

Suche nach freisetzungsmodulierenden Cannabinoid-, Histamin- und Neuropeptid Y-Rezeptoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Valerie Speckmann
aus Münster
2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. E. Schlicker
2. Gutachter: PD Dr. A. Bilkei-Gorzo

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.1.2016

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Präsynaptische Rezeptoren | 7 |
| 1.2 | Cannabinoid-Rezeptoren | 8 |
| 1.3 | Histamin-Rezeptoren | 9 |
| 1.3.1 | Histamin H ₂ -Rezeptor | 10 |
| 1.2.2 | Histamin H ₄ -Rezeptor | 11 |
| 1.4 | Neuropeptid Y-Rezeptoren | 12 |
| 1.5 | Ziele der Dissertation | 14 |
| 2. | Methoden und Statistik | 16 |
| 2.1 | Superfusionsversuche | 16 |
| 2.2 | Berechnungen und Statistik | 19 |
| 2.2.1 | Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung | 19 |
| 2.2.2 | Berechnung der Wirkungsstärken von Pharmaka | 20 |
| 2.2.3 | Statistik | 21 |
| 2.3 | Verwendete Substanzen | 22 |
| 2.4 | Verwendete Geräte und Materialien | 24 |
| 3. | Ergebnisse | 25 |
| 3.1 | Allgemeines | 25 |
| 3.2 | Cannabinoid-Rezeptor | 27 |
| 3.2.1 | Modulation der ³ H-Serotoninfreisetzung | 27 |
| 3.2.2 | Modulation der ³ H-Noradrenalinfreisetzung | 29 |
| 3.2.3 | Modulation der ³ H-Acetylcholinfreisetzung | 30 |
| 3.3 | Histamin-Rezeptoren | 33 |
| 3.3.1 | Histamin H ₂ -Rezeptor | 33 |
| 3.3.1.1 | Impromidin | 33 |
| 3.3.1.2 | UR-BIT106 | 35 |
| 3.3.1.3 | NK-22 | 38 |
| 3.3.2 | Histamin H ₄ -Rezeptor | 42 |
| 3.4 | Neuropeptid Y-Rezeptor | 44 |
| 4. | Diskussion | 47 |
| 4.1 | Allgemeines | 47 |
| 4.2 | Cannabinoid-Rezeptor | 50 |
| 4.3 | Histamin-Rezeptoren | 54 |
| 4.3.1 | Histamin H ₂ -Rezeptor | 54 |
| 4.3.2 | Histamin H ₄ -Rezeptor | 58 |
| 4.4 | Neuropeptid Y-Rezeptor | 59 |
| 5. | Zusammenfassung | 61 |

| | | |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| 6. | Anhang | 63 |
| 6.1 | Abbildungsverzeichnis | 63 |
| 6.2 | Tabellenverzeichnis | 65 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 66 |
| 8. | Danksagung | 72 |

1. Einleitung

1.1 Präsynaptische Rezeptoren

Nervenzellen kommunizieren größtenteils über Synapsen. Das präsynaptische und das postsynaptische Neuron sind über den synaptischen Spalt miteinander verbunden, in den Neurotransmitter aus dem präsynaptischen Neuron exozytotisch freigesetzt werden. Die Neurotransmitter entfalten daraufhin ihre Wirkung an Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran (Starke, 1977). Auch präsynaptische Nervenendigungen sind auf ihrer Zellmembran mit Rezeptoren ausgestattet. Diese können die Menge des in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Neurotransmitters modulieren und haben daher großen Einfluss auf den Informationsfluss zwischen Nervenzellen. Man unterscheidet zwei Klassen von präsynaptischen Rezeptoren. Während der Ligand bei Autorezeptoren der von der Nervenzelle selbst hergestellte Botenstoff ist, werden Heterorezeptoren durch andere, von der Nervenzelle nicht selbst synthetisierte Neurotransmitter aktiviert (Starke, 1977).

Bei den meisten präsynaptischen Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die der Familie der heptahelikalen Rezeptoren angehören. Nach Bindung des Liganden an den Membranrezeptor wird das G-Protein aktiviert und die weiteren Signaltransduktionsvorgänge in der Zelle in Gang gesetzt (Hofmann, 2009). Präsynaptische Rezeptoren mit modulierender Wirkung auf die Transmitterfreisetzung gelten als Ansatzpunkt für neue pharmakotherapeutische Optionen mittels Agonisten, Partialagonisten, inversen Agonisten und Antagonisten. Man verspricht sich von dieser Vorgehensweise im Gegensatz zu dem bei vielen Pharmaka realisierten Angriffspunkt an postsynaptischen Rezeptoren weniger Nebenwirkungen (Langer, 2008).

In der vorliegenden Arbeit werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren untersucht, die eine modulierende Wirkung auf die ausgeschüttete Neurotransmittermenge im synaptischen Spalt ausüben und größtenteils präsynaptisch lokalisiert sind. Im Einzelnen geht es um Cannabinoid- (1.2), Histamin- (1.3) und Neuropeptid Y-Rezeptoren (1.4).

1.2 Cannabinoid-Rezeptoren

Cannabinoide umfassen neben den Inhaltsstoffen der Cannabispflanze, den „natürlichen Cannabinoiden“, die körpereigenen Endocannabinoide sowie die chemisch synthetisierten Cannabinoide. Cannabinoide binden an zwei verschiedene Rezeptoren, den Cannabinoid-Rezeptor 1 und 2, welche beide G-Protein gekoppelt sind (Pertwee, 2005a).

Der Cannabinoid-Rezeptor 2 (CB₂-Rezeptor) wird vornehmlich im peripheren Gewebe des Immunsystems exprimiert und moduliert dort die Zytokinausschüttung aus Immunzellen. Der v. a. im zentralen Nervensystem (ZNS), aber auch peripher exprimierte Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB₁-Rezeptor) ist überwiegend präsynaptisch lokalisiert und wirkt als Heterorezeptor. Die Aktivierung des präsynaptischen Rezeptors führt bei Mensch und Tier zu einer Hemmung der Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, wie z. B. Noradrenalin, Acetylcholin, γ -Amino-Buttersäure (GABA), Serotonin und Glutamat (Schlicker und Kathmann, 2001). CB₁-Rezeptoren tragende Neurone können in 2 Subpopulationen unterteilt werden: Solche Neurone, die den CB₁-Rezeptor in hoher Dichte aufweisen, und solche, die ihn in geringer Dichte aufweisen. Dabei weisen GABAerge Neurone im Hippokampus von Mäusen den CB₁-Rezeptor in hoher Dichte auf, während die Rezeptordichte auf glutamatergen Neuronen deutlich geringer ist (Marsicano und Lutz, 1999). Versuche am Hippokampus von Mäusen, denen der CB₁-Rezeptor an sämtlichen Neuronen fehlt, ergaben eine Steigerung der ³H-Acetylcholinfreisetzung im Vergleich zu Wildtyptieren um 100 % (Kathmann et al., 2001b). Im Unterschied zu den damals verwendeten globalen Knockout (KO)-Tieren stehen nun konditionale KO-Mäuse zur Verfügung, denen der CB₁-Rezeptor nur an einer Neuronenpopulation fehlt (Albayram et al., 2011). In dieser Arbeit soll die Freisetzung von Acetylcholin und den Monoaminen Noradrenalin und Serotonin bei fehlendem CB₁-Rezeptor an GABAergen bzw. glutamatergen Neuronen untersucht werden. Diese Neurotransmitter üben die entscheidende inhibitorische bzw. exzitatorische Wirkung im ZNS aus. Eine CB₁-Rezeptor vermittelte Hemmung der Noradrenalinfreisetzung kommt auch am menschlichen Hippokampus vor; der

entsprechende CB₁-Rezeptor könnte an den psychotropen Wirkungen des Cannabis beteiligt sein (Schlicker et al., 1997).

Weiterhin steht auch die Frage nach einer konstitutiven Aktivität des CB₁-Rezeptors im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Bisher konnten für einige Cannabinoid-Rezeptormodelle Hinweise für einen endogenen Tonus erbracht werden (Pertwee, 2005b; Szabo und Schlicker, 2005). Der genaue Mechanismus wurde nur zum Teil untersucht. Einiges weist darauf hin, dass in mehreren Versuchsmodellen tatsächlich ein konstitutiv aktiver Rezeptor vorliegt (Pertwee, 2005b; Szabo und Schlicker, 2005). Durch die Arbeit an konditionalen KO-Tieren könnte eine spezifischere Aussage über die beteiligten Neuronen getroffen werden als in früheren Versuchen mit globalen CB₁-KO-Tieren. Das Vorliegen eines endogenen Tonus hat weit reichende Konsequenzen: So könnte das Cannabinoidsystem nicht nur im Gehirn, sondern auch im peripheren Nervensystem eine wichtige Rolle spielen und der Einsatz von Antagonisten bzw. inversen Agonisten neben den heute verwendeten Agonisten ein wichtiges pharmakotherapeutisches Prinzip darstellen.

Rimonabant, ein Antagonist bzw. inverser Agonist an CB₁-Rezeptoren, wurde in der Tat als Antiadiposum entwickelt und war für diese Indikation eine Zeitlang verfügbar, bevor es wegen schwerwiegender Nebenwirkungen wie Depression und Angst wieder vom Markt genommen wurde (Giraldo, 2010). Es ist denkbar, dass Pharmaka, die ähnlich wie Rimonabant wirken, aber nicht ins Gehirn verteilt werden, Bedeutung erlangen. Agonisten an CB₁-Rezeptoren werden seit Jahren erfolgreich therapeutisch eingesetzt, u. a. bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen sowie beim AIDS-bedingten Wasting-Syndrom (Robson, 2005).

1.3 Histamin-Rezeptoren

Histamin, ein Gewebshormon und Neurotransmitter, wirkt nach aktuellem Forschungsstand über vier Rezeptor-Subtypen (H₁, H₂, H₃ und H₄), die alle G-Protein-gekoppelt sind. Einen Überblick über die Histaminrezeptorsubtypen gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Charakterisierung der Histaminrezeptorsubtypen (modifiziert nach Sander und Stark, 2011, modifiziert nach Schlicker und Göthert, 2009)

| | H₁-Rezeptor | H₂-Rezeptor | H₃-Rezeptor | H₄-Rezeptor |
|----------------------------|---|--|---|---------------------------------------|
| Vorkommen | Blutgefäße Lunge ZNS | Magen ZNS | ZNS | Hämatopoietische Zellen |
| Kopplung | G _q | G _s | G _{i/o} | G _{i/o} |
| Lokalisation | postsynaptisch | postsynaptisch | präsynaptisch | |
| Physiologie | Vasodilatation Broncho- konstriktion Zentral erregend Erbrechen | Magensaft- sekretion ↑ Tachykardie Kardiale Kontraktilität ↑ | Hemmung der Neurotransmit- terfreisetzung | Immun- reaktionen |
| Pathologie | Allergische Reaktionen Emesis | Ulzera | | Asthma? Allergische Reaktionen? |
| Medikamen- tenbeispiele | Cetirizin Loratadin | Ranitidin | Pitolisant | UR-63325 in Phase II ¹ |

¹ Sander und Stark, 2011

Die Relevanz des H₁- und H₃-Rezeptors im Hirn lässt sich leicht erkennen, wenn man den sedierenden Effekt von H₁-Rezeptor-Antagonisten der 1. Generation bzw. das kurz vor der Markteinführung stehende Medikament Pitolisant bedenkt, welches als inverser H₃-Rezeptor-Agonist gegen exzessive Tagesschläfrigkeit bei Narkolepsie wirkt (Sander und Stark, 2011).

1.3.1 Histamin H₂-Rezeptor

In dieser Arbeit stehen die beiden verbleibenden Histaminrezeptorsubtypen, der H₂- und H₄-Rezeptor, im Fokus. In vitro-Studien am zerebralen Kortex des Meerschweinchens konnten einen H₂-Rezeptor-vermittelten fazilitatorischen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung nachweisen (Timm et al., 1998). Die Steigerung um 20 % fiel

allerdings relativ schwach aus. Um die Aussage dieser Versuche zu untermauern, ist es wichtig, diesen Effekt zu reproduzieren und ggf. durch veränderte Versuchsbedingungen zu steigern. Ein funktionelles H₂-Rezeptor-Modell wäre auch deshalb wünschenswert, da zwischen rekombinanten H₂-Rezeptor-Modellen einerseits und H₂-Rezeptor-Modellen in vivo andererseits relativ wenige klassische in-vitro-Modelle an nativen H₂-Rezeptoren verfügbar sind. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass H₂-Rezeptor-Agonisten ein neues Prinzip für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie werden könnten. Seit Kurzem ist nämlich bekannt, dass die kombinierte Gabe von Histamin (das hierbei über H₂-Rezeptoren wirkt) und Interleukin-2 einen günstigen Effekt auf den Verlauf dieser Erkrankung bei Erwachsenen besitzt (Romero et al., 2009). Hierbei stellt sich die Frage, ob H₂-Rezeptor-Agonisten gegenüber dem unselektiven Histamin nicht Vorteile bieten könnten.

1.3.2 Histamin H₄-Rezeptor

Liganden für periphere H₄-Rezeptoren befinden sich aktuell in klinischer Testung für den therapeutischen Einsatz bei atopischen und rheumatischen Erkrankungen (Liu, 2014). Im Hirn wird das Vorkommen von H₄-Rezeptoren dagegen kontrovers diskutiert. H₄-Rezeptor-mRNA im ZNS konnte in etwa einem Drittel der hierzu publizierten Studien nachgewiesen werden (Marson, 2011). In eigenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde H₄-Rezeptor-mRNA im ZNS von Maus, Meerschweinchen und Mensch gefunden (Feliszek et al., 2012 oder unveröffentlicht). Ergebnisse von Antikörper-basierten Studien müssen in diesem Zusammenhang aufgrund fraglicher Antikörper-Spezifität kritisch betrachtet werden (Schneider et al., 2015). Hinweise für einen funktionellen H₄-Rezeptor wurden bisher sowohl am murinen Kortex (Connelly et al., 2009) als auch am Vestibularorgan der Ratte (Desmadryl et al., 2012) gefunden. Es gilt nun zu klären, ob sich auch im ZNS des Meerschweinchens Hinweise für einen funktionellen H₄-Rezeptor finden lassen. Es ist in diesem Zusammenhang sehr plausibel, nach einem präsynaptischen inhibitorischen H₄-Rezeptor zu suchen, da H₃-Rezeptoren, die wie die H₄-Rezeptoren G_i-Proteingekoppelt sind (Tab. 1), die Noradrenalinfreisetzung hemmen (Timm et al., 1998).

1.4 Neuropeptid Y-Rezeptoren

Von dieser Rezeptorfamilie konnten bisher sechs Rezeptorsubtypen (Y_1 - Y_6 -Rezeptoren) identifiziert werden. Als Liganden dienen neben dem Neuropeptid Y (NPY), einem Polypeptid aus 36 Aminosäuren, das zu den Neurotransmittern zählt, auch das Peptid YY (PYY) und das Pankreatische Polypeptid (PP). Der präsynaptisch lokalisierte Y_2 -Rezeptor hemmt die Freisetzung von elf verschiedenen Neurotransmittern (Schlicker und Kathmann, 2008). In der Retina spielen NPY sowie Y_2 -Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie (Koulu et al., 2004).

In der Retina, die als Modell des zentralen Nervensystems dienen kann (Nowak, 1988), ist der Neurotransmitter Dopamin in den amakrinen Zellen in der inneren Körnerzellschicht der meisten Säugetiere lokalisiert. Bei der Retina handelt es sich entwicklungs geschichtlich um einen Teil des ZNS, gewonnene Informationen über Zellinteraktionen sind demnach auch für andere Bereiche des ZNS relevant. Die dopaminergen Zellen sind u. a. für die Regulation der rezeptiven Felder (Masson et al., 1993), die Bewegungssensibilität (Mora-Ferrer und Gangluff, 2000) und die Hell-Dunkel-Adaptation (Li und Dowling, 2000) zuständig. Außerdem spielt Dopamin eine Rolle beim pathologischen Längenwachstum der Retina, wie z. B. bei Myopien (Schaeffel et al., 1995).

Die Dopaminausschüttung wird dabei durch verschiedene präsynaptische G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren moduliert, insbesondere den Dopamin- D_2 -Autorezeptor, aber auch verschiedene Heterorezeptoren, wie z. B. den CB_1 -Rezeptor und den Histamin- H_3 -Rezeptor (Tab. 2). In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich keine Modulation der Dopaminfreisetzung durch Agonisten an G_q - (Angiotensin II, Bradykinin) bzw. G_s -gekoppelten Rezeptoren (Procaterol, ACTH). Die Freisetzungsmodulation scheint demnach ausschließlich über inhibitorische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren abzulaufen (Weber und Schlicker, 2001). Weiterhin zeigten sich keine Hinweise für serotonerge Rezeptoren an der Meerschweinchenretina (Weber und Schlicker, 2001).

Tab. 2: Liganden und Rezeptoren an dopaminergen Zellen der Meerschweinchenretina. Das Ausmaß der maximalen Hemmung ist nur z. T. unter den verschiedenen Rezeptoren vergleichbar, da die Versuchsbedingungen in den einzelnen Studien variierten

R = Rezeptor

| Rezeptor | Agonist | Antagonist | Maximale Hemmung | Literatur |
|---------------------------------|--|---|--|---|
| Dopamin D ₂ -R | BHT 920 (Talipexol) | ST 148 Haloperidol | BHT: 82 % | Weber und Schlicker (2001) |
| CB ₁ -R | CP-55940 WIN 55-212-2 | SR 141716 | WIN: 72 % | Schlicker et al. (1996) |
| Histamin H ₃ -R | Histamin R α - Methylhistamin | Clobenpropit | Histamin: 80 % | Schlicker und Kathmann (1998) |
| κ -Opioid-R | U-69,593 | MR-2266 | U-69,593: 70 % | Judel (2013) |
| Melatonin MT ₂ -R | Melatonin | 4-P-PDOT (Partialagonist) | Melatonin: 94 % | Weber und Schlicker (2001) |
| Muskarin- R | Oxotremorin | Atropin | Oxotremorin: 96 % | Weber und Schlicker (2001) |
| Nociceptin- R | Nociceptin/ Orphanin FQ (N/OFQ) | Ac-RYYRIK- NH ₂ J-113397 | N/OFQ: 85 % | Flau et al. (2002) Judel (2013) |
| Y ₂ -R | N-Acetyl- [Leu ²⁸ , Leu ³¹]- Neuropeptid Y (24-36) | BIIE0246 | Wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht | |

Im Kontext dieses Projektes zur Charakterisierung präsynaptischer Rezeptoren auf dopaminergen Sinneszellen soll nun untersucht werden, ob die Dopaminfreisetzung in der Retina über präsynaptische Neuropeptid Y-Rezeptoren moduliert wird. Präsynaptische NPY-Rezeptoren an dopaminergen Neuronen sind bisher nur am Striatum der Ratte erforscht. Hier führt die Zugabe von NPY zu einer verminderten Dopaminfreisetzung (Schlicker und Kathmann, 2008; Westfall, 2004).

1.5 Ziele der Dissertation

Diese Arbeit ist vier bekannter- oder vermutetermaßen freisetzungsmulierenden Rezeptoren innerhalb der Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren gewidmet. Zu diesem Zweck wird die Freisetzung von Acetylcholin und/oder der Monoamine Serotonin, Noradrenalin und Dopamin in superfundierten Proben des Gehirns oder der Retina untersucht.

1. Zunächst möchte ich mich dem Cannabinoid-Rezeptor zuwenden. Um die Zusammenhänge der CB_1 -Rezeptor-vermittelten Transmittermodulation am Hippokampus zu untersuchen, soll mit konditionalen Knockout-Mäusen gearbeitet werden, denen der CB_1 -Rezeptor jeweils an einer Neuronenpopulation fehlt. Ich möchte herausfinden, inwieweit das Fehlen von CB_1 -Rezeptoren auf glutamatergen bzw. GABAergen Neuronen im Hirn die cholinerge Transmission im Hippokampus beeinflusst. Vergleichend dazu soll auch die serotonerge und noradrenerge Transmission untersucht werden.

2. Hinsichtlich der Histamin-Rezeptoren möchte ich untersuchen, ob sich durch Optimierung der Versuchsbedingungen das Signal der H_2 -Rezeptor-vermittelten Noradrenalinfreisetzung im Meerschweinchenkortex steigern lässt. Weiterhin sollen zwei neue und besonders potente Histamin H_2 -Rezeptor-Agonisten mit dem Standard- H_2 -Rezeptor-Agonisten Impromidin verglichen werden, nämlich UR-BIT106 und NK-22, die beide von der Arbeitsgruppe von A. Buschauer in Regensburg synthetisiert wurden. Außerdem soll die antagonistische Wirksamkeit des H_2 -Rezeptor-Antagonisten Ranitidin gegenüber diesen H_2 -Rezeptor-Agonisten ermittelt und anhand des pA_2 -Wertes quantifiziert werden.

3. Ferner soll untersucht werden, ob sich ein funktionelles Korrelat für einen H_4 -Rezeptor im Gehirn von Meerschweinchen in Form einer H_4 -Rezeptor-vermittelten Hemmung der Noradrenalinfreisetzung finden lässt.

4. Schließlich möchte ich untersuchen, ob die Dopaminfreisetzung in der Retina des Meerschweinchens über Neuropeptid Y-Rezeptoren moduliert wird. Falls sich Hinweise für eine freisetzungsmulierende Wirkung von NPY finden, soll anschließend die Interaktion von NPY mit dem selektiven Y_2 -Rezeptor-Antagonisten BIIE 0246 betrachtet werden.

2. Methoden und Statistik

2.1 Superfusionsversuche

Die Versuche zum Cannabinoid-Rezeptor wurden an Hirngewebe von verschiedenen Maustierstämmen durchgeführt. Alle anderen Versuchsreihen wurden an Meerschweinchengewebe durchgeführt. Dazu wurden für die Versuche zu Histamin Kortexschnitte und für die Versuche zu Neuropeptid Y Retinaschnitte des Meerschweinchens präpariert.

Für die Versuche am CB₁-Rezeptor wurden männliche Tiere dekapitiert und jeweils Hypothalamus, Kortex und Hippokampus präpariert. Es wurde hierbei mit 3 unterschiedlichen Mausstämmen gearbeitet: dlx-CB₁-KO-Mäuse, denen der CB₁-Rezeptor an GABAergen Neuronen fehlt, nex-cre-CB₁-KO-Mäusen, denen der CB₁-Rezeptor an glutamatergen Neuronen fehlt, und mit Wildtyptieren (C57BL/6N). Dabei wurden die Hirnareale in Schichten von 0,3 mm Dicke geschnitten und diese anschließend in kreisrunde Scheiben mit einem Durchmesser von 2 mm (Hypothalamus, Hippokampus) oder 3 mm (Kortex) gestanzt. Anschließend wurden die Hirnschnitte bei 37 °C in physiologischer Salzlösung für 30-60 Minuten unter Zugabe von 50 nM [³H]-Serotonin, 25 nM [³H]-Noradrenalin bzw. 100 nM [³H]-Cholin (spezifische Aktivitäten 28,3 Ci/mmol, 48,4 Ci/mmol bzw. 85,5 Ci/mmol) unter ständiger Zufuhr von Carbogen inkubiert.

Die physiologische Salzlösung (KH, modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung) setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 3: Zusammensetzung der physiologischen Salzlösung in mM (millimolar)

| | | | | | |
|--------------------|-----|---------------------------------|---------------|-----------------------------------|------|
| NaCl | 118 | CaCl ₂ | 1,3 oder 3,25 | Ascorbinsäure | 0,06 |
| NaHCO ₃ | 25 | KH ₂ PO ₄ | 1,2 | Na ₂ EDTA ¹ | 0,03 |
| KCl | 4,8 | MgSO ₄ | 1,2 | Glucose | 10 |

¹ Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz

Calcium war während der Inkubation in einer Konzentration von 1,3 mM und während der Superfusion z. T. in einer niedrigen (1,3 mM), z. T. in einer hohen (3,25 mM) Konzentration in der KH enthalten (vgl. Kapitel 3.2); soweit nicht anders angegeben wurde eine Calciumkonzentration von 1,3 mM gewählt. Die Versuche an den Tieren mit CB₁-KO an glutamatergen Neuronen sowie die Kontrollversuche an den Wildtyptieren dieser Versuchsreihe wurden mit Magnesium-freier KH durchgeführt. Magnesium blockiert spannungsabhängig schon in physiologischen Konzentrationen den Kationeneinfluss über NMDA-Rezeptoren in die Zelle (Fink et al., 1989; Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Durch die Magnesium-freie Salzlösung wird dieser „Magnesium-Block“ an NMDA-Rezeptoren verhindert.

Die Versuchsreihen zu Histamin und NPY wurden am Gehirn bzw. an der Retina von dekapitierten, männlichen Dunkin-Hartley Meerschweinchen durchgeführt. Für die Versuche zu NPY wurde die Retina vorsichtig vom Augapfel gelöst und in kreisrunde Schnitte mit einem Durchmesser von 3 mm gestanzt. Die Kortexschnitte des Meerschweinchens für die Histamin-Versuche wurden analog zur Maus mit der oben beschriebenen Methode angefertigt. Bei einer speziellen Versuchsreihe zu Histamin schloss sich nun eine 120-minütige Vorinkubation an, während dieser die Kortexschnitte mit ausgewählten H₂-Rezeptor-Agonisten (100 nM UR-BIT106 bzw. 1 µM Impromidin) versetzt wurden, um der langen Äquilibrationszeit des zu untersuchenden Pharmakons UR-BIT106 gerecht zu werden (vgl. Tabelle 9). Hierbei wurde einmalig nach 60 Minuten Superfusionszeit gereizt, sodass die Gesamtdauer eines Versuches dieser Versuchsreihe inklusive Vorinkubation (120 min), Inkubation (60 min) und Superfusion (80 min) 260 Minuten betrug.

Sowohl für die Retina- als auch für die Kortexschnitte des Meerschweinchens wurde eine 60-minütige Inkubation mit 25 nM [³H]-Noradrenalin bei 37 °C in physiologischer Salzlösung durchgeführt. Bei der o. g. Versuchsreihe mit 120-minütiger Vorinkubation waren auch während der Inkubation die jeweiligen H₂-Rezeptor-Agonisten zusätzlich anwesend (s. a. Tabelle 9).

Im Anschluss an die Inkubation wurden alle Gewebsschnitte auf Polypropylnetze zwischen zwei Platinelektroden in Superfusionskammern platziert und die Superfusion gestartet. Die Superfusion erfolgte bei 37 °C unter durchgehender Begasung mit Carbogen bei einem Durchlauf von etwa 1 ml/min. Das Superfusionsmedium enthielt, je nach Versuchsaufbau, verschiedene Hilfspharmaka zur Hemmung der neuronalen Transporter (Desipramin, Hemicholinium, Femoxetin, Nomifensin) bzw. des α_2 -Autorezeptors (Rauwolscin) (vgl. Tabelle 7). Näheres hierzu unter 4.1.

Die Tritiumfreisetzung wurde durch zweiminütige Reizperioden mit elektrischen Rechteckimpulsen stimuliert. Bei den meisten Versuchen wurde zwei Mal gereizt (S_1 und S_2); der Zeitpunkt der Reizabgabe und die Superfusionsdauer sind Tabelle 4 bzw. Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 4: Versuchsbedingungen in den verschiedenen Versuchsreihen

5-HT = 5-Hydroxytryptamin (Serotonin); MS = Meerschweinchen; NA = Noradrenalin; SD = Superfusionsdauer

| Spezies | Gewebe | Inkubation (min) | SD (min) | Reiz ab min | Tracer | Kapitel |
|---------|--------------|--------------------------------|----------|---------------------------|--------------------------|--------------------|
| Maus | Hypothalamus | 60 | 110 | S_1 : 40 S_2 : 90 | [³ H]-5-HT | 3.2 |
| | Kortex | 60 | 110 | S_1 : 40 S_2 : 90 | [³ H]-5-HT | |
| | | 30 | | | [³ H]-NA | |
| | Hippokampus | 60 | 110 | S_1 : 40 S_2 : 90 | [³ H]-5-HT | |
| | | 30 | | | [³ H]-NA | |
| | | | | | [³ H]-Cholin | |
| MS | Kortex | 60 | 160 | S_1 : 60 S_2 : 140 | [³ H]-NA | 3.3.1.1 3.3.1.3 |
| | | 60 (+120 min Vorinkubation) | 80 | S_1 : 60 | [³ H]-NA | 3.3.1.2 |
| | | 60 | 110 | S_1 : 40 S_2 : 90 | [³ H]-NA | 3.3.2 |
| | Retina | 60 | 110 | S_1 : 40 S_2 : 90 | [³ H]-NA | 3.4 |

Während die Hilfspharmaka und Antagonisten während der gesamten Superfusionsdauer im Superfusionsmedium enthalten waren, wurden die Agonisten - soweit nicht anders vermerkt - ab der 62. Minute (bei einer Superfusionsdauer von 110 Minuten)

bzw. ab der 82. Minute (bei einer Superfusionsdauer von 80 und 160 Minuten) hinzugegeben.

Ab der 5. Minute vor S_1 wurde das Superfusat kontinuierlich in 5-Minuten-Fractionen gesammelt und mit 1,2 Volumeneinheiten Lumagel Safe[®], einem Szintillationsmittel mit großer Wasseraufnahmekapazität, vermischt. Die Gewebeschnitte wurden nach Versuchsende in 0,5 ml Soluene[®] aufgelöst und anschließend mit einem selbsthergestellten Cocktail (6 mg PPO und 100 µg POPOP in 1 ml Toluol; ein Szintillationsmittel mit geringer Wasseraufnahmekapazität) versetzt. Die Bestimmung des Tritiumgehaltes der Superfusate und der Gewebeproben erfolgte durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS 6000 TA).

2.2 Berechnungen und Statistik

2.2.1 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung

Zunächst wurde der Tritiumgehalt einer jeden 5-Minuten-Sammelfraktion mithilfe von Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt. Die Tritiumabgabe wurde dann als Anteil des Tritiums berechnet, das zu Beginn der einzelnen 5-Minuten-Sammelperioden im Gewebe vorhanden war („Efflux“). Der basale Efflux, d. h. die ohne Stimulation gemessene Tritiumfreisetzung, konnte durch die Ermittlung der Tritiumabgabe in der Sammelperiode unmittelbar vor dem Pharmakonwechsel (t_1 ; 55.-60. Minute bzw. 75.-80. Minute) und unmittelbar vor dem 2. Reiz (t_2 ; 85.-90. Minute bzw. 135.-140. Minute) quantifiziert werden. Um den Einfluss verwendeter Pharmaka auf die basale Tritiumfreisetzung zu untersuchen, wurde für Pharmaka, die während des gesamten Versuches anwesend waren, t_1 , für Pharmaka, die ab der 62. oder 82. Minute anwesend waren, der Quotient t_2/t_1 bestimmt. Die stimulierte Tritiumabgabe wurde als Differenz zwischen der totalen und der basalen Tritiumabgabe während der Stimulation und den darauffolgenden 13 Minuten errechnet und als Fraktion des zu Beginn der Stimulation in den Schnitten enthaltenen Tritiums angegeben. Dabei wurde eine lineare Abnahme der basalen Tritiumabgabe von der Fraktion vor dem Reiz bis zur Fraktion 15-20 Minuten nach dem Reiz angenommen.

Um den Einfluss der verwendeten Pharmaka auf die stimulierte Tritiumfreisetzung zu beschreiben, wurde für Pharmaka, die während der gesamten Superfusionsdauer anwesend waren, S_1 betrachtet, hingegen für Pharmaka, die ab der 62. Minute anwesend waren, der Quotient S_2/S_1 berechnet.

2.2.2 Berechnung der Wirkungsstärken von Pharmaka

Als Maß für die Wirkungsstärke eines Agonisten diente der pEC_{50} -Wert. Er ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Agonistenkonzentration, die den halbmaximalen Effekt hervorruft.

Zur Quantifizierung der Antagonistenstärke wurde der „scheinbare“ pA_2 -Wert bestimmt. 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).

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

$[E']$: 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

2.2.3 Statistik

Die Versuchsergebnisse sind, soweit nicht anders angegeben, jeweils als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) aufgeführt. Die Stichprobengröße n bezieht sich dabei auf die Anzahl der Versuche. Der SEM berechnet sich aus dem Quotienten der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Versuchsanzahl. Die S_1 - und t_1 -Werte ergeben sich aus einem Mittelwert von mehreren Schnitten pro Versuch, die S_2/S_1 - und t_2/t_1 -Werte basieren auf jeweils einem Schnitt pro Experiment. In den Diagrammen ist vornehmlich die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung dargestellt, größtenteils als Quotient S_2/S_1 , der in Relation zu dem entsprechenden Wert S_2/S_1 der Kontrollversuche gesetzt wurde. Wurde in einem Versuchsaufbau nur ein statt zwei Mal elektrisch gereizt oder ein besonderes Augenmerk auf die Testpharmakon-unabhängige Transmitterfreisetzung gelegt, so wurde der S_1 -Wert in Prozent des im Schnitt befindlichen Tritiums mit dem entsprechenden Wert der Kontrollversuche verglichen.

Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Lagen mehrere Versuchswerte mit identischer Kontrolle vor, wurde die Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

2.3 Verwendete Substanzen

Tab. 5: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen

| | |
|--|--|
| (R)-(-)-[Ring-2,5,6- ³ H]-Noradrenalin | PerkinElmer, Boston, MA, USA |
| [Methyl- ³ H]-Cholinchlorid | PerkinElmer, Boston, MA, USA |
| 4-Methylhistamin-dihydrochlorid | Biotrend, Köln, Deutschland |
| 5-[1,2- ³ H(N)]-Hydroxytryptamin-creatininsulfat (Serotonin) | PerkinElmer, Boston, MA, USA |
| BIIE-0246 N-[(1S)-4-[(Aminoiminomethyl)amino]-1-[[[2-(3,5-dioxo-1,2-diphenyl-1,2,4-triazolidin-4-yl)ethyl]amino)carbonyl]butyl]-1-(2-[4-(6,11-dihydro-6-oxo-5H-dibenz[b,e]azepin-11-yl)-1-piperazinyl]-2-oxoethyl)cyclopentanacetamid | von AG Buschauer, Regensburg; synthetisiert von Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Deutschland |
| Desipramin-hydrochlorid | Sigma, München, Deutschland |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Femoxetin | Ferrosan, Kopenhagen, Dänemark |
| Hemicholinium-3 | ChemCon, Freiburg, Deutschland |
| Histamin-dihydrochlorid | Sigma, München, Deutschland |
| Impromidin-trihydrochlorid-Lösung | Smith Kline&French Laboratories, Welwyn Garden City, Großbritannien |
| Nomifensin | Hoechst, Frankfurt, Deutschland |
| N-Acetyl-[Leu ²⁸ , Leu ³¹]-Neuropeptid Y (24-36) | Polypeptide Laboratories, Straßburg, Frankreich |
| Ranitidin-hydrochlorid | Sigma, Steinheim, Deutschland |
| Rauwolscin-hydrochlorid | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| UR-BIT106 (Strukturformel s. Abb. 15) | synthetisiert von AG Buschauer, Regensburg, Deutschland |

| | |
|--|--|
| NK-22 (Strukturformel s. Abb. 15) | synthetisiert von AG Buschauer, Regensburg, Deutschland |
| U-69,593 (+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]-benzolacetamid | Sigma, München, Deutschland |
| WIN 55,212-2 (WIN-2) (R(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-yl]-(1-naphthalenyl)methanon-mesylat | Sigma, München, Deutschland |

Lumagel Safe[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Lumac-LSC B.V., P.O. Box 9540, 9703 LM Groningen, Niederlande. Soluene[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Packard Instrument Company Inc., One State Street, Meriden, CT, USA.

Stammlösungen der Pharmaka wurden mit DMSO (NK-22 und WIN-2), Wasser bzw. einem Gemisch beider Substanzen (BIIE 0246) hergestellt und mit physiologischer Salzlösung auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Tritiumfreisetzung.

2.4 Verwendete Geräte und Materialien

Tab. 6: Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen

| | |
|---|--|
| Analysenwaage Sartorius 2004 MP 6 | Göttingen, Deutschland |
| Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA | Fullerton, CA, USA |
| Laborwaage Sartorius TE 601 | Göttingen, Deutschland |
| Magnetrührer IKA RH 464995 | Staufen im Breisgau, Deutschland |
| Mikroliterpipette Eppendorf Nr. 4780 | Hamburg, Deutschland |
| Polyethylen-Vials Beckman Nr. 592938 | München, Deutschland |
| Pipettenspitzen Eppendorf Nr. 0030063.619 und 627 | Hamburg, Deutschland |
| Stimulator Hugo-Sachs Typ 215/ II | March-Hugstetten, Deutschland |
| Superfusionsanlage | Eigenbau der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts |
| Thermostat Eppendorf 5320 | Hamburg, Deutschland |
| Wasserbad GFL 1003 | Burgwedel, Deutschland |

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Wie im Methodenteil dargestellt, wurde die basale Tritiumfreisetzung bei Pharmaka, die während des gesamten Versuches anwesend waren, als t_1 beschrieben, während die basale Tritiumfreisetzung bei Pharmaka, die erst ab der 62. oder 82. Minute (nach dem „Pharmakonwechsel“) anwesend waren, durch den Quotienten t_2/t_1 angegeben wurde. Tabelle 7 gibt einen Überblick über verschiedene t_1 -Werte von Kontrollversuchen, die jeweils in Abwesenheit der Agonisten und Antagonisten abgelaufen sind. Die aufgeführten Hilfspharmaka waren während des gesamten Versuches anwesend.

Die t_2/t_1 Werte lagen bei 9 Kontrollversuchen des Meerschweinchenkortex bei 160 Minuten Versuchsdauer mit Desipramin und Rauwolscin als Hilfspharmaka (jeweils 1 μM) bei $0,82 \pm 0,04$. Ähnliche Werte ergaben sich für alle anderen Kontrollserien (nicht gezeigt).

Bis auf den Histamin H_2 -Rezeptor-Agonisten NK-22 hatte kein Pharmakon Einfluss auf die basale Tritiumfreisetzung (nicht gezeigt). NK-22 (0,1 bzw. 1 μM) bewirkte eine Steigerung von t_2/t_1 auf 112 bzw. 236 % im Vergleich zur Kontrolle. Auf die Bedeutung der basalen Effluxsteigerung von NK-22 wird in Abschnitt 3.3.1.3 näher eingegangen.

Die eigentlich interessierende Größe ist die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung. Diese wurde als S_1 angegeben (zur Quantifizierung der Wirkung von Pharmaka, die von Beginn der Superfusion an im Medium enthalten waren) oder aber als S_2/S_1 (Quantifizierung der Wirkung von Pharmaka, die dem Medium erst nach dem ersten elektrischen Reiz hinzugefügt wurden). S_1 -Werte aus verschiedenen Kontrollserien dieser Arbeit sind aus Tabelle 7 ersichtlich. Der S_2/S_1 -Wert aus der o. g. Kontrollserie am Meerschweinchenkortex war $1,03 \pm 0,05$ ($n = 9$). In den anderen Kontrollserien war der S_2/S_1 -Wert ähnlich (Abb. 4, Abb. 11 oder nicht gezeigt).

Tab. 7: Basale und stimulierte Tritiumabgabe von mit ^3H -Noradrenalin, ^3H -Serotonin bzw. ^3H -Cholin vorinkubierten Gewebeschnitten.

Die basale Tritiumfreisetzung wurde in der 5-Minuten-Fraktion vor dem Pharmakonwechsel bestimmt (75.-80. Minute bei einer Versuchsdauer von 160 Minuten bzw. 55.-60. Minute bei einer Versuchsdauer von 110 Minuten). Reizfrequenzen: MS Kortex 0,1 Hz, 200 mA; MS Retina 3 Hz, 200 mA. Maus: 3 Hz, 200 mA, außer Versuche mit ^3H -NA als Tracer (0,3 Hz, 50 mA). Mittelwert \pm SEM aus 4-9 Versuchen. Die Werte bei den Mäusen beziehen sich auf WT-Tiere, die Versuche wurden mit Mg^{2+} -haltiger KH durchgeführt.

5-HT = Serotonin, HK = Hippokampus, HP = Hypothalamus, MS = Meerschweinchen, NA = Noradrenalin, RF = Reizfrequenz, VD = Versuchsdauer

| Gewebe | VD (min) | Tracer | Hilfspharmaka (μM) | Basale Tritiumabgabe | Stimulierte Tritiumabgabe |
|----------------------------|----------|----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------|
| | | | | t_1 | S_1 (%) |
| Kortex (MS) | 160 | ^3H -NA | Desipramin 1 Rauwolscin 1 | $0,0031 \pm 0,0002$ | $2,45 \pm 0,41$ |
| Retina (MS) | 110 | ^3H -NA | Nomifensin 10 | $0,0102 \pm 0,0018$ | $5,41 \pm 1,57$ |
| Kortex (Maus) | 110 | ^3H -5-HT | Femoxetin 1 | $0,0085 \pm 0,0007$ | $2,01 \pm 0,50$ |
| Kortex ¹ (Maus) | 110 | ^3H -5-HT | Femoxetin 1 | $0,0084 \pm 0,0015$ | $2,78 \pm 1,01$ |
| HK (Maus) | 110 | ^3H -5-HT | Femoxetin 1 | $0,0129 \pm 0,0015$ | $1,09 \pm 0,35$ |
| HP (Maus) | 110 | ^3H -5-HT | Femoxetin 1 | $0,0127 \pm 0,0011$ | $1,46 \pm 0,60$ |
| Kortex (Maus) | 110 | ^3H -NA | Desipramin 1 Rauwolscin 1 | $0,0092 \pm 0,0025$ | $11,31 \pm 0,40$ |
| HK (Maus) | 110 | ^3H -NA | Desipramin 1 Rauwolscin 1 | $0,0067 \pm 0,0012$ | $5,41 \pm 0,49$ |
| HK ¹ (Maus) | 110 | ^3H -Cholin | Hemicholinium 10 | $0,0032 \pm 0,0002$ | $1,20 \pm 0,38$ |

¹ Ca^{2+} -Konzentration 3,25 mM

3.2 Cannabinoid-Rezeptor

Untersucht wurde die Neurotransmitterfreisetzung in 2 Knockout-Mausreihen, denen der CB₁-Rezeptor entweder am GABAergen oder am glutamatergen Neuron fehlt. Dabei wurden neben verschiedenen Transmittern (Serotonin, Noradrenalin und Acetylcholin) auch verschiedene Hirnregionen (Kortex, Hypothalamus und Hippokampus) getestet.

3.2.1 Modulation der ³H-Serotoninfreisetzung

Die Versuche wurden an mit ³H-Serotonin vorinkubierten Hirnschnitten von dlx-CB₁-KO- (fehlender CB₁-Rezeptor an GABAergen Neuronen), nex-cre-CB₁-KO- (fehlender CB₁-Rezeptor an glutamatergen Neuronen) und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Als Hilfspharmakon diente Femoxetin 1 µM. Die Superfusionsversuche an den Schnitten der nex-cre-CB₁-KO- und der entsprechenden Wildtyp-Mäuse (jeweils 3. und 4. Säule in Abb. 1 A-D) wurden mit Mg²⁺-freier Lösung durchgeführt.

Die Höhe der freigesetzten Transmittermenge variierte je nach Hirnregion und Calciumgehalt in der Superfusionslösung. So betrug die durchschnittliche, stimulierte Tritiumfreisetzung (Mittel der Werte für WT-Tiere der jeweils 1. Säulen von Abb. 1 A-D) im Kortex 2,0 % des Gesamttritiums bei niedriger Calciumkonzentration, respektive 2,8 % bei erhöhter Calciumkonzentration von 3,25 mM. Sowohl im Hippokampus als auch im Hypothalamus lag die durchschnittlich stimulierte Tritiumfreisetzung mit 1,1 bzw. 1,5 % niedriger als im Kortex (Abb. 1). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der ³H-Serotoninfreisetzung durch das Fehlen des CB₁-Rezeptors an GABAergen und glutamatergen Neuronen (Abb.1).

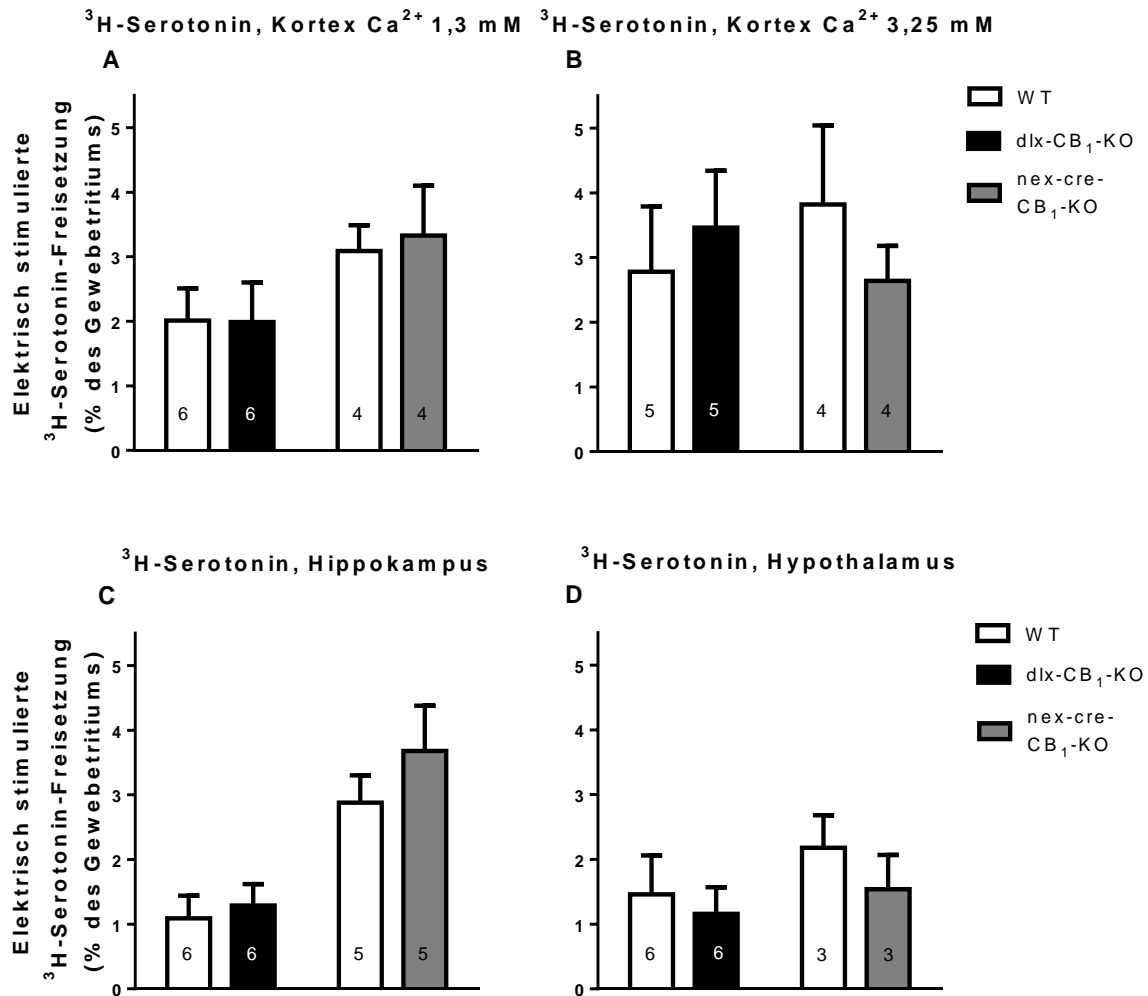


Abb. 1: ³H-Serotoninfreisetzung bei dlx-CB₁-KO-, nex-cre-CB₁-KO- und Wildtyp-tieren. Die Hirnschnitte wurden 60 Minuten mit ³H-Serotonin inkubiert, anschließend 110 Minuten superfundiert. Der 2-minütige elektrische Reiz erfolgte ab der 40. und 90. Minute mit 3 Hz und 200 mA (S₁). Mittelwert ± SEM der in den Säulen angegebenen Versuche.

3.2.2 Modulation der ^3H -Noradrenalinfreisetzung

Untersucht wurden die Hirnregionen Kortex und Hippokampus der drei o. g. Mausstämmen, die zuvor mit ^3H -Noradrenalin über 30 Minuten inkubiert wurden. Die Ca^{2+} -Konzentration in der Superfusionslösung betrug 1,3 mM. Für die Superfusion wurden dem Medium Desipramin und Rauwolscin, jeweils 1 μM , als Hilfspharmaka zugefügt. Die Versuche an den Schnitten der nex-cre- CB_1 -KO- und der Wildtyp-Mäuse (3. und 4. Säule in Abb. 2 A und B) wurden mit Mg^{2+} -freier Lösung durchgeführt.

Im Vergleich zu den Versuchen mit ^3H -Serotonin (Abb. 1) zeigte sich bei den Versuchen mit ^3H -Noradrenalin eine insgesamt stärkere Neurotransmitterfreisetzung. Exemplarisch kann hierzu die durchschnittlich stimulierte Tritiumfreisetzung im Kortex von WT-Tieren bei einer Ca^{2+} -Konzentration von jeweils 1,3 mM verglichen werden (11,3 % zu 2,0 %, Mittel der Werte für WT-Tiere der jeweils 1. Säulen von Abb. 2 A und 1 A). Im Kortex zeigte sich, analog zur Versuchsreihe mit ^3H -Serotonin, eine ausgeprägtere Tritiumfreisetzung als im Hippokampus (11,3 zu 5,4 %, Mittel der Werte für WT-Tiere der jeweils 1. Säulen von Abb. 2 A und B). Ähnlich wie beim Serotonin beeinflusste das Fehlen des CB_1 -Rezeptors an GABAergen bzw. glutamatergen Neuronen die freigesetzte Menge an ^3H -Noradrenalin nicht (Abb. 2).

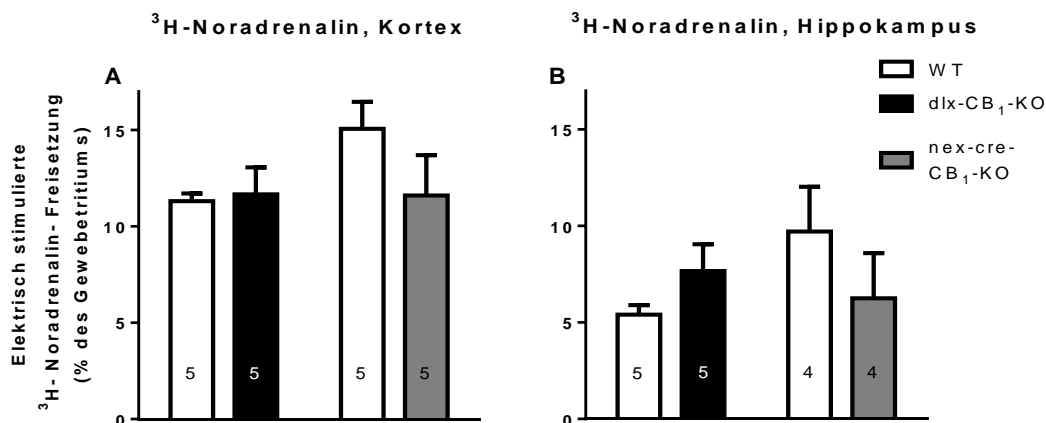


Abb. 2: ^3H -Noradrenalinfreisetzung bei dlx- CB_1 -KO-, nex-cre- CB_1 -KO- und Wildtyp-tieren

Die Hirnschnitte wurden 30 Minuten lang mit ^3H -Noradrenalin inkubiert, anschließend 110 Minuten superfundiert. Der 2-minütige elektrische Reiz erfolgte nach der 40. Minute mit 0,3 Hz und 50 mA (S_1). Mittelwerte \pm SEM der in den Säulen angegebenen Versuche

3.2.3 Modulation der ^3H -Acetylcholinfreisetzung

In dieser Versuchsreihe wurde ausschließlich Hirngewebe des Hippokampus untersucht, welches zunächst 30 Minuten mit ^3H -Cholin inkubiert und anschließend unter Zugabe des Hilfspharmakons Hemicholinium $10\ \mu\text{M}$ superfundiert wurde. Die Calciumkonzentration in der Superfusionslösung betrug $3,25\ \text{mM}$. Die Superfusionsversuche an den Schnitten der *nex-cre-CB₁-KO*- und der Wildtyp-Mäuse (3. und 4. Säule in Abb. 3 und 5. bis 8. Säule in Abb. 4) wurden mit Mg^{2+} -freier Lösung durchgeführt.

Abbildung 3 zeigt die stimulierte ^3H -Acetylcholinfreisetzung im murinen Hippokampus. Die durchschnittlich stimulierte ^3H -Acetylcholinfreisetzung lag mit $1,2\ \%$ des Gesamttritiums (Mittel der Werte für WT-Tiere der 1. Säule von Abb. 3) unterhalb der Werte für ^3H -Noradrenalin und oberhalb der Werte für ^3H -Serotonin in dieser Hirnregion (Abb. 1 und 2).

Aus Abbildung 3 ist auch ersichtlich, dass sich eine Steigerung der Tritiumfreisetzung um $155\ \%$ bei den Tieren ergab, denen der CB_1 -Rezeptor am GABAergen Neuron fehlt, im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Dieser Effekt zeigte sich nicht bei den Tieren, denen der CB_1 -Rezeptor am glutamatergen Neuron fehlt.

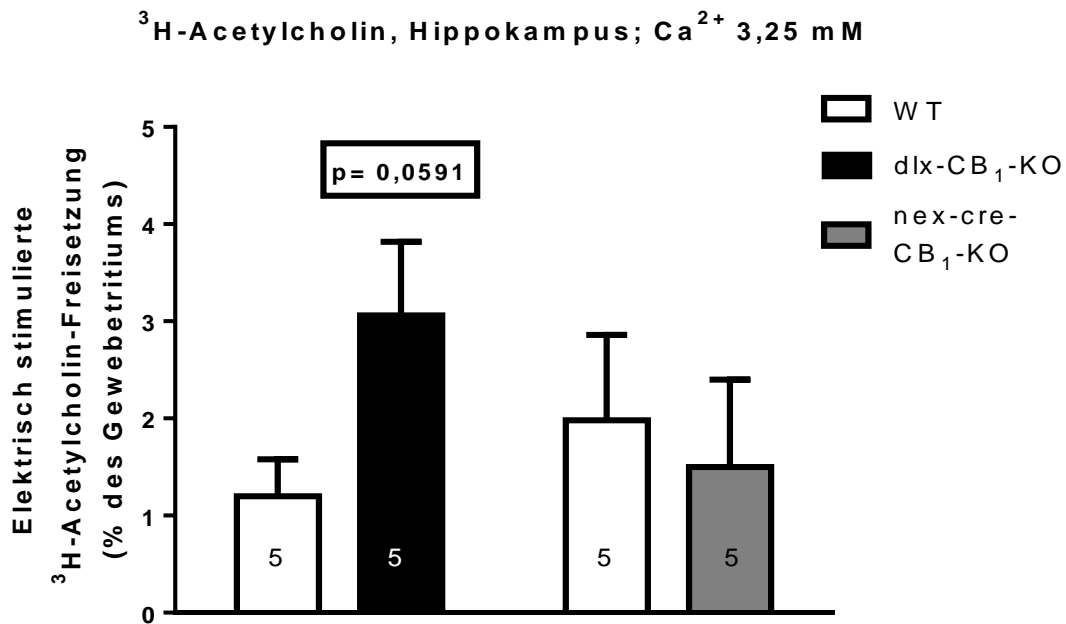


Abb. 3: ³H-Acetylcholinfreisetzung bei dlx-CB₁-KO-, nex-cre-CB₁-KO- und Wildtyp-tieren

Die Hippokampusschnitte wurden 30 Minuten lang mit ³H-Cholin inkubiert, anschließend 110 Minuten superfundiert. Zwei 2-minütige elektrische Reize erfolgten nach 40 und 90 Minuten mit 3 Hz und 200 mA (S₁ und S₂). Dargestellt sind die S₁-Werte. Mittelwert ± SEM der in den Säulen angegebenen Versuche

Diese fazilitatorische Wirkung, die die Signifikanzgrenze knapp verfehlte (p=0,0591), haben wir mithilfe von WIN 55,212-2, einem CB₁-Rezeptor-Agonisten, weiter untersucht (Abb. 4). Die Zugabe von WIN 55,212-2 schwächte die stimulierte Tritiumfreisetzung bei den Wildtyp-tieren ab (p=0,0817, Signifikanzgrenze erneut knapp verfehlt). Für die CB₁-KO-Tiere am GABAergen Neuron ergab sich keine Veränderung der Neurotransmitterfreisetzung durch Zugabe des CB₁-Rezeptor-Agonisten. Ein ganz anderes Bild ergab sich, wenn man die Tiere mit fehlendem CB₁-Rezeptor am glutamatergen Neuron betrachtete. Hier kam es zu einer ausgeprägten Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung, die etwa so stark war wie jene bei den Kontrolltieren ohne Mg²⁺ (5. und 6. Säule von Abb. 4) und mit Mg²⁺ (1. und 2. Säule von Abb. 4) in der Superfusionslösung.

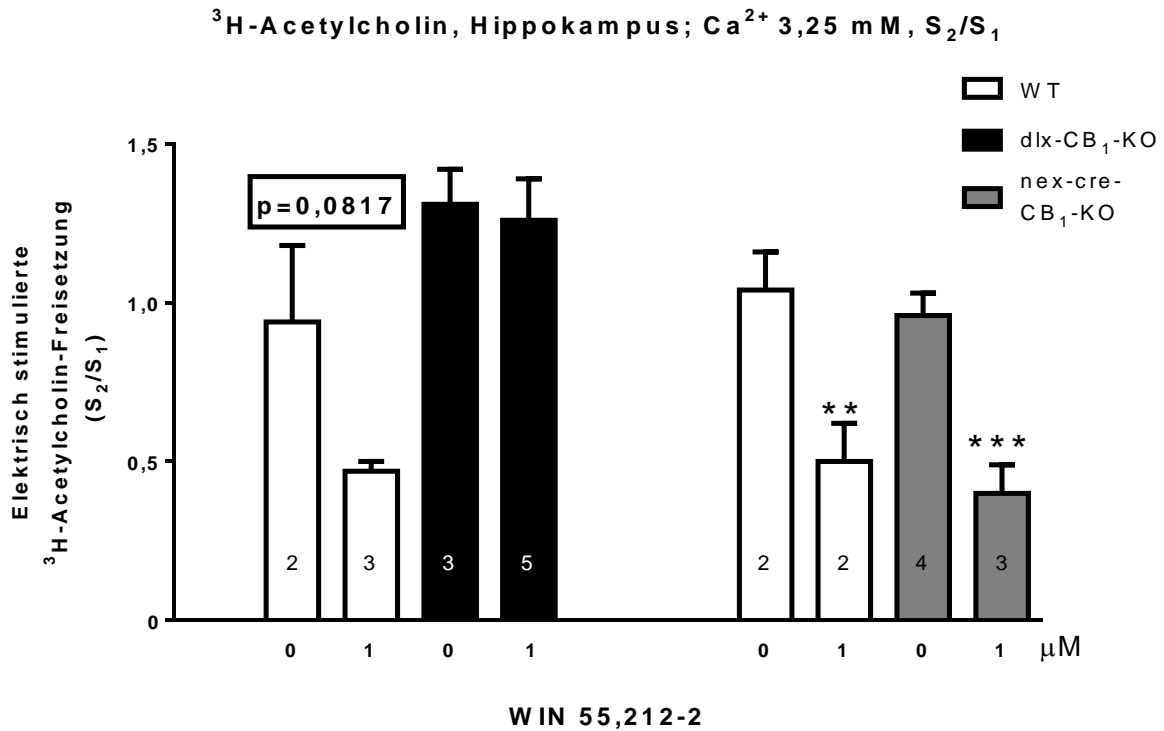


Abb. 4: ^3H -Acetylcholinfreisetzung bei dlx- und nex-cre-CB₁-KO sowie Wildtypieren unter dem Einfluss von WIN 55,212-2

Die Hippokampuschnitte wurden 30 Minuten lang mit ^3H -Cholin inkubiert, anschließend 110 Minuten superfundiert. Ab der 62. Minute wurde WIN 55,212-2 hinzugegeben. Zwei 2-minütige elektrische Reize erfolgten nach 40 und 90 Minuten mit 3 Hz und 200 mA (S_1 und S_2). Dargestellt sind die S_2/S_1 -Werte. Mittelwert \pm SEM der in den Säulen angegebenen Versuche. **p < 0,01, ***p < 0,001

3.3 Histamin-Rezeptoren

3.3.1 Histamin H₂-Rezeptor

3.3.1.1 Impromidin

Zunächst wurde der Einfluss des H₂-Rezeptor-Agonisten Impromidin auf die Tritiumfreisetzung betrachtet und anschließend seine Interaktion mit dem H₂-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin untersucht. Dazu wurde, anders als in früheren Versuchen mit Impromidin, eine Versuchsdauer von insgesamt 160 Minuten mit Reizen ab der 60. und 140. Minute gewählt (s. auch Tabelle 8). Der Pharmakonwechsel fand unmittelbar nach der 80. Minute statt. Die in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit Impromidin verwendeten Reizparameter von 0,3 Hz und 50 mA (Timm et al., 1998) wurden verändert, sodass nun mit einer Frequenz von 0,1 Hz bei einer Stromstärke von 200 mA gereizt wurde, mit dem Ziel, den fazilitatorischen Effekt von Impromidin zu steigern.

Tab. 8: Versuchsanordnung der Impromidin- / Ranitidin-Versuche

↵ = Reizbeginn; ³H-NA = ³H-Noradrenalin; Hilfsphar. = Hilfspharmaka (Desipramin und Rauwolscin, Konzentration jeweils 1 µM); Impro. = Impromidin

| | <u>Inkubation</u> | <u>Superfusion</u> | |
|-------------------|-------------------|--------------------|---|
| Impro. | - | - | + |
| Ranitidin | - | + | + |
| Hilfsphar. | - | + | + |
| ³ H-NA | + | - | - |



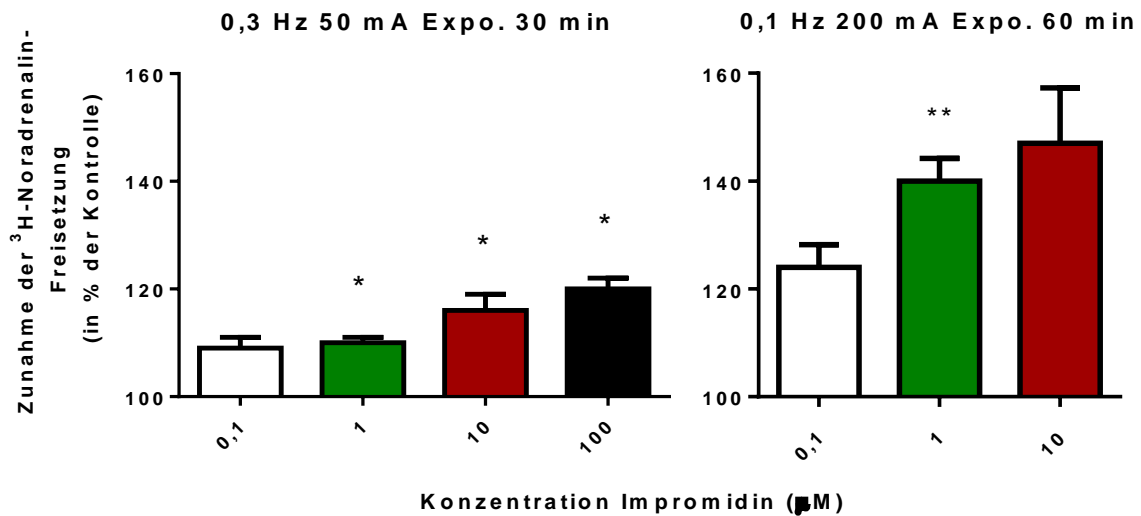


Abb. 5: Vergleich der Impromidin-bedingten Steigerung der ³H-Noradrenalinfreisetzung unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen

Die Kortexschnitte wurden zunächst 60 Minuten mit ³H-Noradrenalin inkubiert und anschließend 110 bzw. 160 Minuten superfundiert. Die elektrische Stimulation erfolgte nach 40 und 90 Minuten mit 0,3 Hz, 50 mA (frühere Versuche aus der Arbeit von Timm et al. (1998)) bzw. 60 und 140 Minuten mit 0,1 Hz und 200 mA (Versuche mit modifizierten Reizbedingungen). Expo. = Expositionsdauer gegenüber Impromidin. Mittelwerte ± SEM aus 3-13 Experimenten. Versuchsordnung vgl. Tab. 8. *p < 0,05, **p < 0,01

Durch die Veränderung der Versuchsbedingungen konnte eine stärkere Impromidin-bedingte Noradrenalinfreisetzung erzielt werden. Bei Reizparametern von 0,1 Hz und 200 mA ergab sich eine Steigerung der Noradrenalinfreisetzung um 40 % (1 μM) bzw. 47 % (10 μM) (Abb. 5, rechts). Das Ausmaß der Steigerung wurde im Vergleich zu der Vorgehensweise in der Arbeit von Timm et al. (1998) (Abb. 5, links) mehr als verdoppelt.

In Abbildung 6 ist die Impromidin-vermittelte konzentrationsabhängige Steigerung der Noradrenalinfreisetzung gezeigt. Der pEC₅₀-Wert beträgt 6,9. Die fazilitatorische Wirkung des Impromidins wurde durch Zugabe des H₂-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin abgeschwächt, wobei der scheinbare pA₂-Wert von Ranitidin bei 7,2 liegt.

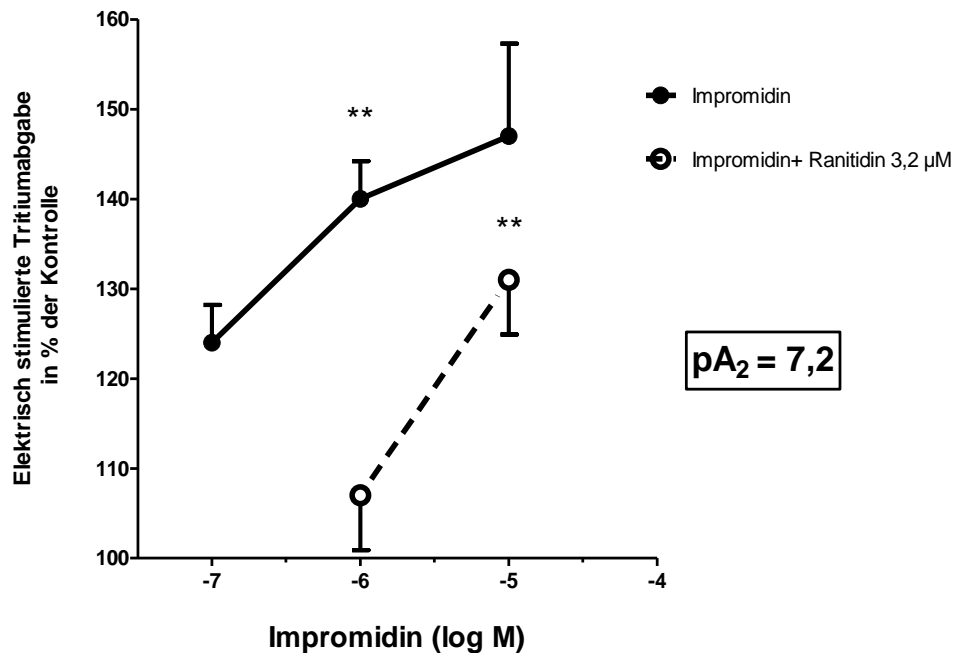


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Impromidin und Wechselwirkung mit Ranitidin

Die Kortexschnitte wurden zunächst 60 Minuten mit ^3H -Noradrenalin inkubiert und anschließend 160 Minuten superfundiert. Die elektrische Stimulation erfolgte nach 60 und 140 Minuten mit 0,1 Hz und 200 mA. Zur Anwesenheit von Impromidin und Ranitidin in der Superfusionslösung, siehe Tab. 8. Mittelwerte \pm SEM aus 3-13 Versuchen. ** $p < 0,01$, verglichen zur entsprechenden, Impromidin-freien Kontrolle (im Bild nicht gezeigt)

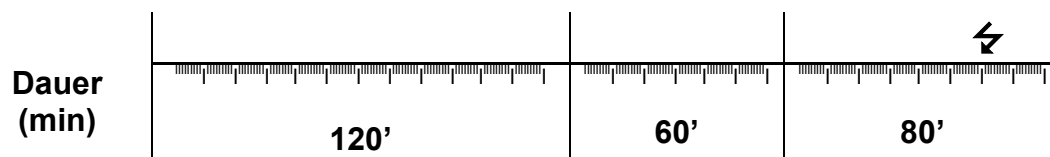
3.3.1.2 UR-BIT106

Der von der Arbeitsgruppe Buschauer in Regensburg neu synthetisierte H_2 -Rezeptor-Agonist UR-BIT106 wurde im Modell der Superfusion getestet und mit dem Standard- H_2 -Rezeptor-Agonisten Impromidin verglichen. Von UR-BIT106 war bereits bekannt, dass es mitunter eine lange Äquilibrationszeit hat (Birnkammer et al., 2012). Aus diesem Grund wurde eine zweistündige Vorinkubation durchgeführt, während der die Hirnschnitte mit dem jeweiligen Testpharmakon (UR-BIT106 0,1 μM bzw. Impromidin 1 μM) versetzt wurden. An diese Vorinkubation schloss sich eine 60-minütige Inkubation an. Dabei waren neben den o. g. Testpharmaka auch der radioaktiv markierte Neurotransmitter anwesend. Die Superfusionsdauer betrug schließlich 80 Minuten, ab der 60. Superfusionsminute wurde einmalig mit 0,1 Hz, 200 mA gereizt (s. a. Methodikteil und Tab. 9).

Tab. 9: Versuchsanordnung der Versuche mit UR-BIT106

↶ = Reizbeginn; $^3\text{H-NA}$ = $^3\text{H-Noradrenalin}$; Hilfsphar. = Hilfspharmaka (Desipramin und Rauwolscin, Konzentration jeweils $1 \mu\text{M}$) Impro. = Impromidin

| | <u>Vorinkubation</u> | <u>Inkubation</u> | <u>Superfusion</u> |
|-----------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| UR-BIT106 | + | + | + |
| Impro. | + | + | + |
| Hilfsphar. | - | - | + |
| $^3\text{H-NA}$ | - | + | - |



UR-BIT106 zeigte in unseren Versuchen einen fazilitatorischen Effekt von 38 % verglichen mit den Kontrollversuchen ohne Testpharmakon (Abb. 7). Dieser Effekt, der die Signifikanzgrenze knapp verfehlte ($p = 0,104$), entspricht damit etwa dem Impromidin-bedingten fazilitatorischen Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung von 45 % (Abb. 7).

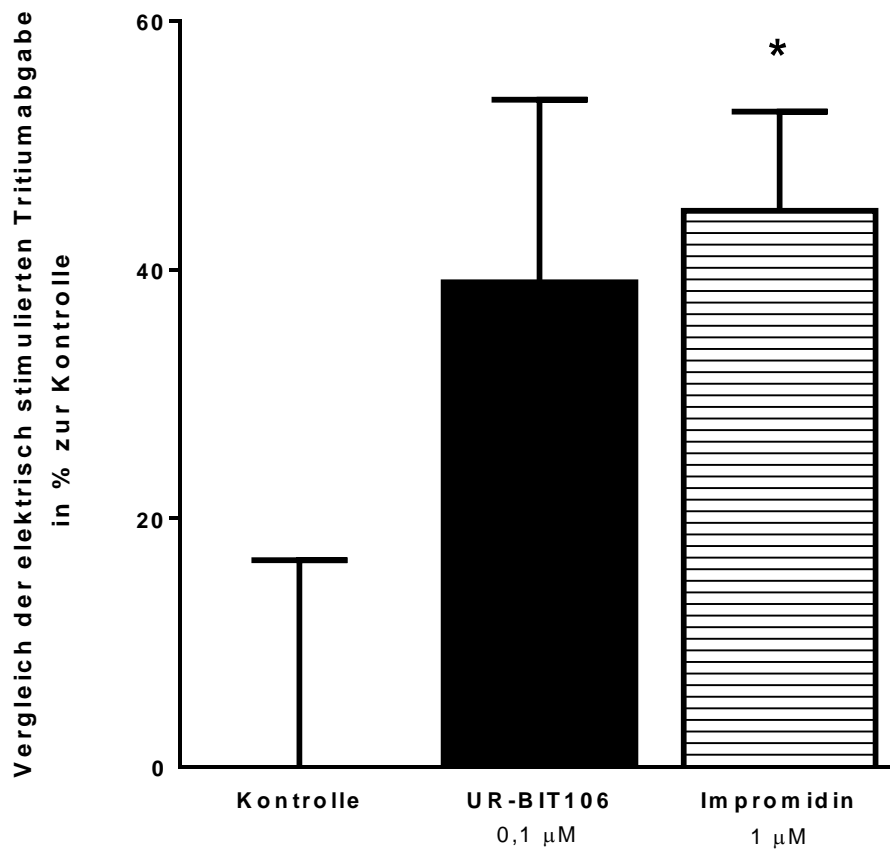


Abb. 7: Vergleich der Wirkung der H₂-Rezeptor-Agonisten UR-BIT106 und Impromidin. Dargestellt sind die S₁-Werte (%). Versuchsanordnung s. Tab. 9. Reizparameter waren: 0,1 Hz, 200 mA. Mittelwert ± SEM aus 6 (UR-BIT106) bzw. 7 (Impromidin) Versuchen. *p < 0,05

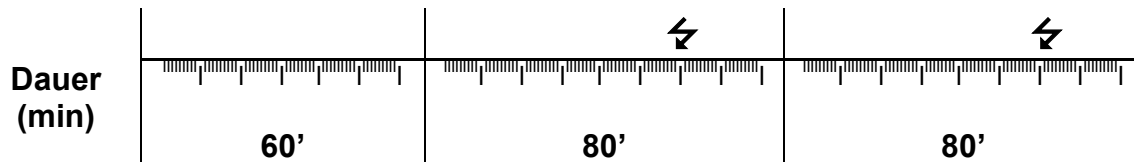
3.3.1.3 NK-22

Auch dieser H₂-Rezeptor-Agonist wurde von der AG Buschauer in Regensburg hergestellt und uns für Superfusionsversuche zur Verfügung gestellt. Der Versuchsaufbau gestaltete sich wie in Tabelle 10 dargestellt (identische Vorgehensweise wie unter 3.3.1.1 und in Tab. 8).

Tab. 10: Versuchsanordnung der Versuche mit NK-22, Impromidin sowie Ranitidin

⚡ = Reizbeginn; ³H-NA = ³H-Noradrenalin; Hilfsphar. = Hilfspharmaka (Desipramin und Rauwolscin, Konzentration jeweils 1 µM); Impro. = Impromidin

| | <u>Inkubation</u> | <u>Superfusion</u> | |
|-------------------|-------------------|--------------------|---|
| NK-22 | - | - | + |
| Impro. | - | - | + |
| Ranitidin | - | + | + |
| Hilfsphar. | - | + | + |
| ³ H-NA | + | - | - |



Im Vergleich zu Impromidin zeigte sich bei NK-22 ein leichter, statistisch nicht signifikanter, fazilitatorischer Effekt in deutlich niedrigeren Konzentrationen, nämlich im nanomolaren bis subnanomolaren Konzentrationsbereich (10 bzw. 15 % Freisetzungsteigerung bei 0,32 bzw. 3,2 nM im Vergleich zur Kontrolle, s. Abbildung 8). Es zeigte sich jedoch insgesamt eine deutlich geringere fazilitatorische Wirkung im Vergleich zu Impromidin (Steigerung von 47 % bei 10 µM). Ein pEC₅₀-Wert von NK-22 kann nur näherungsweise bestimmt werden und könnte etwa bei 9 liegen. Im höheren Konzentrationsbereich kam es zu einem starken Abfall der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung auf 20 % der Werte aus Kontrollversuchen ohne Zugabe des Testpharmakons (s. Abbildung 8).

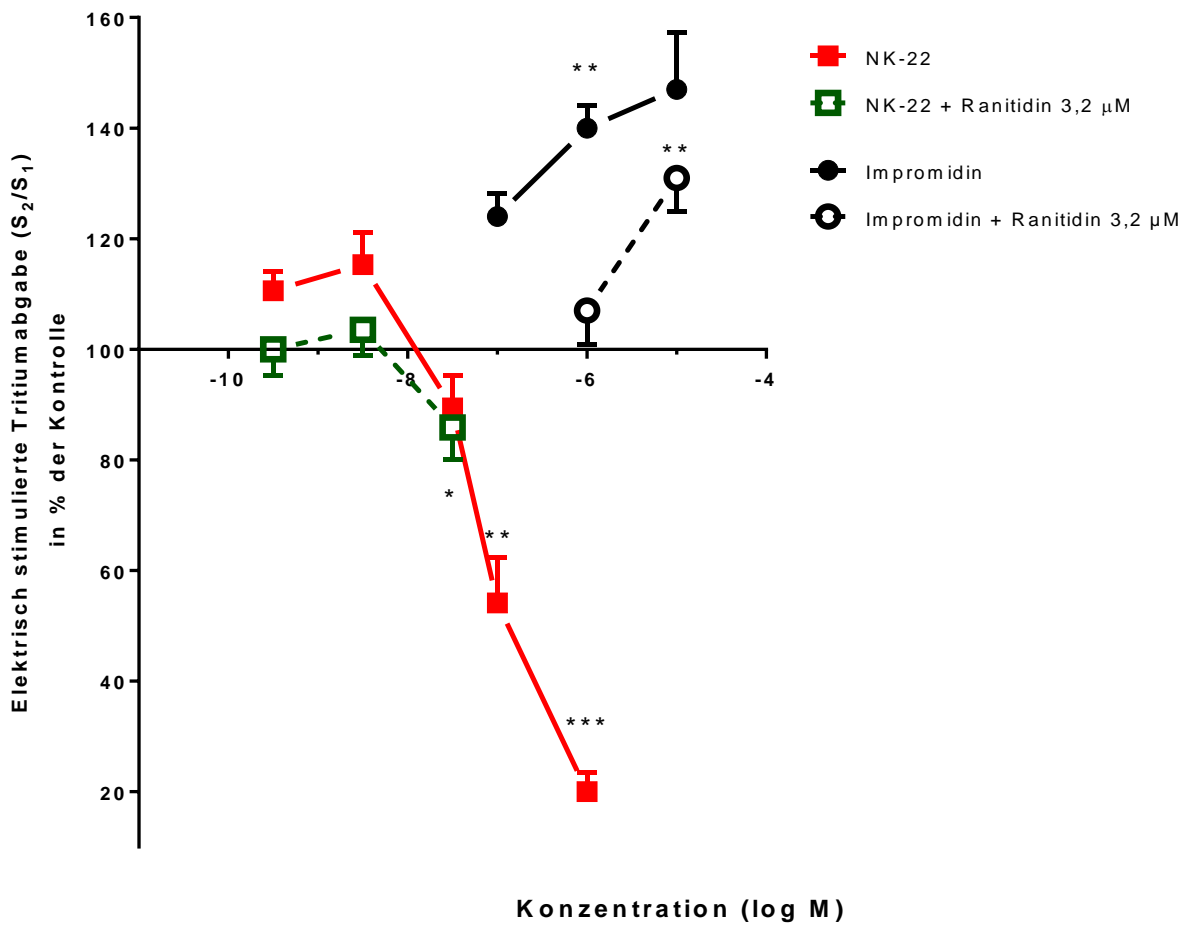


Abb. 8: Wirkung von NK-22 und Impromidin sowie beider Wechselwirkung mit Ranitidin

Reizparameter waren 0,1 Hz, 200 mA nach 60 und 140 Minuten Superfusion (vgl. Tab. 10). Mittelwerte \pm SEM aus 5-16 (NK-22) bzw. 3-13 (Impromidin) Versuchen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, verglichen zur entsprechenden NK-22-, bzw. Impromidin-freien Kontrolle (im Bild nicht gezeigt)

Durch Zugabe des H₂-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin kam es zur statistisch nicht signifikanten Abschwächung der fazilitatorischen Wirkung von NK-22, allerdings war - analog zum pEC₅₀-Wert von NK-22 – die Ermittlung eines pA₂-Wertes aufgrund des geringen Effektes schwierig bzw. unmöglich.

Abbildung 9 zeigt den Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung bei 3,2 nM sowie 1 µM.

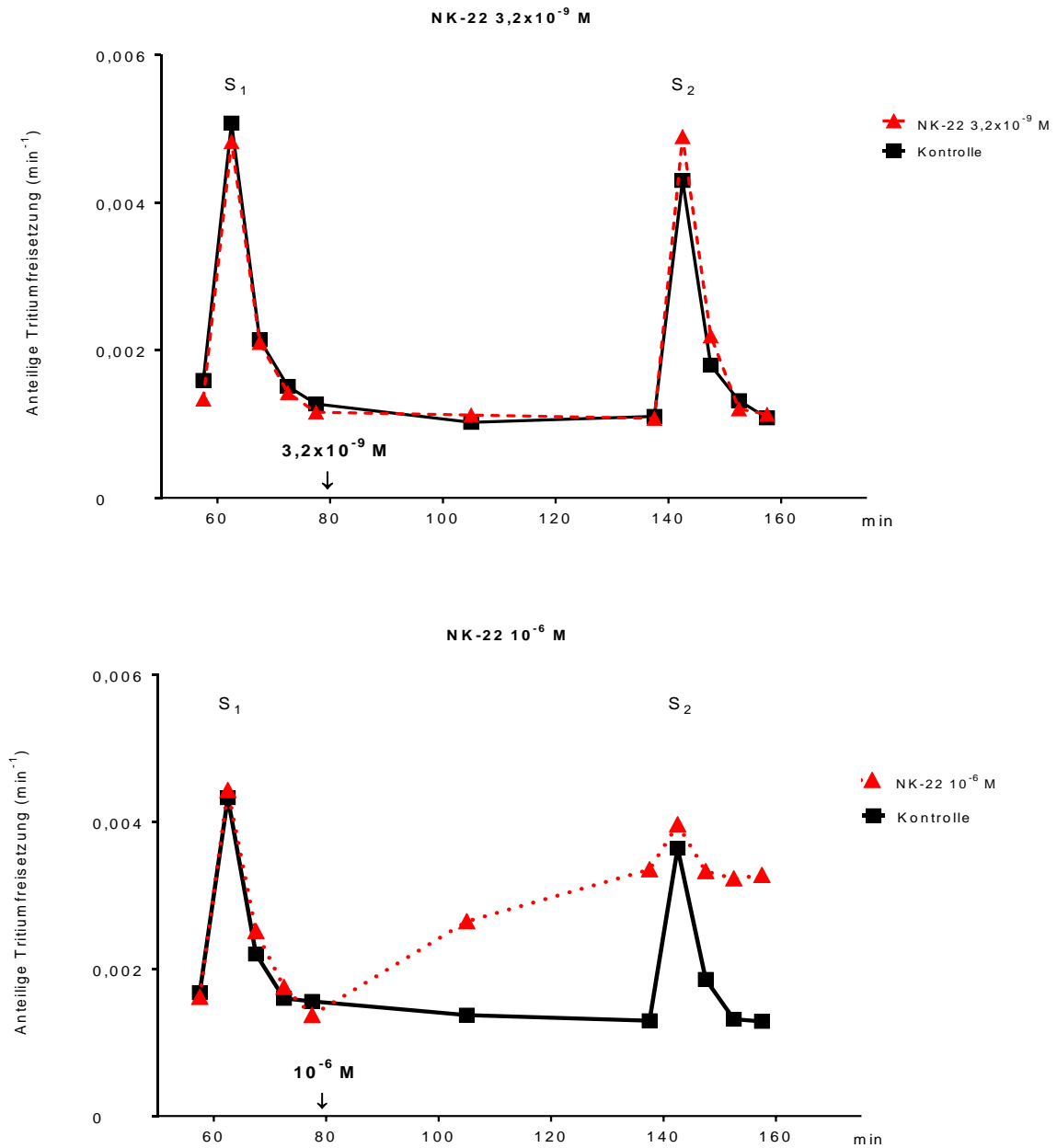


Abb. 9: Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung unter dem Einfluss von NK-22
 Einfluss von NK-22 3,2 nM bzw. 1 μ M auf den Verlauf der Tritiumfreisetzung in mit 3 H-Noradrenalin vorinkubierten, superfundierten Kortexschnitten des Meerschweinchens. Zwei 2-minütige Reizperioden (elektrische Reize von 0,1 Hz, 200 mA) nach 60 und 140 Minuten (S_1 und S_2 ; Versuchsanordnung vgl. Tab. 10). Daten aus jeweils einem repräsentativen Versuch

Nach Zugabe von NK-22 in nanomolarer Konzentration zeigt sich zum Zeitpunkt des 2. elektrischen Reizes bei 140 Minuten eine leichte Zunahme der Transmitterfreisetzung pro Minute im Vergleich zur Kontrolle. Die basale Tritiumfreisetzung wird nicht verändert. Nach Zugabe des H₂-Rezeptor-Agonisten in einer Konzentration von 1 µM kommt es zu einer ausgeprägten Steigerung der basalen Tritiumfreisetzung. Aufgrund dieser basalen Effluxsteigerung wird eine extreme Hemmung der stimulierten Freisetzung vorgetäuscht, letztlich ist die stimulierte Freisetzung nicht mehr quantifizierbar.

Abbildung 10 greift die Beziehung zwischen basalem Efflux (t_2/t_1) und stimulierter Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) für NK-22 auf. Im höheren Konzentrationsbereich zeigt sich eine markante Hemmung der Tritiumfreisetzung (vgl. auch Abbildung 8). Parallel dazu nimmt der basale Efflux stark zu.

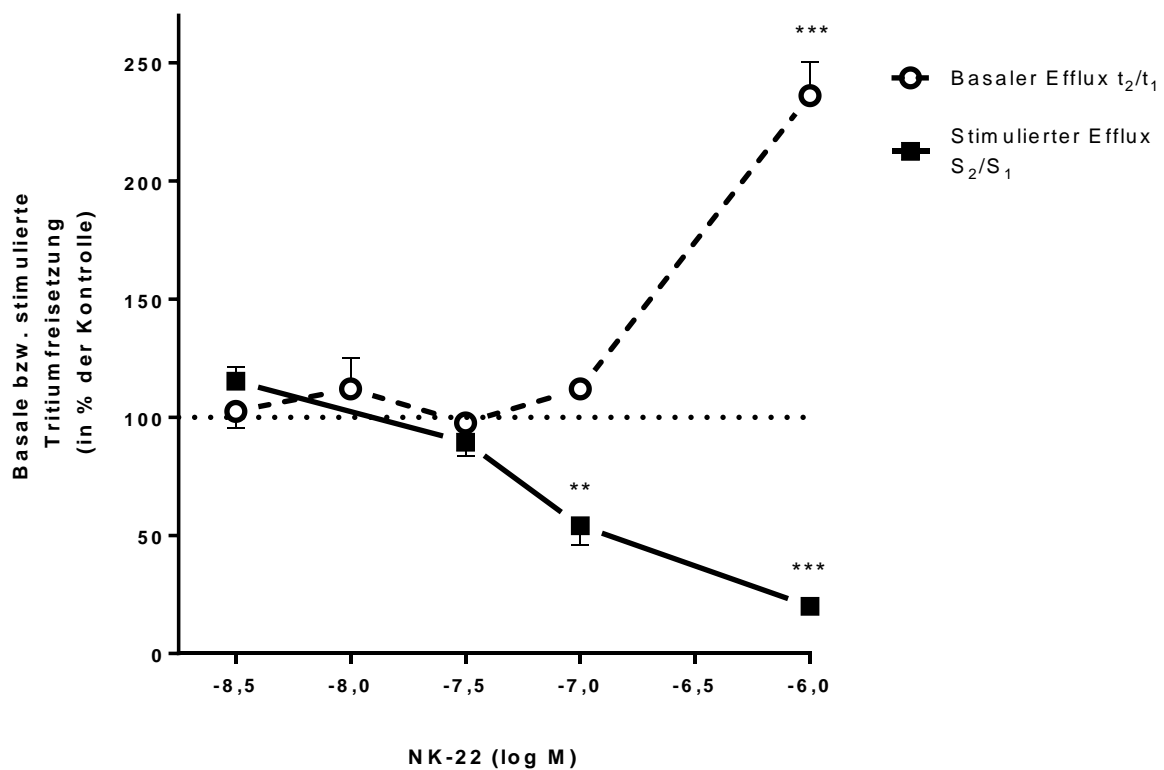


Abb. 10: Basaler und stimulierter Efflux unter dem Einfluss von NK-22
Versuchsanordnung vgl. Tabelle 10. Reizparameter waren: 0,1 Hz 200 mA. Mittelwerte \pm SEM aus 5-16 Versuchen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, verglichen zur entsprechenden NK-22 freien Kontrolle (nicht gezeigt)

3.3.2 Histamin H₄-Rezeptor

Auf der Suche nach funktionellen Histamin H₄-Rezeptoren im ZNS des Meerschweinchens wurde ebenfalls mit Kortexschnitten gearbeitet. Dazu wurden die Hirnschnitte des Meerschweinchens mit dem potenten Histamin H₄-Rezeptor-Agonisten 4-Methylhistamin (Lim et al., 2005) versetzt und die Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung quantifiziert. Bei diesen Versuchen wurden die Reize nach 40 und 90 Minuten appliziert; Reizparameter waren 0,3 Hz, 200 mA. Histamin, das unter diesen Versuchsbedingungen eine H₃-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Noradrenalinfreisetzung hervorruft (Timm et al., 1998), diente als Positivkontrolle. Desipramin 1 µM sowie Rauwolscin 1 µM waren als Hilfspharmaka während der ganzen Superfusionsdauer im Medium enthalten.

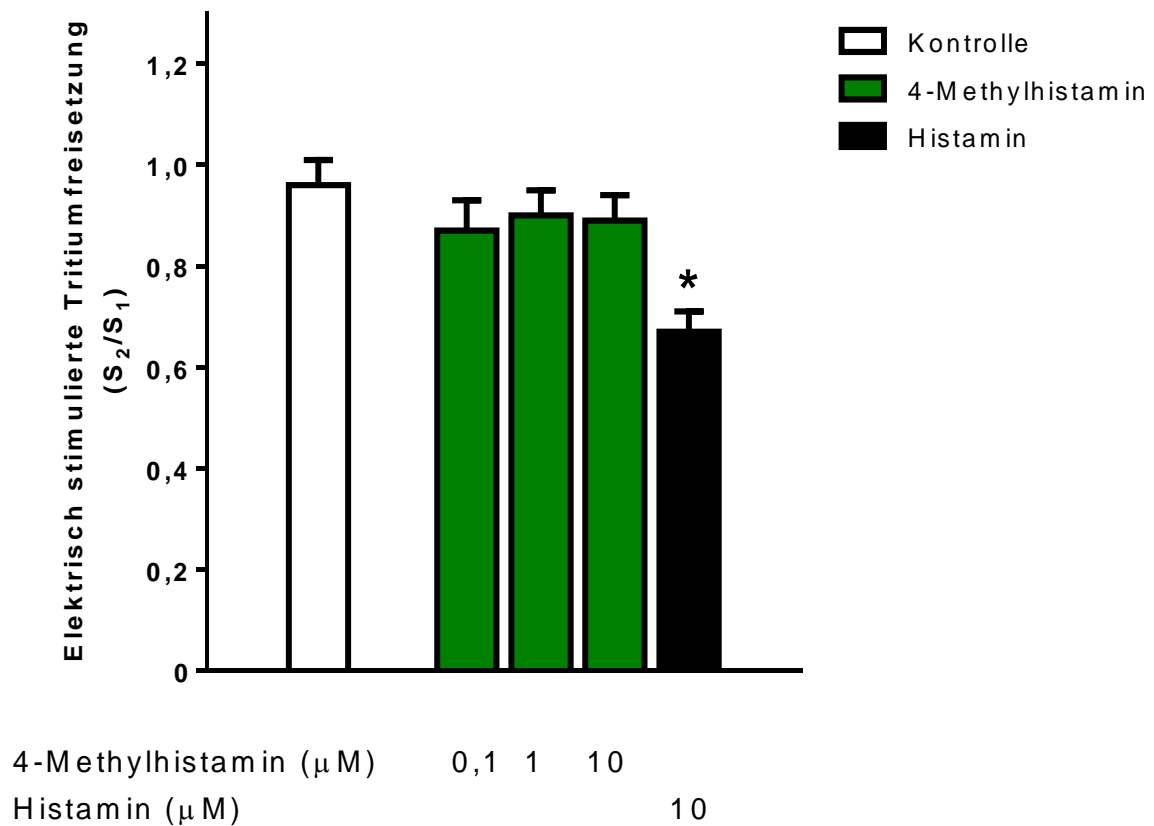


Abb. 11: Wirkung von 4-Methylhistamin und Histamin im Meerschweinchenkortex
Die Hirnschnitte wurden zunächst 60 Minuten mit ³H-Noradrenalin inkubiert, anschließend 110 Minuten superfundiert. Nach 40 und 90 Minuten wurde jeweils mit 0,3 Hz und 50 mA für 2 Minuten lang elektrisch gereizt. Mittelwerte ± SEM aus 5-6 Versuchen. *p<0,05

Abbildung 11 zeigt, dass Histamin 10 μM eine Abschwächung der Neurotransmitterfreisetzung um etwa 30 % bewirkte. 4-Methylhistamin hingegen zeigte im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 μM keine Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung.

3.4 Neuropeptid Y-Rezeptor

In dieser Versuchsreihe sollte die Wirkung von Neuropeptid Y an dopaminergen Zellen der Retina getestet werden. Dazu wurde das Neuropeptid Y-Analogon N-Acetyl-[Leu²⁸, Leu³¹]-Neuropeptid Y (24-36) verwendet (hier als „NPY-Analogon“ bezeichnet), welches einen vergleichbaren Effekt auf den Y₂-Rezeptor hat wie Neuropeptid Y selbst (Potter et al., 1994). Im Sinne der Versuchsoptimierung wurde ³H-Noradrenalin anstelle von ³H-Dopamin als radioaktiver Tracer zur Quantifizierung der dopaminergen Transmission verwendet. Diese Besonderheit wird in Abschnitt 4.1 weiter erläutert. Als Hilfspharmakon wurde in dieser Versuchsreihe Nomifensin 10 µM, ein Hemmstoff des neuronalen Dopamintransporters, zur Superfusionslösung hinzugefügt. Der elektrische Reiz zur Triggerung der Transmitter-freisetzung erfolgte nach 40 und 90 Minuten mit einer Frequenz von 3 Hz und einer Stromstärke von 200 mA.

Abbildung 12 zeigt den Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung in der Meerschweinchenretina. Zugabe des NPY-Analogons 0,1 µM bedingt eine Hemmung der Tritiumfreisetzung (Abb. 12, oben), ein Effekt, der durch den Y₂-Rezeptor-Antagonisten BIIE 0246 0,32 µM abgeschwächt wird (Abb. 12, unten).

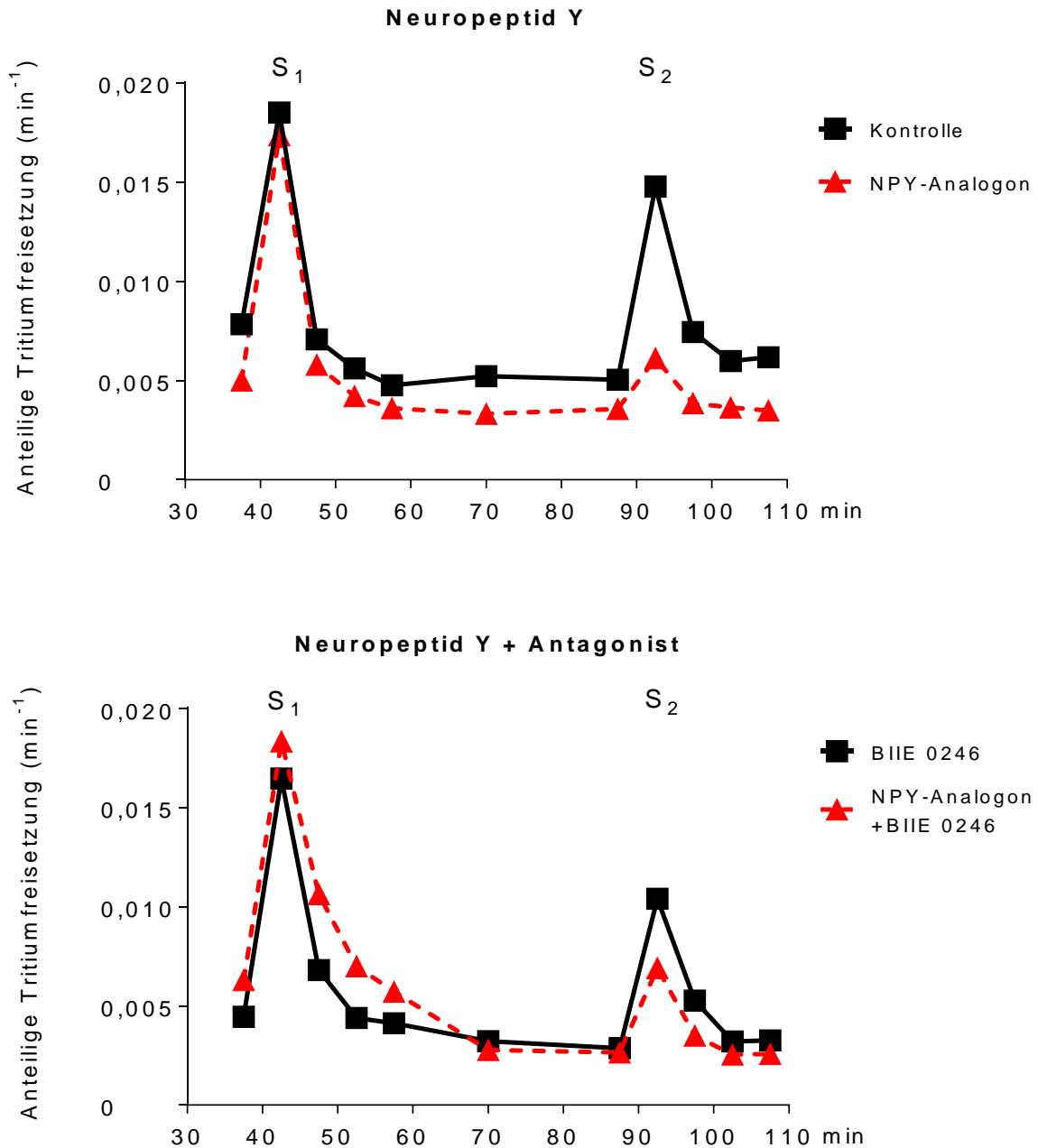


Abb. 12: Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung unter dem Einfluss von NPY und BIIE 0246
 S_1 , S_2 : erste bzw. zweite Reizperiode; Versuchsparameter s. Abb. 13. Daten aus jeweils einem repräsentativen Versuch

Die statistische Auswertung der S_2/S_1 -Werte zeigt Abbildung 13. Das NPY-Analogen hemmte die Noradrenalinfreisetzung konzentrationsabhängig. Die maximal erzielbare Hemmung betrug etwa 60 %, der pEC_{50} -Wert beläuft sich auf 7,6. Die Zugabe des Y_2 -Rezeptor-Antagonisten BIIE 0246 0,32 μ M schwächte die durch das NPY-Analogen in

einer Konzentration von 0,1 μM bedingte Hemmung signifikant ab. BIIE 0246 0,32 μM per se hatte keine Wirkung auf die Noradrenalinfreisetzung (S_1 : $13,85 \pm 1,70$ % ohne und $12,86 \pm 0,73$ % mit BIIE 0246; $n = 5$).

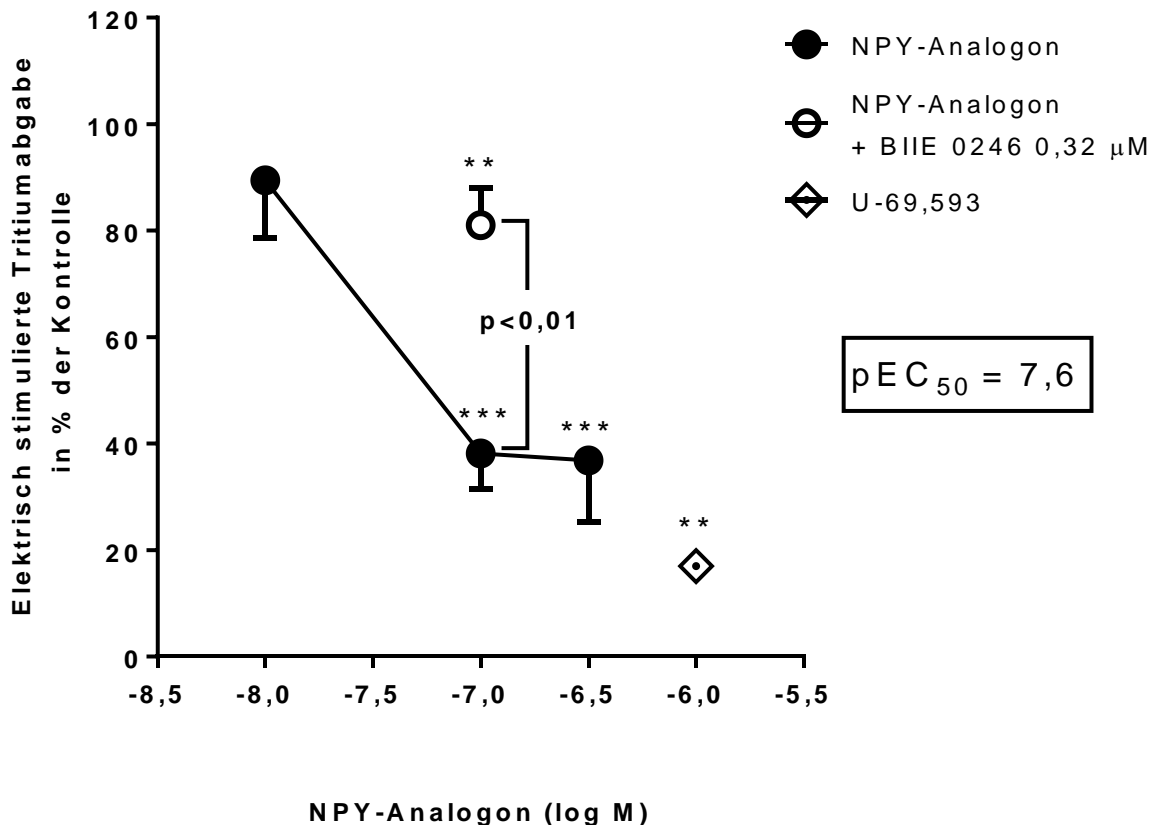


Abb. 13: Konzentrationsabhängige Wirkung des NPY-Analogons und Interaktion mit BIIE 0246

Nach einer 60-minütigen Inkubation mit ^3H -Noradrenalin wurden die Retinascheiben superfundiert. Die Reizparameter waren 3 Hz, 200 mA nach 40 und 90 Minuten. Dargestellt sind die S_2/S_1 -Werte, angegeben als % der jeweiligen Kontrollen (nicht im Bild gezeigt). Die Wirkung des κ -Opioid-Rezeptor-Agonisten U-69,593 ist zu Vergleichszwecken ebenfalls gezeigt. Mittelwerte \pm SEM von 6-10 Versuchen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Als Vergleichspharmakon, das über einen anderen präsynaptisch inhibitorischen Rezeptor wirkt, wurde der κ -Opioid-Rezeptor-Agonist U-69,593 mituntersucht. In einer Konzentration von 1 μM (die zum Maximaleffekt führt; Judel, 2013) bewirkte U-69,593 eine Hemmung von etwa 80 % (Abb. 13).

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Die Superfusion ist eine etablierte Methode zur Messung der Transmitterfreisetzung und ihrer Modulierbarkeit an Gewebeschnitten (Starke et al., 1989). Zur Detektion der Transmitter wurde in dieser Studie das Gewebe mit radioaktiv markierten Transmittern vor Beginn der Superfusion inkubiert. Diese Transmitter zeigen das gleiche chemische Verhalten wie ihre nicht markierten Analoga, werden also über selektive neuronale Transporter in die Nervenendigungen aufgenommen, in Vesikeln gespeichert und nach Stimulation in den synaptischen Spalt freigesetzt. Durch die Messung der abgegebenen radioaktiven Strahlung kann die Menge der freigesetzten Transmitter quantifiziert werden.

Hinsichtlich der verwendeten Tracer sind zwei Punkte herauszustellen. Erstens wurde Acetylcholin nicht selbst verwendet, da nicht Acetylcholin selbst, sondern sein Präkursor Cholin durch einen selektiven Transporter in das Nervenende transportiert wird, wo er zu Acetylcholin umgewandelt wird. Deshalb wurde [^3H]-Cholin (und nicht [^3H]-Acetylcholin) eingesetzt.

Zweitens wurde in den Versuchen an der Meerschweinchen-Retina [^3H]-Noradrenalin anstelle von [^3H]-Dopamin verwendet. Die Besonderheit der Meerschweinchen-netzhaut besteht darin, dass sie nicht vaskularisiert ist (Chase, 1982) und keine noradrenergen Sympathikus-Neurone besitzt. Die Wahl von ^3H -Noradrenalin anstelle von ^3H -Dopamin begründet sich in früheren Studien, die gezeigt haben, dass beide Transmitter in die dopaminergen Zellen der Meerschweinchenretina aufgenommen werden, die Versuchsergebnisse bei den mit ^3H -Noradrenalin durchgeführten Versuchen jedoch deutlich weniger stark variieren (Schlicker et al., 1996). Die Tritiumfreisetzung entspricht also bei der Meerschweinchenretina aufgrund des Fehlens von noradrenergen Zellen der Dopaminfreisetzung aus dopaminergen Zellen.

Die Stimulation erfolgte in unserem Versuchsaufbau elektrisch. Dabei ist zu beachten, dass eine erhöhte Stimulationsfrequenz zwar eine höhere Tritiumfreisetzung bewirkt, andererseits aber auch die Modulierbarkeit reduziert und demnach nicht in jedem Fall erstrebenswert ist (Starke, 1977). Die Wahl der richtigen Reizparameter ist somit entscheidend für den Erfolg der Versuche (s. auch 3.3.1.1 und 4.3.1). Im Organismus werden Aktionspotenziale zum Faserende der Nervenzelle weitergeleitet und triggern dort über einen spannungsabhängigen Calciumeinstrom die exozytotische Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Dabei wird die Freisetzung durch Fehlen von Calcium in der Superfusionslösung sowie durch Anwesenheit von Tetrodotoxin, einem Nervengift, das spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, unterbunden. Frühere Versuche konnten für alle in dieser Arbeit untersuchten Versuchsmodelle zeigen, dass die Freisetzung unter diesen Versuchsbedingungen Calcium-abhängig und Tetrodotoxin-sensitiv war (Judel, 2013; Kathmann et al., 2001b; Timm et al., 1998). Somit kann die Freisetzung als „quasi physiologische“ Neurotransmitterfreisetzung bezeichnet werden.

Weiterhin wurden verschiedene Hilfspharmaka zur Superfusionslösung hinzugegeben: So hemmt Desipramin den neuronalen Noradrenalin-Transporter (NAT) und führt infolgedessen zu einer höheren Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt. Rauwolscin wirkt als selektiver α_2 -Rezeptor-Antagonist und verhindert eine negative Rückkopplung auf die freigesetzte Transmittermenge. Ferner verstärkt Rauwolscin durch Blockade der α_2 -Rezeptoren die CB_1 -Rezeptor bedingte Freisetzungsmodulation (Schlicker und Göthert, 1998). Schließlich wurde Rauwolscin eingesetzt, um die besonders störende α_2 -adrenolytische Wirkung von Impromidin (Schlicker et al. 1989) zu verhindern.

Wie oben erklärt, wurde die Dopaminfreisetzung in der Retina indirekt über die Noradrenalinfreisetzung quantifiziert. Dazu wird (radioaktiv markiertes) Noradrenalin mit hoher Affinität über den neuronalen Dopamintransporter (DAT) in die Sinneszellen der Retina aufgenommen. Diesen Versuchen wurde während der Superfusion Nomifensin, ein Hemmstoff des DAT, hinzugefügt. Analog dazu wurde bei den Versuchen am serotonergen Neuron Femoxetin als Hemmstoff des neuronalen

Serotonintransporters (SERT) und bei den Experimenten am cholinergen Neuron Hemicholinium als Hemmstoff des neuronalen Cholintransporters (HACU) zur Superfusionslösung hinzugefügt.

Bis auf den Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten NK-22 zeigte kein Pharmakon eine Wirkung auf den basalen Efflux. Der in dieser Arbeit primär interessierende Parameter ist die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung. Eine Steigerung des basalen Effluxes durch NK-22 schränkt die Aussagekraft der elektrisch stimulierten Freisetzung erheblich ein (s. auch 4.3.1).

4.2 Cannabinoid-Rezeptor

In den Versuchen mit konditionalen CB₁-KO-Mäusen zeigte sich eine verstärkte hippocampale Acetylcholinfreisetzung bei denjenigen Tieren, denen der CB₁-Rezeptor am GABAergen Neuron fehlt, während die Freisetzung bei Tieren mit fehlendem CB₁-Rezeptor am glutamatergen Neuron nicht beeinflusst wurde. Die Selektivität dieses Befundes wird auch noch dadurch untermauert, dass die Freisetzung der Monoamine Serotonin und Noradrenalin bei beiden konditionalen CB₁-KO-Linien unbeeinflusst blieb (Tab. 11).

Tab. 11: Wirkung von globalem und konditionalem CB₁-Rezeptor-Knockout auf die Transmitterfreisetzung

Untersucht wurden verschiedene Hirnregionen wie Kortex, Hippokampus und Hypothalamus, im Kortex auch bei erhöhter Calcium-Konzentration von 3,25 mM. Globale Knockout-Tiere von AG Zimmer (genetischer Hintergrund: C57BL/6J), konditionale KO-Tiere von AG Lutz (genetischer Hintergrund: C57BL/6N)

5-HT = Serotonin, 5-HT KO, GABA KO, glu KO = Konditionale KO-Tiere mit fehlendem CB₁-Rezeptor am serotonergen, GABAergen bzw. glutamatergen Neuron; ACh = Acetylcholin, AG = Arbeitsgruppe; NA = Noradrenalin

| | ACh | 5-HT | NA | Referenz |
|------------|------------|-------------|-----------|---------------------------------------|
| Globale KO | ↑ | | = | Kathmann et al., 2001b |
| 5-HT KO | = | = | = | Unveröffentlichte Versuche unserer AG |
| GABA KO | ↑ | = | = | s. Kapitel 3.2 |
| glu KO | = | = | = | s. Kapitel 3.2 |

Eine verstärkte Acetylcholinfreisetzung wurde auch bei globalen CB₁-KO-Mäusen beobachtet (Kathmann et al., 2001b). Die verstärkte Acetylcholinfreisetzung bei den CB₁-KO-Mauslinien erinnert an die Wirkung des CB₁-Rezeptor-Antagonisten bzw. inversen CB₁-Rezeptor-Agonisten SR 141716 auf die Acetylcholinfreisetzung im Hippokampus von Wildtyp-Tieren (Kathmann et al., 2001a; b). Es liegt nahe, anzunehmen, dass an den CB₁-Rezeptoren ein endogener Tonus anliegt und dass Fehlen der Blockade dieser Rezeptoren entsprechend zu einer Steigerung der Freisetzung führt. Tatsächlich verlor der CB₁-Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2 bei

beiden CB₁-KO-Mauslinien seine ausgeprägte hemmende Wirkung auf die Acetylcholinfreisetzung.

Bei näherem Hinsehen ergeben sich aber doch noch zwei Probleme in der Deutung. So zeigten unsere früheren Versuche (Kathmann et al., 2001a), dass die CB₁-Rezeptoren, die zur Hemmung der Acetylcholinfreisetzung führen, direkt präsynaptisch an den cholinergen Neuronen und nicht an davor gelagerten GABAergen Interneuronen lokalisiert sind. Diese beiden Sichtweisen können nicht auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden. Zwar wurden die Befunde von Kathmann et al. (2001a) an NMRI-, die von Kathmann et al. (2001b) an C57BL/6J- und diejenigen der vorliegenden Studie schließlich an C57BL/6N-Mäusen erhoben, allerdings erscheint es wenig plausibel, dass die unterschiedlichen Mäuserassen für das Dilemma verantwortlich sind (obwohl entsprechende Versuche an der jeweils gleichen Linie zu fordern wären).

Selbst wenn man die Frage der Lokalisation des verantwortlichen CB₁-Rezeptors ausklammert, ergibt sich noch ein zweites Problem. Wenn der tonisch aktive CB₁-Rezeptor an einem tonisch aktiven GABAergen Neuron fehlt, dann sollte man erwarten, dass die Transmitterfreisetzung aus dem nachgelagerten – hier cholinergen – Neuron vermindert (und nicht erhöht!) ist (Abb. 14 A). Dieses Dilemma könnte allerdings so gelöst werden, dass zwei nacheinander geschaltete GABAerge Neurone beteiligt sind (Abb. 14B). Wenn man annimmt, dass die Dichte der präsynaptischen CB₁-Rezeptoren am „mittleren“ GABAergen Neuron gering ist oder der Rezeptor dort in Gänze fehlt, könnte man das Dilemma sogar noch besser lösen.

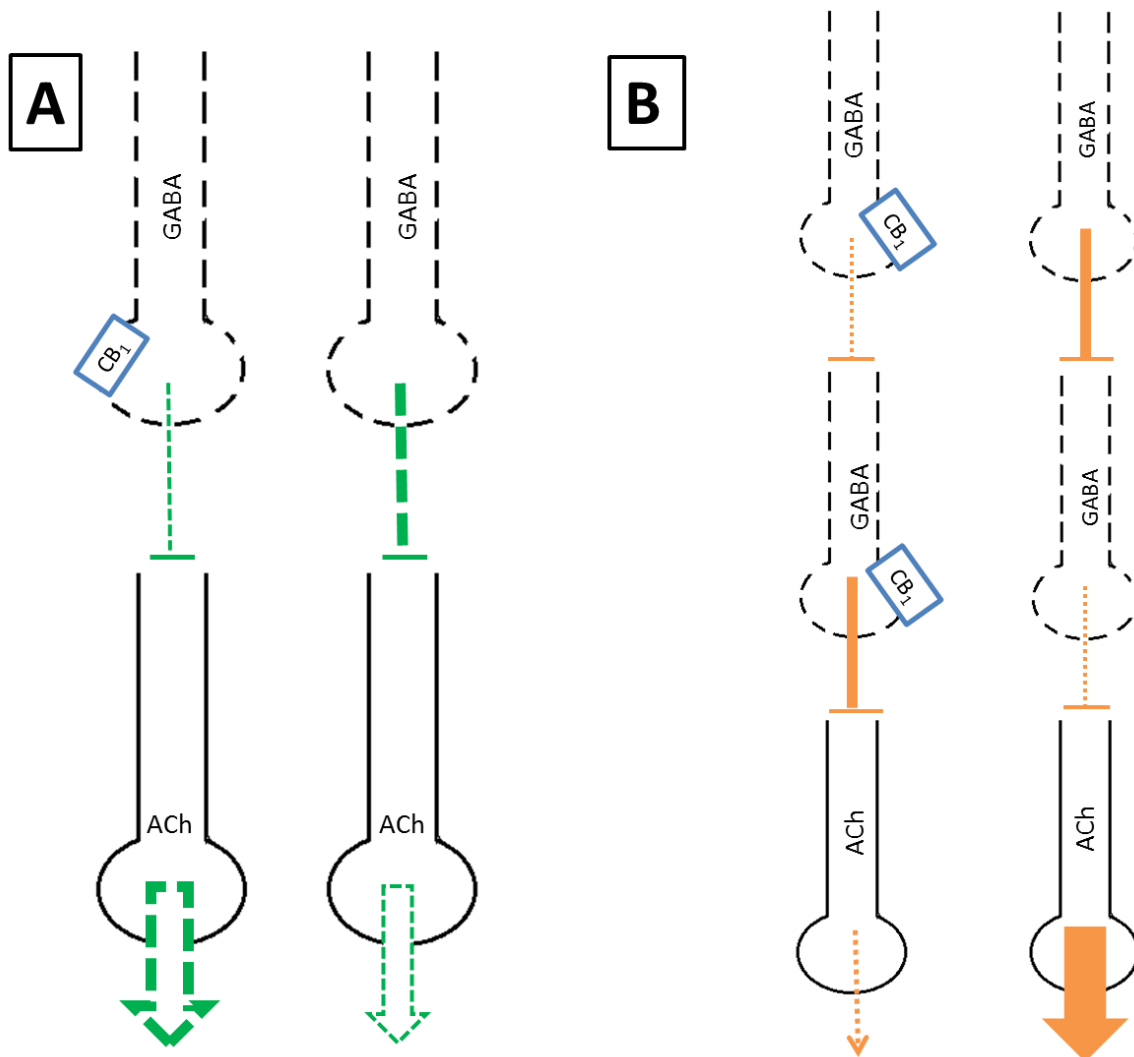


Abb. 14: Mögliche Erklärung der gesteigerten Acetylcholinfreisetzung bei fehlendem CB₁-Rezeptor an GABAergen Neuronen

Bei intaktem CB₁-Rezeptor am GABAergen Interneuron würde man erwarten, dass die Acetylcholinfreisetzung aus dem nachgeschalteten cholinergen Neuron eher hoch ist (1. Spur) und bei Fehlen des CB₁-Rezeptors vermindert wird (2. Spur). Nimmt man zwei nacheinander geschaltete GABAerge Interneurone an, dann ist bei intakten CB₁-Rezeptoren mit einer schwachen (3. Spur), bei fehlenden CB₁-Rezeptoren jedoch mit einer hohen Acetylcholinfreisetzung zu rechnen (4. Spur)

ACh = Acetylcholin; ⊥ = Hemmung

In Tabelle 11 sind der Vollständigkeit halber auch noch unsere Versuche an einer vierten CB₁-KO-Mauslinie aufgeführt, bei welcher der CB₁-Rezeptor an den serotonergen Neuronen fehlt (TPH2-CB₁-KO-Linie). Der konditionale CB₁-Knockout beeinflusste die Serotoninfreisetzung im Hippokampus, zerebralen Kortex und Hypothalamus nicht. Das ist nicht überraschend, denn die Serotoninfreisetzung wird bei

Wildtyp-Tieren (NMRI-Stamm) durch CB₁-Rezeptor-Aktivierung nur sehr schwach gehemmt (Nakazi et al., 2000).

Leider ist die Zahl der Experimente, auf denen die Versuche zu den konditionalen Knockout-Tieren basieren, zum Teil sehr gering. Das hat zwei Gründe: Erstens ist die Zucht dieser Tiere schwierig, und so standen uns nur wenige Mäuse aus den jeweiligen Gruppen zur Verfügung. Zweitens ist bei jenen Versuchen, bei denen zwei Reize (S_1 , S_2) verabfolgt wurden und der Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2 vor dem zweiten Reiz ins Medium eingeleitet wurde, die Aussagekraft des Wertes S_2/S_1 sehr stark von der Höhe des S_1 -Wertes abhängig, der gerade bei Messung der Acetylcholinfreisetzung häufig sehr gering ist (so konnten nicht alle entsprechenden Versuche ausgewertet werden). Trotz dieser Probleme und ausbleibender statistischer Signifikanz kann wegen der extrem ausgeprägten numerischen Unterschiede kein Zweifel an der Aussage der Abb. 3 und 4 zur Auswirkung des Fehlens von CB₁-Rezeptoren an GABAergen Neuronen auf die Acetylcholinfreisetzung und ihre WIN 55,212-2-verursachte Beeinflussung bestehen.

Schließlich sind in den Versuchen bereits bekannte Phänomene aufgetreten, die hier nur ganz kurz gestreift werden sollen. So variierte die stimulierte Transmitterfreisetzung in Abhängigkeit der Hirnregion (z. B. Kortex > Hypothalamus), des untersuchten Transmitters (z. B. Noradrenalin > Acetylcholin) und der verwendeten Ca²⁺-Konzentration (3,25 > 1,3 mM). Damit bei der Acetylcholinfreisetzung überhaupt ein ausreichendes Signal erreicht werden konnte, musste die Ca²⁺-Konzentration – verglichen mit den Versuchen am serotonergen und noradrenergen Neuron – auf 3,25 mM erhöht werden (Kathmann et al., 2001b).

4.3 Histamin-Rezeptoren

4.3.1 Histamin H₂-Rezeptor

In unserer früheren Studie (Timm et al., 1998), in der die H₂-Rezeptor-vermittelte Steigerung der Noradrenalinfreisetzung erstmals gezeigt wurde, bewirkte Impromidin bei 0,3 Hz eine Freisetzungssteigerung um 10 (1 µM) bzw. 16 % (10 µM) im Vergleich zur Kontrolle. Wie in 4.1 erläutert, bewirkt eine höhere Reizfrequenz eine geringere Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung (Starke, 1977). Mittels Senkung der Reizfrequenz von 0,3 Hz auf 0,1 Hz konnte der fazilitatorische Effekt von Impromidin auf bis zu 50 % gesteigert werden. Da bei 0,1 Hz sehr wenig Noradrenalin freigesetzt wurde, wurde zur Kompensation die Reizamplitude von 50 auf 200 mA erhöht.

Neben den Reizparametern wurde auch die Expositionszeit in der neuen Versuchsreihe verändert. So wurde die Expositionszeit deshalb von 30 auf 60 Minuten erhöht, um der langen Äquilibrationszeit von UR-BIT106 (A. Buschauer, persönliche Mitteilung) Rechnung zu tragen. Tatsächlich wurde dann für die Versuche mit UR-BIT106 noch eine viel längere Expositionszeit von 240 Minuten gewählt (Tab. 9). Durch die verlängerte Expositionszeit scheint es zu keiner Histamin-H₂-Rezeptor-Desensibilisierung zu kommen, welche auch beim hier untersuchten G-Protein-gekoppelten Histamin H₂-Rezeptor vorkommen kann (Shayo et al., 2001) und ihrerseits zu einem Signalverlust geführt hätte. Im Einklang mit unseren Ergebnissen stehen frühere Studien von Timm et al., (1998), bei denen der H₂-Rezeptor-Agonist Impromidin nicht zur H₂-Rezeptor-Desensibilisierung führte, wobei allerdings nur Expositionsauern von 10, 20 und 30 Minuten verglichen wurden.

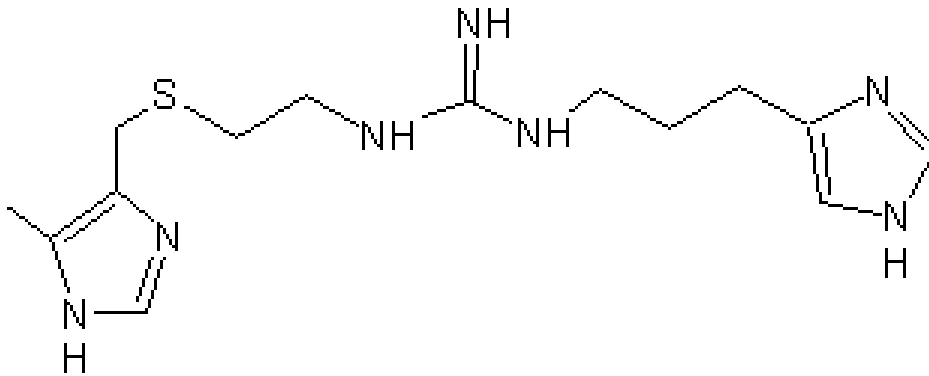
Die viel stärker ausgeprägte Wirkung erlaubte nun auch, die Wirkungsstärke von Impromidin zu ermitteln. Der gefundene pEC₅₀-Wert von 6,9 ist fast identisch mit dem Wert von 6,7, der von Coruzzi et al. (1999) an einem anderen H₂-Rezeptor-Modell des Meerschweinchens bestimmt wurden. Ferner führte Zugabe des H₂-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin in unserem Modell zur Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Impromidin mit einem scheinbaren pA₂-Wert von 7,2. Auch dieser

Wert entspricht Literaturwerten (Arrang et al., 1983), womit sich die Annahme, dass es sich um einen H₂-Rezeptor vermittelten Effekt handelt, bestätigt.

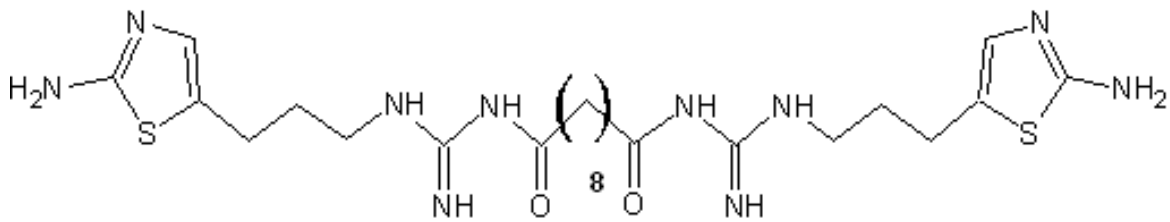
Der freisetzungsteigernde Effekt von Impromidin am Histamin-H₂-Rezeptor wurde von unserer Arbeitsgruppe auch an Kortexschnitten des Menschen untersucht. Hierbei zeigte sich kein Hinweis auf einen freisetzungsmulierenden H₂-Rezeptor im Gehirn des Menschen (Feliszek et al., 2012).

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Suche nach einem potenteren H₂-Rezeptor-Agonisten als Impromidin. Impromidin zeigt neben seiner agonistischen Wirkung am H₂-Rezeptor auch potente antagonistische Wirkungen am H₃-Rezeptor (Arrang et al., 1983; Schlicker et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei von der Arbeitsgruppe Buschauer kürzlich synthetisierte H₂-Rezeptor-Agonisten UR-BIT106 und NK-22 getestet. Bei diesen Agonisten handelt es sich um bivalente Liganden, die zwei Rezeptorbindungsstellen haben und über einen Abstandshalter (Spacer) miteinander verbunden sind (Birnkammer et al., 2012). Abbildung 15 zeigt die Strukturformeln von Impromidin, UR-BIT106 und NK-22.

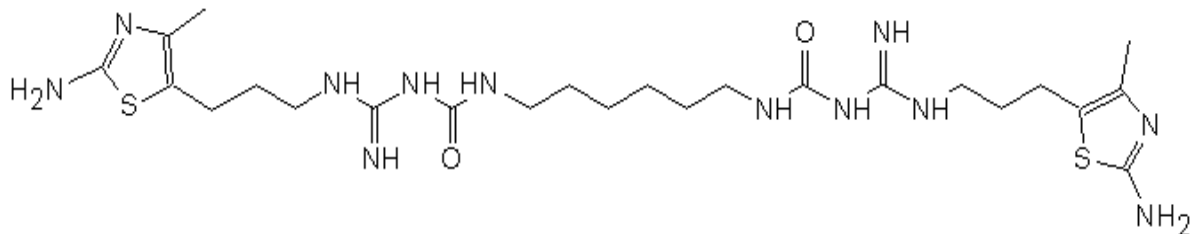
Alle aufgeführten H₂-Rezeptor-Agonisten tragen eine oder zwei Guanidingruppe(n). Zusätzlich finden sich bei Impromidin, analog zum Histamin, zwei Imidazolgruppen. Die beiden bivalenten Liganden besitzen statt der Imidazolringe Aminothiazolringe. Bei Birnkammer et al. (2012) zeigten diese H₂-Rezeptor-Agonisten eine vielfach höhere Potenz im Vergleich zu Histamin. Octandiol- (wie bei UR-BIT106) bzw. Decandiol-Spacer erbrachten hierbei die besten Resultate (Birnkammer et al., 2012).



Impromidin



UR-BIT106



NK-22

Abb. 15: Strukturformeln der drei verwendeten H₂-Rezeptor-Agonisten (persönliche Mitteilung von Nicole Kagermeier, AG Buschauer)

Im Laufe unserer Forschungsarbeiten stellte sich heraus, dass UR-BIT106 in Wasser nicht stabil ist. Trotzdem zeigte sich in den Superfusionsstudien mit UR-BIT106 0,1 µM ein fazilitatorischer Effekt von 38 % (der allerdings keine Signifikanz erreicht hat), während das zu Vergleichszwecken mitgeführte Impromidin bei einer Konzentration von 1 µM eine (signifikante) Steigerung um 45 % bewirkte. Vielleicht

unterliegt UR-BIT106 einem langsamen Zersetzungsprozess, der zum Zeitpunkt der Versuche noch eine Restaktivität zuließ.

NK-22 ist im Vergleich zu UR-BIT106 mit Carbamoyl-Guanidingruppen auf beiden Seiten des Spacers ausgestattet. Durch Anhängen einer Carbamoylgruppe an die Guanidingruppen wird die Stabilität des Moleküls erhöht (persönliche Mitteilung von A. Buschauer). In unserem Versuchsaufbau zeigte NK-22 einen leichten fazilitatorischen Effekt im hohen picomolaren bzw. niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich (Abb. 8). Die Wirkung belief sich auf weniger als 20 % und erreichte keine statistische Signifikanz. In Gegenwart von Ranitidin ergab sich keine steigernde Wirkung von NK-22; allerdings ist der Unterschied der Kurven ohne und mit Ranitidin nicht signifikant. NK-22 $3,2 \times 10^{-8}$ M führte zur Hemmung der Noradrenalinfreisetzung, wobei die Werte ohne und mit Ranitidin praktisch gleich waren. Bei noch höheren Konzentrationen kam es zu einer noch stärkeren Hemmung der stimulierten und parallel zu einer Steigerung der basalen Tritiumfreisetzung (Abb. 10). Mit aller Vorsicht könnten die Befunde so gedeutet werden, dass NK-22 in sehr niedrigen Konzentrationen eine H_2 -Rezeptor-vermittelte Steigerung der Noradrenalinfreisetzung bewirkt, dass diese aber bei zunehmender Konzentration durch eine gegensinnig verlaufende Wirkung unklarer Ursache abgeschwächt und zunehmend zu einer Hemmung wird. Abb. 9 zeigt für 1 μ M, dass im hohen Konzentrationsbereich mit massiv erhöhtem basalen Efflux die stimulierte Freisetzung schon rein rechnerisch nicht mehr zuverlässig erfolgen kann und zu einer Hemmung führen muss.

Die genannten Probleme erklären, warum es aufgrund der geringen Steigerung der Transmitterfreisetzung (NK-22) bzw. mangelnder Stabilität in wässriger Lösung (UR-BIT106) nicht möglich war, entsprechende pA_2 -Werte für Antagonisten zu bestimmen.

4.3.2 Histamin H₄-Rezeptor

Mit Hilfe des Histamin H₄-Rezeptor-Agonisten 4-Methylhistamin sollte geprüft werden, ob sich im Meerschweinchenkortex Hinweise auf einen funktionellen H₄-Rezeptor finden. Die Affinität von 4-Methylhistamin zum Histamin H₄-Rezeptor beim Meerschweinchen wird in der Literatur mit einem pK_i von 7,3 angegeben (Lim et al., 2010). In unserem Versuchsaufbau wurde mit Konzentrationen bis zu 10 µM gearbeitet, also Konzentrationen, die bis zum 200fachen Wert des K_i des H₄-Rezeptor-Agonisten reichen. Trotzdem zeigte sich keine Wirkung von 4-Methylhistamin auf die Transmitterfreisetzung. Im Gegensatz dazu bewirkte Histamin 10 µM eine signifikante Hemmung der Transmitterfreisetzung um etwa 30 %. Histamin wirkt in dieser Konzentration v. a. über präsynaptisch lokalisierte, inhibitorische H₃-Rezeptoren (Timm et al., 1998). In unserem Versuchsaufbau diente es als Positivkontrolle.

In weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe, die sich der Suche nach freisetzungsmodulierenden Histamin H₄-Rezeptoren im Kortex von Mensch und Maus widmeten, fanden sich ebenso wenig Anhaltspunkte für einen H₄-Rezeptor im ZNS dieser Spezies wie beim Meerschweinchen (Feliszek et al., 2015). Die Suche nach funktionellen H₄-Rezeptoren im Meerschweinchenkortex wurde in unserer Arbeitsgruppe mit einem anderen funktionellen Modell, der GTPγS-Bindungsstudie, vervollständigt. Auch hier zeigten sich keine Hinweise auf einen Histamin H₄-Rezeptor im Kortex des Meerschweinchens, obwohl eine H₃-Rezeptor-vermittelte Steigerung dieses Parameters (wiederum als Positivkontrolle) nachgewiesen werden konnte (Feliszek et al., 2015).

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu früheren Studien u. a. auch unserer Arbeitsgruppe, bei denen H₄-Rezeptor-mRNA im ZNS von Maus, Meerschweinchen und Mensch nachgewiesen werden konnte (s. 1.3.2). Es ist allerdings nicht in jedem Fall gerechtfertigt, bei positivem Nachweis von mRNA auf entsprechende Proteinexpression zu schließen. Ein Grund hierfür sind Kontaminationen. Zudem wurde gerade bei GPCR beschrieben, dass trotz positivem mRNA-Nachweis kein Korrelat auf Proteinebene gefunden werden konnte (Schneider et al., 2015).

4.4 Neuropeptid Y-Rezeptor

Im Kontext unseres Arbeitsgruppenprojektes zur Charakterisierung präsynaptischer Rezeptoren auf dopaminergen Sinneszellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Modulation der Dopaminfreisetzung über Y_2 -Rezeptoren untersucht. Anstelle von Neuropeptid Y wurde in den durchgeführten Versuchen an der Meerschweinchenretina das Neuropeptid Y-Analogon NPY (24-36) verwendet, da es – verglichen mit Neuropeptid Y selbst – billiger ist und eine hohe Selektivität für den Y_2 -Rezeptor besitzt (Potter et al., 1994). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Dopaminfreisetzung um maximal 60 %. Dieser Effekt wurde durch Zugabe des potenten und hoch selektiven Y_2 -Rezeptor-Antagonisten BIIE 0246 (Weiser et al., 2000) in einer Konzentration von 320 nM stark abgeschwächt. Weitere Studien zu BIIE 0246 und seiner Wirkung an Y_2 -Rezeptoren sind nötig, um den pA_2 -Wert dieses potenten Y_2 -Rezeptor-Antagonisten an der Meerschweinchenretina zu ermitteln.

Des Weiteren ließe sich mit Hilfe von BIIE 0246 die Frage klären, ob der Y_2 -Rezeptor an der Meerschweinchenretina einem endogenen Tonus unterliegt. In diesem Falle würde man bei alleiniger Zugabe des Y_2 -Rezeptor-Antagonisten eine Steigerung der Neurotransmitterfreisetzung erwarten. Der Antagonist unterbricht nämlich die tonische Hemmung am Y_2 -Rezeptor, die durch endogen freigesetztes und in der Umgebung des präsynaptischen Y_2 -Rezeptor kumulierendes NPY zustande kommt. Bisher konnten in 3 Studien an Ratten und Hunden Hinweise auf einen endogenen Tonus am Y_2 -Rezeptor gefunden werden (Schlicker und Kathmann, 2008). Da viele Studien zum Y_2 -Rezeptor vor Einführung des selektiven Y_2 -Rezeptor-Antagonisten BIIE 0246 durchgeführt wurden, ist die eigentliche Zahl der Y_2 -Rezeptoren, die einem endogenen Tonus unterliegen, vermutlich deutlich höher (Schlicker und Kathmann, 2008). Die fehlende Wirkung von alleine verabreichtem BIIE 0246 spricht allerdings nicht dafür, dass der Y_2 -Rezeptor, der die Dopaminfreisetzung in der Meerschweinchenretina moduliert, einem solchen endogenen Tonus unterliegt.

Y_2 -Rezeptoren sind, analog zu Opioidrezeptoren, $G_{i/o}$ gekoppelte Rezeptoren und zeigen ähnliche Signaltransduktionsvorgänge wie Opioidrezeptoren (Schlicker und

Kathmann, 2008). Während μ - und δ -Opioidrezeptoren keinen Einfluss auf die Modulation der Neurotransmitterfreisetzung an der Meerschweinchenretina zeigen, stellt sich die Situation bei den κ -Opioid-Rezeptoren anders dar (Judel, 2013). In meinen Versuchen zeigte der κ -Opioid-Rezeptor-Agonist U-69,593 1 μ M eine Hemmung der Dopaminfreisetzung um 76 %. Dieser Wert steht in Einklang mit Literaturwerten (Judel, 2013; siehe auch Tab. 2) und bestätigt den Einfluss von κ -Opioid-Rezeptoren auf die Dopaminfreisetzung in der Retina des Meerschweinchens. In den hier gezeigten Versuchen diente U-69,593 zum Vergleich des maximalen Hemmeffektes von NPY am Y_2 -Rezeptor. Die κ -Opioid-Rezeptor-vermittelte Hemmung ist in der Tat etwas höher als die Y_2 -Rezeptor-vermittelte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf ihre freisetzungsmulierende Wirkung an Gewebeschnitten des ZNS und der Retina von Maus und Meerschweinchen untersucht. Dazu wurden die Schnitte mit radioaktiv markiertem Neurotransmitter inkubiert und die durch elektrische Stimulation hervorgerufene Freisetzung von Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin oder Dopamin ermittelt.

In den Untersuchungen zum Cannabinoid-Rezeptor 1 zeigte sich eine verstärkte Acetylcholinfreisetzung im Hippokampus von Mäusen mit fehlendem CB₁-Rezeptor am GABAergen Neuron im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis entspricht früheren Untersuchungen zum CB₁-Rezeptor an Mäusen, denen der CB₁-Rezeptor an sämtlichen Neuronen fehlt und ist ein weiterer Hinweis auf einen endogenen Tonus an CB₁-Rezeptoren. Die Wirkung ist selektiv, denn die Serotonin- und Noradrenalinfreisetzung wurde im gleichen Gewebe nicht beeinflusst, noch kam es zu einer Veränderung der Freisetzung aller drei Transmitter, wenn der CB₁-Rezeptor an glutamatergen Neuronen fehlte.

In den Studien zum Histamin H₂-Rezeptor am Meerschweinchenkortex konnte durch Modifikation der Versuchsbedingungen eine ausgeprägtere Steigerung der Noradrenalinfreisetzung durch den H₂-Agonisten Impromidin erzielt werden. Diese Wirkung ist durch den H₂-Rezeptor-Antagonisten Ranitidin antagonisierbar. Weiterhin wurden 2 neue Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten untersucht, deren Effekte in der Superfusion allerdings schlecht quantifizierbar waren und keinen Vorteil im Vergleich zu Impromidin erbrachten.

Das Ergebnis der Suche nach funktionellen H₄-Rezeptoren im Meerschweinchenkortex verlief negativ. Die in parallelen Versuchen durchgeführte Aktivierung von H₃-Rezeptoren (die wie die H₄-Rezeptoren G_i-Protein-gekoppelt sind) führte allerdings zu der erwarteten Hemmung der Noradrenalinfreisetzung.

Hinsichtlich des NPY-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass die Dopaminfreisetzung in den amakrinen Zellen der Meerschweinchenretina über inhibitorische Y_2 -Rezeptoren moduliert wird. Zugabe des Antagonisten BIIE 0246 hob die Y_2 -Rezeptor-vermittelte Wirkung auf.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

| | <u>Seite</u> |
|---|--------------|
| Abb. 1: ³ H-Serotoninfreisetzung bei dlx-CB ₁ -KO-, nex-cre-CB ₁ -KO- und Wildtyp-tieren..... | 28 |
| Abb. 2: ³ H-Noradrenalinfreisetzung bei dlx-CB ₁ -KO-, nex-cre-CB ₁ -KO- und Wildtyp-tieren..... | 29 |
| Abb. 3: ³ H-Acetylcholinfreisetzung bei dlx-CB ₁ -KO-, nex-cre-CB ₁ -KO- und Wildtyp-tieren..... | 31 |
| Abb. 4: ³ H-Acetylcholinfreisetzung bei dlx- und nex-cre-CB ₁ -KO sowie Wildtyp-tieren unter dem Einfluss von WIN 55,212-2..... | 32 |
| Abb. 5: Vergleich der Impromidin-bedingten Steigerung der ³ H-Noradrenalin-freisetzung unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen..... | 34 |
| Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Impromidin und Wechselwirkung mit Ranitidin..... | 35 |
| Abb. 7: Vergleich der Wirkung der H ₂ -Rezeptor-Agonisten UR-BIT106 und Impromidin..... | 37 |
| Abb. 8: Wirkung von NK-22 und Impromidin sowie beider Wechselwirkung mit Ranitidin..... | 39 |
| Abb. 9: Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung unter dem Einfluss von NK-22 | 40 |
| Abb. 10: Basaler und stimulierter Efflux unter dem Einfluss von NK-22 | 41 |

| | |
|---|----|
| Abb. 11: Wirkung von 4-Methylhistamin und Histamin im Meerschweinchenkortex..... | 43 |
| Abb. 12: Zeitverlauf der Tritiumfreisetzung unter dem Einfluss von NPY und BIIE 0246 | 45 |
| Abb. 13: Konzentrationsabhängige Wirkung des NPY-Analogons und Interaktion mit BIIE 0246..... | 46 |
| Abb. 14: Mögliche Erklärung der gesteigerten Acetylcholinfreisetzung bei fehlendem CB ₁ -Rezeptor am GABAergen Neuron.. .. | 52 |
| Abb. 15: Strukturformeln der drei verwendeten H ₂ -Rezeptor-Agonisten | 56 |

6.2 Tabellenverzeichnis

| | <u>Seite</u> |
|--|--------------|
| Tab. 1: Charakterisierung der Histaminrezeptorsubtypen | 10 |
| Tab. 2: Liganden und Rezeptoren an dopaminergen Zellen der Meerschweinchenretina | 13 |
| Tab. 3: Zusammensetzung der physiologischen Kochsalzlösung | 16 |
| Tab. 4: Versuchsbedingungen in den verschiedenen Versuchsreihen | 18 |
| Tab. 5: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen | 22 |
| Tab. 6: Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen..... | 24 |
| Tab. 7: Basale und stimulierte Tritiumabgabe von mit ^3H -Noradrenalin, ^3H -Serotonin bzw. ^3H -Cholin vorinkubierten Gewebeschnitten..... | 26 |
| Tab. 8: Versuchsanordnung der Impromidin-/ Ranitidin-Versuche..... | 33 |
| Tab. 9: Versuchsanordnung der Versuche mit UR-BIT106..... | 36 |
| Tab. 10: Versuchsanordnung der Versuche mit NK-22, Impromidin sowie Ranitidin .. | 38 |
| Tab. 11: Wirkung von globalem und konditionalem CB_1 -Rezeptor-Knockout auf die Transmitterfreisetzung..... | 50 |

7. Literaturverzeichnis

Albayram O, Alferink J, Pitsch J, Piyanova A, Neitzert K, Poppensieker K, Mauer D, Michel K, Legler A, Becker A, Monory K, Lutz B, Zimmer A, Bilkei-Gorzo A. Role of CB₁ cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 11256-11261

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302: 832-837

Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 1959; 14: 48-58

Birnkammer T, Spickenreither A, Brunskole I, Lopuch M, Kagermeier N, Bernhardt G, Dove S, Seifert R, Elz S, Buschauer A. The bivalent ligand approach leads to highly potent and selective acylguanidine-type histamine H₂ receptor agonists. *J Med Chem* 2012; 55: 1147-1160

Chase J. The evolution of retinal vascularization in mammals. A comparison of vascular and avascular retinae. *Ophthalmology* 1982; 89: 1518-1525

Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G, Chazot PL. The histamine H₄ receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 55-63

Coruzzi G, Pozzoli C, Poli E, Coppelli G, Bertaccini G. Effects of histamine H₂ receptor agonists and antagonists on the isolated guinea pig gallbladder. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; 13: 84-90

Desmadryl G, Gaboyard-Niay S, Brugeaud A, Travo C, Broussy A, Saleur A, Dyhrfeld-Johnsen J, Wersinger E, Chabbert C. Histamine H₄ receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 905-916

Feliszek M, Schacht D, Schulte K, Jergas B, von Lehe M, Schlicker E. Do histamine H₂ and H₄ receptors affect noradrenaline release in the human cerebral cortex? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385 (Suppl 1): 25

Feliszek M, Speckmann V, Schacht D, von Lehe M, Stark H, Schlicker E. A search for functional histamine H₄ receptors in the human, guinea pig and mouse brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2015; 388: 11-17

Fink K, Göthert M, Molderings G, Schlicker E. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated stimulation of noradrenaline release, but not release of other neurotransmitters, in the rat brain cortex: receptor location, characterization and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 339: 514-521

Flau K, Redmer A, Liedtke S, Kathmann M, Schlicker E. Inhibition of striatal and retinal dopamine release via nociceptin/orphanin FQ receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 1355-1361

Giraldo J. How inverse can a neutral antagonist be? Strategic questions after the rimonabant issue. *Drug Discov Today* 2010; 15: 411-415

Hofmann F. Wirkungen von Pharmaka auf den Organismus: allgemeine Pharmakodynamik. *Pharmakologie*. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* München: Urban und Fischer, 2009: 5-25

Judel S. Opioidrezeptor-vermittelte Hemmung der Monoaminfreisetzung in der Meerschweinchenretina und im Nagerkortex. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2013

Kathmann M, Weber B, Schlicker E. Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001a; 363: 50-56

Kathmann M, Weber B, Zimmer A, Schlicker E. Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB₁ receptor-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2001b; 132: 1169-1173

Koulu M, Movafagh S, Tuohimaa J, Jaakkola U, Kallio J, Pesonen U, Geng Y, Karvonen MK, Vainio-Jylha E, Pollonen M, Kaipio-Salmi K, Seppala H, Lee EW, Higgins RD, Zukowska Z. Neuropeptide Y and Y₂-receptor are involved in development of diabetic retinopathy and retinal neovascularization. *Ann Med* 2004; 36: 232-240

Langer SZ. Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int* 2008; 52: 26-30

Li L, Dowling JE. Effects of dopamine depletion on visual sensitivity of zebrafish. *J Neurosci* 2000; 20: 1893-1903

Lim HD, van Rijn RM, Ling P, Bakker RA, Thurmond RL, Leurs R. Evaluation of histamine H₁-, H₂-, and H₃-receptor ligands at the human histamine H₄ receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H₄ receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1310-1321

Lim HD, de Graaf C, Jiang W, Sadek P, McGovern PM, Istyastono EP, Bakker RA, de Esch IJ, Thurmond RL, Leurs R. Molecular determinants of ligand binding to H₄R species variants. *Mol Pharmacol* 2010; 77: 734-743

Liu WL. Histamine H₄ receptor antagonists for the treatment of inflammatory disorders. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1222-1225

Marsicano G, Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB₁ in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4213-4225

Marson CM. Targeting the histamine H₄ receptor. *Chem Rev* 2011; 111: 7121-7156

Masson G, Mestre D, Blin O. Dopaminergic modulation of visual sensitivity in man. *Fundam Clin Pharmacol* 1993; 7: 449-463

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309: 261-263

Mora-Ferrer C, Gangluff V. D₂-dopamine receptor blockade impairs motion detection in goldfish. *Vis Neurosci* 2000; 17: 177-186

Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 361: 19-24

Nowak JZ. The isolated retina as a model of the CNS in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 80-82

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462-465

Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005a; 168: 1-51

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sci* 2005b; 76: 1307-1324

Potter EK, Barden JA, McCloskey MJ, Selbie LA, Tseng A, Herzog H, Shine J. A novel neuropeptide Y analog, N-acetyl [Leu²⁸,Leu³¹]neuropeptide Y-(24-36), with functional specificity for the presynaptic (Y₂) receptor. *Eur J Pharmacol* 1994; 267: 253-262

Robson P. Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 719-756

Romero AI, Thorén FB, Aurelius J, Askarieh G, Brune M, Hellstrand K. Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in AML. *Scand J Immunol* 2009; 70: 194-205

Sander K, Stark H. Neue Generationen von Antihistaminika. *Pharm Ztg* 2011; 156: 20-27

Schaeffel F, Bartmann M, Hagel G, Zrenner E. Studies on the role of the retinal dopamine/melatonin system in experimental refractive errors in chickens. *Vision Res* 1995; 35:1247-1264

Schlicker E, Göthert M. Interactions between the presynaptic α_2 -autoreceptor and presynaptic inhibitory heteroreceptors on noradrenergic neurones. *Brain Res Bull* 1998; 47: 129-132

Schlicker E, Göthert M. Pharmakologie des Histamins. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* München: Urban und Fischer, 2009: 223-230

Schlicker E, Kathmann M. Modulation of in vitro neurotransmission in the CNS and in the retina via H_3 heteroreceptors. In: Leurs R, Timmerman H, (Hrsg.) *The Histamine H_3 Receptor* Amsterdam: Elsevier, 1998: 13-26

Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 565-572

Schlicker E, Kathmann M. Presynaptic neuropeptide receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 184: 409-434

Schlicker E, Betz R, Göthert M. Histamine H_3 receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; 337: 588-590

Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, Göthert M. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H_3 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 340: 633-638

Schlicker E, Timm J, Göthert M. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 354: 791-795

Schlicker E, Timm J, Zentner J, Göthert M. Cannabinoid CB_1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 583-589

Schneider EH, Neumann D, Seifert R. Histamine H_4 -receptor expression in the brain? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2015; 388: 5-9

Shayo C, Fernandez N, Legnazzi BL, Monczor F, Mladovan A, Baldi A, Davio C. Histamine H₂ receptor desensitization: involvement of a select array of G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1049-1056

Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77: 1-124

Starke K, Göthert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 1989; 69: 864-989

Szabo B, Schlicker E. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 327-365

Timm J, Marr I, Werthwein S, Elz S, Schunack W, Schlicker E. H₂ receptor-mediated facilitation and H₃ receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea-pig brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 357: 232-239

Weber B, Schlicker E. Modulation of dopamine release in the guinea-pig retina by G_i- but not by G_s- or G_q-protein-coupled receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 393-400

Weiser T, Wieland HA, Doods HN. Effects of the neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist BIIIE0246 on presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 2000; 404: 133-136

Westfall TC. Prejunctional effects of neuropeptide Y and its role as a cotransmitter. *Handb Exp Pharmacol* 2004; 162: 137-183

8. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Eberhard Schlicker für die Überlassung des Themas und die stets zugewandte, motivierende und fachkundige Betreuung.

Meinen Kolleginnen aus dem Labor, Frau Doris Petri und Frau Monika Feliszek, möchte ich für die angenehme und bereichernde Zusammenarbeit danken. Frau Doris Petri danke ich darüber hinaus für die Einarbeitung in labortechnische Verfahren.

Einige Versuche zum Histamin H₂-Rezeptor wurden von Herrn Bernd Jergas durchgeführt, dem ich für die Bereitstellung der Daten danke.

Prof. Beat Lutz von der Universität Mainz danke ich für die Überlassung der konditionalen CB₁-Rezeptor-Knockout-Mäuse und der entsprechenden Wildtypiere (C57BL/6N) im Rahmen der DFG-Forschergruppe 926 (Physiology and Pathophysiology of the Endocannabinoid System).

Weiterhin danke ich Prof. Armin Buschauer von der Universität Regensburg für die Bereitstellung der H₂-Rezeptor-Agonisten.

Herrn Mazyar Matin danke ich für computertechnische Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich bei der BONFOR-Forschungskommission für die finanzielle Unterstützung sowie die ideelle Weiterbildung im Rahmen des SciMed Promotionskollegs bedanken.