33$ (*)	$0,99 \pm 0,06$	7
WIN 55,212-2	1 μ M	-	$0,37 \pm 0,01$	$3,41 \pm 0,17$	$0,86 \pm 0,04$	25
	1 μ M	U. 10 mM	$0,39 \pm 0,02$	$2,81 \pm 0,18$ (*)	$0,84 \pm 0,05$	20

- **Eigenwirkung von Urethan und Pentobarbital**

Bevor der Einfluss der beiden Anästhetika Urethan und Pentobarbital auf die Wirkung verschiedener Agonisten an ihren präsynaptischen Rezeptoren mit Hilfe der Superfusion untersucht werden konnte, sollte zunächst eine eventuelle Eigenwirkung ausgeschlossen werden. Dazu wurden die beiden Pharmaka ab der 62. Minute dem Superfusionsmedium zugegeben, das kein Rauwolschin enthielt, um auch eine eventuelle α_2 -Wirkung sichtbar zu machen.

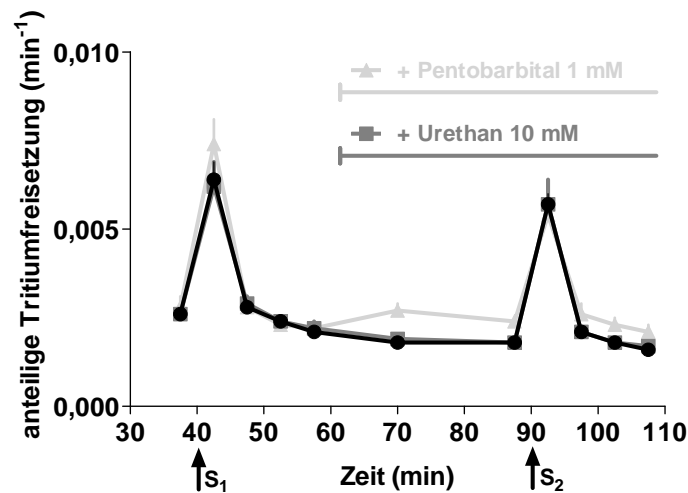


Abbildung 17: Einfluss von Pentobarbital 10 mM und Urethan 1 mM (ab 62. Minute) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ($[^3\text{H}]$ -Noradrenalin) in superfundiertem Großhirnrinden-Schnitten der Maus. Elektrische Reize (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 4-9 Experimenten.

Aus dem Verlauf der Tritiumfreisetzung (Abbildung 17) ist bereits deutlich zu erkennen, dass das sehr lipophile Pharmakon Pentobarbital in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM beim Einleiten ins Superfusionsmedium eine Erhöhung der basalen Tritiumfreisetzung bewirkt. Die induzierte Tritiumfreigabe zeigt zwar einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolle, aber durch die Berechnung des S_2 -Wertes als Fläche unter der Kurve abzüglich des Basalwertes wird der absolute Wert der induzierten Tritiumfreisetzung S_2/S_1 als zu niedrig eingeschätzt. Diesen Zusammenhang kann man auch in Abbildung 18 erkennen, in der Basalwerte und induzierte Freisetzung verschiedener Konzentrationen von Pentobarbital aufgetragen sind. Je höher der Basalwert, desto geringer die stimulierte Tritiumfreisetzung. Dieser Zusammenhang beruht aber auch auf der besonderen experimentellen und mathematischen Durchführung bzw. Auswertung des Versuchs, und man kann daraus nicht unbedingt auf eine Wirkung von Pentobarbital an präsynaptischen Rezeptoren schließen.

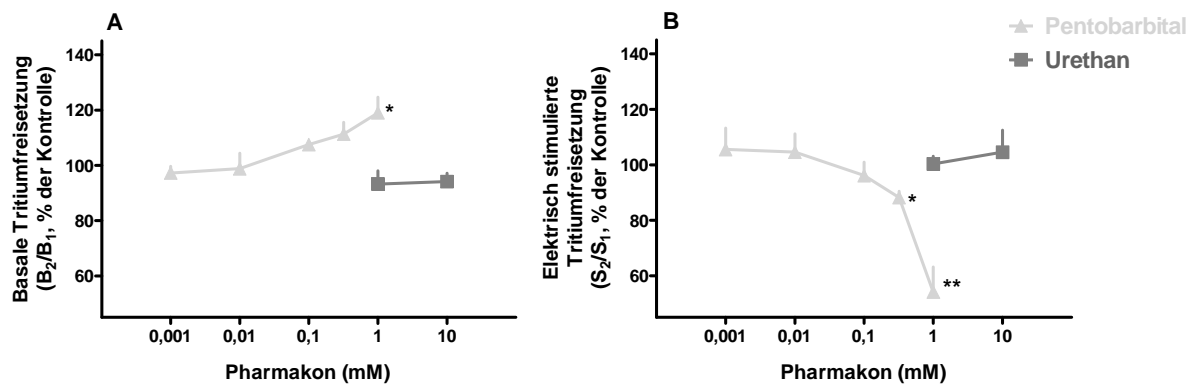


Abbildung 18: Einfluss von Pentobarbital und Urethan (ab 62. min) auf die basale Tritiumfreisetzung (B_2/B_1 in Prozent der Kontrolle) und die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung (S_2/S_1 in Prozent der Kontrolle) in superfundierten Großhirnrindenschnitten der Maus. Mittelwert \pm SEM aus 4-6 Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Urethan zeigte keine statistisch signifikante Abweichung von der Kontrolle, und man kann so eine agonistische Eigenwirkung an präsynaptischen Rezeptoren, einschließlich der in dieser Arbeit interessierenden α_2 - und H_3 -Rezeptoren, ausschließen.

• Interaktion von Urethan mit Agonisten an präsynaptischen Rezeptoren

Die Wirkung von je einem Agonisten an den drei Rezeptoren (CB_1 : WIN 55,212.-2; α_2 : Clonidin; H_3 : Histamin) wurde mittels Superfusion in passenden Geweben nachgewiesen. Dann wurde untersucht, ob Urethan den erhaltenen Effekt signifikant verändern kann.

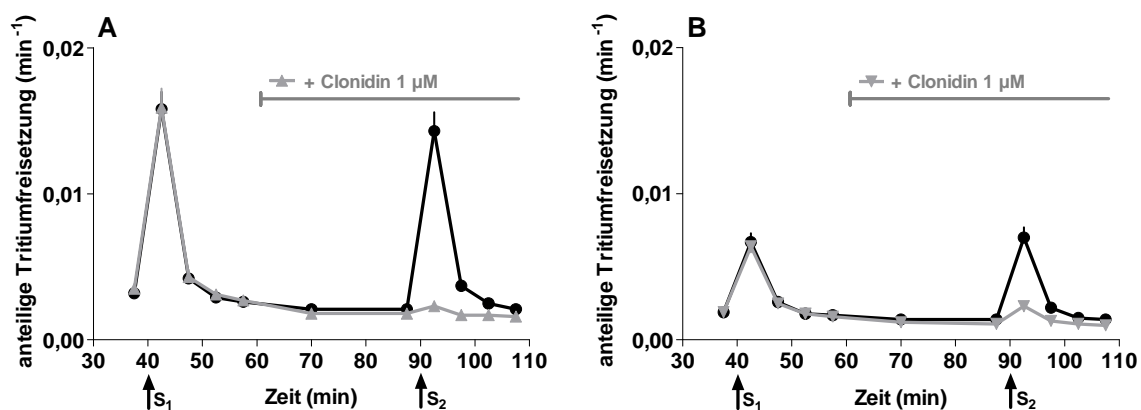


Abbildung 19: Einfluss von Clonidin 1 μ M (Zugabe nach 62. min) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ($[^3H]$ -Noradrenalin) in superfundierten Großhirnrindenschnitten der Maus und Unterschied zwischen Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von Rauwolscin 0,1 μ M. Elektrische Reize (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 4-5 Experimenten.

Beispielhaft ist in Abbildung 19 der Verlauf der Tritiumfreisetzung für die Versuche mit dem α_2 -AR-Agonisten Clonidin in An- und Abwesenheit des α_2 -AR-Antagonisten Rauwolscin in der Großhirnrinde der Maus gezeigt. Wie erwartet, ist die basale und induzierte Tritiumfreisetzung bei Abwesenheit von Rauwolscin höher und zeigt bis zur Zugabe von Clonidin nach 62 Minuten einen ähnlichen Verlauf wie die jeweilige Kontrollkurve. Nach dem 2. Reiz hingegen zeigen nun die beiden Clonidin-Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf und eine fast vollständige Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle.

Trägt man nun die erhaltenen Hemmwerte konzentrationsabhängig auf (Abbildung 20B), erreicht die Versuchsreihe mit Clonidin eine fast vollständige Hemmung der Tritiumfreisetzung, während in Abwesenheit von Rauwolscin Clonidin in der höchsten Konzentration von 1 μM nur eine Hemmung von ca. 80% erreicht.

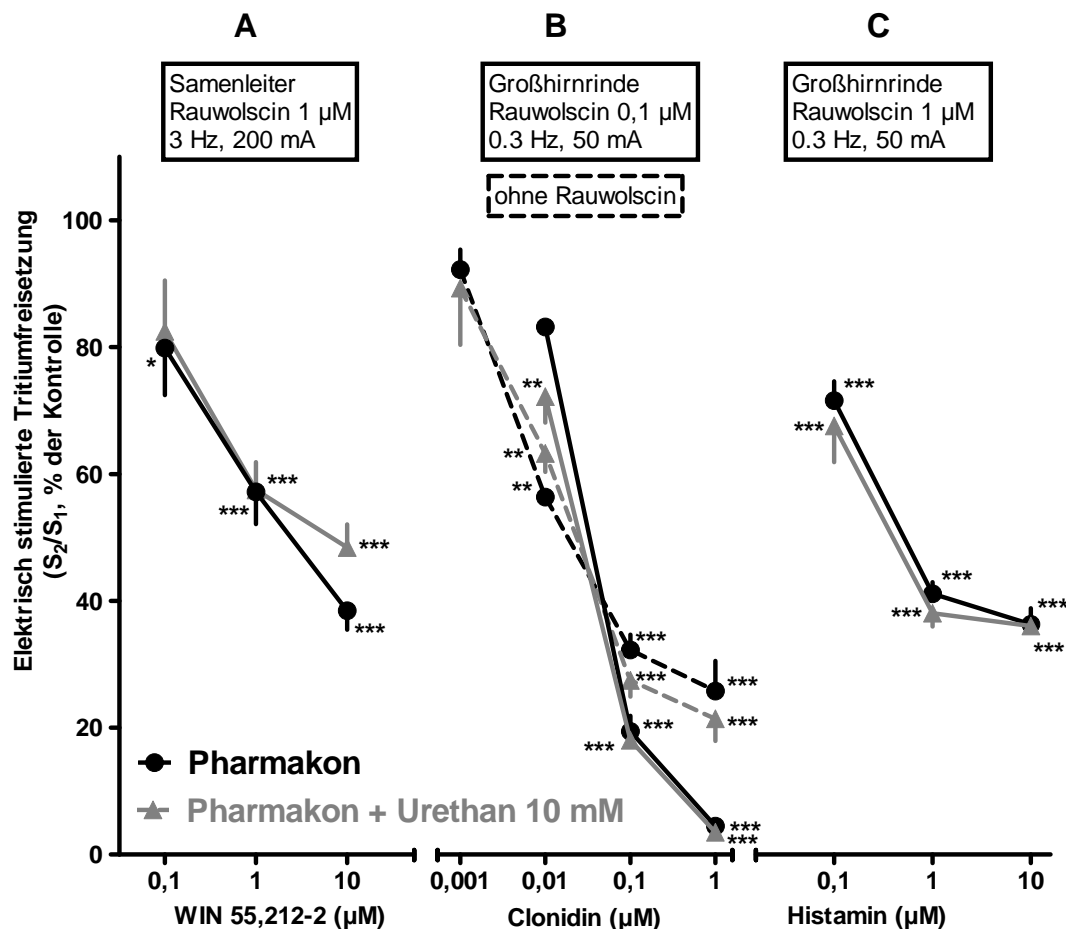


Abbildung 20: Konzentrationsabhängiger Effekt von verschiedenen Rezeptoragonisten auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundiertem Mausgewebe (A: WIN 55,212-2; B: Clonidin; C: Histamin) und Interaktion mit Urethan 10 mM. Mittelwert und SEM aus 4-10 Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Weiterhin wurde der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 im Samenleiter der Maus und Histamin in der Großhirnrinde der Maus untersucht (Abbildung 20A und 20C). Urethan 10 mM konnte keine der Konzentrations-Wirkungs-Kurven signifikant verändern.

- **Interaktion von Pentobarbital mit der Aktivität von Clonidin am α_2 -Rezeptor**

Da die Auswertbarkeit von Superfusionsversuchen mit Pentobarbital mit bestimmten Problemen behaftet ist, wurde in zwei Versuchsreihen die mögliche Änderung der Wirkung von Clonidin am α_2 -Rezeptor durch Interaktion mit Pentobarbital untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied der Effekte von Clonidin in An- und Abwesenheit von Pentobarbital zu erkennen war.

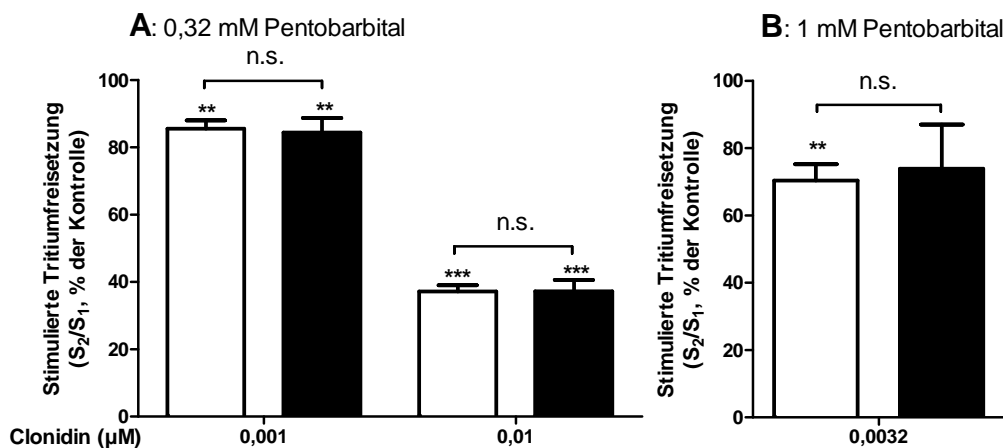


Abbildung 21: Effekt von Clonidin auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundierten Großhirnrindenschnitten der Maus und Interaktion mit 0,32 mM (A) und 1 mM (B) Pentobarbital. Mittelwert und SEM aus 6-8 Experimenten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

1.1.4 Untersuchungen zum endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor

Zur vollständigen pharmakologischen Charakterisierung eines Rezeptors benötigt man einen Agonisten und einen möglichst neutralen Antagonisten. Für den CB₁-Rezeptor waren bisher nur Agonisten wie WIN 55,212-2 oder CP 55,940 und inverse Agonisten wie Rimonabant bekannt, so dass die Frage der Ursache des endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor nicht geklärt ist. Die Substanz NESS 0327 wurde als neutraler Antagonist am CB₁-Rezeptor publiziert (Ruiu *et al.* 2003).

Um das Verhalten von NESS 0327 am präsynaptischen CB₁-Rezeptor zu bestimmen, wurden Superfusionsversuche in Meerschweinchen-Retina-Scheiben und Maus-Samenleiter-Stücken

durchgeführt. Wie Tabelle 12 zeigt, erhöhte NESS 0327 die basale und stimulierte Tritiumfreisetzung in der Retina sehr stark. Im Samenleiter zeigte sich eine Tendenz für eine erhöhte Tritiumfreisetzung, die allerdings statistisch nicht signifikant ist.

Tabelle 12: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in superfundierten Retinascheiben des Meerschweinchens und Samenleiterstücken der Maus in verschiedenen Versuchsreihen. Zusatz von NESS 0327 jeweils von Beginn der Superfusion an. Mittelwert \pm SEM aus n Experimenten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Gewebe	Versuchsreihe	NESS 0327	B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
Meerschwein Retina	TTX/Calcium	-	0,94 \pm 0,07	15,30 \pm 1,30	0,59 \pm 0,11	5
	NESS	-	0,66 \pm 0,02	9,09 \pm 0,48	0,68 \pm 0,04	18
		1 μ M	0,88 \pm 0,04 (***)	18,46 \pm 1,03 (***)	0,82 \pm 0,03	10
Maus Samenleiter	TTX/Calcium	-	0,34 \pm 0,02	2,61 \pm 0,27	1,20 \pm 0,05	2
	NESS	-	0,38 \pm 0,02	4,73 \pm 0,42	1,01 \pm 0,03	11
		1 μ M	0,34 \pm 0,02	5,64 \pm 0,32	0,98 \pm 0,05	12

Die Erhöhung dieser Kontrollwerte in der Retina des Meerschweinchens lässt sich auch im Verlauf der Tritiumfreisetzung (Abbildung 22) gut erkennen.

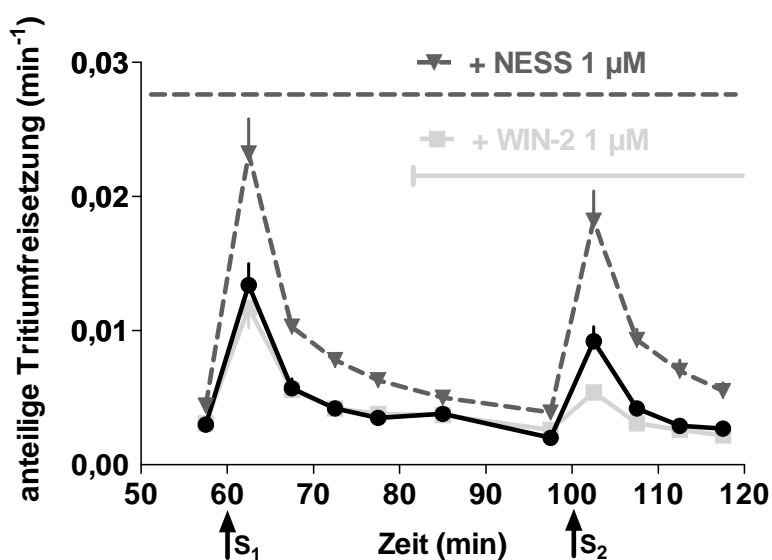


Abbildung 22: Einfluss von WIN 55,212-2 (WIN-2) 1 μ M (Zugabe ab 82 min) und NESS 0327 (NESS) 1 μ M (von Beginn an) auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ($[^3\text{H}]$ -Noradrenalin) in superfundierten Meerschweinchenretinascheiben. Elektrische Reize (3 Hz, 50 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 60 (S_1) und 100 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 4-6 Experimenten.

Die antagonistische Wirksamkeit von NESS 0327 konnte in Studien mit dem CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 gezeigt werden (Abbildung 23). Die Substanz vermag in beiden Geweben die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Agonisten zu höheren Konzentrationen zu verschieben. Allerdings sei hier bereits angemerkt, dass dies erst bei 1 μ M NESS 0327 zu erreichen war, nach den Literaturangaben wäre schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen ein Effekt zu erwarten gewesen.

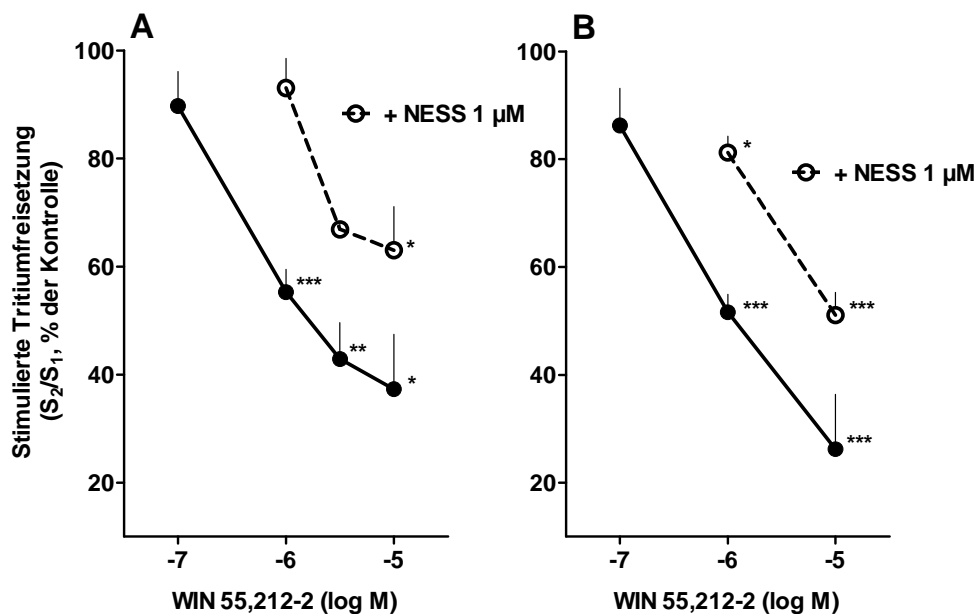


Abbildung 23: Konzentrationsabhängiger Effekt von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundierten Meerschweinchen-Retinascheiben (A) bzw. Maus-Samenleiterstücken (B) und Interaktion mit NESS 0327 (NESS) 1 μ M. Mittelwert und SEM aus 3-10 Experimenten. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 13 zeigt zusammenfassend die Wirkungsstärken von WIN 55,212-2 und NESS 0327 an den beiden Geweben.

Tabelle 13: Agonistische Potenz (pIC_{50}) sowie Maximaleffekt von WIN 55,212 und antagonistische Potenz (pA_2) von NESS 0327 bezüglich der stimulierten Tritiumfreisetzung ($[^3H]$ -Noradrenalin) in superfundiertem Meerschweinchen- und Mausgewebe. Zur Beachtung: Es wurde bei beiden Modellen angenommen, dass WIN 55,212-2 10 μ M den maximalen Hemmeffekt hervorruft.

Gewebe	Maximaler Effekt (%)	pIC_{50}	pA_2
MS Retina	60	6,5	6,8
Maus Samenleiter	70	6,4	7,0

1.1.5 Untersuchungen zur retrograden Informationsübertragung am CB₁-Rezeptor

Nach dem bisherigen Verständnis der Aktivierung des präsynaptischen CB₁-Rezeptors durch Endocannabinoide erfolgt diese im ZNS im Rahmen einer retrograden Informationsübertragung, und zwar unter Anderem nach der postsynaptischen Aktivierung von verschiedenen Rezeptoren. Es ist wenig darüber bekannt, ob ein solcher Mechanismus auch in peripheren Geweben existiert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine α_1 -AR-Aktivierung zur Hemmung der stimulierten Tritiumfreisetzung (³H]-Noradrenalin) führt bzw. –genauer gesagt– ob die Aktivierung postsynaptischer α_1 -AR zur Endocannabinoid-Bildung führt, die ihrerseits über einen retrograd wirkenden Mechanismus die Noradrenalinfreisetzung via präsynaptische CB₁-Rezeptoren hemmt. Als Agonisten wurden Methoxamin und Phenylephrin, als Gewebe Meerschweinchen-Samenleiter gewählt.

Tabelle 14: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S₁ in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S₂/S₁) in superfundierten Samenleiterstücken des Meerschweinchens in verschiedenen Versuchsreihen. Zusatz von Prazosin von Beginn der Superfusion an. Mittelwert \pm SEM aus n Experimenten. ***p<0,001, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Versuchsreihe	Bedingung	B ₁ (%)	S ₁ (%)	S ₁ /S ₂	n
TTX/Calcium	-	0,13 \pm 0,02	3,6 \pm 0,38	0,96 \pm 0,02	2
	-	0,21 \pm 0,02	2,29 \pm 0,09	0,75 \pm 0,03	37
Prazosin	Prazosin 1 μ M	0,33 \pm 0,01 (***)	2,36 \pm 0,14	0,66 \pm 0,03 (*)	19

Tabelle 14 zeigt die basale und stimulierten Tritiumfreisetzung in superfundierten Samenleiterstücken des Meerschweinchens. Dabei zeigt die Anwesenheit von Prazosin eine erhöhte basale Tritiumfreisetzung, was man auch im Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung (Abbildung 24B) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24A) erkennen kann.

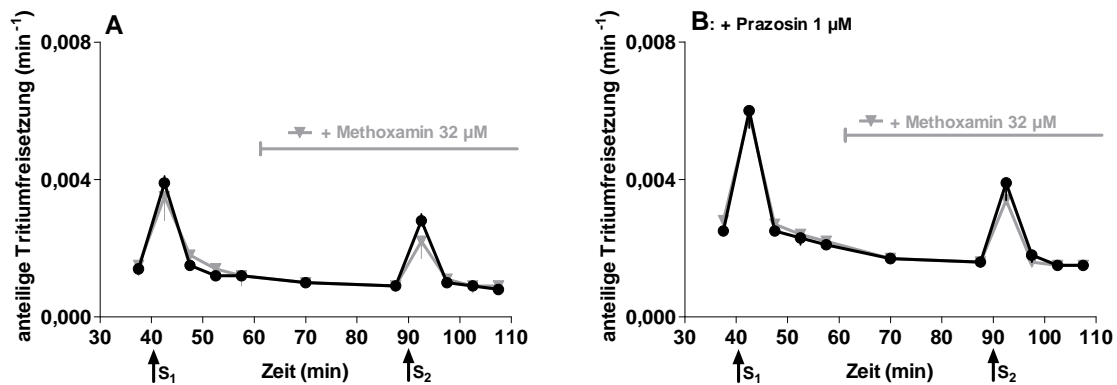


Abbildung 24: Einfluss von Methoxamin 32 μM (Zugabe ab 62 min) und der Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Prazosin 1 μM auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung (^3H -Noradrenalin) in superfundierten Samenleiterstücken des Meerschweinchens. Elektrische Reize (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgten über 120 Sekunden nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten, Mittelwert und SEM aus 4-8 Experimenten.

Abbildung 25A zeigt, dass beide Agonisten die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung in begrenztem Maße und in sehr hohen Konzentrationen hemmen können. Allerdings geht dies auch mit einer Erhöhung der basalen Tritiumfreisetzung nach Einleiten der Pharmaka vor dem zweiten Reiz einher (Abbildung 25B). Der erzielte Effekt sollte mit dem α_1 -AR-Antagonisten Prazosin wieder aufhebbar sein. Hierfür wurde Methoxamin 32 μM verwendet, da bei dieser Konzentration eine relativ starke Hemmung der stimulierten Freisetzung erfolgt, während die basale Tritiumabgabe nicht beeinflusst wird.

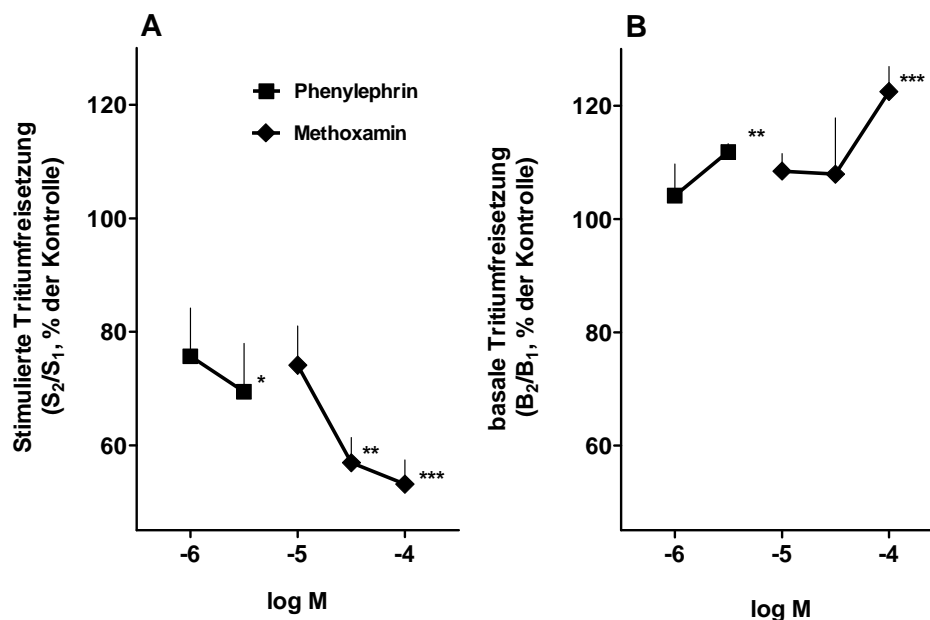


Abbildung 25: Konzentrationsabhängiger Effekt von Phenylephrin und Methoxamin auf die basale (B) und elektrisch stimulierte (A) Tritiumfreisetzung, in Prozent der Kontrolle, in superfundierten Meerschweinchen-Samenleiterstücken. Mittelwert und SEM aus 6-8 Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 26 zeigt allerdings, dass der Hemmeffekt von Methoxamin 32 μM auf die stimulierte Tritiumfreisetzung in An- und Abwesenheit von 1 μM Prazosin etwa gleich stark ausgeprägt ist.

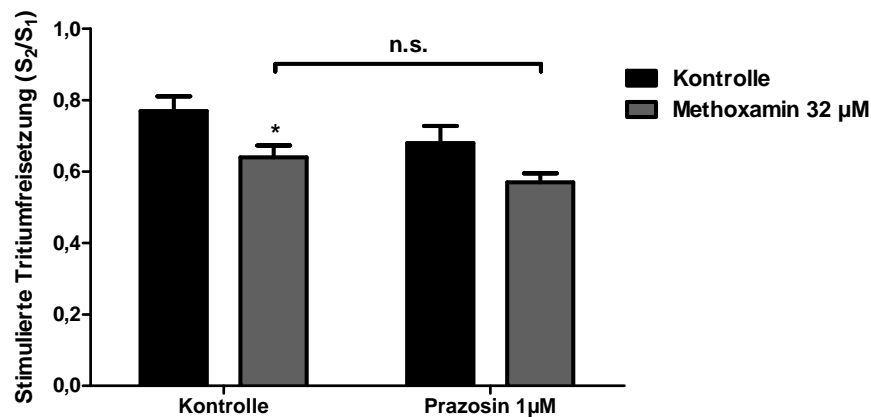


Abbildung 26: Wirkung von Prazosin 1 μM auf den hemmenden Effekt von Methoxamin 32 μM auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in superfundierten Samenleiterstücken des Meerschweinchens. Mittelwert und SEM aus 12 Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

1.2 Sequenzierung des CB_1 -Rezeptors des Meerschweinchens

Die Aminosäuresequenz des CB_1 -Rezeptors war bereits von vielen Arten bekannt, nicht allerdings vom Meerschweinchen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Meerschweinchen- CB_1 -Rezeptor (gp CB_1R) kloniert und sequenziert.

Abbildung 27 zeigt die aus der Basenabfolge resultierende Aminosäuresequenz und vergleicht sie mit der des CB_1 -Rezeptors von drei anderen Säugetierarten. Die gp CB_1R -Sequenz wurde von uns außerdem unter der Nummer DQ355990 in der NIH GenBank® veröffentlicht.

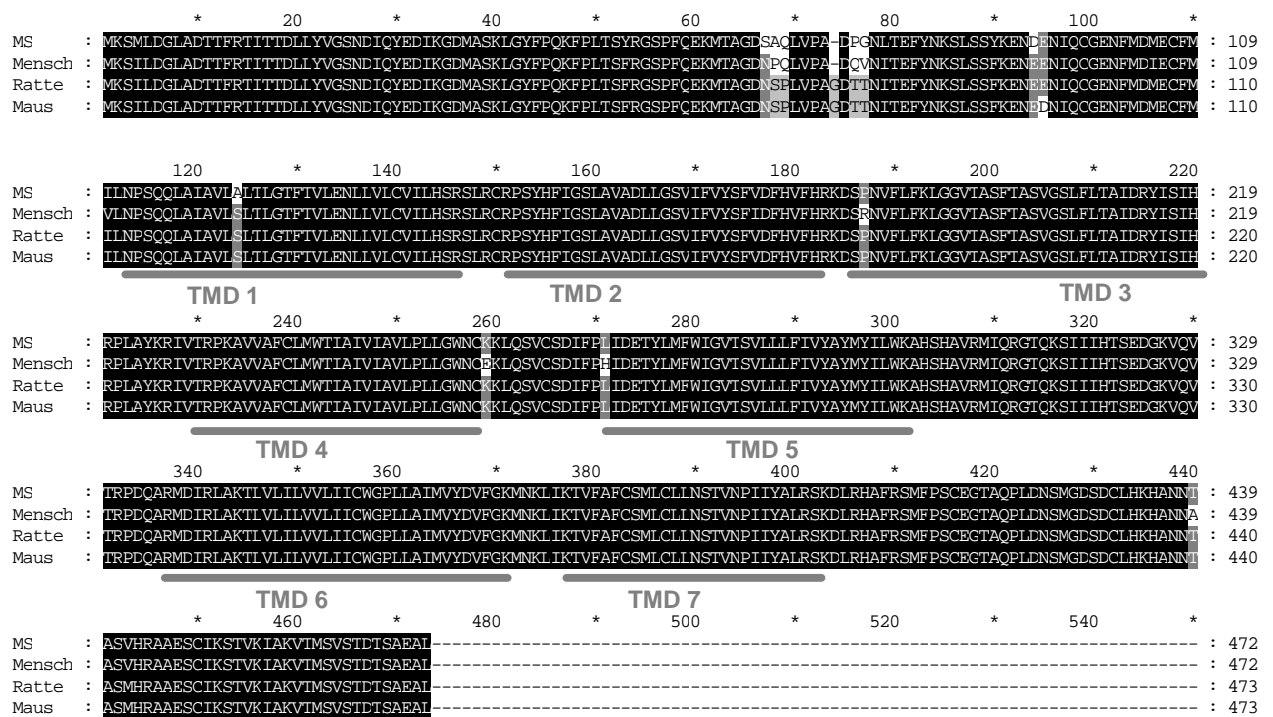


Abbildung 27: Vergleich der Aminosäuresequenz des CB₁-Rezeptors von vier Säugetierarten: Meer-schweinchen (MS, *Cavia porcellus*), Mensch (*Homo sapiens*, Gerard et al. 1990), Ratte (*Rattus norvegicus*, Matsuda et al. 1990) und Maus (*Mus musculus*, Chakrabarti et al. 1995). Die mutmaßliche Verteilung der sieben transmembranären Domänen (TMD 1-7) ist unterstrichen. Schwarze Boxen markieren eine Konser-vierung der jeweiligen Aminosäure in allen vier Spezies, grau in mindestens zwei.

Wenn man zwischen der Homologie (gleiche Aminosäure oder ähnliche physikochemische Ei-genschaften) und der Identität (absolut gleiche Aminosäure) unterscheidet, ergibt sich eine sehr hohe Konservierung in der Gesamtsequenz und im Besonderen in der Sequenz der sieben trans-membranären Domänen (Tabelle 15).

Tabelle 15 Homologie und Identität der Aminosäuren (AS)-Sequenz des CB₁-Rezeptors des Meerschwein-chens im Vergleich zu der von Mensch, Ratte und Maus, in Prozent (TMD – transmembranäre Domäne).

Vergleich der AS-Sequenz des Meerschweinchens zu:		Mensch	Ratte	Maus
Gesamtsequenz (472 - 473 AS)	Homologie	98,7	99,2	99,2
	Identität	96,4	97,3	97,0
TMD-Sequenz (223 AS)	Homologie	99,1	99,6	99,6
	Identität	98,7	99,6	99,6

2 Untersuchungen an anderen Rezeptoren

2.1 Effekt von Abn-CBD an präsynaptischen Rezeptoren

Das abnormale Cannabidiol (Abn-CBD) ist eine chemisch veränderte Variante des natürlich vorkommenden Cannabidiols (Strukturformeln siehe B.1.6). Es wurde bis jetzt keine Aktivität am CB₁-Rezeptor nachgewiesen; die vorhandenen Effekte werden mit einer Aktivität als Ligand eines z. T. endothelial lokalisierten, noch nicht klonierten Rezeptors erklärt (*Jarai et al. 1999*).

Hier sollte untersucht werden, ob Abn-CBD über präsynaptische Rezeptoren die Noradrenalin-freisetzung beeinflusst. Dazu wurden Superfusionsstudien in drei unterschiedlichen Spezies und in verschiedenen zentralnervösen und peripheren Geweben durchgeführt. Die erhaltenen Parameter der Tritiumfreisetzung sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Kontrollwerte der basalen Tritiumfreisetzung (B_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums) und der elektrisch induzierten Tritiumfreisetzung (S_1 in Prozent des Gesamtgewebetritiums und Quotient S_2/S_1) in superfundiertem Gewebe verschiedener Versuchsreihen. Mittelwert \pm SEM aus n Experimenten.

Spezies	Gewebe	B_1 (%)	S_1 (%)	S_2/S_1	n
Maus	Großhirn	$0,41 \pm 0,06$	$10,75 \pm 0,79$	$1,17 \pm 0,03$	4
	Aorta	$0,48 \pm 0,03$	$3,17 \pm 0,66$	$0,93 \pm 0,09$	7
Meerschweinchen	Niere	$0,65 \pm 0,12$	$6,50 \pm 0,82$	$0,78 \pm 0,09$	4
	Vorhof	$0,31 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,37$	$0,51 \pm 0,05$	9
Ratte	Samenleiter	$0,33 \pm 0,01$	$3,00 \pm 0,43$	$1,04 \pm 0,09$	7

Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Tritiumfreisetzung für zwei ausgewählte Gewebe, Samenleiter der Ratte, und Großhirnrinde der Maus. Als Positivkontrolle diente jeweils 1 μ M Prostaglandin E₂ (PGE₂).

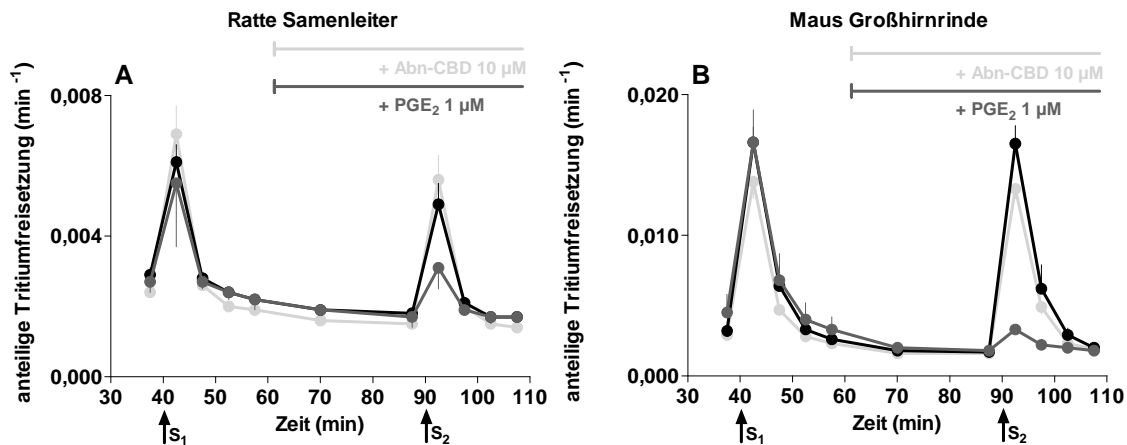


Abbildung 28: Einfluss von abnormalem Cannabidiol (Abn-CBD) 10 µM und Prostaglandin E₂ (PGE₂) 1 µM auf den Verlauf der anteiligen Tritiumfreisetzung ([³H]-Noradrenalin) in superfundierten Samenleiterstücken der Ratte (A) und Großhirnrindenschnitten der Maus (B). Mittelwert und SEM aus 2-7 Experimenten.

Abn-CBD konnte in keiner der fünf Versuchsreihen die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung verändern. Prostaglandin E₂ als Positivkontrolle zeigte hingegen jeweils eine Hemmung der Tritiumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 28 und Abbildung 29).

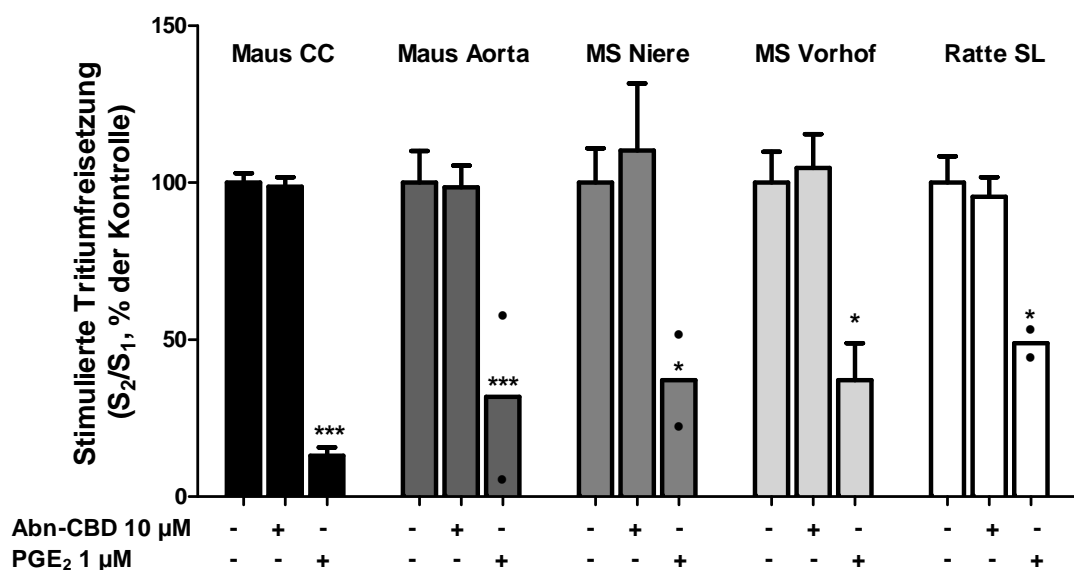


Abbildung 29: Einfluss von abnormalem Cannabidiol (Abn-CBD) 10 µM und Prostaglandin E₂ (PGE₂) 1 µM auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung in fünf verschiedenen superfundierten Geweben: Großhirnrinde der Maus (Maus CC), Aorta der Maus (Maus Aorta), Niere des Meerschweinchens (MS Niere), Vorhof des Meerschweinchens (MS Vorhof) und Samenleiter der Ratte (Ratte SL). Mittelwert und SEM aus 2-7 Experimenten. PGE₂ wurde in einigen Modellen nur in zwei Versuchen untersucht; hier sind anstelle von SEM die beiden Einzelwerte direkt durch Punkte repräsentiert. *p<0,05, *** p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

2.2 Affinität von Endocannabinoiden am Thromboxan-Rezeptor

Die Strukturverwandtschaft von Prostaglandinen und Endocannabinoiden und die ungeklärte Rolle des Thromboxan A₂-Rezeptors bei den kardiovaskulären Wirkungen von Anandamid führten zur Fragestellung, ob Anandamid eine Affinität am TP-Rezeptor besitzt.

Dazu wurden Bindungsstudien an gewaschenen Rattenthrombozyten durchgeführt. Zuerst wurde die Bindung des Radioliganden [³H]-SQ 29,548, eines Tritium-markierten TP-R-Antagonisten, charakterisiert. Die Regression ergab eine einseitige ($n_H = 0,98 \pm 0,03$) Sättigungsisotherme mit einem K_D von $4,7 \pm 1,5$ nM und einem B_{max} von 1415 ± 367 fmol/mg (Abbildung 30).

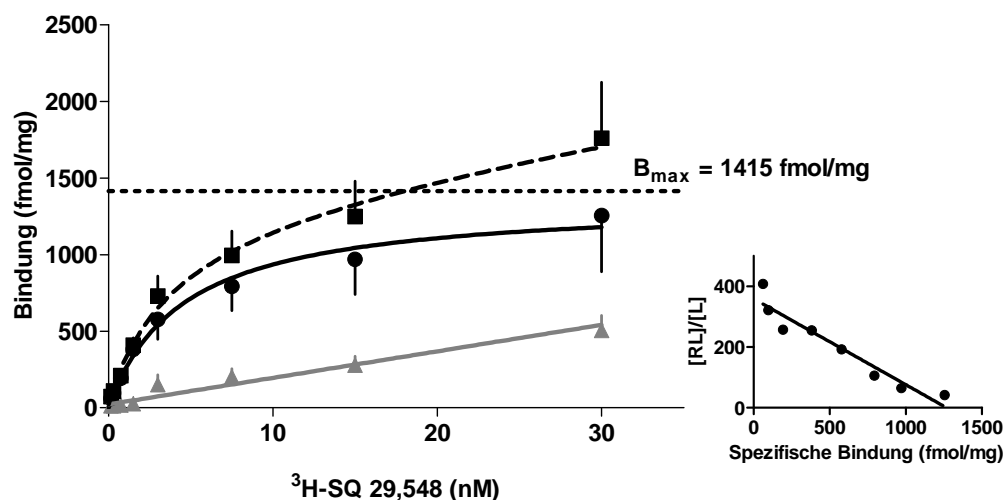


Abbildung 30: Isothermen der totalen, spezifischen und unspezifischen Bindung von [³H]-SQ 29,548 an gewaschenen Rattenthrombozyten und lineare Regression nach Scatchard (kleines Bild). Mittelwert und SEM aus 4 Experimenten. [RL]/[L]: Quotient aus rezeptorgebundenem und freiem Radioliganden. Eingesetztes Protein: $42,1 \pm 12,4$ μ g; unspezifische Bindung (50 μ M kaltes SQ 29,548): 22 ± 2 %.

Zur Bestimmung der Affinität von Anandamid wurden Verdrängungsstudien mit 3 nM [³H]-SQ 29,548 durchgeführt. Nachdem Anandamid den Radioliganden nicht vom Rezeptor verdrängen konnte (Abbildung 31A), wurden zusätzliche Experimente mit Methanandamid, dem enzymatisch stabilen Analogon von Anandamid durchgeführt (Abbildung 31B). Hier zeigte sich in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μ M eine statistisch signifikante Hemmung der Radioligandbindung um 38 % ($p < 0,05$).

Die Versuche wurden in Anwesenheit von $0,5$ % Rinderserumalbumin (BSA) wiederholt, um einen Verlust der sehr lipophilen Substanzen durch Adsorption an den Oberflächen von Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäßen zu vermeiden. Auch hier konnte keine Affinität der beiden Substanzen gezeigt werden (Abbildung 31 gestrichelte Linien), und auch die Hemmung durch 10 μ M Methanandamid konnte nicht wiederholt werden.

Als Positivkontrolle wurde der TP-Rezeptor-Agonist U 46,619 eingesetzt, der eine Affinität mit einem pK_i von $7,3 \pm 0,1$ (IC_{50} : $75,5 \pm 18,8$ nM) zeigte (Abbildung 31)

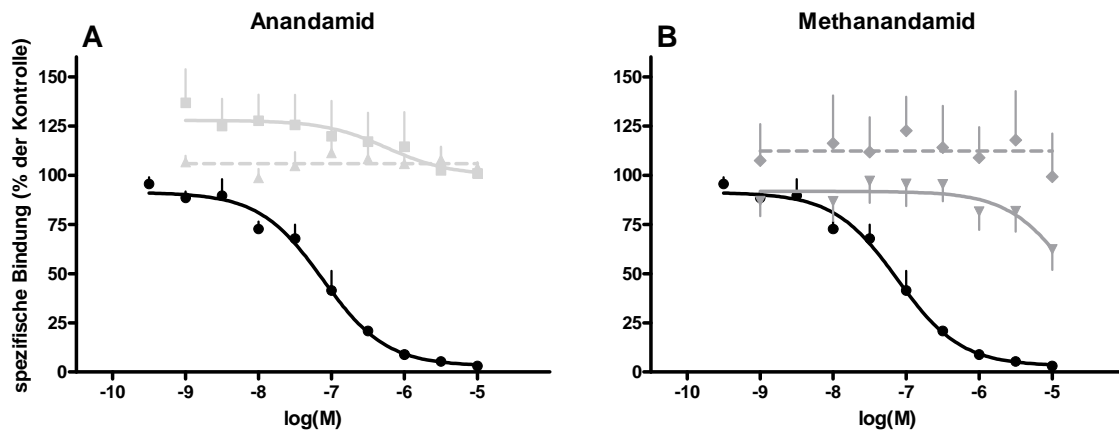


Abbildung 31: Verdrängung von 3 nM $[^3H]$ -SQ 29,548 von gewaschenen Rattenthrombozyten durch U 46,619 (A+B je schwarze Linie), Anandamid (A) und Methanandamid (B). Die Versuche erfolgten jeweils in Anwesenheit (gestrichelte Linien) und Abwesenheit (durchgezogene Linien) von 0,5 % BSA. Mittelwert und SEM von je 3 Experimenten. Eingesetztes Protein $54,7 \pm 2,7$ μ g; unspezifische Bindung (50 μ M kaltes SQ 29,548): 9 ± 1 %.

Da zum Lösen der sehr lipophilen Substanzen Ethanol als Lösungsvermittler eingesetzt wurde, wurde zuletzt ein möglicher Einfluss von Ethanol auf die Bindung untersucht. Die am höchsten eingesetzte Konzentration von Ethanol in den Verdrängungs-Versuchen war 0,3 %, aber erst eine 10-fach höhere Konzentration zeigte eine Tendenz, die $[^3H]$ -SQ 29,548-Bindung zu hemmen; dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 32).

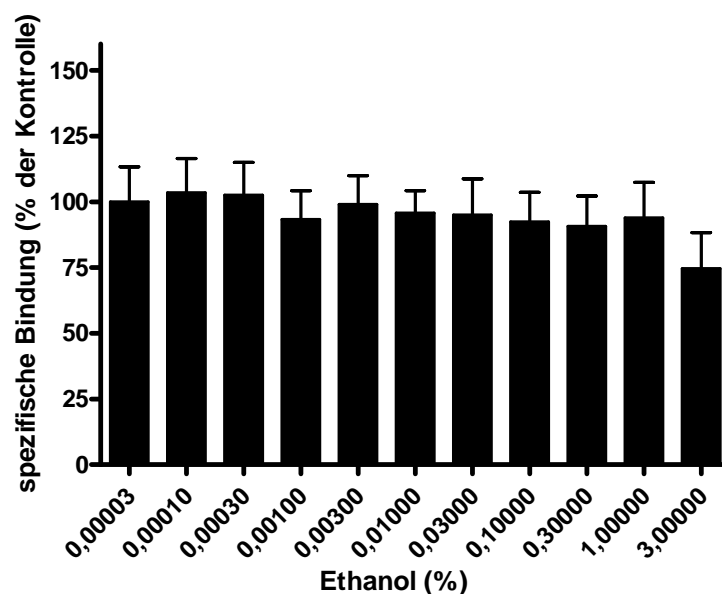


Abbildung 32: Einfluss des Ethanolgehalts im Puffer auf die spezifische $[^3H]$ -SQ 29,548-Bindung an gewaschenen Rattenthrombozyten. Mittelwert + SEM von 4 Experimenten.

D.Diskussion

1 Methodische Vorbemerkungen

1.1 Versuchbedingungen in der Superfusion

Superfusionsversuche dienen der Untersuchung präsynaptischer Mechanismen. Mit Hilfe dieser Methode (*Starke 1977*) wird die Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung durch an präsynaptisch lokalisierten Rezeptoren angreifende Substanzen dargestellt. Um die Transmitter detektieren zu können, kann das zu untersuchende Gewebe mit radioaktiv markiertem Transmitter oder dem radioaktiv markierten Präkursor des Transmitters vorinkubiert werden. Die Freisetzung des Transmitters wird durch chemische oder elektrische Stimulation ausgelöst; und durch die kontinuierliche Durchspülung des Gewebes mit physiologischer Salzlösung kann durch Auffangen des so gewonnenen Superfusats die Radioaktivität und damit die Transmittermenge bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Noradrenalinfreisetzung im noradrenergen System des Gehirns und im sympathischen Nervensystem untersucht. Dazu ist zu bemerken, dass radioaktiv markierte Transmitter das gleiche chemische Verhalten wie ihre nicht markierten Analoga aufweisen, aber wegen ihrer Radioaktivität einfacher quantitativ bestimmt werden können. Das in dieser Arbeit verwendete [³H]-Noradrenalin wird über den neuronalen Noradrenalin-Transporter in die Zelle aufgenommen und nach erfolgter Speicherung in den Vesikeln durch geeignete Stimulation als solches exozytotisch wieder freigesetzt. Die stimulierte Tritiumabgabe besteht unter ähnlichen wie den hier gewählten Versuchsbedingungen zu 90 % aus nicht metabolisiertem [³H]-Noradrenalin (*Baumann und Maitre 1977*). Hingegen besteht das außerhalb der Reizperiode abgegebene Tritium, also die basale Tritiumfreisetzung, fast ausschließlich aus Metaboliten von [³H]-Noradrenalin. Der primäre interessierende Parameter ist die elektrisch stimulierte Tritium- bzw. [³]-Noradrenalin-Freisetzung. Die basale Tritiumfreisetzung ist der Vollständigkeit halber in den Tabellen 6, 8, 11, 12, 14 und 16 angegeben und ist im Wesentlichen von Belang, wenn ein Pharmakon zu einer massiven Erhöhung dieses Parameters führt, weil dann die Berechnung der stimulierten Freisetzung leidet. Dies trifft in dieser Arbeit vor Allem auf die höchste Pentobarbital-Konzentration zu.

Die Qualität der Ergebnisse hängt zum einen von der freigesetzten Tritiummenge und zum anderen von einer guten Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung ab. Durch die richtige Wahl der Parameter für den elektrischen Reiz und der Kalziumkonzentration im Superfusionsmedium für jedes einzelne Versuchsmodell können beide Faktoren optimiert werden. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz und der Calciumkonzentration hat zwar eine höhere Tritiumfreisetzung zur Folge, andererseits bewirkt es eine Abnahme der Modulierbarkeit und ist somit nicht in jedem Fall erstrebenswert (*Starke 1977*). Beispielhaft wurde dieser Effekt in dieser Arbeit in Kapitel C.1.1.2.1 gezeigt. Eine fast physiologische Calcium-Konzentration von 1,625 mM führte zu einem stärkeren Effekt des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 im Vergleich zur doppelt so hohen Calciumkonzentration von 3,25 mM. Da der Effekt bei der höheren Calcium-Konzentration aber immer noch deutlich war und die Versuche mit der niedrigeren Calciumkonzentration aufgrund ihrer signifikant erniedrigten stimulierten Tritiumfreisetzung oft zu nicht auswertbaren Ergebnissen führten, wurde der höheren Calciumkonzentration schließlich der Vorzug gegeben. In dieser Arbeit wurden an insgesamt acht verschiedenen Geweben von drei Tierarten Superfusionsversuche durchgeführt. Die Versuchsbedingungen in den einzelnen Versuchsreihen sind in Kapitel B.2.1.1 aufgeführt. Zum Teil wurden sie in dieser Arbeit, zum Teil in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe optimiert (im Einzelnen waren dies: Maus Aorta: *Schultheiss et al. 2005*; Maus Großhirnrinde: *Schlicker et al. 1992a*; Maus Samenleiter: *Schlicker et al. 2003*; Meerschweinchen Retina: *Schlicker et al. 1996*). Im Allgemeinen kann man sagen, dass Hirnareale eine niedrigere Stimulationsfrequenz benötigen als periphere Gewebe.

Des Weiteren wird bei der Etablierung von Superfusionsexperimenten die Art der Reizweiterleitung untersucht. Die exozytotische Transmitterfreisetzung aus Neuronen erfolgt so, dass Aktionspotentiale entlang der Axone in die Nervenendigungen gelangen und dort zum Ca²⁺-Einstrom und schließlich zur Freisetzung des Transmitters aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt führen. Die Abwesenheit von Calciumionen oder die Tetrodotoxin-vermittelte Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle, welche in das Fortleiten des Aktionspotentials involviert sind, unterbindet die Freisetzung des Transmitters. In Kapitel C.1.1.1 wurde repräsentativ für alle in dieser Arbeit untersuchten Versuchsmodelle gezeigt, dass die [³H]-Noradrenalinfreisetzung in vier Geweben des Meerschweinchens unter diesen Versuchsbedingungen Ca²⁺-abhängig und Tetrodotoxin-sensitiv war und somit mit der physiologischen Transmitterfreisetzung vergleichbar ist; dies wird als „quasi-physiologische“ Transmitterfreisetzung bezeichnet. Die quasi-physiologische Transmitterfreisetzung wurde für folgende Versuchsmodelle

bereits beschrieben: noradrenerges System in der Großhirnrinde (*Schlicker et al. 1992a*) sowie im Samenleiter der Maus (*Schlicker et al. 2003*). Für die weiteren hier verwendeten Versuchsmodelle wurden entsprechende Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt, auf die Darstellung der einzelnen Ergebnisse allerdings verzichtet.

Eine weitere Versuchsbedingung, der Zusatz der Hilfspharmaka Desipramin und Rauwolscin zum Superfusionsmedium, erklärt sich, wenn man bedenkt, dass der freigesetzte Transmitter seinerseits die messbare Tritiummenge beeinflusst, indem er durch aktive Transporter in die Zelle zurück aufgenommen wird und infolge eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch Aktivierung präsynaptischer Autorezeptoren die eigene Freisetzung hemmt. Beides führt zu einer Abnahme der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt. Desipramin als Hemmstoff des Noradrenalin-Transporters (NAT) und Rauwolscin als α_2 -Autorezeptor-Antagonist dienen also der Ausschaltung dieser beiden Mechanismen. Weitere Gründe sind die Vermeidung von Wechselwirkungen des Testpharmakons am NAT oder α_2 -AR und im Falle von Rauwolscin auch noch die Beobachtung, dass das Ausmaß der CB₁-Rezeptor-vermittelten Inhibition der Noradrenalinfreisetzung nach Blockade des α_2 -AR erhöht ist (*Schlicker und Göthert 1998*). Allerdings gab es auch hier einige Ausnahmen, so benötigen Versuche in der Retina keines dieser beiden Pharmaka, weil dort [³H]-Noradrenalin in Ermangelung noradrenerger Zellen in dopaminerge Zellen aufgenommen wird (für dessen Dopamin-Transporter es eine hohe Affinität besitzt) und die beobachteten Effekte auf die freigesetzte Tritiummenge einer Dopaminfreisetzung entsprechen (*Schlicker et al. 1996*) und somit eine Blockade von NAT und α_2 -AR hinfällig wird. Außerdem wurde in Versuchen in der Großhirnrinde der Maus und der Niere des Meerschweinchens z. T. auf Rauwolscin verzichtet, da die Wirkung von Clonidin oder Noradrenalin auf den präsynaptischen α_2 -AR interessierte. Ferner wurde im Zuge der Optimierung der Versuchsbedingungen im Vorhof des Meerschweinchens in einigen Versuchen auf die Zugabe von Rauwolscin verzichtet. In Abbildung 5 und Abbildung 9 kann man den Einfluss des Rauwolscins auf die Tritiumfreisetzung sehr gut nachvollziehen.

1.2 Bindungsstudien

Radioligandbindungsstudien stellen eine sensible Meßmethode zur Bestimmung der Größe einer Rezeptorpopulation sowie der Affinität zwischen Rezeptor und Liganden dar. Ähnlich wie in der Superfusion sollte sich der radioaktiv markierte Ligand genauso verhalten wie der

entsprechende unmarkierte Ligand. Die ist bei den hier verwendeten Tritium-Markierten Liganden der Fall, da der Austausch eines [^1H]- gegen das [^3H]-Isotop die physikochemischen Eigenschaften nicht maßgeblich verändert. Weitere wichtige Eigenschaften eines Radioliganden nach *Bylund und Yamamura (1990)* sind eine möglichst hohe Affinität und Selektivität zum Rezeptor, die allerdings in einer reversiblen Bindung resultieren sollte, da ein entsprechender Displacer ihn auch wieder verdrängen können muss. Zusätzlich sollte sich nach einer definierten Inkubationszeit ein Sättigungsgleichgewicht einstellen, in dem gleichzeitige Assoziations- und Dissoziationsvorgänge sich die Waage halten.

In den Bindungsexperimenten dieser Arbeit wurden vier verschiedene Radioliganden eingesetzt, die alle die oben genannten Eigenschaften aufweisen. Drei davon wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach in vergleichbaren Versuchsbedingungen verwendet, so dass auf eine Charakterisierung der Sättigungsbindung verzichtet wurde und die K_D -Werte den entsprechenden Publikationen entnommen wurden (siehe Tabelle 10). Der vierte Radioligand [^3H]-SQ 29,548 ist ein selektiver Antagonist am TP-Rezeptor und in der Literatur für seine gute Eignung als Radioligand für Bindungsstudien an gewaschenen Thrombozyten der Ratte (*Miki et al. 1992; Romstedt et al. 1993*) und des Menschen (*Hedberg et al. 1988; Rotondo et al. 1993*) beschrieben. Der in Rahmen dieser Arbeit erhaltene K_D von 4,7 nM ist gut vergleichbar mit den Literaturwerten von 3,1 nM (Ratte, *Romstedt et al. 1993*) und 5,0 nM (Mensch, *Hedberg et al. 1988*). Die maximale Anzahl der Bindungsstellen ($B_{\max} = 1415 \text{ fmol/mg}$ oder $0,4 \text{ fmol}/10^6$ Thrombozyten) unterscheidet sich leicht von den Literaturwerten an Ratten- ($0,2 \text{ fmol}/10^6$, *Romstedt et al. 1993*) und humanen (2633 fmol/mg , *Hedberg et al. 1988*) Thrombozyten, was sich durch die Unterschiede im Aufreinigungsprozess und der Proteinbestimmung bzw. Zellzählung erklären lässt. Dagegen ließ sich sowohl durch nichtlineare Regression der Sättigungsisothermen also auch durch Scatchard-Analyse zeigen, dass die Bindung des Radioliganden an nur einer Bindungsstelle sättigbar erfolgt. Ein Einfluss von Ethanol, das aufgrund der starken Lipophilie der getesteten Substanzen als Lösungsvermittler zugegeben wurde, konnte ausgeschlossen werden.

1.3 Molekularbiologie

Um die Sequenz eines Proteins zu bestimmen, ist es, seitdem durch die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *Mullis et al. 1986*) die Möglichkeit besteht, DNA in größerem

Umfang zu amplifizieren, am einfachsten, das entsprechende Gen zu klonieren und sequenzieren und danach die Aminosäureabfolge mit Hilfe des genetischen Codes zu „übersetzen“. In dieser Arbeit wurde anstelle von genomischer DNA, die die gesamte Erbinformation eines Organismus enthält, aus mRNA revers transkribierte cDNA verwendet, die nur Gene enthält, die gerade von einer bestimmten Zelle zu Proteinsynthese „benutzt“ werden. Dies hat zum einen den Vorteil, dass eine größere Menge des gewünschten DNA-Abschnitts vorliegt, wenn man weiß, dass dieses in einem bestimmten Organismus oder Teilen davon gehäuft vorkommt. Zum anderen kann man sogar Nachweise erbringen, ob ein bestimmtes Gen in bestimmten Regionen oder bei bestimmten pathogenen oder physiologischen Zuständen aktiv ist. In unserem Fall wurde zur Sequenzierung des Meerschweinchen-CB₁-Rezeptors aus Hippokampi isolierte mRNA verwendet, da bekannt war, dass dieser Rezeptor in großer Dichte im Meerschweinchen-Hippokampus vorliegt (*Schlicker et al. 1997; Ross et al. 1998*) und somit auch die entsprechende mRNA in ausreichender Zahl vorhanden ist. Um den gewünschten DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, benötigt man passende Primer, die die PCR-Reaktion starten und damit das PCR-Produkt an beiden Enden begrenzen. In dieser Arbeit wurden als Primer die Enden des bekannten menschlichen CB₁-Rezeptors verwendet, die aufgrund der starken Konservierung zwischen den beiden Spezies die gewünschte DNA vervielfältigen konnten. Da man zur Sequenzierung eines Gens wieder einen Primer zum Start der Sanger-Reaktion (*Sanger et al. 1977*) benötigt und die PCR-Produkte meist zu kurz sind, bedient man sich eines Plasmid-Vektors, um das amplifizierte Stück in Bakterien weiter zu vervielfältigen und verschiedene andere nützliche Eigenschaften des Plasmids zu nutzen. In unserem Falle wurde pGEM®4z verwendet, der neben definierten Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme das lacZ-Blaufärbessystem und ein Ampicillinresistenzgen besitzt (siehe auch Kapitel B.2.3.6), was eine einfache Identifizierung positiver Klone ermöglicht. Zusätzlich enthält dieser Vektor zwei sogenannte Promotoren vor und nach der Klonierungsstelle, die als Primererkennungssequenz eine einfache Sequenzierung des einklonierten Stückes ermöglichen. Das Übersetzen in Aminosäuren erfolgte direkt online in den Datenbanken des NCB, die alle veröffentlichten Sequenzen sammelt und der Öffentlichkeit zur Verfügung stellt. Hier wurde auch die Homologie und Identität zwischen den verschiedenen Spezies bestimmt.

2 Identifizierung von präsynaptischen Rezeptoren in zwei verschiedenen Meerschweinchengeweben

Zur Identifizierung von funktionellen präsynaptischen CB₁-Rezeptoren dienten in der Vergangenheit vor allem Gewebe von Mäusen und Ratten (eine Übersicht bietet *Szabo und Schlicker 2005*), weniger oft vom Meerschweinchen. Allerdings zeigte sich, dass gerade im Meerschweinchen in verschiedenen Geweben präsynaptische CB₁-Rezeptoren nachgewiesen wurden, die in Ratte und Maus nicht gefunden wurden. So konnte zum Beispiel in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Noradrenalinfreisetzung in Hippocampus und Aorta durch CB₁-Rezeptoren im Meerschweinchen, aber nicht in Ratte oder Maus, inhibiert werden kann (*Schlicker et al. 1997; Schultheiss et al. 2005*). Wenn man bedenkt, dass dieser Effekt auch in humanen Hippocampi nachgewiesen wurde (*Molderings et al. 1999*), stellt sich die Frage, ob das Meerschweinchen nicht ein viel besserer Prädiktor des humanen Endocannabinoidsystems darstellt als die viel verwendeten Ratten und Mäuse. Folglich sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Meerschweinchengewebe auf funktionelle präsynaptische CB₁-Rezeptoren untersucht werden.

Im menschlichen Vorhof waren nämlich von *Molderings et al. (1999)* ebenfalls durch Superfusionsstudien präsynaptische CB₁-Rezeptoren nachgewiesen worden, während dies in der Maus (*Trendelenburg et al. 2000; Schlicker et al. 2003*) und der Ratte (*Lay et al. 2000*) nicht gelang. Im Meerschweinchen-Vorhof wurden auch diverse andere modulatorische präsynaptische Rezeptoren nachgewiesen, die z. B. zu Vergleichszwecken oder – bei fehlender Nachweisbarkeit von CB₁-Rezeptoren – als Positivkontrolle verwendet werden können. Unter anderem wurde ein Einfluss auf die Noradrenalinfreisetzung durch Histamin-Rezeptoren (*Luo et al. 1996*), P2X-Rezeptoren (*Sperlagh et al. 2000*), Opioid-Rezeptoren (*Fuder et al. 1986*), α_2 -Adrenozeptoren (*Trendelenburg et al. 1995*) sowie muskarinische Acetylcholinrezeptoren (*Lindmar et al. 1968; Olmez et al. 1995*) und Prostanoid-Rezeptoren (*Mantelli et al. 1990*) aufgezeigt.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Noradrenalinfreisetzung durch den CB₁-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 konzentrationsabhängig inhibiert wurde und sich dieser Effekt in Anwesenheit des entsprechenden Antagonisten Rimonabant rechtsverschieben ließ. Der erhaltene pA₂-Wert von 8,3 ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien am CB₁-Rezeptor (8,2: *Croci et al. 1998; Schultheiss et al. 2005*). Da außerdem das inaktive Enantiomer des Agonisten, WIN 55-212-3, keinen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung aufwies, kann man

davon ausgehen, dass im Meerschweinchen-Atrium funktionelle präsynaptische CB₁-Rezeptoren die Noradrenalinfreisetzung beeinflussen.

Zusätzlich wurde der Effekt von WIN 55,212-2 noch unter zwei weiteren Versuchsbedingungen getestet, und zwar in Abwesenheit von Rauwolschin und bei einer niedrigeren Calciumkonzentration von 1,63 mM. Beides entspricht mehr der physiologischen Situation als die Standard-Bedingungen (3,25 mM Ca²⁺ und 1 µM Rauwolschin). Der deutlichere Hemmeffekt von WIN 55,212-2 bei der niedrigeren Calciumkonzentration kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass die Neurotransmitterfreisetzung u. A. durch einen sättigbaren Einfluss von Calciumionen bestimmt wird und der entsprechende Effekt mit steigender Calciumkonzentration nach Erreichen des Sättigungslevels abnimmt (*Starke 1977*). Die zweite Versuchsbedingung mit einer Calciumkonzentration von 3,25 mM ohne Zusatz von Rauwolschin zeigte die erwartete niedrige stimulierte Tritiumfreisetzung, und so wurde die Tendenz einer Hemmung der stimulierten Tritiumfreisetzung nicht signifikant. Bei beiden Bedingungen waren sehr viele Versuche aufgrund eines zu geringen S₁-Wertes (< 0,9 %) nicht auswertbar, so dass die Zweckmäßigkeit der Standard-Bedingungen bestätigt wurde.

Ein ebenfalls aus der Literatur bekanntes Phänomen ist die Erhöhung der stimulierten Tritiumfreisetzung in Anwesenheit von Rimonabant, welches in einigen Geweben an CB₁-Rezeptoren als inverser Agonist wirkt (*Szabo und Schlicker 2005; Pertwee 2005b*). Zur näheren mechanistischen Abklärung dieses Phänomens wurden eigene Versuchsserien durchgeführt, auf die unter Kapitel D.4 eingegangen wird.

Zum Vergleich der Superfusionsergebnisse mit bereits bekannten präsynaptischen Modulatoren im Meerschweinchenvorhof wurden muskarinische Acetylcholinrezeptoren und Prostaglandin-Rezeptoren ausgewählt. Der maximale Hemmeffekt des unselektiven M-Rezeptor-Agonisten Oxotremorin von 55 % ist sehr viel höher als der von WIN 55,212-2 an CB₁-Rezeptoren erzielte von 35%, andererseits etwas geringer als vergleichbare Literaturwerte (ca. 70%; *Kobayashi et al. 1987; Haunstetter et al. 1994; Oe et al. 1999*), was sich wahrscheinlich ähnlich wie bei WIN 55,212-2 mit dem hohen Calciumgehalt des Superfusionsmediums erklären lässt. Die antagonistische Potenz des Antagonisten AF-DX 384 ist jedoch gut vergleichbar mit Literaturwerten (*Alexander et al. 2008*) und belegt die Wirkung an präsynaptischen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, wahrscheinlich vom M₂ und M₄-Subtyp (*Trendelenburg et al. 2003*).

Auch der maximale inhibitorische Effekt von PGE₂ mit 65 % Hemmwirkung war höher als der CB₁-vermittelte Effekt, aber geringer als in der Literatur (90%; *Mantelli et al. 1991*).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Meerschweinchenvorhof ein weiteres Beispiel für die bessere Eignung von Meerschweinchengewebe zur Detektion von funktionellen präsynaptischen CB₁-Rezeptoren darstellt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die CB₁-Rezeptoren in Mensch und Meerschweinchen eine höhere Rezeptordichte auf noradrenergen Neuronen aufweisen als bei Ratte und Maus. Allerdings wurde dies bisher noch nicht systematisch untersucht und bleibt so lange Spekulation.

Das zweite Meerschweinchen-Gewebe, das auf präsynaptische CB₁-Rezeptoren untersucht werden sollte, war die Nierenrinde. Hierzu sind keine Untersuchungen am Menschen bekannt, in der Maus konnte in vergleichbaren Versuchen an der Maus kein Effekt von WIN 55,212-2 gezeigt werden (*Schultheiss 2005*). Allerdings zeigte sich in der Ratte ein Einfluss von Anandamid auf die chemisch (KCl) induzierte Noradrenalinfreisetzung in Nierenarteriensegmenten (*Deutsch et al. 1997*). Interessanterweise gab es in der Literatur überhaupt keine systematischen Untersuchungen zur präsynaptischen Modulation in der Meerschweinchen-Nierenrinde, so dass uns noch eine Reihe weiterer Superfusionsstudien an diesem Gewebe sinnvoll erschien.

Ein Einfluss von WIN 55,212-2 auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung konnte jedoch in diesem Gewebe auch nach einer sehr hohen Anzahl von Versuchen nicht festgestellt werden, und auch ein anderer Cannabinoid-Rezeptor-Agonist, CP 55,940, zeigte keinen Effekt. Somit scheint das Vorhandensein eines funktionellen präsynaptischen CB₁-Rezeptors in der Meerschweinchen-Nierenrinde unwahrscheinlich.

Dagegen konnte Oxotremorin einen deutlichen Hemmeffekt zeigen. Es wurde die Möglichkeit genutzt, mit Hilfe von drei verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten AF-DX 384 einen so genannten Schild-Plot (*Arunlakshana und Schild 1959*) aufzunehmen und damit einen pA₂ von 8,7 zu bestimmen. Die Steigung des Schild-Plots, die nicht signifikant verschieden von eins ist, deutet auf eine kompetitive Hemmung an einer gemeinsamen Ligand-Bindungsstelle hin.

Nachdem analog zum Vorhof auch in der Nierenrinde eine konzentrationsabhängige Wirkung von PGE₂ gezeigt werden konnte, wurde unserer Arbeitsgruppe kurz vor der Fertigstellung dieser Arbeit der selektive EP₃-Rezeptor-Antagonist L 826266 zur Verfügung gestellt. Die konzentrationsabhängige Wirkung des selektiven EP₃-Agonisten Sulproston wurde von L 826266 rechtsverschoben. Der pA₂-Wert von 7,8 ähnelt Werten, die von *Jones et al. (2008)* und unserer

Arbeitsgruppe (unveröffentlicht) in anderen EP₃-Rezeptor-Modellen beschrieben wurden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die präsynaptische Modulation der Noradrenalinfreisetzung in der Nierenrinde durch Prostanoid-Rezeptoren vom EP₃-Subtyp zustande kommt. Der höhere Maximaleffekt von Sulproston im Vergleich zum Prostaglandin E₂ stellt – wie schon im Ergebnisteil angedeutet wurde – wahrscheinlich ein Artefakt dar, das in einem sehr verschiedenen Zeitraum aufgenommenen Versuchsreihen vorliegt.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit an der Meerschweinchennierenrinde noch der Einfluss von verschiedenen Adrenozeptoren auf die Noradrenalinfreisetzung untersucht, da es noch keine vergleichbaren Arbeiten in der Literatur gibt. Die sympathische Innervierung der Meerschweinchenniere wurde zwar schon früh mittels Autoradiographie und Fluoreszenzhistochemie nachgewiesen (*Dolezel et al. 1976*), und auch Hinweise auf das Vorhandensein verschiedener Adrenozeptoren gibt es seit längerem, jedoch fehlte eine systematische Untersuchung der funktionellen präsynaptischen Modulation. Die Adrenozeptoren der Meerschweinchenniere wurden in der Literatur vor allem mittels Radioligandbindungsstudien untersucht, und so konnte man zwischen verschiedenen Rezeptor-Subtypen unterscheiden, für die selektive Radioliganden bekannt waren. Gefunden wurden dabei: α_2 -AR (*Brodde et al. 1983; Erdbrugger et al. 1995*), wahrscheinlich vom α_{2B} -Subtyp (*Uhlen et al. 1995*), α_1 -AR (*Buscher et al. 1996*) und auch β -AR, wobei der β_1 -Subtyp wahrscheinlich dominiert und der β_2 -Subtyp nur im geraden Teil des proximalen Tubulus vorkommt (*Engel et al. 1985; Lew und Summers 1985*).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals nachgewiesen werden, dass α_2 - und β_2 -AR einen funktionellen modulatorischen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung haben. Dabei war der Effekt auf α_2 -Rezeptoren besonders ausgeprägt, hier konnte der α_2 -Antagonist Rauwolscin die induzierte Tritiumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle verdoppeln, und der Effekt des unspezifischen Agonisten Noradrenalin konnte durch vorherige Zugabe von Rauwolscin vollständig gehemmt werden. Am β_2 -Rezeptor gab es durch den selektiven Agonisten Procaterol eine 50 %-ige Erhöhung der stimulierten Tritiumfreisetzung, der selektive Antagonist ICI 118.551 hatte alleine keinen Effekt, konnte aber den Procaterol-Effekt in den hier gewählten Konzentrationen verringern.

Interessant ist hierbei auch ein Vergleich mit anderen Spezies. *Trendelenburg et al. (1994)* konnten in humanen Nierenrinden einen vergleichbaren Effekt von Rauwolscin auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung zeigen. Untersuchungen an β -AR in humanen Nierenrinden

liegen nicht vor. Dagegen liegen mehrere Arbeiten zur Modulation der stimulierten Noradrenalinfreisetzung in Rattennierenrinden vor. Dabei konnte sowohl ein Einfluss von α_1 - (Murphy und Majewski 1989; Murphy und Majewski 1990b; Taoda et al. 2001) als auch von β -Rezeptoren (Murphy und Majewski 1990a; Lakhani et al. 1994) gezeigt werden. Die exakte Bestimmung des β -Subtyps blieb dabei umstritten. Autoradiographien hatten ähnlich wie im Meerschweinchen eine Dominanz von β_1 - im Vergleich zu β_2 -Rezeptoren gezeigt, aber die Effekte auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung waren von β_2 -Subtyp-selektiven Pharmaka wesentlich stärker als die der entsprechenden β_1 -selektiven, wobei ja auch allgemein in anderen Geweben und Spezies meistens der β_2 -Rezeptor als präsynaptischer Modulator auftritt (Gilsbach und Hein 2008). Interessant wäre also für die Zukunft eine Untersuchung der Meerschweinchennierenrinde auf einen präsynaptisch-modulierenden Effekt selektiver β_1 -Pharmaka.

3 Einfluss von Urethan und Pentobarbital auf Aktivität und Affinität verschiedener Pharmaka an ihrem Rezeptors

Für in vivo bzw. in situ Experimente in Versuchstieren werden diese vor Versuchsbeginn mit Hilfe verschiedener Anästhetika betäubt. Armstrong et al. (1982) erkannten, dass dabei die Wahl des Anästhetikums durchaus Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben kann. Sie beobachteten, dass der Effekt von α_2 -Agonisten (Clonidin und Oxymetazolin) auf die Herzfrequenz in mit Pentobarbital betäubten Ratten wesentlich ausgeprägter als in mit Urethan anästhetisierten Tieren war. Analog dazu konnte die mit uns kooperierende Arbeitsgruppe von B. Malinowska (Uniwersytet Medyczny, Białystok, Polen) in bisher unveröffentlichten Daten zeigen, dass sowohl die Verminderung der elektrisch induzierten Herzfrequenz durch den CB_1 -Agonisten CP 55,940 als auch der Einfluss auf den diastolischen Blutdruck durch den H_3 -Agonisten Imetit in Pentobarbital-anästhetisierten Ratten wesentlich ausgeprägter als in mit Urethan betäubten Tieren war. Im Falle des Imetit blieb der Effekt bei Verwendung von Urethan sogar gänzlich aus. Es hatte sich also bestätigt, dass Urethan einen deutlichen Effekt auf die Versuchsergebnisse hat. Mit in vitro Versuchen sollte in dieser Arbeit ein möglicher molekularer Effekt des Urethans auf die entsprechenden Rezeptoren bzw. auf die Wirkung ihrer Agonisten untersucht werden.

Dazu wurden zunächst Bindungsstudien an den drei Rezeptoren, CB_1 , α_2 und H_3 , in Ratten-Großhirnrinden-Membransuspensionen durchgeführt. Dabei konnte auf eine Rezeptorcharakte-

risierung durch Sättigungsbindungsstudien verzichtet werden, da an allen Rezeptoren in unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit bereits gearbeitet wurde und die entsprechenden Daten veröffentlicht sind. Unter den damals optimierten Versuchsbedingungen wurde mit Verdrängungsstudien untersucht, ob Urethan oder Pentobarbital Affinität zu den entsprechenden Rezeptoren aufweisen, wobei jeweils ein bekannter Ligand als Positivkontrolle diente.

Im Einzelnen wurde zunächst die Affinität am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor mittels Verdrängung des Radioliganden [³H]-Rimonabant untersucht. Dieser hatte in Sättigungsbindungsstudien unserer Arbeitsgruppe an Rattengroßhirnrindenmembran einen Dissoziationskonstante K_D von 1,55 ± 0,1 nM und eine maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} von 0,51 ± 0,03 pmol/mg ergeben (Kathmann *et al.* 1999). Die K_D-Werte ähneln den in der Literatur beschriebenen Werten (Hirst *et al.* 1996: Rattenkleinhirnmembranen: K_D 0,61 ± 0,12 nM; Rinaldi-Carmona *et al.* 1996: Rattengroßhirnsynaptosomenmembranen: K_D: 0,61 ± 0,06 nM; Jung *et al.* 1997: Rattengroßhirn-Primärkulturen: K_D: 0,76 ± 0,09 nM; Busch *et al.* 2004: Rattenohrspeicheldrüsenmembranen: K_D: 0,41 ± 0,03 nM; Ross *et al.* 1998: Meerschweinchenvorderhirnmembranen: K_D: 1,24 ± 0,21 nM; Abood *et al.* 1997: Maus-Gesamthirnmembranen: K_D: 0,16 ± 0,01 nM).

Als Positivkontrolle dienten zwei CB₁-Rezeptor-Liganden, die beide noch nicht an Rezeptoren dieses Gewebes untersucht worden waren; O-2050 wurde sogar bisher in überhaupt keiner Bindungsstudien untersucht. Beide zeigten eine vergleichbare Affinität am Rezeptor mit pK_i-Werten von 7,5 (AM-281) bzw. 7,2 (O-2050). Der Wert für AM-281 ist etwas niedriger als der in Rattenhippokampusmembranen von Gifford *et al.* 1997 gefundene von 7,9 und der in unserer Arbeitsgruppe an Meerschweinchengroßhirnrindenmembranen bestimmte von 8,2 (Schultheiss 2005).

Des Weiteren wurden mit [³H]-N- α -Methylhistamin Affinitäten am H₃-Rezeptor bestimmt. Die Sättigungsbindung an Rattengroßhirnrindenmembranen hatte hier einen K_D von 0,70 ± 0,03 nM bei einem B_{max}-Wert von 97,7 ± 5,7 fmol/mg ergeben (Kathmann *et al.* 1993), was ebenfalls vergleichbar mit diversen Literaturstellen war: K_D: 0,37 ± 0,04 nM (Ratten –Gesamthirnmembranen, West *et al.* 1990); K_D: 0,7 nM Maus-Gesamthirnrinde, Schlicker und Marr 1997); K_D: 0,7 nM (Maus-Parietalkortexmembranen, Cumming *et al.* 1994); K_D: 1,0 nM (Meerschweinchen-Cingulum-cortexmembranen, Cumming *et al.* 1994); K_D: 1,1 ± 0,4 nM (Schweinevorderhirnmembranen, Mezzomo *et al.* 2007).

Auch hier zeigte die Positivkontrolle Imetit eine hohe Affinität; der pKi von 9,5 war vergleichbaren Literaturwerten sehr ähnlich (pKi: 9,8 (*Kathmann et al. 1993*); pKi: 9,5 (*Yao et al. 2006*), beide an Rattengroßhirnrindenmembranen).

Schließlich erfolgte die Untersuchung der Affinität am α_2 -Rezeptor mit Hilfe des selektiven Radioliganden [³H]-Rauwolscin, dessen Bindungsparameter am entsprechenden Gewebe (K_D : $1,2 \pm 0,2$ nM; B_{max} : $42,7 \pm 0,9$ fmol/mg) in unserer Arbeitsgruppe bestimmt worden waren (*Schlicker et al. 1994b*). Der K_D reihte sich ebenfalls gut in die Literatur ein: Rattengroßhirnrindenmembranen: K_D : $1,8 \pm 0,3$ nM (*Broadhurst und Wyllie 1986*) und $1,8 \pm 0,3$ nM (*Cheung et al. 1982*); humane Vorderhirnrindenmembranen: K_D : $4,0 \pm 0,9$ nM (*De Vos et al. 1991*).

Die Verdrängung des Radioliganden durch unmarkiertes Rauwolscin ergab einen pKi von 8,5, was in der Spannweite der publizierten Werte in vergleichbarem Gewebe liegt (*Cheung et al. 1982*: 8,2; *Broadhurst und Wyllie 1986*: 8,0; *Schlicker et al. 1994b*: 8,6).

Urethan und Pentobarbital konnten keinen dieser drei Radioliganden von ihrem Rezeptor verdrängen. Lediglich eine sehr hohe Konzentration von Pentobarbital (1 mM) führte am CB₁-Rezeptor zu einer statistisch signifikanten Hemmung von 40%. Dies ist allerdings eine so hohe Konzentration, dass es zum einen in einigen Versuchen zum Auskristallisieren des Pentobarbitals führte, zum anderen damit kaum physiologische Werte repräsentiert werden.

In Studien zur Pharmakokinetik von Pentobarbital in Ratten wurde nach einer i.v.-Dosierung von 50 mg/kg bzw. 40 mg/kg nach einer Stunde eine Pentobarbital-Plasma-Konzentration von ungefähr 0,1 mM bzw. 0,05 mM gemessen (*Hatanaka et al. 1988*; *Jung und Prasad 1989*), in einer anderen nach oraler Gabe von 40 mg/kg ca. 0,05 mM (*Knodell et al. 1980*). Malinowska und Mitarbeiter verwendeten in den hier verglichenen in vivo Studien 300 μ mol/kg, was ungefähr 68 mg/kg entspricht, allerdings i.p. appliziert.

Zur Pharmakokinetik von Urethan in der Ratte gibt es keine publizierten Daten, in der Maus erreichte eine einmalige Dosierung von 1,2 g/kg, was vergleichbar zu den in den in vivo Studien von Malinowska verwendeten 14 mmol/kg (1,25 g/kg) ist, eine maximale Plasmakonzentration von ca. 15 mM nach einer Stunde, die in 12 h auf ungefähr 6 mM absank (*O'Flaherty und Sichak 1983*), generell wird eine Plasmakonzentration von 10-15 mM für eine Sedierung bei chirurgischen Interventionen als ausreichend erachtet (*Koblin 2002*).

Zusammenfassend kann man aus den Versuchsergebnissen schließen, dass Urethan und Pentobarbital keine nennenswerte Affinität an den genannten Rezeptoren besitzen.

Deswegen sollte als Nächstes untersucht werden, ob eventuell eine funktionelle Aktivität von Urethan oder Pentobarbital an den drei oben genannten Rezeptoren besteht. Dies würde nicht im Widerspruch zur fehlenden Affinität stehen, man denke nur an nicht-kompetitive Interaktionen oder eine direkte Einwirkung auf den jeweiligen Agonisten. Die Aktivität wurde wieder im Versuchsmodell der Superfusion an präsynaptischen Rezeptoren in jeweils geeigneten Geweben untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass Urethan keine Eigenwirkung auf die basale Tritiumfreisetzung und auf die elektrisch induzierte Noradrenalinfreisetzung in Rattengroßhirnrindenschnitten besaß, wenn es vor dem 2. Reiz dem Versuchsmedium zugegeben wurde. Dies galt sogar für die sehr hohe Konzentration von 10 mM, bei der man schon osmotische Wirkungen erwarten könnte. Pentobarbital erhöhte zwar konzentrationsabhängig die basale Tritiumfreisetzung und erniedrigte die stimulierte Tritiumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Nach einem Blick auf die anteilige Tritiumfreisetzung über die Zeit kann man jedoch sehr schnell erkennen, dass dies kein direkter Einfluss auf die stimulierte Tritiumfreisetzung ist, sondern dass sich durch die erhöhte basale Tritiumfreisetzung eine vermeintlich niedrigere Fläche zwischen den Kurven ergibt. Die beiden Wirkungen von hohen Konzentrationen von Pentobarbital beruhen möglicherweise auf einem unspezifischen Membraneffekt (wahrscheinlich aufgrund seiner Lipophilie). Im hohen Konzentrationsbereich ist Pentobarbital deswegen ungeeignet für Superfusionsstudien.

Für die Experimente an CB₁-Rezeptoren wurde der Samenleiter der Maus als Modell gewählt, und es konnte in Kontrollstudien mit dem Agonisten WIN 55,212-2 eine konzentrationsabhängige Wirkung, ähnlich wie in der Literatur beschrieben (*Trendelenburg et al. 2000; Schlicker et al. 2003*), gezeigt werden. Präsynaptische α_2 - und H₃-Rezeptoren sind ebenfalls schon in unserer Arbeitsgruppe in der Großhirnrinde der Maus untersucht worden (*Schlicker et al. 1992b; Kathmann et al. 1993; Schlicker et al. 1994a*) und die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde entsprechen den damals erzielten Ergebnissen.

Die Versuche mit Clonidin als α_2 -AR-Agonist wurden teils ohne und teils mit Rauwolscin als α_2 -AR-Antagonist (allerdings mit einer geringeren Konzentration (0,1 μ M statt 1 μ M)) durchgeführt. Der Grund für die Verwendung von Rauwolscin in einem Teil der Versuche liegt in der

Überlegung, dass Urethan auch als allosterischer Modulator die Wirkung von Rauwolscin als Antagonisten verstärken könnte, ohne direkt mit dem Agonisten Clonidin zu reagieren. Beispiele für solche Interaktionen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, unter anderem auch am α_2 -AR, sind hinlänglich bekannt (eine Übersicht bietet *May et al. 2007*).

In allen vier Versuchssystemen (WIN 55,212-2; Histamin; Clonidin ohne bzw. mit Rauwolscin) wurden nun die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Agonisten in Anwesenheit von Urethan (von Beginn der Superfusion an) aufgenommen. Keine der Kurven wurde dadurch nennenswert beeinflusst, so dass man schlussfolgern kann, dass Urethan keine direkte oder indirekte Wirkung an diesen drei präsynaptischen Rezeptoren besitzt.

Zuletzt wurde trotz der schlechten Eignung hoher Konzentrationen von Pentobarbital für die Superfusion doch in zwei kleinen Versuchsreihen dessen Einfluss auf die Wirkung von Clonidin auf die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung untersucht. Zur Überlegung stand, ob nicht von Anfang an die Annahme falsch war, Urethan würde den kardiovaskulären Effekt der verschiedenen Agonisten *in vivo* hemmen, sondern das Gegenteil der Fall sein könnte, dass Pentobarbital diese Wirkungen verstärkt. Jedoch konnte auch in diesem Versuchsmodell kein Effekt von Pentobarbital gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte also keine Affinität oder funktionelle Wirksamkeit von Urethan und Pentobarbital an den drei präsynaptischen Rezeptoren gezeigt werden, und so bleibt der molekulare Mechanismus der *in vivo* erhaltenen Daten *in vitro* weiter unaufgeklärt.

4 Untersuchungen zum endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor

Zur Charakterisierung von CB₁-Rezeptoren wäre ein neutraler Antagonist besonders hilfreich (z.B. VCHSR: *Hurst et al. 2002*). *Ruiu et al. (2003)* stellten eine Substanz vor, die ein Derivat von Rimonabant darstellt und ein neutraler CB₁-Antagonist sein soll. Diese Substanz, NESS 0327, wurde unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. NESS 0327 hatte in Bindungsstudien an Mausvorderhirnmembranen eine außergewöhnlich hohe Affinität zum CB₁-Rezeptor gezeigt (pK_i: 12,5; *Ruiu et al. 2003*), was in unserer Arbeitsgruppe auch an Rattengroßhirnrindenmembranen nachgewiesen wurde (pK_i: 11,0; unveröffentlichte Daten). Seine Eigenschaft als neutraler Antagonist wurde durch zwei *in vitro*- (elektrisch induzierte Zuckungsantwort in Maus- und Rattensamenleitern und [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Mauskleinhirnmembranen) und zwei *in vivo*-Studien (Hot-Plate- und Tail-Flick-Schmerztests an Mäusen) nachgewiesen. In die-

sen Versuchen hatte Rimonabant jeweils eine Eigenwirkung entgegengesetzt der des Antagonisten, während NESS 0327 keine Eigenwirkung, aber Antagonismus bei gleichzeitiger Gabe des Agonisten WIN 55,212-2 zeigte (Ruiu et al. 2003; Tambaro et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Eigeneffekt und die antagonistische Potenz von NESS 0327 in zwei verschiedenen Geweben untersucht, von denen bekannt ist, dass die Noradrenalinfreisetzung durch CB₁-Agonisten gehemmt wird und durch Rimonabant gesteigert wird: Meerschweinchen-Retina (Schlicker et al. 1996; Schultheiss et al. 2005) und Maus-Samenleiter (Schlicker et al. 2003), welcher besonders interessant war, da er auch von Ruiu et al. (2003) zur in vitro Charakterisierung von NESS 0327 verwendet worden war. In beiden Geweben konnte NESS 0327 in Superfusionsstudien erst in einer relativ hohen Konzentration von 1 µM die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von WIN 55,212-2 rechtsverschieben und damit einen Antagonismus zeigen, der mit einem pA₂-Wert von 6,8 bzw. 7,0 charakterisiert wurde. Ruiu et al. (2003) und Tambaro et al. (2005) hatten in ihren in vitro-Tests einen pA₂ von 12,5 an der Maus und von 8,5 an der Ratte bestimmt. Dieser große Unterschied im gleichen Testsystem (Zuckungsantwort am Samenleiter) ist trotz der verschiedenen Spezies erstaunlich und wird von den Autoren der jüngeren Publikation, welche die Daten von der Ratte enthält, nicht diskutiert. Der Unterschied zu den in dieser Arbeit erzielten Daten lässt sich zum Teil mit der Verschiedenheit der Testsysteme erklären. So wurde in der Studie von Ruiu et al. (2003) die Zuckungsantwort als Pendant des freigesetzten Transmitters und in der vorliegenden Studie der freigesetzte Transmitter (Noradrenalin) direkt bestimmt.

Besonders interessant war auch die Tatsache, dass NESS 0327 bei einer Konzentration von 1 µM einen Eigeneffekt auf die (basale und) stimulierte Tritiumfreisetzung aufwies, und zwar besonders ausgeprägt in der Meerschweinchen-Retina, in der sich die stimulierte Tritiumfreisetzung S₁ im Vergleich zur Kontrolle verdoppelte. Im Maus-Samenleiter war die Erhöhung der stimulierten Tritiumfreisetzung tendenziell zu beobachten, wurde aber nicht signifikant zur Kontrolle. Eine steigernde Wirkung von Rimonabant auf die Transmitterfreisetzung, unter anderem in den verwendeten Geweben, ist hinlänglich bekannt (Schlicker et al. 1996; Schlicker et al. 2003; Schultheiss et al. 2005). Eine weitere Analyse, ob in den beiden Geweben ein endogener Tonus durch Spontanaktivität von CB₁-Rezeptoren und/oder durch Bildung von Endocannabinoiden zustande kommt, hätte Experimente mit der [³⁵S]GTPγS-Bindungsmethode in den beiden Geweben erforderlich gemacht. In Membranen können sich Endocannabinoiden nicht anhäufen,

und so wäre ein hemmender Effekt von NESS 0327 als inverser Agonismus und ein fehlender Effekt als neutraler Antagonismus zu deuten. Auf solche Experimente wurde aber verzichtet, da die extreme Diskrepanz zwischen Affinität dieser Substanz (pKi: 11,0-12,5) und ihrer Wirkungsstärke bei *Tambaro et al. 2005* und uns (pA₂: 6,8-8,5) schwer zu vermitteln ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NESS 0327 trotz seiner sehr hohen Affinität keine höhere Aktivität oder sonstigen Vorteile im Vergleich zu Rimonabant besitzt und die Suche nach neutralen CB₁-Antagonisten immer noch weitergehen muss, zumal auch VCHSR als neutraler CB₁-Antagonist wegen seiner niedrigen Potenz und schlechten Löslichkeit problematisch ist (*Flau 2004*).

5 Untersuchungen zur retrograden Informationsübertragung am CB₁-Rezeptor

Die Rolle von Endocannabinoiden bei der retrograden Informationsübertragung an neuronalen Synapsen wurde bis heute vor allem an glutamatergen und GABAergen Neuronen mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden gezeigt (*Hashimoto et al. 2007*; siehe auch Kapitel A.1.5.2). Die Endocannabinoide werden dabei in der Postsynapse gebildet, wandern über den synaptischen Spalt zurück zur Präsynapse und hemmen dort über CB₁-Rezeptoren die weitere Neurotransmitterfreisetzung. Besonders interessant ist dabei die Frage, wie die Endocannabinoid-Synthese und -Freisetzung aktiviert wird und abläuft. Bis heute wurden verschiedene Mechanismen der Endocannabinoid-Aktivierung entdeckt, im Wesentlichen einmal über Calcium-vermittelte postsynaptische Depolarisation oder Rezeptor-vermittelt durch postsynaptische Rezeptoren oder durch ein Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen. Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung wurde bisher in verschiedenen Regionen des ZNS nachgewiesen, und zwar vor allem durch einen metabotropen Glutamat-Rezeptor (mGluR; u.a. *Maejima et al. 2001*; *Varma et al. 2001*; *Ohno-Shosaku et al. 2002*; *Galante und Diana 2004*; *Narushima et al. 2006*), aber auch durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren (M₁ und M₃; *Kim et al. 2002*; *Fukudome et al. 2004*) und den Orexin-Rezeptor (*Haj-Dahmane und Shen 2005*).

Die Idee hinter der in dieser Arbeit durchgeführten Studie zur retrograden Informationsübertragung war also, in einem peripheren Gewebe und an einem noch nicht auf Endocannabinoid-Bildung und -Freisetzung untersuchten postsynaptischen Rezeptor diese mittels Superfusionsstudien nachzuweisen. Ein möglicher Mechanismus dieser Theorie ist in Abbildung 33 dargestellt. Der Nachweis von präsynaptischen CB₁-Rezeptoren im Meerschweinchen-Samenleiter ist

von Pertwee veröffentlicht (Pertwee 1993) und ist auch schon in unserer Arbeitsgruppe erfolgt (unveröffentlicht).

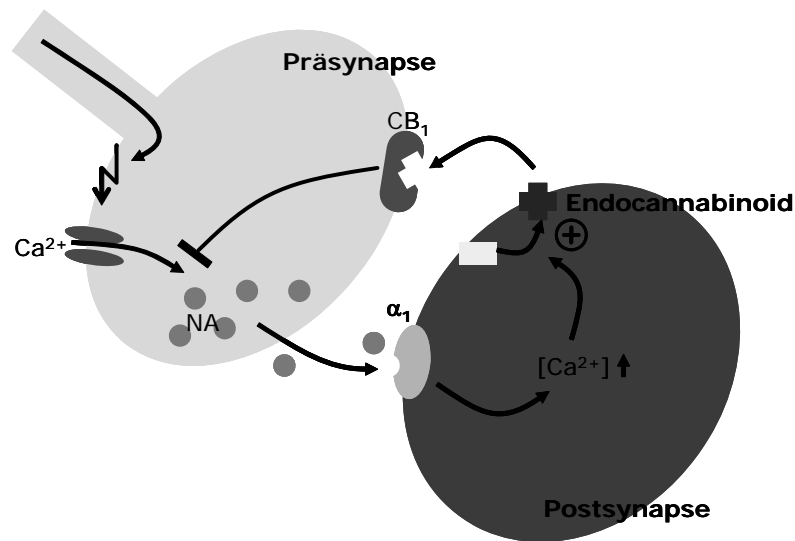


Abbildung 33: Schema einer gedachten retrograden Wirkung von Endocannabinoiden nach Aktivierung postsynaptischer α_1 -Adrenozeptoren durch Noradrenalin. Die ankommende elektrische Reizweiterleitung führt über eine Membrandepolarisation zum Einstrom von Calcium-Ionen, was wiederum zur Freisetzung von Noradrenalin führt. Das freigesetzte Noradrenalin wandert über den synaptischen Spalt und aktiviert postsynaptische α_1 -AR. Dadurch wird die Calciumkonzentration in der Zelle erhöht, was die enzymatische Bildung und die Freisetzung von Endocannabinoiden aus der Zellmembran bewirkt, die dann zur Präsynapse wandern und durch Aktivierung des präsynaptischen CB₁-Rezeptors die Noradrenalinfreisetzung hemmen.

Präsynaptische α_1 -Adrenozeptoren im Meerschweinchen-Samenleiter waren zwar vorgeschlagen worden (Ellis *et al.* 1990), später wurde aber nachgewiesen, dass die in dieser Studie verwendeten Pharmaka wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus wirken (Vizi *et al.* 1992; Santha *et al.* 2001), und so kann man davon ausgehen, dass vorhandene α_1 -AR ausschließlich postsynaptisch lokalisiert sind.

Die Aktivierung von postsynaptischen α_1 -AR durch die selektiven Agonisten Methoxamin und Phenylephrin resultierte in den Superfusionsstudien dieser Arbeit tatsächlich in einer verminderten stimulierten Noradrenalinfreisetzung, allerdings z. T. unter Erhöhung der basalen Tritiumfreisetzung und bei sehr hohen Konzentrationen. Da sich diese Wirkung zudem durch den selektiven α_1 -AR-Antagonisten Prazosin in einer sehr hohen Konzentration nicht aufheben ließ, konnte die Theorie der Endocannabinoid-Freisetzung durch Adrenozeptoren so nicht gestützt werden, und man muss davon ausgehen, dass die Hemmung der Noradrenalinfreisetzung durch einen anderen Mechanismus zustande kommt.

6 Sequenzierung des CB₁-Rezeptors des Meerschweinchens

Der in Kapitel C.1.1.2.1 nachgewiesene präsynaptische CB₁-Rezeptor im Meerschweinchen-Vorhof ist ein weiteres Beispiel eines präsynaptischen CB₁-Rezeptors im Meerschweinchen. Vor Allem im ZNS (z. B. *Schlicker et al. 1997*), aber auch in peripheren Geweben wie der Retina (*Schlicker et al. 1996*), der Lunge (*Vizi et al. 2001*), in Blutgefäßen (*Schultheiss et al. 2005*) und im Gastrointestinaltrakt (*Pertwee et al. 1996; Coutts und Pertwee 1997; Izzo et al. 1998; Lan et al. 1999*) wird der Rezeptor funktionell exprimiert.

Umso erstaunlicher war die Tatsache, dass die Rezeptorsequenz dieses Rezeptors bis dato noch nicht bekannt war. Nur eine Teilsequenz des CB₁-R des eng mit dem Meerschweinchen verwandten Bergpaca *Agouti taczanowskii* war im Rahmen einer Phylogenese studie untersucht worden (*Murphy et al. 2001*). Ausgehend von dieser Bergpaca-Sequenz wurde in unserer Arbeitsgruppe zunächst das entsprechende Teilstück des gpCB₁-R kloniert und schließlich im Rahmen dieser Arbeit die gesamte Rezeptorsequenz durch Sequenzierung nach Klonierung aus cDNA bestimmt.

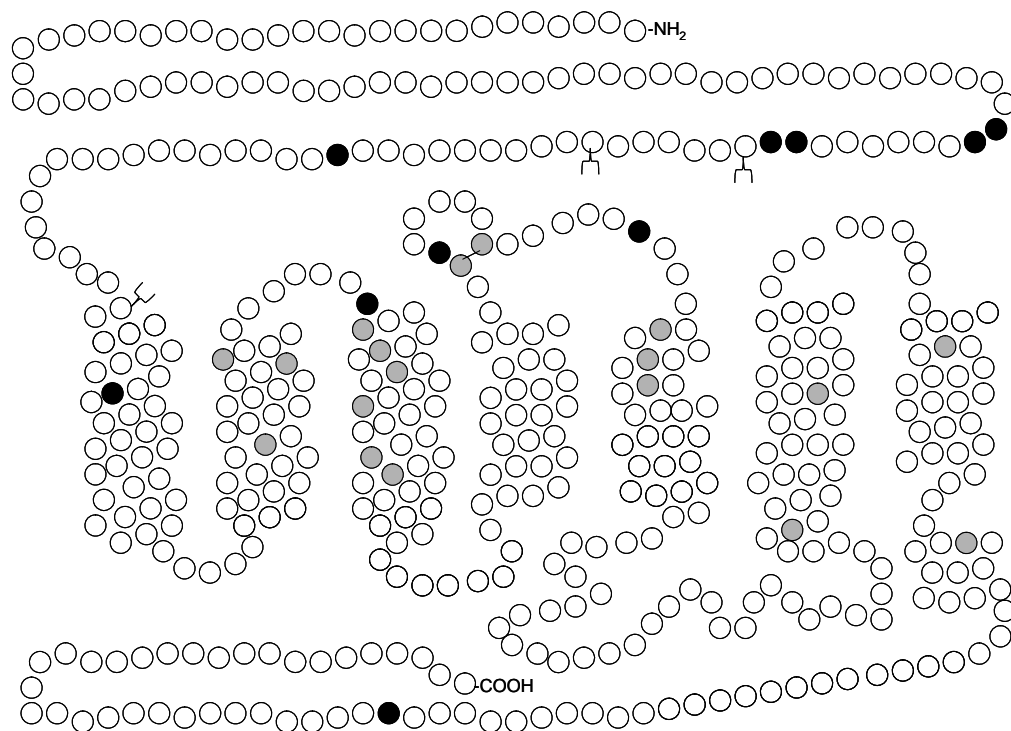


Abbildung 34: schematisches Topologiemodell des humanen CB₁-Rezeptors. Neben dem extrazellulären N-Terminus (oben) und dem intrazellulären C-Terminus (unten) sind die sieben transmembranären Domänen in der Mitte mit angedeuteten Helices zu erkennen. Es bilden sich je 3 extra- und intrazelluläre Schleifen. Grau eingefärbt sind Aminosäuren, die laut Mutagenesestudien zur Ligandbindung oder Rezeptorfunktion beitragen; schwarz eingefärbt sind Aminosäuren, die nicht homolog zu denen des in dieser Arbeit klonierten Meerschweinchen-CB₁-Rezeptors sind. Weiterhin dargestellt sind die drei Glykolisierungsstellen (Y) im N-Terminus und die Disulfidbrücke in der 2. extrazellulären Schleife.

Beim Aminosäuresequenzvergleich mit dem humanen CB₁-R (*Gerard et al. 1990*) und dem der Ratte (*Matsuda et al. 1990*) und der Maus (*Chakrabarti et al. 1995*) zeigte sich eine sehr hohe Homologie des Meerschweinchen-Rezeptors zu den anderen Spezies (siehe Tabelle 15), vor Allem innerhalb der transmembranären Domänen (TMD), wobei nur in TMD1 ein relevanter Aminosäureaustausch (von Serin in den anderen Spezies zu Alanin im Meerschweinchen) zu finden war. Abbildung 34 zeigt ein schematisches Topologiemodell des humanen CB₁-Rezeptors, in dem die zum Meerschweinchen nicht homologen Aminosäuren schwarz markiert sind.

Diverse Mutagenesestudien haben gezeigt, dass die für die Ligandbindung bzw. Rezeptorfunktion essentiellen Aminosäuren vor allem in den TMD 2, 3, 5, 6 und 7 lokalisiert sind. Eine Übersicht über diese Aminosäuren und ihre Lage im schematischen Aufbau des Rezeptors bieten Tabelle 17 und Abbildung 34 (graue Kreise). Mutagenesestudien, die zu keiner Änderung einer Funktion führen, wurden wahrscheinlich nicht alle veröffentlicht. Ob der Aminosäureaustausch in TMD1 beim Meerschweinchen also überhaupt einen Einfluss auf Ligandbindung oder Rezeptorfunktion hat, müsste in neuen Vergleichsstudien untersucht werden.

Tabelle 17: Für die Ligandbindung oder Rezeptorfunktion laut Mutagenesestudien essentielle Aminosäuren des humanen CB₁ und ihre Lage innerhalb des Rezeptors (TMD: Transmembranäre Domäne; ES: Extrazelluläre Schleife).

TMD2	D163 (<i>Tao und Abood 1998; Roche et al. 1999; Nie und Lewis 2001</i>); I175 (<i>Kapur et al. 2008</i>); D176 (<i>Kapur et al. 2008</i>).
TMD3	F189 (<i>McAllister et al. 2003</i>); K192 (<i>Song und Bonner 1996; Hurst et al. 2002</i>); G195 (<i>Chin et al. 1999</i>); F200 (<i>McAllister et al. 2003; Shen et al. 2006</i>); L207 (<i>D'Antona et al. 2006b</i>); T210 (<i>D'Antona et al. 2006a</i>).
ES2	C257 (<i>Shire et al. 1996</i>); C264 (<i>Shire et al. 1996</i>).
TMD5	Y275 (<i>McAllister et al. 2002</i>); W279 (<i>McAllister et al. 2003</i>); V282 (<i>Song et al. 1999</i>).
TMD6	D338 (<i>Nebane et al. 2006</i>); W356 (<i>McAllister et al. 2003</i>).
TMD7	S383 (<i>Kapur et al. 2007</i>); L404 (<i>Anavi-Goffer et al. 2007</i>)

Betrachtet man aber die zwischen Meerschweinchen- und humanem CB₁ nicht homologen Aminosäuren, finden sich diese meisten im extrazellulären Teil des Rezeptors und nur eine im intrazellulären C-Terminus. Da außerdem keine Änderung in den für die Ligandbindung wichtigen Regionen vorliegt und ja auch die diversen funktionellen Studien im Meerschweinchen keine wesentlichen Spezies-Unterschiede gefunden haben, spricht einiges dafür, dass der gpCB₁ die

gleichen funktionellen Eigenschaften im Meerschweinchen wie der hCB₁ im Menschen besitzt. Insbesondere die nachgeschalteten intrazellulären Vorgänge dürften kaum beeinträchtigt sein.

7 Effekt von Abn-CBD an präsynaptischen Rezeptoren

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise auf weitere Cannabinoid-Rezeptoren neben den beiden etablierten, CB₁ und CB₂. Unter anderem schloss man aus Versuchen an CB₁/CB₂-Knock-out-Mäusen, in denen verschiedene Cannabinoide immer noch Wirkung zeigten (Jarai et al. 1999), auf einen sogenannten „endothelialen Cannabinoid-Rezeptor“. Dieser wurde später in verschiedenen Geweben nachgewiesen, z.B. in Endothelzellkulturen von menschlichen Nabelvenen (Begg et al. 2003; Offertaler et al. 2003; Mo et al. 2004); Eingeweidearterien von Ratten (Ho und Hiley 2003); Maus-Samenleitern (Thomas et al. 2004); Pulmonalarterien von Mensch (Kozłowska et al. 2007) und Kaninchen (Su und Vo 2007) und Kaninchen-Aorten (McCollum et al. 2007).

Abn-CBD ist ein Ligand des GPR55-Rezeptors (Ryberg et al. 2007; Johns et al. 2007), der lange als möglicher Kandidat für den „endothelialen Cannabinoid-Rezeptor“ galt, aber nach Studien in GPR55-Knockout-Mäusen, in denen Abn-CBD immer noch eine kardiovaskuläre Wirkung zeigte (Johns et al. 2007; Hiley und Kaup 2007), muss man nun davon ausgehen, dass es neben dem GPR55 noch weitere unentdeckte Cannabinoid-Rezeptoren gibt, an denen Abn-CBD wirkt.

Zu einer möglichen präsynaptischen Wirkung von Abn-CBD auf die Neurotransmitterfreisetzung gab es bis heute noch keine publizierten Untersuchungen, obwohl dies durchaus plausibel erscheinen würde, da ja viele Wirkungen von CB₁-Rezeptoren präsynaptisch erfolgen und die „neuen“ Rezeptoren mit diesen vielleicht verwandt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte also in Superfusionsversuchen die Wirkung von Abn-CBD auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung in verschiedenen Geweben untersucht werden, die bereits etablierte Systeme der präsynaptischen Modulation sind. Dazu wurden zentrale und periphere Gewebe aus drei verschiedenen Spezies gewählt, um einen möglichst breiten Bereich präsynaptischer Modulation abzudecken. Als Positivkontrolle diente PGE₂, von dem jeweils seine hemmende Wirkung auf die stimulierte Tritiumfreisetzung bekannt war (Maus Großhirnrinde: Nakazi et al. 2000; Maus Aorta: Schultheiss et al. 2005; Meerschweinchen Niere; Kurz et al. 2008, diese Arbeit; Meerschweinchen Vorhof: Kurz et al. 2008, diese Arbeit; Ratte Samenleiter: Tomlinson 1980).

Allerdings konnte Abn-CBD in keinem der fünf Testsysteme einen Einfluss auf die stimulierte Tritiumfreisetzung zeigen, und so kann man davon ausgehen, dass seine molekularbiologisch noch zu definierenden Rezeptoren nicht präsynaptisch lokalisiert sind.

8 Affinität von Endocannabinoiden am Thromboxan-Rezeptor

Wie in der Einleitung beschrieben, wirken Endocannabinoide nicht nur an den bekannten Cannabinoid-Rezeptoren, sondern auch an anderen bekannten und noch unbekanntem Rezeptoren. Dabei sind besonders die kardiovaskulären Wirkungen von Anandamid in letzter Zeit in den Fokus gerückt. Schon 1995 wurde gezeigt, dass nach intravenöser Injektion von Anandamid in anästhetisierten Ratten eine dreiphasige Blutdruckänderung resultiert (Varga *et al.* 1995). Ein beispielhafter Verlauf des diastolischen Blutdrucks, der nach kurzem Abfall (Phase I) und anschließender Erhöhung (Phase II) in einer länger andauernde Blutdrucksenkung endet (Phase III), und der Herzfrequenz, die nur eine kurze Senkung parallel zur Phase I erfährt, ist in Abbildung 35 gezeigt.

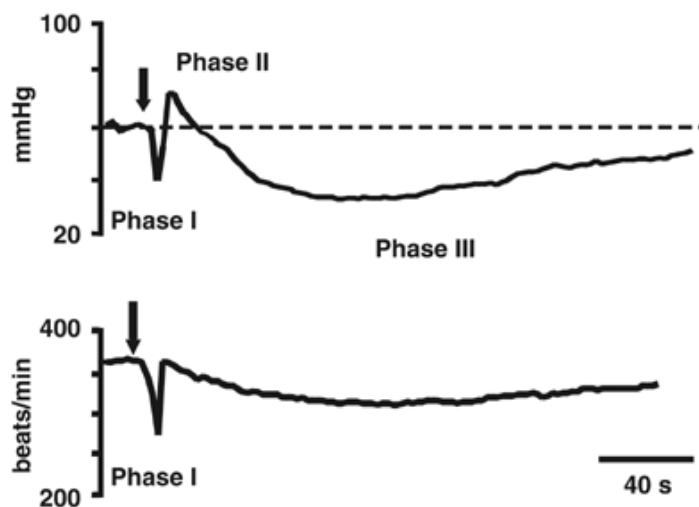


Abbildung 35: Typischer Verlauf des diastolischen Blutdrucks (oben, in mmHg) und der Herzfrequenz (unten in Schlägen (beats) pro Minute) über die Zeit nach intravenöser Injektion von 3 µmol/kg Anandamid (Applikationszeitpunkt ist mit einem Pfeil markiert) in der anästhetisierten Ratte. Man erkennt deutlich die drei Phasen der Anandamid-induzierten Blutdruckveränderungen (aus: Kwolek *et al.* 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten, die Wirkung von Anandamid während der einzelnen Phasen zu erklären, aber viele Fragen sind noch ungeklärt, und man kann sich noch kein vollständiges Bild vom Ablauf der Reaktionen machen. Als erwiesen gilt, dass Phase I durch Aktivierung von TRPV₁-Rezeptoren im Herzen zustande kommt (Malinowska *et al.* 2001; Smith und McQueen 2001) und Phase III aus einer Aktivierung von CB₁-Rezeptoren resultiert (Lake *et*

al. 1997; Ledent et al. 1999; Malinowska et al. 2001). Für den blutdrucksteigernden Effekt von Phase II wurde vor Kurzem von unserer Kooperationsarbeitsgruppe um Malinowska eine Beteiligung von zentralen β_2 - und NMDA-Rezeptoren und peripheren Calciumkanälen (Bass et al. 2002; Kwolek et al. 2005; Randall 2005) gezeigt, aber dadurch konnten noch nicht alle Fragen zu diesem Effekt geklärt werden. Nachdem in weitere Studien in der anästhetisierten Ratte unter anderem eine Abschwächung des Phase II blutdrucksteigernden Effekts durch TP-Rezeptor-Antagonisten aufgetreten war (Labor Malinowska, unveröffentlichte Daten), stellte sich für uns die Frage, ob Anandamid auch in vitro eine Affinität am TP-Rezeptor aufweist. Dies wäre aufgrund der chemischen Verwandtschaft (beides sind Arachidonsäurederivate) durchaus denkbar. Umgekehrt ist nämlich von einigen Arachidonsäurederivaten eine gewisse Affinität am CB₁-Rezeptor bekannt (Howlett et al. 1992).

Zu diesem Zweck wurde in unserer Arbeitsgruppe die Isolierung von Ratten-Thrombozyten und Bindungsstudien am TP-Rezeptor mit Hilfe des Radioliganden [³H]-SQ 29,548, angelehnt an ein Protokoll an menschlichen Thrombozyten (Hedberg et al. 1988), etabliert (siehe auch D.1.2). Als Positivkontrolle diente der selektive TP-R-Agonist U 46,619, der den Radioliganden mit einem pK_i von 7,3 vom Rezeptor verdrängen konnte, was im Bereich der Literaturwerte für Rattenthrombozyten (7,0: Miki et al. 1992) und etwas niedriger als an humanen Thrombozyten (7,7: Kan und Tai 1993; 8,4: Hedberg et al. 1988) lag.

Anandamid und auch sein enzymatisch stabiles Derivat Methanandamid zeigten aber keinerlei Affinität am TP-Rezeptor, und so lässt sich die in vivo Aktivität nicht durch eine direkte Wirkung von Anandamid an diesem Rezeptor erklären.

E. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der endogenen Cannabinoide und Cannabinoid-Rezeptoren hat man eine Vielzahl von Erkenntnissen zum Endocannabinoidsystem und seiner verschiedenen Komponenten, die außer den Rezeptoren auch noch die Synthese- und Abbauenzyme umfassen, gewonnen. Aber trotz intensiver Forschung an den einzelnen Beteiligten und deren Zusammenspiel untereinander und mit anderen Regelkreisen des menschlichen Organismus, ist ein vollständiges Verständnis der beteiligten Vorgänge noch nicht erreicht.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, einige Teilaspekte des Endocannabinoidsystems besser zu verstehen. Insbesondere der CB₁-Rezeptor stand dabei im Mittelpunkt.

Zunächst sollten neue *in vitro* Tier-Modelle gefunden werden, die bei der Untersuchung von CB₁-Rezeptoren einen besseren Prädiktor der Situation im menschlichen Organismus darstellen als die bisher oft verwendeten Nagetiere. Das Meerschweinchen hatte sich dazu in der Vergangenheit oft als geeignet erwiesen, und auch im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Superfusionsstudien im Meerschweinchen-Vorhof funktionelle präsynaptische CB₁-Rezeptoren mit einem hemmenden Einfluss auf die Noradrenalinfreisetzung nachgewiesen werden, die zuvor in Maus und Ratte nicht gefunden wurden. Unter identischen Versuchsbedingungen konnten in der Meerschweinchen-Nierenrinde allerdings keine präsynaptischen CB₁-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die beiden Gewebe wurden zusätzlich noch auf andere präsynaptische Rezeptoren untersucht, um einen Vergleich der Modulierbarkeit bzw. eine Positivkontrolle zu erhalten.

Neben dem in dieser Arbeit gefundenen CB₁-Rezeptor im Vorhof ist dieser auch in einer Reihe von anderen Meerschweinchen-Geweben nachgewiesen. Trotzdem war die Rezeptorsequenz des Meerschweinchen-CB₁-Rezeptors noch nicht bekannt und wurde deshalb von uns aus cDNA kloniert und sequenziert. Die dabei erhaltene Aminosäuresequenz war zu 97% identisch und zu fast 99% homolog mit der des humanen CB₁-Rezeptors. Ein Vergleich der beiden Sequenzen, und auch mit den Sequenzen von Ratte und Maus, zeigte, dass die wesentlichen Unterschiede bis auf eine Ausnahme im extrazellulären Bereich des Rezeptors liegen und nicht in Bereichen, die nach publizierten Mutagenesestudien essentiell für Ligandbindung oder Rezeptorfunktion sind.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der beiden Anästhetika Pentobarbital und Urethan auf ihre Affinität und Aktivität am CB₁-, aber auch am H₃- und α₂-Rezeptor. Hier lag die Beobachtung zugrunde, dass bei in vivo Studien in anästhetisierten Ratten das Ausmaß der Wirkung der jeweiligen Rezeptor-Agonisten je nach verwendetem Narkotikum unterschiedlich ausfällt. Die Vermutung lag also nahe, dass einer der beiden auch in vitro eine Affinität oder Aktivität am Rezeptor oder eine Interaktion mit den Agonisten zeigen würde. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit für beide Anästhetika keinerlei Affinität (in Radioligandbindungsstudien) oder Aktivität (in Superfusionsstudien) gezeigt werden. Die Interaktion während der in vivo Versuche scheint also einen anderen molekularen Mechanismus zugrunde zu haben.

Ein weiterer Teil der Arbeit sollte sich auf Untersuchungen zum endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor beziehen, wobei ein neuer Ligand, der in der Literatur als neutraler Antagonist beschrieben wurde, überprüft wurde. Da sich dabei allerdings herausstellte, dass diese Substanz, NESS 0327, eine um Zehnerpotenzen niedrigere Wirkungsstärke als CB₁-Rezeptor-Affinität besaß, wurde auf weitere Versuche verzichtet und konnten keine weiteren Erkenntnisse zum endogenen Tonus am CB₁-Rezeptor gewonnen werden.

Als Nächstes sollte in einem peripheren Modell eine Aktivierung des Endocannabinoid-Systems durch postsynaptische α₁-Rezeptoren mit retrograder CB₁-Rezeptor-vermittelter Hemmung der Transmitterfreisetzung gezeigt werden. Ein solches Phänomen findet zum Beispiel an glutamatergen Neuronen im ZNS durch Aktivierung von metabotropen Glutamat-Rezeptoren statt. Bei den Versuchen mit selektiven α₁-Agonisten und -Antagonisten konnte ein solcher Regelkreis jedoch nicht nachgewiesen werden.

Außerdem wurde das Cannabinoid „abnormes Cannabidiol“ (Abn-CBD), das ein Ligand von zwei Cannabinoid-artigen Rezeptoren (des sogenannten GPR55 und des mutmaßlichen „endothelialen Cannabinoid-Rezeptors“) ist, auf seinen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung in fünf verschiedenen Geweben von drei Spezies getestet. Die Substanz zeigte allerdings in keinem Testsystem einen Einfluss, und so kann man davon ausgehen, dass Rezeptoren, an denen Abn-CBD aktiv ist, keine Modulatoren der Neurotransmitterfreisetzung sind.

Ein letzter Aspekt dieser Arbeit war die Frage nach einer möglichen Affinität von Endocannabinoiden am Thromboxan A₂-Rezeptor (TP-R). Es ist schon lange bekannt, dass Cannabinoide auch an anderen Rezeptoren als den Cannabinoid-Rezeptoren Affinität und Wirkungen aufwei-

sen. Außerdem sucht man noch nach den molekularen Mechanismen, die den kardiovaskulären Wirkungen von Anandamid zugrunde liegen. Da TP-R-Antagonisten in einem in vivo Modell die Wirkung des endogen gebildeten Cannabinoids Anandamid abschwächt, sollte eine mögliche Affinität am TP-Rezeptor untersucht werden. Diese konnte allerdings in Bindungsstudien an Ratten-Thrombozyten nicht nachgewiesen werden.

F. Literaturverzeichnis

- Abood ME, Ditto KE, Noel MA, Showalter VM & Tao Q (1997): Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* **53**: 207-214.
- Alexander SP, Mathie A & Peters JA (2008): Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 2**: S1-209.
- Anavi-Goffer S, Fleischer D, Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Shi S, Lewis DL, Mukhopadhyay S, Howlett AC, Reggio PH & Abood ME (2007): Helix 8 Leu in the CB1 cannabinoid receptor contributes to selective signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* **282**: 25100-25113.
- Armstrong JM, Lefevre-Borg F, Scatton B & Caverio I (1982): Urethane inhibits cardiovascular responses mediated by the stimulation of alpha-2 adrenoceptors in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **223**: 524-535.
- Arunlakshana O & Schild HO (1959): Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* **14**: 48-58.
- Bass CE, Griffin G, Grier M, Mahadevan A, Razdan RK & Martin BR (2002): SR-141716A-induced stimulation of locomotor activity. A structure-activity relationship study. *Pharmacol Biochem Behav* **74**: 31-40.
- Baumann PA & Maitre L (1977): Blockade of presynaptic alpha-receptors and of amine uptake in the rat brain by the antidepressant mianserine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **300**: 31-37.
- Begg M, Mo FM, Offertaler L, Batkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM & Kunos G (2003): G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca²⁺-dependent K⁺ current. *J Biol Chem* **278**: 46188-46194.
- Boehm S & Kubista H (2002): Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev* **54**: 43-99.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP & Versteeg HH (2004): Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 1187-1205.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Broadhurst AM & Wyllie MG (1986): A reassessment of the binding of [3H]rauwolscine to membranes from the rat cortex. *Neuropharmacology* **25**: 287-295.
- Brodde OE, Eymmer T & Arroyo J (1983): 3H-yohimbine binding to guinea-pig kidney and calf cerebral cortex membranes: comparison with human platelets. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **266**: 208-220.

- Busch L, Sterin-Borda L & Borda E (2004): Expression and biological effects of CB1 cannabinoid receptor in rat parotid gland. *Biochem Pharmacol* **68**: 1767-1774.
- Buscher R, Heeks C, Taguchi K & Michel MC (1996): Comparison of guinea-pig, bovine and rat alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* **117**: 703-711.
- Bylund DB and Yamamura HI (1990): Methods for Receptor Binding, in *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis* (Yamamura HI, Enna SJ & Kuhar MJ Hrsg.) S. 1-35, Raven Press, New York.
- Chakrabarti A, Onaivi ES & Chaudhuri G (1995): Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* **5**: 385-388.
- Cheng Y & Prusoff WH (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.
- Cheung YD, Barnett DB & Nahorski SR (1982): [3H]Rauwolscine and [3H]yohimbine binding to rat cerebral and human platelet membranes: possible heterogeneity of alpha 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **84**: 79-85.
- Chin CN, Murphy JW, Huffman JW & Kendall DA (1999): The third transmembrane helix of the cannabinoid receptor plays a role in the selectivity of aminoalkylindoles for CB₂, peripheral cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 837-844.
- Coutts AA & Pertwee RG (1997): Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* **121**: 1557-1566.
- Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S & Ferla G (1998): In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB₁ receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* **125**: 1393-1395.
- Cumming P, Laliberte C & Gjedde A (1994): Distribution of histamine H₃ binding in forebrain of mouse and guinea pig. *Brain Res* **664**: 276-279.
- Curtin F & Schulz P (1998): Multiple correlations and Bonferroni's correction. *Biol Psychiatry* **44**: 775-777.
- D'Antona AM, Ahn KH & Kendall DA (2006a): Mutations of CB₁ T210 produce active and inactive receptor forms: correlations with ligand affinity, receptor stability, and cellular localization. *Biochemistry* **45**: 5606-5617.
- D'Antona AM, Ahn KH, Wang L, Mierke DF, Lucas-Lenard J & Kendall DA (2006b): A cannabinoid receptor 1 mutation proximal to the DRY motif results in constitutive activity and reveals intramolecular interactions involved in receptor activation. *Brain Res* **1108**: 1-11.
- De Vos H, Czerwiec E, De Backer JP, De Potter W & Vauquelin G (1991): [3H]rauwolscine behaves as an agonist for the 5-HT_{1A} receptors in human frontal cortex membranes. *Eur J Pharmacol* **207**: 1-8.

- Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G & Moore LC (1997): Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* **100**: 1538-1546.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A & Mechoulam R (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**: 1946-1949.
- Dolezel S, Edvinsson L, Owman C & Owman T (1976): Fluorescence histochemistry and autoradiography of adrenergic nerves in the renal juxtaglomerular complex of mammals and man, with special regard to the efferent arteriole. *Cell Tissue Res* **169**: 211-220.
- Ellis JL, Kasakov L, Vlaskovska M & Burnstock G (1990): Prejunctional alpha 1-adrenoceptors modify release of [3H]noradrenaline in the guinea-pig vas deferens. *Gen Pharmacol* **21**: 53-57.
- Engel G, Maurer R, Perrot K & Richardson BP (1985): beta-Adrenoceptor subtypes in sections of rat and guinea-pig kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **328**: 354-357.
- Erdbrugger W, Raulf M, Otto T & Michel MC (1995): Does [3H]2-methoxy-idazoxan (RX 821002) detect more alpha-2-adrenoceptor agonist high-affinity sites than [3H]rauwolscine? A comparison of nine tissues and cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **273**: 1287-1294.
- Feuerstein TJ (2008): Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Handb Exp Pharmacol* **184**: 289-338.
- Flau K (2004) Wirkung von Cannabinoiden und von short interfering RNA auf Cannabinoid-CB1- und μ -Opioid-Rezeptoren, Dissertation, Universität Bonn.
- Fuder H, Buder M, Riers HD & Rothacher G (1986): On the opioid receptor subtype inhibiting the evoked release of 3H-noradrenaline from guinea-pig atria in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **332**: 148-155.
- Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T & Kano M (2004): Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* **19**: 2682-2692.
- Galante M & Diana MA (2004): Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production. *J Neurosci* **24**: 4865-4874.
- Gerard C, Mollereau C, Vassart G & Parmentier M (1990): Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* **18**: 7142.
- Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R & Makriyannis A (1997): Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett* **238**: 84-86.

- Gilsbach R & Hein L (2008): Presynaptic metabotropic receptors for acetylcholine and adrenaline/noradrenaline. *Handb Exp Pharmacol* **184**: 261-288.
- Haj-Dahmane S & Shen RY (2005): The wake-promoting peptide orexin-B inhibits glutamatergic transmission to dorsal raphe nucleus serotonin neurons through retrograde endocannabinoid signaling. *J Neurosci* **25**: 896-905.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T & Kano M (2007): Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* **13**: 127-137.
- Hatanaka T, Sato S, Endoh M, Katayama K, Kakemi M & Koizumi T (1988): Effect of chlorpromazine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pentobarbital in rats. *J Pharmacobiodyn* **11**: 18-30.
- Haunstetter A, Haass M, Yi X, Kruger C & Kubler W (1994): Muscarinic inhibition of cardiac norepinephrine and neuropeptide Y release during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* **267**: R1552-R1558.
- Hedberg A, Hall SE, Ogletree ML, Harris DN & Liu EC (1988): Characterization of [5,6-³H]SQ 29,548 as a high affinity radioligand, binding to thromboxane A₂/prostaglandin H₂-receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* **245**: 786-792.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR & Rice KC (1990): Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1932-1936.
- Hiley CR & Kaup SS (2007): GPR55 and the vascular receptors for cannabinoids. *Br J Pharmacol* **152**: 559-561.
- Hirst RA, Almond SL & Lambert DG (1996): Characterisation of the rat cerebella CB1 receptor using SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist. *Neurosci Lett* **220**: 101-104.
- Ho WS & Hiley CR (2003): Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **138**: 1320-1332.
- Howlett AC, Evans DM and Houston DB (1992): The Cannabinoid Receptor, in *Marijuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology* (Murphy L & Bartke A Hrsg.) S. 35-72, CRC Press.
- Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X & Le Breton GC (2004): Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cell Signal* **16**: 521-533.
- Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Hyatt SM, Seltzman HH, Zhong M, Song ZH, Nie J, Lewis D & Reggio PH (2002): N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol* **62**: 1274-1287.
- Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F & Capasso F (1998): Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* **124**: 1363-1368.

-
- Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A & Kunos G (1999): Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14136-14141.
- Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue TL, Brown AJ, Morrison AD & Douglas SA (2007): The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol* **152**: 825-831.
- Jones R, Woodward D & Wang J (2008): Investigation of the slow kinetics of the prostanoid EP3 receptor antagonists L-798106 and L-826266 on guinea-pig aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **22**: 73.
- Jung D & Prasad PP (1989): Influence of nutritional status on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pentobarbital. *Drug Metab Dispos* **17**: 365-368.
- Jung M, Calassi R, Rinaldi-Carmona M, Chardenot P, Le Fur G, Soubrie P & Oury-Donat F (1997): Characterization of CB1 receptors on rat neuronal cell cultures: binding and functional studies using the selective receptor antagonist SR 141716A. *J Neurochem* **68**: 402-409.
- Juteau H, Gareau Y, Labelle M, Sturino CF, Sawyer N, Tremblay N, Lamontagne S, Carriere MC, Denis D & Metters KM (2001): Structure-activity relationship of cinnamic acylsulfonamide analogues on the human EP3 prostanoid receptor. *Bioorg Med Chem* **9**: 1977-1984.
- Kan WM & Tai HH (1993): Characterization of (5Z)-7-[3-endo-[(4-iodophenylsulfonyl) amino] - bicyclo[2.2.1]hep-2-exo-yl]heptenoic acid (IS-145) as an antagonist for the study of thromboxane A2 receptor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **48**: 439-445.
- Kapur A, Hurst DP, Fleischer D, Whitnell R, Thakur GA, Makriyannis A, Reggio PH & Abood ME (2007): Mutation studies of Ser7.39 and Ser2.60 in the human CB1 cannabinoid receptor: evidence for a serine-induced bend in CB1 transmembrane helix 7. *Mol Pharmacol* **71**: 1512-1524.
- Kapur A, Samaniego P, Thakur GA, Makriyannis A & Abood ME (2008): Mapping the structural requirements in the CB1 cannabinoid receptor transmembrane helix II for signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* **325**: 341-348.
- Kathmann M, Bauer U, Schlicker E & Göthert M (1999): Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 466-470.
- Kathmann M, Schlicker E, Detzner M & Timmerman H (1993): Nordimaprit, homodimaprit, clobenpropit and imetit: affinities for H3 binding sites and potencies in a functional H3 receptor model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **348**: 498-503.
- Kim J, Isokawa M, Ledent C & Alger BE (2002): Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* **22**: 10182-10191.
-

- Knodell RG, Spector MH, Brooks DA, Keller FX & Kyner WT (1980): Alterations in pentobarbital pharmacokinetics in response to parenteral and enteral alimentation in the rat. *Gastroenterology* **79**: 1211-1216.
- Kobayashi O, Nagashima H, Duncalf D, Chaudhry IA, Harsing LG, Jr., Foldes FF, Goldiner PL & Vizi ES (1987): Direct evidence that pancuronium and gallamine enhance the release of norepinephrine from the atrial sympathetic nerve by inhibiting prejunctional muscarinic receptors. *J Auton Nerv Syst* **18**: 55-60.
- Koblin DD (2002): Urethane: help or hindrance? *Anesth Analg* **94**: 241-242.
- Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudanski J & Malinowska B (2007): Identification of the vasodilatory endothelial cannabinoid receptor in the human pulmonary artery. *J Hypertens* **25**: 2240-2248.
- Kreitzer AC & Regehr WG (2001): Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* **29**: 717-727.
- Kurz CM, Gottschalk C, Schlicker E & Kathmann M (2008): Identification of a presynaptic cannabinoid CB1 receptor in the guinea-pig atrium and sequencing of the guinea-pig CB1 receptor. *J Physiol Pharmacol* **59**: 3-15.
- Kwolek G, Zakrzewska A, Schlicker E, Göthert M, Godlewski G & Malinowska B (2005): Central and peripheral components of the pressor effect of anandamide in urethane-anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* **145**: 567-575.
- Lake KD, Martin BR, Kunos G & Varga K (1997): Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **29**: 1204-1210.
- Lakhlani PP, Amenta F, Napoleone P, Felici L & Eikenburg DC (1994): Pharmacological characterization and anatomical localization of prejunctional beta-adrenoceptors in the rat kidney. *Br J Pharmacol* **111**: 1296-1308.
- Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R & Makriyannis A (1999): Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* **42**: 769-776.
- Lay L, Angus JA & Wright CE (2000): Pharmacological characterisation of cannabinoid CB(1) receptors in the rat and mouse. *Eur J Pharmacol* **391**: 151-161.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W & Parmentier M (1999): Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**: 401-404.
- Leff P (1995): The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 89-97.
- Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P & Costa T (1993): Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 303-307.
-

-
- Lew R & Summers RJ (1985): Autoradiographic localization of beta-adrenoceptor subtypes in guinea-pig kidney. *Br J Pharmacol* **85**: 341-348.
- Lindmar R, Löffelholz K & Muscholl E (1968): A muscarinic mechanism inhibiting the release of noradrenaline from peripheral adrenergic nerve fibres by nicotinic agents. *Br J Pharmacol Chemother* **32**: 280-294.
- Luo XX, Wen AD, Guo ZA & Tan YH (1996): Direct evidence for histamine H3 receptor-mediated inhibition of norepinephrine release from sympathetic terminals of guinea pig myocardium. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **17**: 425-428.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A & Kano M (2001): Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* **31**: 463-475.
- Malinowska B, Kwolek G & Göthert M (2001): Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **364**: 562-569.
- Mantelli L, Amerini S & Ledda F (1990): Different effects of prostaglandins on adrenergic neurotransmission in atrial and ventricular preparations. *Br J Pharmacol* **99**: 717-720.
- Mantelli L, Amerini S, Rubino A & Ledda F (1991): Prejunctional prostanoid receptors on cardiac adrenergic terminals belong to the EP3 subtype. *Br J Pharmacol* **102**: 573-576.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC & Bonner TI (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**: 561-564.
- May LT, Leach K, Sexton PM & Christopoulos A (2007): Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 1-51.
- McAllister SD, Rizvi G, Anavi-Goffer S, Hurst DP, Barnett-Norris J, Lynch DL, Reggio PH & Abood ME (2003): An aromatic microdomain at the cannabinoid CB(1) receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *J Med Chem* **46**: 5139-5152.
- McAllister SD, Tao Q, Barnett-Norris J, Buehner K, Hurst DP, Guarnieri F, Reggio PH, Nowell Harmon KW, Cabral GA & Abood ME (2002): A critical role for a tyrosine residue in the cannabinoid receptors for ligand recognition. *Biochem Pharmacol* **63**: 2121-2136.
- McCollum L, Howlett AC & Mukhopadhyay S (2007): Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor--independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **321**: 930-937.
- Mezzomo K, Cumming P & Minuzzi L (2007): Comparison of the binding distribution of agonist and antagonist ligands for histamine H3 receptors in pig brain by quantitative autoradiography. *Eur J Pharmacol* **564**: 75-79.
-

-
- Miki I, Kishibayashi N, Nonaka H, Ohshima E, Takami H, Obase H & Ishii A (1992): Effects of KW-3635, a novel dibenzoxepin derivative of a selective thromboxane A2 antagonist, on human, guinea pig and rat platelets. *Jpn J Pharmacol* **59**: 357-364.
- Miller RJ (1998): Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 201-227.
- Mo FM, Offertaler L & Kunos G (2004): Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol* **489**: 21-27.
- Molderings GJ, Likungu J & Göthert M (1999): Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**: 157-164.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Munro S, Thomas KL & Abu-Shaar M (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**: 61-65.
- Murphy TV & Majewski H (1989): Modulation of noradrenaline release in slices of rat kidney cortex through alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **169**: 285-295.
- Murphy TV & Majewski H (1990a): Pertussis toxin attenuates angiotensin II but not beta-adrenoceptor facilitation of noradrenaline release from rat kidney cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **17**: 521-526.
- Murphy TV & Majewski H (1990b): Pertussis toxin differentiates between alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release from rat kidney cortex. *Eur J Pharmacol* **179**: 435-439.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA & O'Brien SJ (2001): Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* **409**: 614-618.
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M & Schlicker E (2000): Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**: 19-24.
- Narushima M, Hashimoto K & Kano M (2006): Endocannabinoid-mediated short-term suppression of excitatory synaptic transmission to medium spiny neurons in the striatum. *Neurosci Res* **54**: 159-164.
- Nebane NM, Kellie B & Song ZH (2006): The effects of charge-neutralizing mutation D6.30N on the functions of CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *FEBS Lett* **580**: 5392-5398.
- Nie J & Lewis DL (2001): Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J Neurosci* **21**: 8758-8764.
- O'Flaherty EJ & Sichak SP (1983): The kinetics of urethane elimination in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* **68**: 354-358.
-

- Oe K, Sperlagh B, Santha E, Matko I, Nagashima H, Foldes FF & Vizi ES (1999): Modulation of norepinephrine release by ATP-dependent K(+)-channel activators and inhibitors in guinea-pig and human isolated right atrium. *Cardiovasc Res* **43**: 125-134.
- Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD & Kunos G (2003): Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* **63**: 699-705.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T & Kano M (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* **29**: 729-738.
- Ohno-Shosaku T, Shosaku J, Tsubokawa H & Kano M (2002): Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci* **15**: 953-961.
- Olmez E, Guc MO & Ilhan M (1995): Inhibitory muscarinic cholinergic receptors on postganglionic sympathetic nerves in the guinea pig isolated atrium are of the M3 subtype. *Pharmacology* **51**: 112-117.
- Pertwee R (1993): The evidence for the existence of cannabinoid receptors. *Gen Pharmacol* **24**: 811-824.
- Pertwee RG (2005a): Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* **76**: 1307-1324.
- Pertwee RG (2005b): Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* **168**: 1-51.
- Pertwee RG (2008a): Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* **13**: 147-159.
- Pertwee RG (2008b): The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* **153**: 199-215.
- Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE & Coutts AA (1996): Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* **118**: 2199-2205.
- Randall MD (2005): The cardiovascular actions of anandamide: more targets? *Br J Pharmacol* **145**: 565-566.
- Rinaldi-Carmona M, Pialot F, Congy C, Redon E, Barth F, Bachy A, Breliere JC, Soubrie P & Le Fur G (1996): Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci* **58**: 1239-1247.
- Roche JP, Bounds S, Brown S & Mackie K (1999): A mutation in the second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Mol Pharmacol* **56**: 611-618.
- Romstedt KJ, Shin Y, Shams G, Doyle K, Tantishaiyakul V, Clark MT, Adejare A, Hamada A, Miller DD & Feller DR (1993): Halogen-substituted trimetoquinol analogs as thromboxane A2 receptor antagonists in platelets and aorta. *Biochem Pharmacol* **46**: 2051-2059.

-
- Ross RA, Brockie HC, Fernando SR, Saha B, Razdan RK & Pertwee RG (1998): Comparison of cannabinoid binding sites in guinea-pig forebrain and small intestine. *Br J Pharmacol* **125**: 1345-1351.
- Rotondo S, De Gaetano G & Cerletti C (1993): Antiplatelet activity of 2-(6-carboxyhexyl)-3-n-hexylcyclohexylamine (IBI P-05006), a thromboxane receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **232**: 41-45.
- Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R & Pani L (2003): Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 363-370.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T & Greasley PJ (2007): The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* **152**: 1092-1101.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T & Lefkowitz RJ (1993): A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**: 4625-4636.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM & Smith M (1977): Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695.
- Santha E, Lendvai B & Gerevich Z (2001): Low temperature prevents potentiation of norepinephrine release by phenylephrine. *Neurochem Int* **38**: 237-242.
- Schlicker E, Behling A, Lummen G & Göthert M (1992a): Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**: 489-493.
- Schlicker E, Behling A, Lummen G, Malinowska B & Göthert M (1992b): Mutual interaction of histamine H3-receptors and alpha 2-adrenoceptors on noradrenergic terminals in mouse and rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**: 639-646.
- Schlicker E & Göthert M (1998): Interactions between the presynaptic alpha2-autoreceptor and presynaptic inhibitory heteroreceptors on noradrenergic neurones. *Brain Res Bull* **47**: 129-132.
- Schlicker E & Kathmann M (2001): Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 565-572.
- Schlicker E, Kathmann M, Detzner M, Exner HJ & Göthert M (1994a): H3 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: an investigation into the involvement of Ca²⁺ and K⁺ ions, G protein and adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **350**: 34-41.
- Schlicker E, Kathmann M, Exner HJ, Detzner M & Göthert M (1994b): The 5-HT₃ receptor agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide facilitates noradrenaline release by blockade of alpha 2-adrenoceptors in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **349**: 20-24.
- Schlicker E & Marr I (1997): Mutual interactions of the presynaptic histamine H3 and prostaglandin EP3 receptors on the noradrenergic terminals in the mouse brain. *Neuroscience* **79**: 247-254.
-

- Schlicker E, Redmer A, Werner A & Kathmann M (2003): Lack of CB1 receptors increases noradrenaline release in vas deferens without affecting atrial noradrenaline release or cortical acetylcholine release. *Br J Pharmacol* **140**: 323-328.
- Schlicker E, Timm J & Göthert M (1996): Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**: 791-795.
- Schlicker E, Timm J, Zentner J & Göthert M (1997): Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 583-589.
- Schultheiss T (2005) Modulation der Neurotransmitterfreisetzung durch Cannabinoide und andere präsynaptisch angreifende Liganden, Dissertation, Universität Bonn.
- Schultheiss T, Flau K, Kathmann M, Göthert M & Schlicker E (2005): Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in guinea-pig vessels, but not in rat and mouse aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**: 139-146.
- Shen CP, Xiao JC, Armstrong H, Hagmann W & Fong TM (2006): F200A substitution in the third transmembrane helix of human cannabinoid CB1 receptor converts AM2233 from receptor agonist to inverse agonist. *Eur J Pharmacol* **531**: 41-46.
- Shire D, Calandra B, Delpech M, Dumont X, Kaghad M, Le Fur G, Caput D & Ferrara P (1996): Structural features of the central cannabinoid CB1 receptor involved in the binding of the specific CB1 antagonist SR 141716A. *J Biol Chem* **271**: 6941-6946.
- Smith PJ & McQueen DS (2001): Anandamide induces cardiovascular and respiratory reflexes via vasosensory nerves in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* **134**: 655-663.
- Song ZH & Bonner TI (1996): A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol Pharmacol* **49**: 891-896.
- Song ZH, Slowey CA, Hurst DP & Reggio PH (1999): The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol Pharmacol* **56**: 834-840.
- Sperligh B, Erdelyi F, Szabo G & Vizi ES (2000): Local regulation of [(3)H]-noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P(2X)-receptors located on axon terminals. *Br J Pharmacol* **131**: 1775-1783.
- Starke K (1977): Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **77**: 1-124.
- Su JY & Vo AC (2007): 2-Arachidonylglycerol ether and abnormal cannabidiol-induced vascular smooth muscle relaxation in rabbit pulmonary arteries via receptor-pertussis toxin sensitive G proteins-ERK1/2 signaling. *Eur J Pharmacol* **559**: 189-195.

-
- Szabo B & Schlicker E (2005): Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* **168**: 327-365.
- Tambaro S, Mongeau R, Dessi C, Pani L & Ruiu S (2005): Modulation of ATP-mediated contractions of the rat vas deferens through presynaptic cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol* **525**: 150-153.
- Tao Q & Abood ME (1998): Mutation of a highly conserved aspartate residue in the second transmembrane domain of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, disrupts G-protein coupling. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 651-658.
- Taoda M, Adachi YU, Uchihashi Y, Watanabe K, Satoh T & Vizi ES (2001): Effect of dexmedetomidine on the release of [3H]-noradrenaline from rat kidney cortex slices: characterization of alpha2-adrenoceptor. *Neurochem Int* **38**: 317-322.
- Thomas A, Ross RA, Saha B, Mahadevan A, Razdan RK & Pertwee RG (2004): 6''-Azidohept-2''-yne-cannabidiol: a potential neutral, competitive cannabinoid CB1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **487**: 213-221.
- Tomlinson DR (1980): Do endogenous prostaglandins modulate noradrenergic transmission in the rat isolated perfused vas deferens? *Med Biol* **58**: 82-86.
- Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L & Starke K (2000): Modulation of (3)H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues. *Br J Pharmacol* **130**: 321-330.
- Trendelenburg AU, Gomeza J, Klebroff W, Zhou H & Wess J (2003): Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors mediating inhibition of sympathetic transmitter release: a study with M2- and M4-receptor-deficient mice. *Br J Pharmacol* **138**: 469-480.
- Trendelenburg AU, Limberger N & Rump LC (1994): Alpha 2-adrenergic receptors of the alpha 2c subtype mediate inhibition of norepinephrine release in human kidney cortex. *Mol Pharmacol* **45**: 1168-1176.
- Trendelenburg AU, Limberger N & Starke K (1995): Subclassification of presynaptic alpha 2-adrenoceptors: alpha 2D-autoreceptors in guinea-pig atria and brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**: 49-57.
- Uhlen S, Muceniece R, Rangel N, Tiger G & Wikberg JE (1995): Comparison of the binding activities of some drugs on alpha 2A, alpha 2B and alpha 2C-adrenoceptors and non-adrenergic imidazoline sites in the guinea pig. *Pharmacol Toxicol* **76**: 353-364.
- Varga K, Lake K, Martin BR & Kunos G (1995): Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* **278**: 279-283.
- Varma N, Carlson GC, Ledent C & Alger BE (2001): Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* **21**: RC188.
-

Vizi ES, Katona I & Freund TF (2001): Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* **431**: 237-244.

Vizi ES, Sperlagh B & Baranyi M (1992): Evidence That ATP, Released from the Postsynaptic Site by Noradrenaline, Is Involved in Mechanical Responses of Guinea-Pig Vas-Deferens - Cascade Transmission. *Neuroscience* **50**: 455-465.

West RE Jr, Zweig A, Shih NY, Siegel MI, Egan RW & Clark MA (1990): Identification of two H3-histamine receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **38**: 610-613.

Wilson RI & Nicoll RA (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**: 588-592.

Yao BB, Witte DG, Miller TR, Carr TL, Kang CH, Cassar S, Faghieh R, Bennani YL, Surber BW, Hancock AA & Esbenshade TA (2006): Use of an inverse agonist radioligand [³H]A-317920 reveals distinct pharmacological profiles of the rat histamine H3 receptor. *Neuropharmacology* **50**: 468-478.

G.Eigene Veröffentlichungen

1 Originalarbeiten

Kurz CM, Gottschalk C, Schlicker E & Kathmann M (2008): Identification of a presynaptic cannabinoid CB₁ receptor in the guinea-pig atrium and sequencing of the guinea-pig CB₁ receptor. *J Physiol Pharmacol* **59**: 3-15

2 Kongressbeiträge (Vorträge und Posterpräsentationen)

Kurz CM, Redmer A, Kathmann M & Schlicker E (2006): Effects of cannabidiol, Δ⁹-tetrahydrocannabinol and rimonabant on μ opioid (MOP) and δ opioid (DOP) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372 (Suppl. 1)**: 44.

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie: 47th Spring Meeting, Mainz 2006.

Kurz CM, Kathmann M & Schlicker E (2007): Cannabinoid CB₁ receptor in the guinea-pig: partial sequencing and identification of an atrial presynaptic receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375 (Suppl. 1)**: 25.

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie: 48th Spring Meeting Mainz 2007.

Kurz CM, Kathmann M & Schlicker E (2007): Functional and molecular characterization of cannabinoid CB₁ receptors in the guinea-pig.

Pre-Satellite Meeting of the 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam 2007

Schlicker E, Kurz CM & Kathmann M (2007): Identification of a presynaptic cannabinoid CB₁ receptor in the guinea-pig atrium and partial sequencing of the guinea-pig CB₁ receptor. *Acta Pharmacol Sin* **27 (Suppl. 1)**: 104 .

XVth World Congress of Pharmacology, Peking 2007.

Kurz CM, Baranowska U, Göthert M, Malinowska B & Schlicker E (2008): Lack of urethane to blunt the effect of agonists at three presynaptic receptors under in vitro conditions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377 (Suppl. 1)**: 18.

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie: 49th Spring Meeting, Mainz 2008.

Kurz CM, Baranowska U, Göthert M, Malinowska B & Schlicker E (2008): Urethane lacks affinity and potency at three presynaptic receptors in vitro.

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft: Jahrestagung, Bonn 2008.