

**Untersuchungen zur differentiellen Genexpression
im ZNS von
Noradrenalintransporter-Knockout- und Wildtyp-Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Ralf Gilsbach
aus Hemer

Bonn 2005

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Zeit von November 2001 bis September 2005 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. Bönisch angefertigt. Sie ist auf der Homepage der Universitäts- und Landesbibliothek Bonn (http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erstgutachter (Betreuer): Prof. Dr. rer. nat. H. Bönisch

Zweitgutachter : Prof. Dr. med. K. Mohr

Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. rer. nat U. Jaehde

Fachangrenzendes Mitglied: Prof. Dr. med. V. Gieselmann

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 23.2.2006

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
A. Einleitung.....	1
1. Monoaminerge Neurotransmission.....	1
1.1 Noradrenerges System	2
1.1.1 Der Noradrenalintransporter	6
1.2 Dopaminerges System	7
2. Depression und Antidepressiva	10
3. Noradrenalintransporter-Knockout-Mäuse.....	12
4. Genexpressionsanalyse.....	14
5. Zielsetzung der Arbeit	15
B. Versuchstiere, Material und Methoden	17
1. Materialien	17
1.1 Arbeitsgeräte	17
1.2 Verbrauchsmaterial	18
1.3 Computersoftware und Datenbanken.....	19
1.4 Kits für die Molekularbiologie	19
1.5 Enzyme	20
1.6 Größenmarker, Vektoren und Nukleinsäuren.....	20
1.7 Chemikalien	20
1.8 Radiochemikalien und Standards.....	22
1.9 Strukturformeln der Liganden.....	23
1.10 Nährmedien für die Bakterienkultur	24
1.11 Puffer und Lösungen	24
2. Haltung und Präparation der Versuchstiere	26
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Transkardiale Perfusion	26
2.3 Präparation der Hirnareale	26
2.4 Anfertigung von Kryoschnitten	27

3. Molekularbiologische Methoden.....	27
3.1 DNA Extraktion aus Blut zur Genotypisierung	27
3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	27
3.3 Plasmid Mini-Präparation	27
3.4 RNA-Extraktion.....	28
3.4.1 Isolierung von RNA aus peripheren Geweben	28
3.4.2 Isolierung von RNA aus ZNS-Proben	28
3.4.2.1 Isolierung von RNA aus Hirnarealen	29
3.4.2.2 Isolierung von RNA aus Gesamthirnen	29
3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.6 Fällung von Nukleinsäuren	30
3.7 In vitro Transkription	31
3.8 Reverse Transkription	31
3.9 PCR.....	31
3.10 Quantitative PCR.....	32
3.10.1 Prinzip der quantitativen real-time PCR	32
3.10.2 PCR-Effizienz.....	34
3.10.3 Relative Quantifizierung	34
3.10.4 Detektion.....	35
3.10.5 Schmelzkurvenanalytik	37
3.10.6 Standardreaktionsbedingungen	37
3.10.7 Datenanalyse	38
3.11 Qualitative PCR	40
3.12 Auswahl der PCR-Primer	41
3.13 Microarray	43
3.13.1 Prinzip	43
3.13.2 Versuchsdurchführung.....	44
3.13.2.1 Reverse Transkription unter Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe.....	44
3.13.2.2 Hybridisierung und Waschen der Arrays	45
3.13.3 Scannen und Datenanalyse	46
3.14 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.15 Klonierung von PCR-Produkten	48
3.16 Bakterien-Dauerkulturen.....	48

3.17 Restriktionsverdau von DNA	48
3.18 DNA-Sequenzierung	49
4. Biochemische Methoden.....	50
4.1 Radioligandbindung an Membransuspensionen	50
4.1.1 Membranpräparation	50
4.1.2 Proteinbestimmung	50
4.1.3 Sättigungsexperiment	50
4.2 Autoradiografie	51
4.3 HPLC-Bestimmung von Catecholaminen	52
5. Verhaltenspharmakologische Methoden	54
5.1 Clonidin-induzierte Sedation	54
6. Statistische Auswertung	55
C. Ergebnisse.....	56
1. Charakterisierung der Versuchstiere	56
1.1 Genotypisierung der Versuchstiere	56
1.2 Körpergewicht und Probengewichte der Versuchstiere.....	58
2. Ergebnisse der molekularbiologischen Versuche	58
2.1 Optimierung der RNA-Extraktion	58
2.2 Synthese der cRNA.....	60
2.3 Genexpressionsanalyse mit qPCR.....	61
2.3.1 Charakterisierung und Optimierung der Methode	61
2.3.1.1 Effizienz und Spezifität der qPCR	61
2.3.1.2 Optimierung des Reaktionsvolumens.....	65
2.3.1.3 Charakterisierung der reversen Transkription	67
2.3.1.4 Normalisierung der Expressionsdaten	70
2.3.1.5 Normalverteilung der relativen Expressionsdaten	72
2.3.2 Vergleich der Expressionsstärke der Zielgene im Gehirn	73
2.3.3 Durch den Knockout des Noradrenalintransporters induzierte Regulation der Zielgene	75
2.4 Genexpressionsanalyse mit der Microarray-Technologie.....	81
2.4.1 Analyse der Daten	82

2.4.2 Validität und Präzision der Methode	85
2.4.3 Differenziell exprimierte Gene.....	86
2.5 Klonierung des murinen VMAT2.....	91
2.5.1 Klonierung der kodierenden Sequenz des mVMAT2	91
2.5.2 Vergleich der ermittelten mVMAT2 Aminosäuresequenz mit publizierten Daten anderer Spezies	92
3. Ergebnisse der biochemischen Versuche	94
3.1 Noradrenalintransporter-Knockout-induzierte Änderung der Expression von $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren	94
3.1.1 Sättigung der [3 H]RX821002-Bindung an Homogenaten des Gesamthirns.....	94
3.1.2 [3 H]RX821002-Autoradiographie an koronaren Hirnschnitten	96
3.2 Vergleich der Catecholaminspiegel von NAT $^{-/-}$ - und NAT $^{+/+}$ -Mäusen	99
4. Verhaltenspharmakologische Ergebnisse	101
4.1 Einfluss des Noradrenalintransporter-Knockouts auf die Clonidin- induzierte Hypoaktivität	101
D. Diskussion.....	103
1. Noradrenalin-Homöostase in NAT$^{-/-}$-Mäusen	104
2. Änderung der Genexpression der Adrenozeptoren.....	108
2.1 Regulation von α_1 -Adrenozeptoren	108
2.2 Regulation und Expression von α_2 -Adrenozeptoren.....	109
2.2.1 Expression der α_2 -Subtypen im Gesamthirn von Mäusen.....	109
2.2.2 Noradrenalintransporter-Knockout-induzierte Regulation der mRNA und des Rezeptorproteins von α_2 -Adrenozeptoren.....	110
2.3 Regulation und Expression von β -Adrenozeptoren	114
3. Regulation des dopaminergen Systems	115
4. Genexpressionsanalyse mit Microarrays	117
4.1 Regulation der RNA-Expression von ribosomalen Proteinen	118
4.2 Regulation der RNA-Expression von Proteinen der Atmungskette.....	118
E. Zusammenfassung	120

F. Anhang	123
1. Partielle genomische Sequenz des Noradrenalintransportergens von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren	123
2. cDNA-Sequenz des murinen VMAT2.....	126
3. mRNA-Expressionsprofile der Zielgene	127
4. Der qCalculator	132
4.1 Die Befehlsleiste	133
4.2 Das „Setup“-Arbeitsblatt	134
4.3 Die „Data“-Arbeitsblätter.....	136
4.4 Das „Efficiency“-Arbeitsblatt	138
4.5 Das „Internal Standard“-Arbeitsblatt	140
4.6 Das „Result“- und das „Diagram“-Arbeitsblatt	142
4.7 Die „IS“-Arbeitsblätter	144
G. Literaturverzeichnis.....	145
1. Referenzen	145
2. Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit:.....	156
2.1 Originalarbeiten:.....	156
2.2 Vortrag:	157
2.3 Poster:.....	157
2.4 Im Rahmen dieser Arbeit in der GenBank-Datenbank (NCBI) abgelegte Nukleinsäuresequenzen:	158

Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt werden international gebräuchliche Einheiten, wie die SI-Einheiten, und die von diesen Einheiten abgeleiteten Maßeinheiten und Potenzen.

A

%	Gewichtsprozent pro Volumen (g / 100 ml)
A	Adenin oder Ampere
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Adrenozeptor oder Aldehydreduktase
AS	Aminosäure

B

B _{max}	Anzahl der spezifischen Bindungsstellen
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bulbus olf.	Bulbus olfactorius

C

C	Cytosin
cDNA	<i>copy DNA</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Ct	<i>threshold cycle</i>

D

DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase

Abkürzungsverzeichnis

DDC	Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
DHPG	Dihydroxyphenylglykol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dGTP, dATP, dTTP oder dCTP)
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
dpm	Zerfälle pro Minute

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N',N'-tetraacetat, Na-Salz
EtOH	Ethanol (absolut)

G

G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein

H

HPRT 1	Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyl-Transferase
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

I

i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

K

kb	Kilobasenpaar
K_D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
K_m	Michaelis-Konstante
KO	Knockout

L

lacZ	Gen für die β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani

M

MAO	Monoaminoxidase
MHPG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA

N

NA	Noradrenalin
NaAc	Natriumacetat
NAT	Noradrenalin-Transporter
NAT ^{-/-} -Maus	Noradrenalintransporter-Knockout-Maus
NAT ^{+/+} -Maus	Wildtyp-Maus
NSRI	selektiver Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor

O

OCT	organischer Kationentransporter
-----	---------------------------------

P

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>

R

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase

S

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SERT	Serotonin-Transporter
SSC	<i>Standard Saline Citrat</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSNRI	selektiver Serotonin-/Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor
SSRI	selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor

T

T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TH	Tyrosinhydroxylase
T _m	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(Hydrxymethyl)-1,3-propandiol

Abkürzungsverzeichnis

U

U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett

V

VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>
VMAT	vesikulärer Monoamin-Transporter

X

X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
XIA	X-gal, IPTG, Ampicillin

Z

ZNS	Zentralnervensystem
-----	---------------------

A. Einleitung

1. Monoaminerge Neurotransmission

Das Nervensystem dient der schnellen Übertragung von Informationen. In den einzelnen Neuronen erfolgt die Reizleitung durch fortgeleitete Aktionspotentiale elektrisch. Die Reizweiterleitung zu nachfolgenden Neuronen oder Erfolgsorganen erfolgt an speziellen Kontaktzonen, den Synapsen. In Abbildung 1 wird exemplarisch eine noradrenerge Synapse veranschaulicht. Als Botenstoffe agieren chemische Verbindungen, die als Neurotransmitter bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe gehören die Monoamine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Ihre Freisetzung erfolgt durch das Verschmelzen von Speichervesikeln mit der Plasmamembran der entsprechenden Neurone. Auslösendes Moment für diesen als Exozytose bezeichneten Vorgang ist ein Aktionspotential, das zur Depolarisation und nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom führt. Die in den synaptischen Spalt gelangten Neurotransmitter interagieren mit post- und präsynaptischen Rezeptoren. Hierbei dient die Erregung postsynaptischer Rezeptoren der Auslösung von entsprechenden Signalkaskaden im Erfolgsorgan bzw. nachgeschalteten Neuron und somit der Reizweiterleitung. Die Erregung präsynaptischer Rezeptoren vermag hingegen die Freisetzung weiterer Neurotransmitter im Sinne einer negativen oder positiven Rückkopplung zu modulieren. Um eine permanente Besetzung der Rezeptoren zu verhindern und auf diese Weise die Weiterleitung nachfolgender Aktionspotentiale zu ermöglichen, müssen die freigesetzten Neurotransmitter schnell und effizient aus dem Spalt entfernt werden. Hierdurch wird zusätzlich die Diffusion aus dem synaptischen Spalt in das umgebende Gewebe limitiert. Diese Aufgabe übernehmen in erster Linie membranständige Transporter. An den Synapsen der dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Neurone werden entsprechend Dopamin-, Noradrenalin- bzw. Serotonintransporter (DAT, NAT bzw. SERT) exprimiert. Diese führen die Monoamine dem Zytoplasma der postsynaptischen Neurone zu. Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) sind für den anschließenden Transport aus dem Zytoplasma in die Speichervesikel verantwortlich. Von diesem Transporter existieren zwei unterschiedliche Subtypen. Der VMAT1 wird in der Peripherie und der VMAT2 überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (Peter et al.

1995). Nur ein geringer Teil der rückaufgenommenen Monoamine wird von der Monoaminoxidase (MAO) inaktiviert. Die Monoamine unterliegen somit zum größten Teil einem Kreislauf, sie werden sozusagen „recycelt“. Dieser Sachverhalt unterstreicht die physiologische Bedeutung der Neurotransmittertransporter für die Monoaminhomöostase. Eine veränderte Funktion dieser Transporter hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Konzentration bzw. die Verweildauer der Neurotransmitter im synaptischen Spalt. Da sich die vorliegende Arbeit insbesondere mit dem noradrenergen und dopaminergen System befasst, werden diese in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert.

1.1 Noradrenerges System

Noradrenalin ist ein wichtiger chemischer Botenstoff, der eine Vielzahl physiologischer Funktionen vermittelt. Als postganglionärer Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems ist Noradrenalin in der Peripherie direkt in die Funktion und Steuerung des kardiovaskulären Systems und die Aktivität vieler Gewebe und Organe eingebunden. Im ZNS werden insbesondere im Hirnstamm noradrenerge Neuronen in hoher Dichte exprimiert. Von hieraus innervieren die Nervenendigungen nahezu das gesamte ZNS. Dies erklärt die globale Bedeutung von Noradrenalin für die Funktion des ZNS. Das noradrenerge System beeinflusst neben der zentralen Steuerung des endokrinen Systems und des autonomen Nervensystems direkt die Gemütsverfassung. Hier sei insbesondere das Schlaf-Wachverhalten, die Erregbarkeit, Aggressivität und die allgemeine Stimmungslage erwähnt. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass Störungen der Noradrenalinhomöostase weitreichende Auswirkungen auf physiologische Vorgänge und das Verhalten haben.

Die Biosynthese von Noradrenalin erfolgt im Zytosol der noradrenergen Neuronen (vgl. Abbildung 1 und Abbildung 2). Der initiale Syntheseschritt ist die Hydroxylierung von Tyrosin zu L-Dopa (L-Dihydroxyphenylalanin) durch die Tyrosinhydroxylase (TH). Die Aktivität dieses Enzyms ist zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt der Biosynthese (Übersichtsartikel: Dunkley et al. 2004). Anschließend wird L-Dopa von der ubiquitären, aromatischen L-Aminosäure-Decarboxylase (DDC) zum Dopamin decarboxyliert. Das Dopamin wird von VMATs in die Speichervesikel transportiert und abschließend von der Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) zu Noradrenalin umgesetzt.

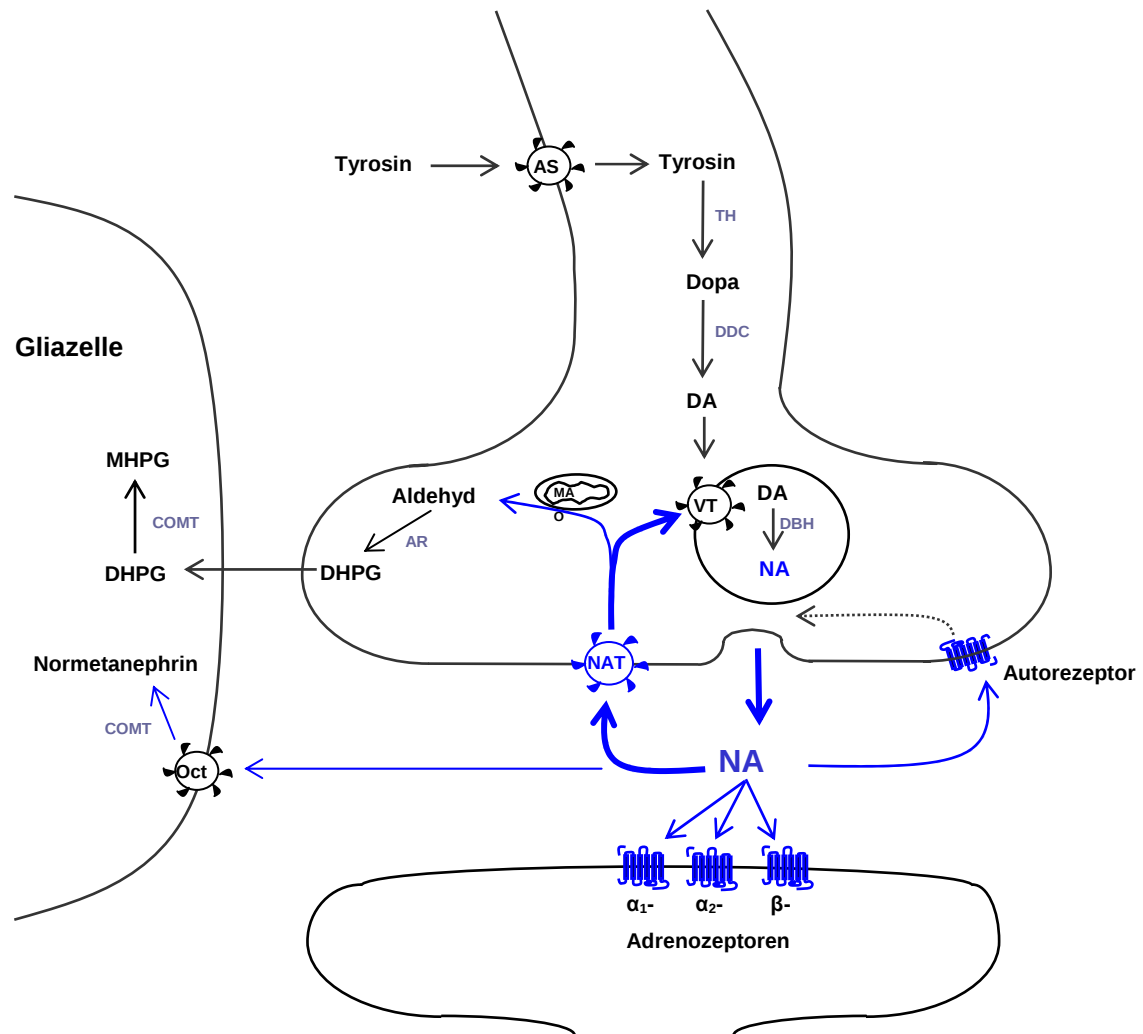


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer noradrenergen Synapse

Besprechung im Text. Abkürzungen:

Substanzen: DA, Dopamin; DHPG, Dihydroxyphenylglykol; MHPG, Methoxyhydroxyphenylglykol; NA, Noradrenalin;

Enzyme: AR, Aldehydreduktase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DBH, Dopamin-β-Hydroxylase; DDC, aromatische Aminosäuredecarboxylase; MAO, Monoaminoxidase; TH, Tyrosinhydroxylase

Transporter: AS, Aminosäure-Transporter; NAT, Noradrenalintransporter; Oct, Organischer-Kationentransporter 3; VT, vesikulärer Monoamintransporter (VMAT)

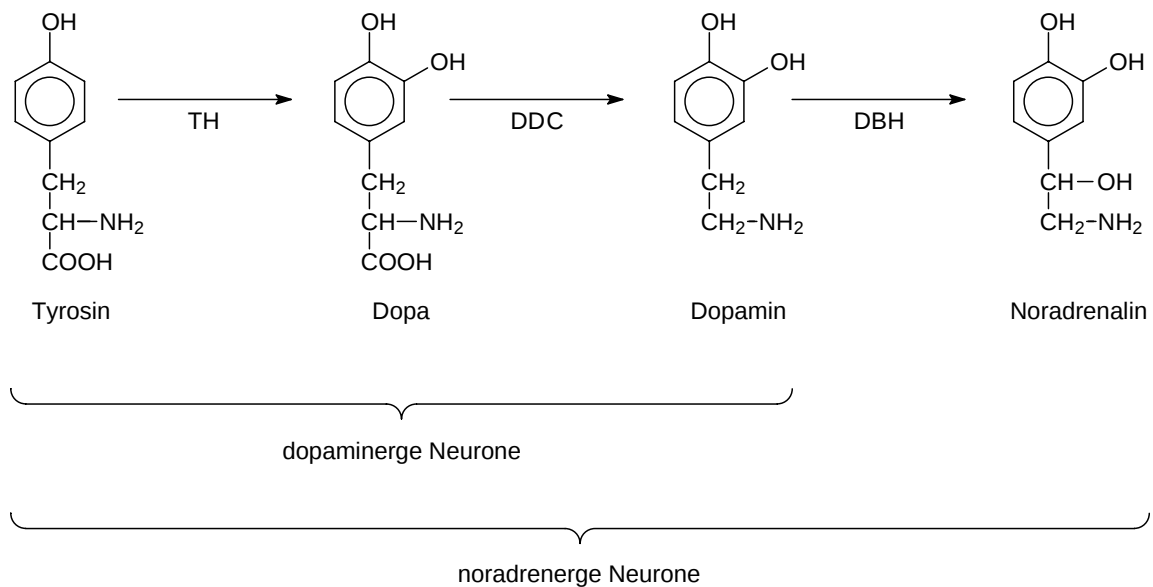


Abbildung 2: Synthese von Dopamin und Noradrenalin

Aufgrund der unterschiedlichen Enzymausstattung erfolgt in dopaminergen Neuronen die Synthese bis zum Dopamin und in noradrenergen bis zum Noradrenalin.

Abkürzungen: TH, Tyrosinhydroxylase; DDC, aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase, DBH; Dopamin-β-Hydroxylase

Aus Speichervesikeln in den synaptischen Spalt freigesetztes Noradrenalin vermittelt seine Wirkung über postsynaptische, adrenerge α - und β -Rezeptoren (Adrenozeptoren). Diese Rezeptoren unterteilen sich weiter in α_1 -, α_2 - und $\beta_{1,2,3}$ -Adrenozeptoren. Die in die Subtypen A, B und D untergliederten α_1 -Adrenozeptoren koppeln an G-Proteine vom G_q -Typ, während die α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -Adrenozeptoren an solche vom G_i -Typ koppeln. Die β_1 -Adrenozeptoren nutzen zur Signaltransduktion G_s -Proteine. Die β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren vermitteln ihre Wirkung auf die verschiedenen Signalkaskaden über G_s - oder auch G_i -Proteine. Im Gegensatz zu den anderen Adrenozeptoren ist die physiologische Bedeutung des β_3 -Adrenozeptors nicht genau bekannt. Da er vornehmlich auf Fettzellen exprimiert wird, scheint er in die Lipolyse involviert zu sein. Der β_2 -Adrenozeptor ist für die noradrenerge Signaltransduktion nur von nachrangiger Bedeutung, da Noradrenalin nur eine vergleichsweise geringe Affinität zu diesem Rezeptor aufweist.

Außerdem werden auch präsynaptische Rezeptoren erregt. In erster Linie sind hier inhibitorische α_{2A} - und α_{2C} -Autorezeptoren zu nennen, welche die Freisetzung im Sinne einer negativen Rückkopplung modulieren. Es sei angemerkt, dass diese physiologisch auch als sogenannte Heterorezeptoren die Exozytose von z. B. Dopamin (Bücheler et al. 2002) oder Serotonin (Scheibner et al. 2001) aus den entsprechenden Neuronen regulieren (Übersichtsartikel: Engelhardt und Hein 2004).

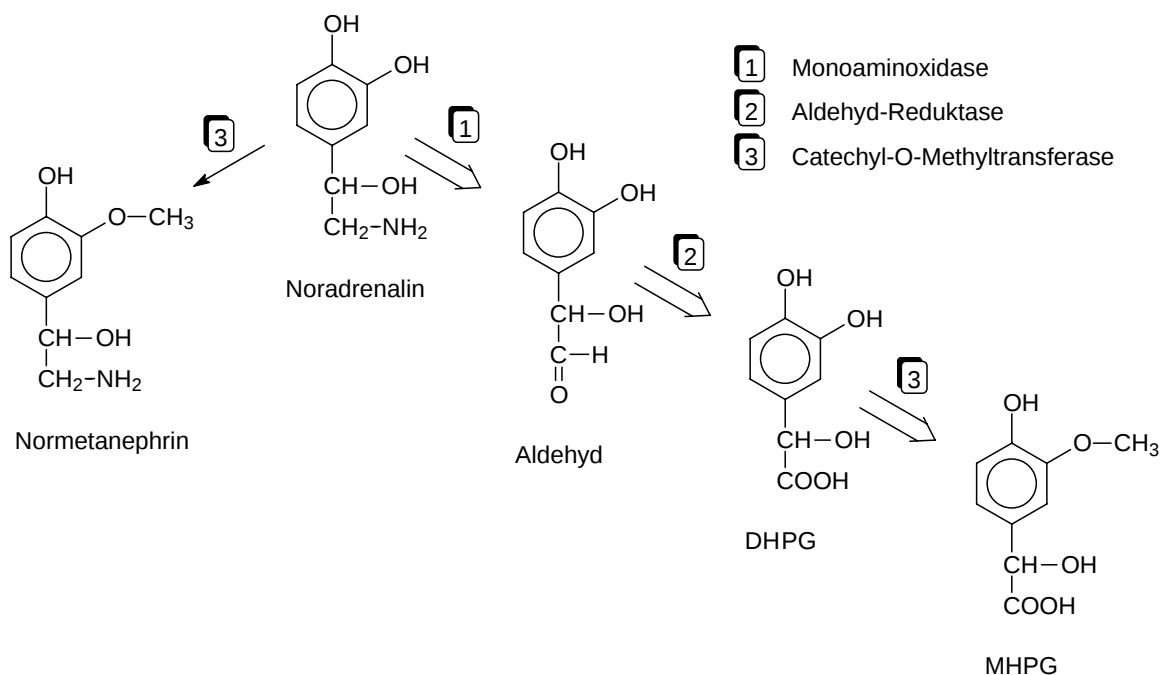


Abbildung 3: Synaptische Hauptabbauwege von Noradrenalin

Der Hauptteil des Noradrenalins wird durch die MAO intraneuronal zum Aldehyd desaminiert. Anschließend wird es zu Dihydroxyphenylglykol (DHPG) reduziert. In Gliazellen setzt die COMT DHPG zu Methoxyhydroxyphenylglykol (MHPG) um. Extraneuronal aufgenommenes Noradrenalin wird in Gliazellen von der COMT zu Normetanephrin methyliert (nach Aktories et al. 2004, Lehrbuch).

Für die schnelle Rückaufnahme des Noradrenalins in die Präsynapse ist der membranständige Noradrenalintransporter (NAT) zuständig (vgl. A.1.1.1). Er transportiert das Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt zurück ins noradrenerge Neuron. Hier wird es nur zu einem sehr geringen Teil durch die Monoaminoxidase (MAO) und die Aldehyd-Reduktase zu Dihydroxyphenylglykol (DHPG) abgebaut. In Gliazellen wird das DHPG durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zum Hauptmetaboliten Methoxyhydroxyphenylglykol

(MHPG) umgesetzt (Übersichtsartikel: Leonard 1997; Eisenhofer 2001). Dass nur ein geringer Anteil (ca. 10 %) des Noradrenalins diesem Abbauweg unterliegt, beruht auf der im Vergleich zur MAO höheren Affinität des Noradrenalins zum vesikulären Monoamin Transporter (VMAT). Die hohe Effizienz des Noradrenalintransporters (siehe A.1.1.1) gewährleistet zudem, dass nur ein geringer Anteil des freigesetzten Noradrenalins aus dem synaptischen Spalt abdiffundiert. Diese Fraktion wird zumeist durch unspezifische organische Kationentransporter wie dem OCT3 in Gliazellen aufgenommen (Übersichtsartikel: Eisenhofer 2001) und überwiegend durch COMT zu Normetanephrin umgesetzt. Die Kombination aus der hohen Effizienz des Noradrenalintransporters und der vesikulären Monoamintransporter führt dazu, dass mehr als 80 % des Noradrenalins wieder den Speichervesikeln zugeführt und nur ein geringer Anteil metabolisiert wird (Übersichtsartikel: Eisenhofer 2001). Das Noradrenalin unterliegt somit in weiten Bereichen einem Kreislauf. Nur ein geringer Anteil entspringt aus der Neusynthese.

1.1.1 Der Noradrenalintransporter

Der Noradrenalintransporter gehört, wie z. B. auch der Dopamintransporter (DAT), zur Familie der membranständigen Na^+ - und Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter (Übersichtsartikel: Masson et al. 1999). Das humane hNAT-Gen ist auf dem Chromosom 16q12.2 kartiert (Brüss et al. 1993) und umfasst 14 Exons (Pörzgen et al. 1995; Fritz et al. 1998). Diese kodieren für das 617 Aminosäuren große, 69 kD Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen. Die Aminosäuresequenzen des Noradrenalintransporters verschiedener Spezies weisen eine hohe Homologie auf, so ist die Aminosäuresequenz des Menschen (Pacholczyk et al. 1991) zu 93 % mit der von Ratte (Brüss et al. 1997) und Rind (Lingen et al. 1994) und zu 94 % mit der Sequenz der Maus (Fritz et al. 1998) identisch.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich wird, ist der Noradrenalintransporter in der Plasmamembran lokalisiert und für die schnelle Rückaufnahme des Noradrenalins aus dem synaptischen Spalt zuständig. Neben Noradrenalin transportiert der Noradrenalintransporter jedoch auch die Catecholamine Adrenalin und Dopamin sowie diverse Amine (z. B. Tyramin, Amphetamin). Dieses Phänomen scheint physiologisch von Bedeutung zu sein, denn im Nucleus accumbens und insbesondere im präfrontalen Cortex ist der in die Clearance von Dopamin

involviert (Moron et al. 2002). Die geringe Substratspezifität kann aber auch pharmakologisch ausgenutzt werden. So verursachen die indirekten Sympathomimetika durch die Erhöhung der Noradrenalkonzentration im synaptischen Spalt (Trendelenburg et al. 1987; Bönisch und Brüss 1994) eine erhöhte sympathische Aktivität. Abhängig von der Lipophilie der Substanzen treten entweder periphere oder zentrale Effekte in den Vordergrund. Vornehmlich periphere Effekte auf das Herzkreislaufsystem verursacht z. B. Tyramin. Lipophile Substanzen wie Amphetamin oder im geringen Ausmaß auch Ephedrin haben zusätzlich eine zentrale, psychostimulierende Wirkkomponente. Ebenfalls zu dieser Gruppe zählt Cocain, das neben dem Noradrenalintransporter auch andere Neurotransmittertransporter, wie den Dopamintransporter, inhibiert.

Die Bedeutung des Noradrenalintransporters für die Herz- und Kreislauffunktion verdeutlicht auch die von einer natürlich vorkommenden, funktionell eingeschränkten (Paczkowski et al. 2002; Hahn et al. 2003) Variante (Ala457Pro) des humanen Transporters ausgelöste orthostatische Intoleranz (Shannon et al. 2000).

1.2 Dopaminerges System

Im zentralen Nervensystem sind vier Hauptnervenbahnen des dopaminergen Systems bekannt. Vom ventralen Tegmentum (VTA) ziehen die mesocorticalen Bahnen zum Cortex und die mesolimbischen in das limbische System. Diese Neurone sind wichtig für die Empfindung von Lust und Freude, weshalb man sie auch als „Belohnungsbahn“ bezeichnet. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie aber auch in das Suchtgeschehen involviert. Ein weiterer dopaminerges Nervenstrang innerviert vom Hypothalamus aus die Hypophyse und moduliert z. B. die Prolaktinsekretion. Eine pathophysiologisch bedeutende dopaminerge Nervenbahn reicht von der Substantia nigra zum Striatum, ihre Degeneration ist die Ursache der Parkinsonschen Krankheit (Übersichtsartikel: Dailly et al. 2004).

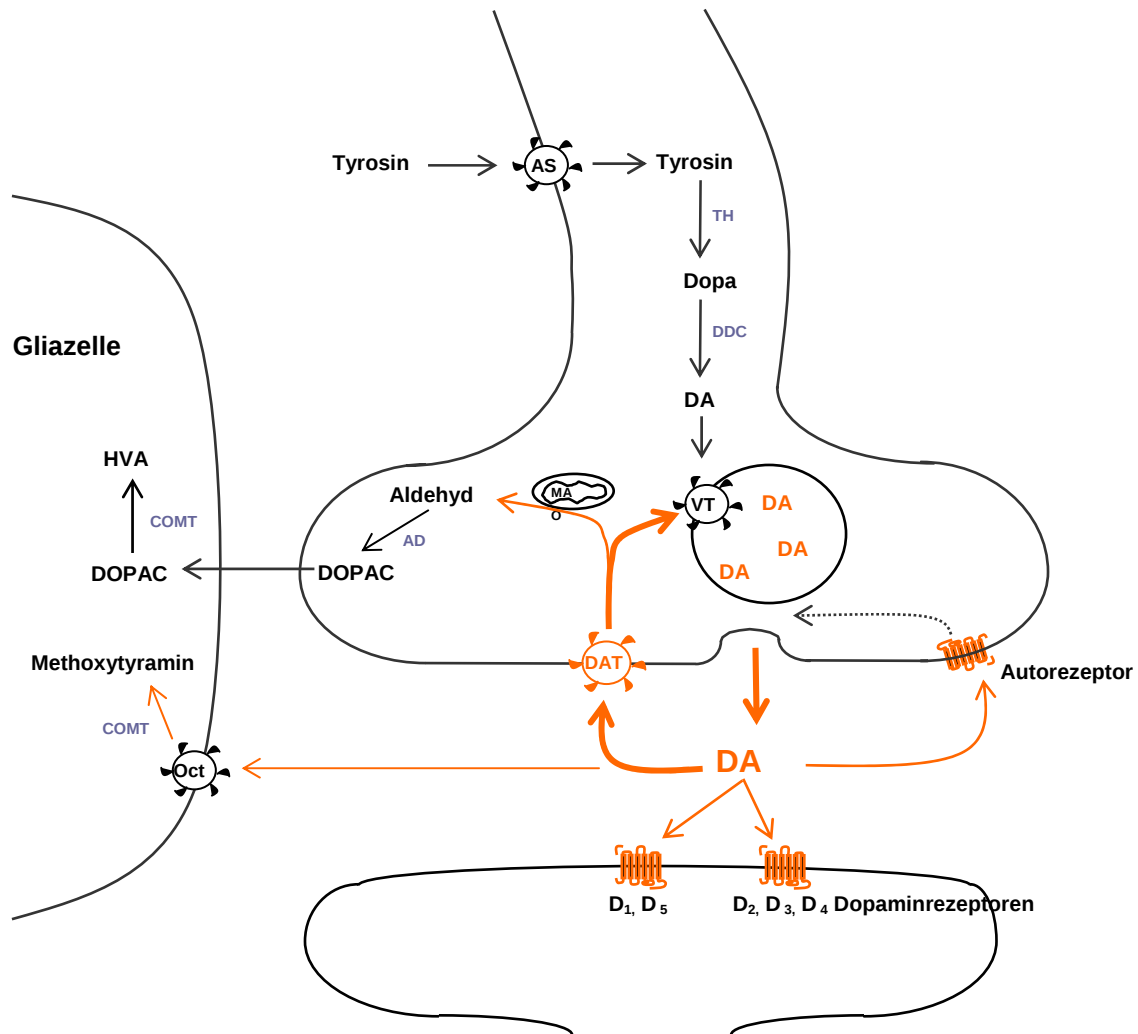


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer dopaminergen Synapse

Besprechung im Text. Abkürzungen:

Substanzen: DA, Dopamin; DOPAC, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure; HVA, Homovanillinsäure

Enzyme: AD, Aldehyddehydrogenase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DDC, aromatische Aminosäuredecarboxylase; MAO, Monoaminoxidase; TH, Tyrosinhydroxylase

Transporter: AS, Aminosäure-Transporter; DAT, Dopamintransporter; Oct, Organischer-Kationtransporter 3; VT, vesikulärer Monoamintransporter

Dopamin geht aus dem gleichen Syntheseweg wie Noradrenalin hervor und ist ein Zwischenprodukt der Noradrenalinsynthese (vgl. Abbildung 2). In den dopaminergen Neuronen (siehe Abbildung 4) erfolgt jedoch keine terminale Umsetzung des

Dopamins zu Noradrenalin, da keine Dopamin- β -Hydroxylase exprimiert wird (Übersichtsartikel: Weinshenker und Szot 2002).

Nach Freisetzung des Dopamins in den synaptischen Spalt werden Dopaminrezeptoren der D_1 - und der D_2 -Subfamilie erregt. Zur D_1 -Familie, die an G-Proteine vom G_s -Typ koppeln, gehören die postsynaptischen, D_1 und D_5 -Rezeptoren. Die $D_{2,3,4}$ -Rezeptoren der D_2 -Familie nutzen zur Signaltransduktion G_i -Proteine und werden nicht nur postsynaptisch sondern auch präsynaptisch exprimiert. An der Präsynapse agieren sie als inhibitorische Autorezeptoren.

Die D_1 - und D_2 -Rezeptoren sind die Dopaminrezeptoren mit der höchsten Dichte im ZNS. Die Subtypen $D_{3,4,5}$ kommen nur in sehr geringer Dichte und regional begrenzt vor (Übersichtsartikel: Dailly et al. 2004). Die Rückaufnahme des freigesetzten Dopamins erfolgt durch den Dopamintransporter, der, wie der Noradrenalintransporter, zur Familie der Na^+ - und Cl^- -abhängigen Neurotransmittertransporter gehört (Übersichtsartikel: Masson et al. 1999). Neben dem Noradrenalintransporter wurde auch der Dopamintransporter als Zielstruktur der Psychostimulantien Cocain (Ritz et al. 1987) und Amphetamin (Jones et al. 1998) bestätigt. Beide Substanzen haben in Mäusen mit genetischer Deletion des Dopamintransporters keinen weiteren Effekt auf die Dopaminfreisetzung und die Bewegungsaktivität (Giros et al. 1996). Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, wird das vom Noradrenalintransporter aufgenommene Dopamin von VMATs in die Vesikel transportiert und bis zur erneuten Freisetzung gespeichert. Der Anteil des nicht den Speichervesikeln zugeführten Dopamins wird von der MAO und der Aldehyddehydrogenase zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) abgebaut und nachträglich extraneuronal in Gliazellen durch die COMT zu Homovanillinsäure metabolisiert. Extraneuronal in Gliazellen aufgenommenes Dopamin wird hingegen in erster Linie von der Catechol-O-Methyltransferase zu 3-Methoxytyramin verstoffwechselt (siehe Abbildung 5).

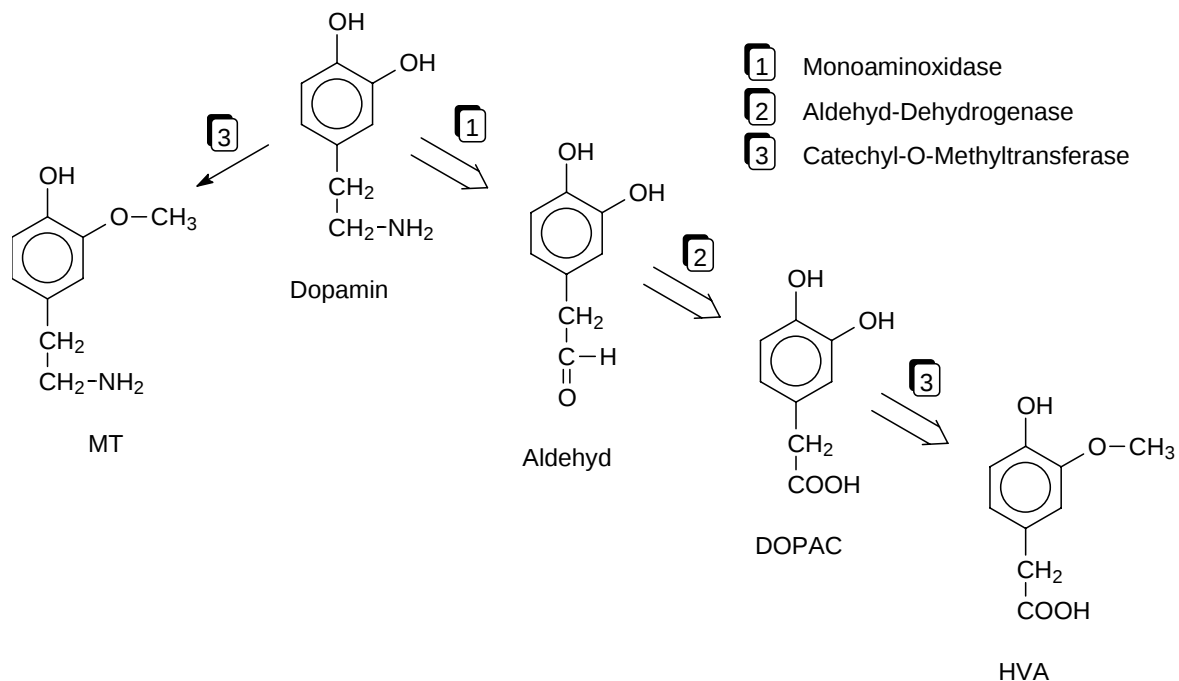


Abbildung 5: Synaptische Hauptabbauwege von Dopamin

Der Hauptteil des Dopamins wird durch die MAO intraneuronal zum Aldehyd desaminiert. Anschließend wird es zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) oxidiert. In Gliazellen setzt die COMT DOPAC zu Homovanillinsäure (HVA) um. Extraneuronal aufgenommenes Dopamin wird in Gliazellen von der COMT zu Methoxytyramin (MT) methyliert (nach Aktories et al. 2004, Lehrbuch).

2. Depression und Antidepressiva

Die Depression ist eine häufige, schwerwiegende und oft lebenslange Erkrankung. Bis zu 20 % der Erwachsenen erleiden in ihrem Leben zumindest zeitweise diese Erkrankung. In dieser Patientengruppe gehen bis zu 15 % der Todesfälle auf Selbstmorde zurück. Hinzu kommt, dass depressive Erkrankungen ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind (Musselman et al. 1998). So vermutet die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass sich depressive Erkrankungen zur zweithäufigsten Ursache für vorzeitige Todesfälle und vorzeitige Arbeitsunfähigkeit im Jahr 2020 entwickeln werden (Übersichtsartikel: Pacher und Kecskemeti 2004).

Die weitverbreitetste theoretische Erklärung für diese Erkrankung ist die Monoaminmangel-Hypothese. Sie basiert auf der klinischen Beobachtung, dass Substanzen, welche die extrazelluläre Monoamin-Konzentration senken, depressive Verstimmungen auslösen. Hierzu gehört z.B. Reserpin, das die

vesikulären Monoamin-Transporter hemmt und somit zur Verarmung der Speichervesikel an Neurotransmittern führt. Zu dieser Gruppe kann man aber auch die eigentlich psychostimulierenden Substanzen Amphetamin und Cocain zählen, da auf die initiale Steigerung der physischen und psychischen Leistungsfähigkeit nach einer gewissen Zeit depressive Verstimmungen und Erschöpfungszustände folgen. Die Ursache für diese Wirkungsumkehr ist, dass es aufgrund der initial stark erhöhten Freisetzung von Monoaminen zu einer Entleerung Plasmalemm-naher Speichervesikel kommt und konsekutiv nur geringe Mengen der Monoamine freigesetzt werden.

Auf der anderen Seite haben Substanzen, welche die Konzentration von Monoaminen im synaptischen Spalt chronisch erhöhen einen antidepressiven Effekt (Übersichtsartikel: Leonard 1997). Anfänglich stand Noradrenalin im Mittelpunkt dieser Theorie (Schildkraut 1965), da sich die Blockade des Noradrenalintransporters (z. B. durch Desipramin) als auch die Hemmung des Noradrenalinabbaus durch die Inhibierung der Monoaminoxidase (Tranlylcypromin) als antidepressiv wirksam erwies. Nachdem erkannt wurde, dass auch die Inhibierung des Serotonintransporters durch trizyklische Antidepressiva (Clopimipramin) oder durch selektive Hemmstoffe, wie z. B. Fluoxetin, klinisch und experimentell erfolgreich war, wurde Serotonin in die Hypothese integriert (Coppin 1967). Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung einer Reihe von Antidepressiva der zweiten Generation, die im Gegensatz zu den trizyklischen Verbindungen (z. B. Imipramin, Amitriptylin), selektiv den Serotonintransporter (selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren SSRI, z. B. Paroxetin, Citalopram), den Noradrenalintransporter (selektive Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren NSRI, Reboxetin) oder beide hemmen (selektive Serotonin-/Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren, SSNRI, Venlafaxin).

Die Monoamin-Mangel-Hypothese kann die antidepressive Wirkung all dieser Substanzen jedoch nicht restlos erklären. Widersprüchlich ist insbesondere das Fehlen einer zeitlichen Korrelation zwischen der nach wenigen Minuten eintretenden Wirkung der Antidepressiva auf die Monoaminhomöostase und der erst nach Wochen einsetzenden antidepressiven Wirkung. Nach allgemeiner Lehrmeinung lösen von der erhöhten Neurotransmission ausgelöste Adaptionsvorgänge den antidepressiven Effekt aus. Das Verständnis dieser Vorgänge würde unter anderem Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapieformen eröffnen.

Aus der Literatur ergeben sich zahlreiche Hinweise auf Alterationen der prä- und postsynaptischen adrenergen Rezeptoren nach der Blockade des Noradrenalintransporters. Durchgängig ist die Beobachtung, dass es nach Behandlung mit Reboxetin oder Desipramin zu einer Downregulation der β -Adrenozeptoren kommt. Inkonsistent sind hingegen die Angaben zur Regulation der verschiedenen α -Adrenozeptoren (Übersichtsartikel: Leonard 1997; Gould et al. 2003). Neuere Untersuchungen zeigen, dass zwischen dem noradrenergen, serotonergen und dopaminergen System Interaktionen bestehen (Übersichtsartikel: Blier 2001; Dailly et al. 2004).

Noradrenerge Neurone innervieren serotonerge Neurone und umgekehrt. Diese Innervationen erweisen sich als physiologisch relevant bei der Behandlung von Depressionen und Angstzuständen (Blier 2001). Noradrenerge Neurone innervieren aber auch dopaminerge Neurone im ventralen Tegmentum (Liprando et al. 2004). Zusätzlich bestehen zwischen diesen Systemen reziproke Interaktionen bedingt durch die Modulation der Dopaminfreisetzung durch α_2 -Heterozeptoren (Millan et al. 2000). Die Inhibierung des Noradrenalintransporters ruft neben erhöhten extrazellulären Noradrenalinspiegeln auch erhöhte Dopaminspiegel im präfrontalen Cortex (Valentini et al. 2004) hervor. Der wahrscheinliche Mechanismus hierfür ist die Blockade der physiologischen Dopaminaufnahme durch den Noradrenalintransporter in Regionen mit geringer Dopamintransporterexpression (Moron et al. 2002).

Die Identifizierung von Zielgenen, die essenziell für den antidepressiven Effekt sind, wird nicht nur durch die beschriebene Komplexität der involvierten Neurotransmittersysteme erschwert. Im Gegensatz zu anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson oder Alzheimer, denen pathophysiologische Veränderungen in definierten Hirnregionen zugrunde liegen, ist die Depression nicht einer bestimmten Hirnregion zuzuordnen. Vielmehr sind viele verschiedene Hirnregionen an der Symptomatik beteiligt (Nestler et al. 2002).

3. Noradrenalintransporter-Knockout-Mäuse

Trotz intensiver Forschungstätigkeit ist der genaue Mechanismus der antidepressiven Wirkung von Substanzen, wie z. B. Desipramin oder Reboxetin, die den Noradrenalintransporter inhibieren, nicht bekannt. Die in der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Caron generierten und erstmalig von Wang et al. (1999) publizierten

Noradrenalintransporter defizienten Mäuse (NAT^{-/-}-Mäuse) stellen ein vielversprechendes Tiermodell zur Untersuchung dieser Fragestellung dar. In diesen Tieren wurde das Gen des Noradrenalintransporters durch homologe Rekombination inaktiviert (Knockout bzw. KO).

In Noradrenalin-reichen Hirnregionen (präfrontaler Cortex, Hippocampus, Cerebellum) dieser Tiere führt der Verlust der Noradrenalin-Rückaufnahme zu einer Verarmung der intraneuronalen Speicherung (55 - 70 %). Dem gegenüber wurde repräsentativ im Cerebellum eine ca. 2-fach erhöhte Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt bestimmt (Xu et al. 2000). Dieser Effekt korreliert mit Befunden nach medikamentöser Inhibierung des Noradrenalintransporters. Nach chronischer Behandlung von Ratten mit Reboxetin ist die extrazelluläre Konzentration an Noradrenalin ca. 4-fach erhöht (Übersichtsartikel: Page 2003). Grund hierfür ist das Wegfallen des wichtigsten Inaktivierungswegs. Die Daten der NAT^{-/-}-Tiere stehen zusätzlich in Übereinstimmung mit denen von Serotonintransporter- und Dopamintransporter-Knockout-Mäusen (Übersichtsartikel: Gainetdinov et al. 2002). Infolge der erhöhten extrazellulären Noradrenalinspiegel kommt es im Hippocampus der NAT^{-/-}-Mäuse zu einer erniedrigten (ca. 30 %) Expression an α_1 -Adrenozeptoren (Xu et al. 2000).

Im Porsolt-Test (Porsolt 2000; Übersichtsartikel: Cryan et al. 2002) einem Verhaltenstest zur Bestimmung des antidepressiven Effekts, verhielten sich die NAT^{-/-}-Mäuse wie mit Antidepressiva behandelte Tiere (Drozdowska et al. 2005). In einem weiteren Verhaltensmodell, dem Tail-Suspension-Test (Übersichtsartikel: Cryan et al. 2002; Cryan et al. 2005) ergab sich das gleiche Bild. Interessanterweise lösten in diesem Test weder die NAT-Inhibitoren (z. B. Desipramin) noch SERT-Inhibitoren (z. B. Paroxetin) oder unselektive Monoamintransporter-Inhibitoren (z. B. Bupropion) weitere Effekte in den NAT^{-/-}-Tieren aus (Xu et al. 2000). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass diese Substanzen trotz ihrer unterschiedlichen Zielstrukturen einen gemeinsamen neuronalen Signalweg ansprechen (Xu et al. 2000).

Allgemein ist zu bedenken, dass die im Vergleich zu einer partiellen Inhibierung durch Antidepressiva, der Noradrenalintransporter in den NAT^{-/-}-Tieren schon in der Embryonalentwicklung vollständig ausgeschaltet wurde, was möglicherweise komplexe Adaptionsvorgänge auslöst.

Zusammengefasst kann man sagen, dass sich die NAT^{-/-}-Tiere wie Antidepressiva-behandelte Tiere verhalten und somit ein neuartiges Model zur Identifizierung des Wirkmechanismus der Antidepressiva darstellen.

4. Genexpressionsanalyse

Der technologische Fortschritt der letzten Jahrzehnte eröffnete zahlreiche Möglichkeiten Expressionsunterschiede auf Proteinebene, zu untersuchen. Allerdings erfordern die unterschiedlichen Zielstrukturen individuelle Nachweismethoden.

Die Transkription der genomischen DNA in mRNA ist der erste Schritt der Genexpression und Voraussetzung für die nachfolgende Protein-Biosynthese. Daher können Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene wichtige Hinweise auf eine Regulation auf Proteinebene geben und zum Verständnis des regulativen Prozesses beitragen. Diese Herangehensweise hat in den letzten Jahren, aufgrund der rasanten Entwicklung experimenteller Methoden, der Bioinformatik und der Verfügbarkeit der kodierenden Sequenzen von einer Vielzahl von Organismen, rasant an Bedeutung zugenommen. Im Gegensatz zu einer Quantifizierung der Proteine ermöglicht eine Quantifizierung auf mRNA-Ebene die Bestimmung verschiedenster Zielgene mit jeweils gleichen Methoden.

Zur Quantifizierung von Expressionsunterschieden bieten sich insbesondere die quantitative PCR (Holland et al. 1991) und die Microarray-Technologie (Schena et al. 1995) an.

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine sehr sensitive Messmethode mit einem großen dynamischen Messbereich. Sie ermöglicht die mRNA-Quantifizierung einzelner Zielgene in verschiedenen Gewebeproben im Hochdurchsatzverfahren (Übersichtsartikel: Freeman et al. 1999; Huggett et al. 2005).

Die Microarray-Technologie stellt ebenfalls ein Hochdurchsatzmessverfahren dar. Im Gegensatz zur qPCR erlaubt diese Methode die parallele Bestimmung des Expressionslevels von Tausenden von Genen in einem Experiment. Auf diese Art und Weise werden auch neue Zielgene erfasst, die möglicherweise krankheitsrelevant sind (Übersichtsartikel: Marcotte et al. 2001; Mirnics und Pevsner 2004).

5. Zielsetzung der Arbeit

Eine große Zahl der klinisch relevanten Antidepressiva vermitteln ihre Wirkung über die Inhibierung der Noradrenalinrückaufnahme (Übersichtsartikel: Bönisch und Brüss 1994). Wie bereits dargestellt, liegen der Wirkung dieser Substanzen vermutlich adaptive Änderungen der Genexpression bestimmter Gene zugrunde. Der Identifizierung dieser Zielgene kommt somit eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Wirkungsmechanismen von Antidepressiva und der Entwicklung neuer Therapieformen zu.

Die von der Arbeitsgruppe von Dr. Marc Caron generierten NAT^{-/-}-Mäuse zeigen die gleichen Verhaltensänderungen wie Wildtyp-Mäuse (NAT^{+/+}-Mäuse) nach Gabe von Antidepressiva (Xu et al. 2000), was klar zeigt, dass diese Mäuse ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirkungsweise von Antidepressiva sind.

Ziel dieser Arbeit war die Erfassung der durch den Knockout des Noradrenalintransporters induzierten Änderung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Mit quantitativer real-time PCR wurde der Einfluss des Knockouts auf die Genexpression des noradrenergen und dopaminergen Systems in definierten Hirnarealen (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum) und in Gesamthirnen untersucht. Die Liste der determinierten Gene umfasste Synthesenzyme (Dopamin- β -Hydroxylase und Tyrosinhydroxylase), Neurotransmittertransporter (Dopamintransporter und vesikulärer Monoamintransporter 2), ferner adrenerge Rezeptoren (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 und β_2) und Dopaminrezeptoren (D_1 , D_2 und D_3). Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Kenntnis der jeweiligen kodierenden Sequenzen der Gene. Bis auf die des neuronal exprimierten vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT 2) lagen diese zum Zeitpunkt der Arbeit vor. Die genannte fehlende Sequenz sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

Mit der Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Microarrays für die Maus eröffnete sich die Möglichkeit Tausende von Genen simultan auf ihre differenzielle Expression auf Gesamthirnebene zu überprüfen. Diese Methode sollte genutzt werden, um neue Zielgene zu identifizieren.

Im Anschluss an diese Untersuchungen sollte für selektierte Gene der Effekt der mRNA-Expressionänderung auf die Proteinexpression und Funktion untersucht werden.

Zum Verständnis der erhaltenen Daten trägt die Kenntnis über die Homöostase der Catecholamine bei. Aus der Literatur waren jedoch nur Angaben für wenige Hirnregionen zu entnehmen. Um diese Lücke zu schließen, sollten in Kooperation mit Herrn Dr. Wölfel (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg) die Konzentrationen von Noradrenalin, Dopamin, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Methoxyhydroxyphenylglykol hirnregionspezifisch für NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tiere bestimmt werden.

B. Versuchstiere, Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	A 210 P, Sartorius FA 3100-2iEC, Faust
Beleuchtungstisch	Just-Normlicht
Heizrührer	Ikamag RH, Ika
Kryostat	Jung CM 3000, Leica
Membranpumpe	Typ EKF45, Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
pH-Meter	pH 522, WTW
Fotodokumentation Umfasst: UV/VIS Leuchttisch Kamera Thermoprinter Bildschirm	MWG Biotech TFP-M/WL KP-M1U, Hitachi P66E, Mitsubishi IM400-E, Javelin
Phosphorimager	BAS 5000, Fujifilm
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia UVmini 1240, Shimadzu
Pipetten	Research, Eppendorf PreCision, Finpipett Pipetman, Gilson
real-time PCR Detektionssystem	iCycler iQ, Bio-Rad Mx 3000P, Stratagene
Rotationsmischer	Vibrax-VXR, Vortex Genie 2, Bender & Holbein
Rotor-Stator-Homogenisatoren	Ultra Turrax TP 18/10, IKA-Labortechnik Polytron PT 10/35, Kinematic Littau
Schüttelinkubator	TR-125, Infors AG
Sequenzier	LI-COR 4200 und 4200L, MWG
Spannungsgeräte	Modell 493, ISCO

	2303 Multidrive XL, Pharmacia LKB ECPS 3000/150 Pharmacia LKB P25, Biometra
Speedvac Concentrator	SVC 100H, Savant
Sterilarbeitsbank	HA 2448 GS, Heraeus
Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckmann
Thermocycler	Trioblock (mit Deckelheizung), Biometra
Wasseraufbereitung (Bidestille)	Aquatron A400D, Bibby
Wasserbad	Hartenstein
Zellharvester	Brandel
Zellhomogenisator	Wheaton Potter
Zentrifugen	5114 und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma CPKR (Rotor: GH-3.7) Beckmann JS-21 (Rotor: JA-20) Beckmann

1.2 Verbrauchsmaterial

Einbettmedium	Jung tissue-freezing medium, Leica
Filmrolle für Thermoprinter	K65HM, Mitsubishi
Kanülen	Braun
Glasfaserfilter	GF/B Filter, Whatman
PCR-Platten und Deckelfolien	0990 Thermo-Fast 96 PCR-plate 1170 Absolute QPCR Seal, Abgene
Pipettenspitzen	Eppendorf/ Saarsedt safe seal-Tips, Biozym
Reaktionsgefäße	Safelock 0,5 ml und 2 ml, Eppendorf 1,5 ml Saarsedt
Spritzen, Insulinspritzen, 26G Kanülen	Braun
Sterilfilter	Typ GVPP, 0,22 µm, Millipore
UV-Küvette (Einweg)	UVette, Eppendorf
Zählröhrchen	Mini POLY-Q Vials, Beckmann
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Nunc

1.3 Computersoftware und Datenbanken

BLAST at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Entrez at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
Graph Pad Prism, Instat	Graph Pad Software
iCycler iQ Optical System Software 3.0A	Bio-Rad
Image Gauge V 4.0	Fujifilm
Mouse Genome Server	www.ensembl.org/Mus_musculus/
mFold	Integriert in OligoAnalyzer 3.0
OligoAnalyzer 3.0	IDT
Office 2000 (Excel, Word, Access)	Microsoft

1.4 Kits für die Molekularbiologie

FTA-Filter (Clone Saver Card) and Purification Reagent	Whatman
Gene Elute Agarose Spin Columns	Sigma
MaxiScript SP6/T7	Ambion
Micoarray10KA-Mouse Array	MWG Biotech
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
PCR-Reagent System	Invitrogen
Plasmid Mega Kit	Qiagen
QuantitectSyBrGreen PCR Kit	Qiagen
Qiaquick	Qiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Lipid Kit	Qiagen
RNeasy Mini/Maxi Kit	Qiagen
Spin Miniprep Kit	Qiagen
Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham

1.5 Enzyme

DNase RNase frei	Ambion
RNase H	Roche
RNasin RNase Inhibitor	Promega, MBI
Restriktionsendonukleasen	MBI, Roche
Markierte und unmarkierte Oligonukleotide	MWG

1.6 Größenmarker, Vektoren und Nukleinsäuren

1kb-DNA-Ladder	Invitrogen
dNTPs	MBI
Cy3-/Cy5-dCTPs	Amersham
GeneRuler 50bp DNA Ladder	MBI
GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI
NTPs	MBI
pCR 2.1	Invitrogen
pcdna3.1Zeo(+)	Invitrogen

1.7 Chemikalien

Agar-Agar	Merck
Agarose (for electrophoresis)	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Merck und BioRad
Ampicillin	Roche
Bactotrypton	Life Technologies
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Caseinhydrolysat	Life Technologies
Chloroform	Merck, Roth
Citronensäuremonohydrat	AppliChem
Clonidin	Biotrend
DC Proteinassay	BioRad
Destilliertes Wasser (Zellkulturgrad)	Life Technologies

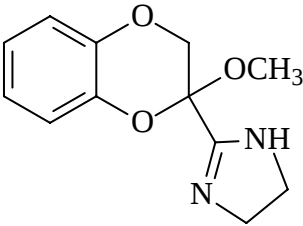
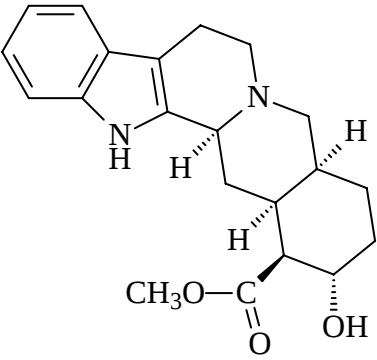
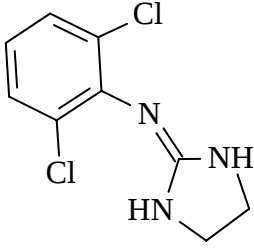
3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA)	Sigma
Dopamin	Sigma
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N',N'-tetraacetat, Na-Salz (EGTA)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz (EDTA)	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Fluorescein	Bio-Rad
Gelatine	Merck, Sigma
Glycerol (87 %)	Merck
Glycylglycine	Sigma
Hefeextrakt	Life Technologies
4-Hydroxy-3-Methoxyphenylglycol (MHPG)	Sigma
Isopropanol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Noradrenalin	Sigma

Octansulfonsäure	Sigma
RNA-Ladepuffer	Ambion
RNase Zap	Ambion
Salzsäure (37 %)	Merck
Scintillator 199 TM	Packard
Sequagel XR	Biozym
Rauwolscin	Biotrend
Tert.-Amylalkohol	Sigma
Tris-(hydroxymethylen)-aminomethan	Roth/Merck
(Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)	Sigma
TRIzol	Invitrogen, Sigma
2,2,2-Tribromoethanol	Sigma
X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Roche bzw. Roth

1.8 Radiochemikalien und Standards

[³ H]microscale	Amersham
[³ H]RX821002, 41 Ci/mmol	Amersham

1.9 Strukturformeln der Liganden

RX821002	
Rauwolscin	
Clonidin	

1.10 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium, pH 7,0	1 % Bactotrypton oder Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
LB/Amp-Medium	LB-Medium mit 200µg/ ml Ampicillin
SOC-Medium (pH 7,0)	2 % Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 0,05 % NaCl 2,5 mM KCl Zugabe nach dem Autoklavieren: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 0,2 % Glukose, sterilfiltriert
XIA-Platten	LB-Medium mit X-Gal (40 µg/ml), IPTG (50 µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml), 1,5 % Agar-Agar

1.11 Puffer und Lösungen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 %, frisch oder gelagert bei -20 °C
Ampicillin	10 %, aliquotiert, gelagert bei -20 °C
Avertin-Stammlösung	10 g 2,2,2-Tribromethanol gelöst in 10 ml Tert-Amylalkohol max. 6 Monate (20 °C) unter Lichtausschluss
Avertin	1 ml Avertin-Stammlösung gelöst in 29 ml PBS-Puffer max. 6 Monate (4 °C) unter Lichtausschluss
Bindungspuffer	32 mM Hepes 80 mM NaCl 4 mM EGTA 4 mM EDTA, pH 7,6

Filtrationspuffer	25 mM Glycylglycine, pH 7,6
DNA-Probenpuffer (5x)	15 % Ficoll 400 5x TBE 0,25 % Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung	1 % in H ₂ O, lichtgeschützt bei 4 °C
Glycerol (50 %)	in H ₂ O, autoklaviert
MOPS (10x)	200 mM MOPS 50 mM NaAc 10 mM NaEDTA pH 7,0
PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 83 mM Na ₂ HPO ₄ 14 mM KH ₂ PO ₄
Saccharoselösung	0,32 M Saccharose 4 mM Hepes, pH 7,6
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
TBE (10x)	1 M Tris HCl 1 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer (pH 8)	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer (pH 9)	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 9,0
Tris-HCl pH 6,8	1 M Tris-HCl, pH 6,8
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Wasser	Bidestilliertes Wasser

2. Haltung und Präparation der Versuchstiere

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden altersgleiche, adulte (3 - 6 Monate), männliche Mäuse mit einer genetischen Deletion des Noradrenalintransporters ($\text{NAT}^{-/-}$) und Wildtyp-Mäuse ($\text{NAT}^{+/+}$) verwendet. Diese waren Nachkommen heterozygoter Tiere ($\text{NAT}^{+/-}$) (Xu et al. 2000), die uns von Dr. Marc Caron zur Verfügung gestellt wurden. Der genetische Hintergrund dieser Tiere ist der Inzuchtstamm C57/Bl6. Die Tiere wurden in einem fensterlosen Raum bei einer Temperatur von 24 °C gehalten, wobei die Beleuchtung in einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet war (7 Uhr Licht an). Die Tiere erhielten pelletiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum. Die Haltung der Tiere entsprach den Richtlinien der Europäischen Union (86/609/EWG).

2.2 Transkardiale Perfusion

Die für RNA-Expressionsuntersuchungen verwendeten Tiere wurden transkardial perfundiert. Hierzu wurden die Tiere mit Avertin (37 °C, 25 - 30 $\mu\text{l/g}$, i.p.) anästhesiert und die Schmerzreflexe bis zur vollständigen Unempfindlichkeit überwacht. Nach Eröffnung des Thorax wurde eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt. Eine gleichzeitige Eröffnung des rechten Herzvorhofes gewährleistete das Abfließen des Blutes und Perfusates. Das gesamte Blutgefäßsystem wurde mit 10 - 15 ml eiskaltem PBS-Puffer bis zum vollständigen Entbluten durchgespült. Hierzu wurde die Entfärbung der Leber kontrolliert.

2.3 Präparation der Hirnareale

Nach der Perfusion bzw. nach direkter Dekapitation wurde die Schädelplatte eröffnet und das Gehirn freipräpariert. Das Gehirn wurde entnommen und direkt auf einem gekühlten Block (0 °C) präpariert. Mit stumpfem Besteck wurden Bulbus olfactorius (Bulbus olf.), Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum präpariert und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Versuch wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Es sollte bedacht werden, dass die als Hirnstamm bezeichnete Probe auch Teile des Thalamus und des Mittelhirns einschließt.

2.4 Anfertigung von Kryoschnitten

Nativ entnommene, nicht transkardial perfundierte Gehirne von dekapitierten Tieren wurden auf Trockeneis eingefroren und gelagert. Das auf -19 °C temperierte Gehirn wurde auf dem vorgekühlten (-19 °C) Schnittblock mit „Tissue Freezing Medium“ aufgefroren. Am Kryostat wurden serielle koronare Schnitte in ventrodorsaler Richtung von 12 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Um Austrocknung zu verhindern, wurden die Präparate luftdicht verpackt und bei -70 °C gelagert. Vor dem Versuch wurden sie bei Raumtemperatur (20 °C) aufgetaut.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 DNA Extraktion aus Blut zur Genotypisierung

Ein Tropfen Blut aus der Schwanzspitze von Mäusen wurde entnommen und auf „FTA-Filter“ gegeben. Das aufgetragene Blut löst Reagenzien aus dem imprägnierten Filter, die innerhalb von 20 min (20 °C) zur Lyse führen. Die enthaltenen Nukleinsäuren werden sterisch im Filter fixiert und sind laut Herstellerangaben über mehrere Jahre stabil (20 °C). Ein Stück Filter (Durchmesser 1 mm) wurde ausgestanzt und dreifach mit 150 µl Reinigungspuffer (FTA-Purification Reagent) und abschließend dreifach mit dem gleichen Volumen Wasser gereinigt. Der Stanzling wurde direkt in den PCR-Ansatz gegeben.

3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Mit einem Skalpell wurde das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt, unter UV Licht (254 nm) ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gelstück wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3 Plasmid Mini-Präparation

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien von Übernachtskulturen (2 ml) wurde das „Spin-Miniprep Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Angaben des Herstellers. In dem Verfahren werden die Bakterien initial alkalisch lysiert. Die folgende Aufreinigung der Plasmide beruht auf der pH- und salzabhängigen Bindung von Nukleinsäuren an Silicagel. Die

Verwendung kommerzieller Produkte, die dieses Prinzip nutzen ermöglicht eine direkte Sequenzierung der Plasmid-DNA ohne eine weitere Aufreinigung.

3.4 RNA-Extraktion

3.4.1 Isolierung von RNA aus peripheren Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus peripheren Geweben erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen. Zur Homogenisierung der Gewebe wurde ein Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra-Turrax) verwendet. In einem Ansatz konnten 50 - 100 µg RNA über eine Silica-Matrix innerhalb von 30 min isoliert werden. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene RNA ist sehr rein und enthält nur sehr geringe Mengen an DNA und wurde für die qualitative RT-PCR (vgl. B.3.11, Seite 40) verwendet. Die extrahierte RNA wurde bei -80 °C für maximal 6 Monate gelagert und vor der Verwendung auf Eis aufgetaut, um eine Degradierung zu vermeiden.

3.4.2 Isolierung von RNA aus ZNS-Proben

Das unter 3.4.1 beschriebene Verfahren ist für Proben aus dem ZNS nicht gut geeignet. Aufgrund des hohen Fettgehaltes des Gewebes kann es zu niedrigeren RNA-Ausbeuten durch Verstopfen der Silica-Matrix kommen. Aus diesem Grund wurde dem oben genannten Verfahren eine TRIzol-Extraktion vorangestellt. Der DNAase-Verdau direkt auf der Säule stellte die Entfernung von genomischer DNA sicher, ohne die Reinheit der Präparation zu beeinträchtigen. Dieses Vorgehen war erforderlich, da die so gewonnenen RNAs für qPCR und Microarrays verwendet wurden. Für beide Methoden ist die Reinheit und die Integrität der extrahierten RNA essenziell.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden entstammen ursprünglich „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al. 2004). Seit Januar 2001 gibt es eine entsprechende Produktreihe der Firma Qiagen "RNeasy Lipid Tissue". Alleinig wird in diesen Produkten „TRIzol“ (Invitrogen) „QIAzol“ genannt.

3.4.2.1 Isolierung von RNA aus Hirnarealen

Die gefrorenen Hirnproben wurden in einem Zentrifugenröhrchen (2 ml) in 0,5 ml TRIzol (20 °C) mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax) 2 x 15 s (höchste Stufe) homogenisiert. Anschließend wurden erneut 0,5 ml TRIzol hinzugegeben und die Probe wurde auf einem Rotationsmischer gemischt. Nach 5 min (20 °C) wurden 200 µl Chloroform zugegeben und für 15 s auf dem Rotationsmischer gemischt. Nach 3 min (20 °C) wurde 15 min zentrifugiert (12.000 g, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde abgetrennt und mit dem gleichen Volumen Ethanol (70 %) versetzt. Nach erneutem Mischen wurde die Lösung in 700 µl Aliquoten durch die Säule mit der Silica-Matrix aus dem "RNeasy Mini Spin Column" zentrifugiert (12.000 g, 15 s, 25 °C). Das weitere Vorgehen entsprach den Vorgaben des Herstellers (RNeasy Mini Kit, Qiagen) inklusive des optionalen DNase-Verdaus direkt auf der Säule. Die RNA wurde mit dem im Kit enthaltenen Wasser eluiert, sofort eingefroren (-80 °C) und für maximal 6 Monate (-80 °C) gelagert.

3.4.2.2 Isolierung von RNA aus Gesamthirnen

Gefrorene Gesamthirne wurden in 12,5 ml TRIzol (20 °C) in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Polytron) 2 x 30 s (höchste Stufe) homogenisiert. Nach 5 min (20 °C) wurden 2,5 ml Chloroform zugegeben und 30 s auf dem Rotationsmischer gemischt und 3 min inkubiert 20 °C. Nach der Zentrifugation (12.000 g, 15 min, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Ethanol (70 %) vermischt und durch eine aus dem "RNeasy Maxi Kit" stammende Säule zentrifugiert (12.000 g, 15 s, 25 °C). Die weitere Durchführung entsprach den Angaben des Handbuchs des „RNeasy Maxi Kits“ (Qiagen), inklusive dem optionalen DNase-Verdaus direkt auf der Säule. Die RNA wurde mit Wasser (RNeasy maxi Kit, Qiagen) eluiert und bei -80 °C eingefroren und für maximal 6 Monate gelagert.

3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption von Nukleinsäuren bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm (A_{260}). Zur Kontrolle der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm (A_{280}) gemessen. Die Bestimmung wurde entweder mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) oder UVmini 1240 (Shimadzu) durchgeführt. Letzteres ermöglichte die Aufnahme von Spektren (220 - 1100 nm). Zur Messung wurden entweder Quarzküvetten oder Einwegküvetten (UVette) verwendet. Die einzelverpackten UVetten sind steril und DNAase/RNAase frei und wurden zur verlustfreien Messung verwendet. Zunächst wurde das Photometer mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Proben kalibriert und anschließend die Proben in einer Verdünnung vermessen, die eine Messung in einem Extinktionsbereich zwischen 0,1 und 1 ermöglichte. Konzentrationen von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm einen Extinktionswert von 1 auf. Ein Verhältnis A_{260} zu A_{280} von 1,8 - 1,9 zeigt reine DNA an, während ein größerer Wert (1,9 - 2,1) reine RNA und ein kleinerer Wert Proteinverunreinigungen anzeigt, da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen.

Die Vermessung von RNA in wässriger Lösung erfordert einen pH-Wert von 7,5 - 8,5, da sonst die Ratio A_{260}/A_{280} verfälscht wird (Wilfinger et al. 1997). In dieser Arbeit wurde, soweit möglich, 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) zur Messung verwendet.

3.6 Fällung von Nukleinsäuren

Die in wässriger Lösung vorliegenden Nukleinsäuren wurden mit 2,5 Volumenteilen eiskaltem 96 % Ethanol und einem 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und der Ansatz gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20 °C über 30 min (DNA) bzw. 12 h (RNA). Nach Zentrifugation (13.000 g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Pellet mit 2 Volumenteilen eiskaltem 70 % Ethanol überschichtet. Nach Durchmischen wurde 30 min zentrifugiert (13.000 g, 4 °C), vorsichtig abdekantiert, das Pellet unter Vakuum in der Speedvac getrocknet (5 - 15 min) und in der erforderlichen Menge Wasser gelöst.

3.7 In vitro Transkription

Die cRNA wurde anhand von linearisierten DNA Matrizen mit T7-Promotoren, welche die zu transkribierenden Sequenzen am 5'-Ende flankieren, synthetisiert. Es wurde das „MAXIscript SP6/T7 Kit“ unter Einsatz der enthaltenen T7-Polymerase und ca. 1 µg linearisierter Plasmide nach Herstellerangaben verwendet. Zur Entfernung von Plasmid-DNA wurde der Ansatz 30 min (37 °C) mit 20 U RNase-freier DNase inkubiert. Der Ansatz wurde unter Anwendung des Protokolls "RNA-Cleanup" mit dem „RNeasy-Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Zur Entfernung eventueller residualer Plasmid-DNA wurde der optionale DNase-Verdau während der Aufreinigung nach den Angaben des Herstellers ausgeführt.

3.8 Reverse Transkription

Die Synthese der cDNA erfolgte mit der „Superscript II RNase H⁻ Reversen Transkriptase“ und Random-Hexamer- oder OligodT₁₈-Primern (MWG) nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen). In einem Ansatz (20 µl) wurden RNA-Mengen zwischen 100 ng und 4 µg umgeschrieben. Im Fall von RNAs, die mit qPCR analysiert werden sollten, wurden generell 2 µg Gesamt-RNA umgeschrieben und Random-Hexamer-Primer verwendet. Die Umschreibungen erfolgten unter Zusatz von 1 µl (20 U/µl) RNase Inhibitor.

3.9 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der in vitro Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche (Mullis und Faloona 1987). Aufgrund des exponentiellen Charakters der Reaktion ist es möglich, wenige Kopien der Zielsequenz stark zu amplifizieren. Die verschiedenen Schritte der Reaktion werden zyklisch, temperaturabhängig durchlaufen. Die doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim darauffolgenden Abkühlen hybridisieren als Primer bezeichnete Oligonukleotide (siehe B.3.12, Seite 41) mit den komplementären Abschnitten der Einzelstränge (Annealing). Im letzten Schritt verlängert die eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3' komplementär zum jeweiligen Einzelstrang (Elongation). Dieser Zyklus wird mehrfach durchlaufen, wobei es zur Akkumulation der Reaktionsprodukte kommt. Mathematisch entspricht dies der Gleichung 1. Wobei N_n die Kopienzahl vor und

N_{n+1} die Anzahl der Kopien nach einem Zyklus angibt. Der Faktor X ($0 \leq X \leq 1$) entspricht dem Anteil der Kopien, die während des Zyklus verdoppelt werden.

$$N_{n+1} = (1 + X) \times N_n \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Summe aus 1 und dem Faktor X wird üblicherweise als Effizienz E ($1 \leq E \leq 2$) der Reaktion definiert. Unter Annahme einer konstanten Effizienz E_{const} in jedem Zyklus der Reaktion würde die Akkumulation der PCR-Produkte durch die Gleichung 2 beschrieben.

$$N_n = N_0 \times E^n \quad \text{Gleichung 2}$$

N_0 = initiale Kopienzahl der spezifischen Matrizen-DNA

N_n = Produktmenge nach n Zyklen

Diese exponentielle Beziehung gilt jedoch nur in der frühen Phase der PCR. Aus diesem Grund wird diese auch als exponentielle Phase bezeichnet. Im späteren Verlauf sinkt die Effizienz bis zum Erreichen der Plateauphase gegen 1. In dieser Phase werden keine weiteren PCR-Produkte gebildet. Die Ursachen werden z. B. von Morrison und Gannon (1994) diskutiert.

3.10 Quantitative PCR

3.10.1 Prinzip der quantitativen real-time PCR

Bei der quantitativen real-time PCR (qPCR) wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus bestimmt (Holland et al. 1991; Morrison et al. 1998). Der Verlauf der Reaktion kann somit in Echtzeit (real-time) verfolgt werden. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffs, dessen Signalintensität proportional zur DNA-Menge ist (siehe B.3.10.4, Seite 35).

Folglich kann in Gleichung 2 die Gesamtmenge N_N und die initiale Menge N_0 durch die entsprechenden Fluoreszenzwerte F_N und F_0 ersetzt werden. In Abwesenheit von Nukleinsäuren ist ein Signal messbar, das sogenannte

Hintergrundsignal oder Rauschen R . In den frühen PCR-Zyklen überlagert es das Signal der PCR-Produkte (vgl. Abbildung 7, Seite 39). Es ergibt sich folglich Gleichung 3.

$$F_N = F_0 \times E^N + R \quad \text{Gleichung 3}$$

Setzt man eine funktionierende PCR ($E > 1$) voraus, führt jeder PCR-Zyklus zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Eine Probe mit einer hohen Anfangskonzentration der Zielsequenz erreicht ein bestimmtes Fluoreszenzniveau in einem früheren Zyklus, als eine Probe mit niedriger Anfangskonzentration. Die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau über dem Hintergrundsignal zu erreichen, stellt die quantitative Einheit der qPCR dar und wird als C_t (threshold cycle) bezeichnet (Higuchi et al. 1993). Ein quantitativer Vergleich zweier Proben (A, B) ist nur in der exponentiellen Phase möglich, da nur in dieser Phase die PCR-Effizienz konstant ist. In diesem Fall gilt (Pfaffl 2001):

$$F_{0_A} \times E^{C_{t_A}} + R = F_{0_B} \times E^{C_{t_B}} + R \quad \text{Gleichung 4}$$

$$F_{N_A} = F_{N_B} \quad \text{Gleichung 5}$$

$$\frac{F_{0_A}}{F_{0_B}} = E^{C_{t_B} - C_{t_A}} = V \quad \text{Gleichung 6}$$

Verläuft die PCR mit idealer Effizienz entspricht E dem Wert 2. Folglich ergibt sich in diesem Fall die Gleichung:

$$V = 2^{C_{t_B} - C_{t_A}} = 2^{\Delta C_t} \quad \text{Gleichung 7}$$

Der Wert V spiegelt das Verhältnis der initialen Produktmenge in den Probe A und B wider. Die Effizienz kann mittels Standardkurven (siehe B.3.10.2, Seite 34) ermittelt werden.

3.10.2 PCR-Effizienz

Die PCR-Effizienz ist neben der Spezifität das maßgebliche Bewertungskriterium einer PCR. Unter optimalen Reaktionsbedingungen wird die maximale PCR-Effizienz von $E = 2$ erreicht, d. h. jeder PCR-Zyklus führt zu einer Verdopplung der PCR-Produkte. Experimentell kann die Effizienz aus relativen Standardkurven ermittelt werden. Hierzu werden verschiedene Verdünnungen der Probe vermessen und die Ct-Werte gegen den Logarithmus der relativen Konzentrationen aufgetragen. Die Messwerte beschreiben eine Gerade mit negativer Steigung, wenn der Ct-Wert in der exponentiellen Phase der PCR bestimmt wird. Aus diesem Grund wird die exponentielle Phase auch als log-lineare Phase bezeichnet. Aus der Steigung S der Geraden kann die Effizienz E der Reaktion anhand von Gleichung 8 (Pfaffl 2001) berechnet werden.

$$E = 10^{-1/S}$$

Gleichung 8

3.10.3 Relative Quantifizierung

Zur Bestimmung der relativen Expression eines Zielgens (ZG) ist eine Normalisierung auf einen internen Standard erforderlich (Vandesompele et al. 2002). Dieser gleicht Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben aus, die bei der Analyse von cDNAs auftreten, da z. B. die Effizienz der reversen Transkription von Probe zu Probe variieren kann. Als interne Standards (IS) werden in der Regel Gene verwendet, von denen man annimmt, dass sie stabil exprimiert werden. Da häufig endogene Referenzgene verwendet werden, die in den grundlegenden Zellstoffwechsel involviert sind, werden sie in der englischsprachigen Literatur auch als "housekeeper" oder "housekeeping genes" bezeichnet. Als Alternative zu endogenen Referenzgenen kann eine in vitro synthetisierte cRNA als interner Standard (cRNA) verwendet werden. Diese wird vor der reversen Transkription in einem fixen Verhältnis zur RNA-Menge zugegeben und parallel zum Zielgen vermessen.

Legt man die Gleichung 6 zugrunde ergibt sich in beiden Fällen zur Berechnung der normalisierten relativen Expression die in dieser Arbeit verwendete Gleichung 9 (Pfaffl 2001):

$$R = \frac{V_{ZG}}{V_{IS}} = \frac{E^{Ct_{BZG} - Ct_{AZG}}}{E^{Ct_{BIS} - Ct_{AIS}}} = \frac{E^{\Delta Ct_{ZG}}}{E^{\Delta Ct_{IS}}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Entspricht die Effizienz des Zielgens und des internen Standards dem Wert 2, ergibt sich analog aus Gleichung 7:

$$R = \frac{V_{ZG}}{V_{IS}} = \frac{2^{Ct_{BZG} - Ct_{AZG}}}{2^{Ct_{BIS} - Ct_{AIS}}} = \frac{2^{\Delta Ct_{ZG}}}{2^{\Delta Ct_{IS}}} = 2^{\Delta \Delta Ct} \quad \text{Gleichung 10}$$

Diese Art der Berechnung wird in der Literatur üblicherweise als $\Delta\Delta Ct$ Methode bezeichnet (Livak und Schmittgen 2001).

Der Wert R entspricht dem Verhältnis der relativen Expression des Zielgens in den beiden Proben. Ein Wert R von $1 > R \geq 0$ bedeutet z. B., dass das Zielgen in der Probe A stärker exprimiert wird als in der Probe B. Im umgekehrten Fall ergäbe sich ein Wert zwischen $1 < R < \infty$. An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Werte nicht normalverteilt sein können, da der Wertebereich nicht linear ist. Für die in dieser Arbeit verwendeten statistischen Methoden (vgl. B.6, Seite 54) werden jedoch normalverteilte Ergebnisse vorausgesetzt. Mathematisch kann dies durch die Logarithmierung der Verhältniszahlen erreicht werden (Motulsky 2003). Aus Gründen der Anschaulichkeit wurde in dieser Arbeit der Logarithmus zur Basis 2 gewählt.

Bei der Verwendung mehrerer interner Standards wurden die Ergebnisse separat nach Gleichung 9 berechnet, logarithmiert und abschließend der Mittelwert gebildet.

3.10.4 Detektion

Die Detektion erfolgte mit dem unsymmetrischen Cyaninfarbstoff SYBRGreen I, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet. Gebundenes SYBRGreen I fluoresziert ca. 1000-fach stärker als die freie Substanz (siehe Abbildung 6) (Molecular Probes 2004). Dieses Fluoreszenzsignal ist in weiten Bereichen proportional zur vorhandenen DNA-Menge (Vitzthum et al. 1999) und ermöglicht somit eine indirekte Quantifizierung von Doppelstrang-DNA.

Die vom Patentinhaber nicht veröffentlichte Strukturformel wurde von Zipper et al. (2004) aufgeklärt (siehe Abbildung 6). Das Emissionsmaximum des an doppelsträngige DNA gebundenem SYBRGreen I liegt bei 521 nm und das Exzitationsmaximum bei 494 nm.

Die Verwendung von SYBRGreen I in der qPCR erfordert die Auswahl hochspezifischer Primer, da die Bindung von SYBRGreen I prinzipiell sequenzunspezifisch ist und folglich auch unspezifische PCR-Nebenprodukte und Primerdimere erfasst werden.

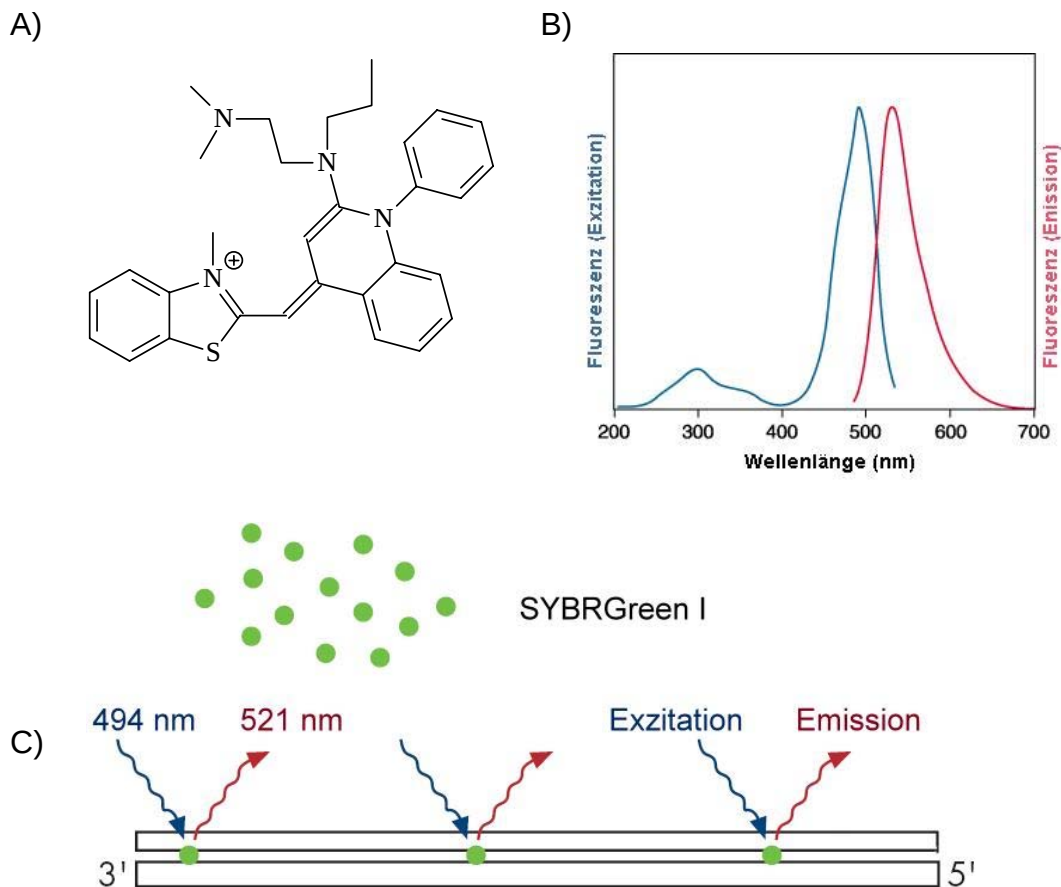


Abbildung 6: SYBRGreen I

A) Strukturformel von SYBRGreen I

B) Exzitations- / Emissionsspektrum von SYBRGreen I in Gegenwart von doppelsträngiger DNA (Molecular Probes 2004)

C) Entstehung der Fluoreszenz von SYBRGreen I in Gegenwart doppelsträngiger DNA

3.10.5 Schmelzkurvenanalytik

Der Einsatz von unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, wie SYBRGreen I, erfordert die Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte, um Verfälschungen durch Primerdimere und unspezifische PCR-Produkte nachweislich ausschließen zu können. Gegenüber der für einen hohen Probendurchsatz nicht geeigneten Gelelektrophorese (siehe B.3.14, Seite 47) ermöglicht die Schmelzkurvenanalytik eine Routineprüfung der PCR-Produkte im direkten Anschluss an die PCR (siehe Abbildung 14, Seite 62).

Hierzu wird der Reaktionsansatz schrittweise von ca. 50 °C bis auf 100 °C aufgeheizt und das Fluoreszenzsignal nach jeder Temperaturerhöhung gemessen. Es kommt zum temperaturabhängigen Aufschmelzen der Doppelstränge, was eine Abnahme der Fluoreszenz bedingt. Trägt man hingegen das Integral des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur auf, erhält man für jedes PCR-Produkt ein Maximum, den Schmelzpunkt (vgl. Abbildung 14, Seite 62). Treten zusätzlich zum Schmelzpeak der gewünschten PCR-Produkte weitere Maxima auf, zeigt dies die Anwesenheit unspezifischer Nebenprodukte an. Die Nebenprodukte beeinträchtigen prinzipiell allerdings nur dann eine erfolgreiche Quantifizierung, wenn sie bei der Messtemperatur der qPCR als Doppelstrang vorliegen. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Amplifikation unspezifischer Produkte grundsätzlich die Effizienz (siehe B.3.10.2) der Amplifikation der Zielsequenz mindert, da Primer und Nukleotide verbraucht werden und sich Pyrophosphat anreichert.

3.10.6 Standardreaktionsbedingungen

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist die Gewährleistung konstanter Reaktionsbedingungen der zu vergleichenden Proben. Hierzu wurden die cDNAs direkt nach der Konzentrationseinstellung in versuchsgerechten Aliquoten (0,5 - 50 ng/10 µl, vgl. folgende Seite) bei -20 °C eingefroren. Zur Minimierung von Pippetierungenauigkeiten wurden von den Reaktionskomponenten wenn möglich Vormischungen, sogenannte Mastermixe, angefertigt.

Das verwendete „QuantitectSYBRGreen PCR Kit“ (Qiagen) nutzt zur Erhöhung der Spezifität eine chemisch inaktivierte Hot-Start-Taq-Polymerase, die durch eine initiale Denaturierung (94 °C, 15 min) aktiviert wird. Ferner enthält der doppelt konzentrierte Mastermix dNTPs, SYBRGreen und den PCR-Puffer. Der verwendete iCycler erforderte zusätzlich den Zusatz von Fluorescein (Endkonzentration

10 nM) als internen Standard, um messpositionsabhängige Unterschiede in der Detektionseffizienz auszugleichen. Ein (35 µl) Ansatz enthielt, abhängig von der Expressionsstärke des Zielgens, 0,5 - 50 ng revers transkribierte RNA und Primer (300 bzw. 900 nM). Die optimalen Konzentrationsverhältnisse (300 / 900 nM, 300 / 300 nM, 900 / 300 nM) von Sense- zu Antisenseprimer wurden für jedes Primerpaar initial bestimmt (siehe Tabelle 2, Seite 63).

Die Messung erfolgte in Triplikaten in 10 µl Volumina in einem iCycler unter Verwendung von PCR-Platten mit 96 Vertiefungen (Reaktionskammern) und den zugehörigen Abdeckfolien.

Für alle Reaktionen wurde das auf der folgenden Seite aufgeführte Temperaturprogramm gewählt. Die Detektion erfolgte im direkten Anschluss an die Elongationsphase bei 72 °C.

1. Denaturierung:	94 °C	15 min
2. Denaturierung:	94 °C,	15 s
3. Annelina:	58 °C,	30 s
4. Kettenverlängerung (Elongation):	72 °C	30 s

Die Schritte 2-4 wurden 40-48x wiederholt.

Nach der PCR wurden die Schmelzkurven bestimmt. Hierzu wurden die Proben in 0,5 °C Schritten von 50 °C auf 100 °C erwärmt. Die Temperatur wurde jeweils für 15 s gehalten und die Fluoreszenz gemessen.

3.10.7 Datenanalyse

Die während der qPCR erhobenen Messwerte wurden mit der "iCycler IQ Optical system software 3.0A" (Bio-Rad) ausgewertet. Um das unterschiedliche Hintergrundsignal (Rauschen) der Proben auszugleichen, errechnet die Software die Differenz aus dem Fluoreszenzsignal (RFU) und einer extrapolierten Basislinie. Zur Definierung der Basislinien nutzt die Software die ersten PCR-Zyklen, in denen das Rauschen die vom PCR-Produkt verursachte Fluoreszenz überlagert (vgl. Abbildung 7, Seite 39). Dieser Abschnitt wurde begrenzt, indem in der Software der Zyklus, bevor das erste exponentielle Signal der PCR identifizierbar war, und der zweite PCR-Zyklus eingetragen wurden.

Die Lage des Fluoreszenzschwellenwertes wird von der Software anhand der Korrelationen der Triplikate automatisch optimiert. Zur Überprüfung der Softwarevorgabe wurde die Abszisse logarithmiert, um den exponentiellen Abschnitt leichter identifizieren zu können (vgl. Abbildung 15, Seite 64). Lag das von der Software vorgeschlagene Niveau nicht in der exponentiellen Phase, wurde es manuell festgelegt.

Da die angegebenen Parameter die absolute Höhe der Ct-Werte direkt beeinflussen, können nur Ct-Werte in Beziehung zueinander gesetzt werden, die bei gleichem Schwellenwert und Basislinienniveau bestimmt werden. Hieraus ergibt sich auch, dass ein direkter Vergleich von Ct-Werten aus verschiedenen Experimenten nicht möglich ist.

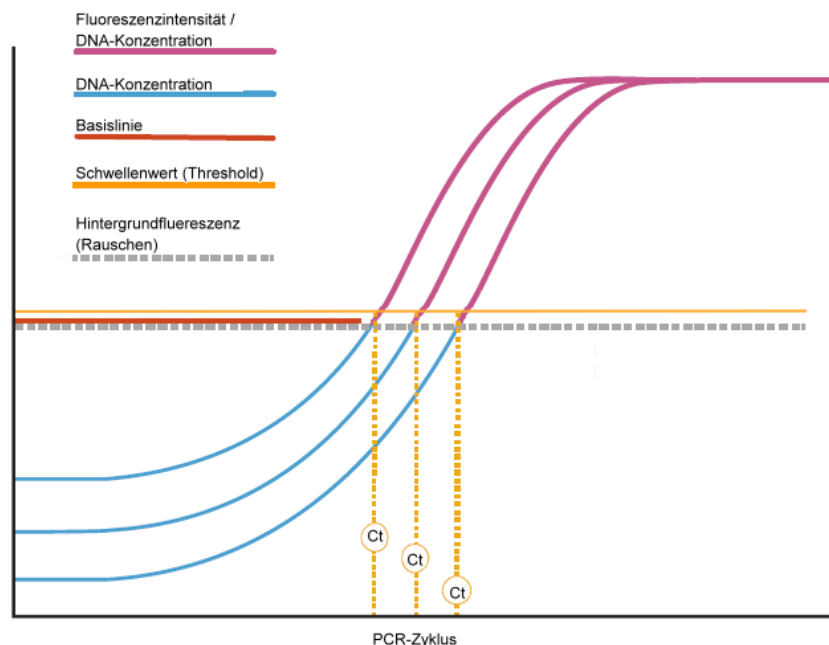


Abbildung 7: Theoretische Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der emittierten Fluoreszenz und der Konzentration der Zielsequenz während der qPCR (mod. nach qPCR-Guide (Stratagene))

Die ermittelten Ct-Werte wurden zur weiteren Auswertung nach Excel exportiert und mit Hilfe eines, im Rahmen dieser Arbeit unter „Visual Basic for Applications“ (VBA) für Excel (Microsoft) entwickelten, Programms (qCalculator) ausgewertet (siehe F.4, Seite 132).

3.11 Qualitative PCR

Bei der qualitativen PCR werden die Produkte im Anschluß an die PCR-Reaktion analysiert. Um mehrere DNA-Fragmente gleichzeitig zu amplifizieren, wurden PCR-Reaktionen mit mehr als zwei Primern durchgeführt (vgl. C.1.1; Seite 56).

Die Reaktion wurde in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurde das "PCR Reagent System" der Firma Invitrogen verwendet. Ein Ansatz bestand aus 10x Reaktionspuffer, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 0,3 - 1 µM sense- und antisense-Primer, Template-DNA im pg-µg Bereich und 2,5-5 Units Taq-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 - 50 µl.

Die Schmelztemperatur der Primer sowie die Länge und Basenzusammensetzung der Template-DNA bestimmten das Temperaturprofil. Die Annealing-Temperatur (T_A) lag normalerweise 5 - 10 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Ein typisches PCR-Temperaturprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. Denaturierung:	94 °C	4 min
2. Denaturierung:	94 °C	30 - 60 s
3. Annealing:	50-70 °C	15 - 60 s
4. Kettenverlängerung (Elongation):	72 °C	1 min/kb

Die Schritte 2 - 4 werden 30 - 40x wiederholt.

Sollten die PCR-Produkte sequenziert werden, wurde ein Hot-Start durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Hierzu wurde die Taq-Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben.

3.12 Auswahl der PCR-Primer

Die Auswahl von Primerpaaren für die PCR erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der Sequenzdatenbank (GenBank). Die Sequenzen der Primerpaare und die Identifikationsnummer (accession number) der entsprechenden Referenzsequenz der Primerbank sind in Tabelle 2 (Seite 63) angegeben.

Das wichtigste Kriterium bei der Auswahl von Primern ist ihre ausschließliche Sequenzidentität zur Zielsequenz. Zur Überprüfung wurde das Programm BLAST verwendet. Die weiteren angegebenen Kriterien wurden soweit erfüllt, wie es die Zielsequenz ermöglichte.

1) Die Schmelztemperatur (T_M) gibt die Temperatur an bei der die Hälfte der gebundenen Oligonukleotide vom komplementären Strang abdissoziieren. Sie sollte paarweise möglichst identisch sein und theoretisch 5 - 8 °C oberhalb der gewählten Annealing-Temperatur der PCR liegen (B.3.9, Seite 31). Bei der qPCR wird dieser Temperaturunterschied zumeist unterschritten, um die Spezifität der Bindung zu erhöhen. Aus der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Schmelztemperatur bekannt, deren Ergebnisse um bis zu 5 °C differieren. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte beziehen sich auf die von der Firma MWG-Biotech angegebene Näherungsformel:

$$T_M = 69,3 + 41 \times \frac{(nC/G)}{S} - \frac{650}{S} \quad \text{Gleichung 11}$$

nC/G: Anzahl der Guanosin- und Cytosin-Basen innerhalb der Sequenz

s: Gesamtzahl der Nukleotide

2) Der G/C-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % betragen.

3) Die Primer sollten keine Sekundärstrukturen (Palindrome) aufweisen, die unter den PCR-Reaktionsbedingungen stabil sind ($T_M > 45$ °C). Zur Überprüfung wurde das Programm mFold (Zuker 2003) eingesetzt.

4) Zur Vermeidung von Primerdimeren sollten im 3'-Bereich der Primer keine selbst und paarweise komplementären Basenfolgen auftreten. Dies wurde mit dem Programm OligoAnalyzer 3.0 verifiziert.

5) Primer für die qPCR sollten im 3'-Bereich nicht mehr als 2 Gs oder Cs innerhalb der letzten 5 Basen aufweisen.

Primer für die konventionelle PCR sollten terminal am 3' - und 5'-Ende ein G oder C aufweisen.

6) Innerhalb der Primersequenz sollten insbesondere sich direkt wiederholende Abfolgen der Nukleotide Guanosin und Cytosin vermieden werden. Ferner sollten keine repetitiven Sequenzen vorkommen.

Grundsätzlich sollten Primer für quantitative und konventionelle, qualitative PCR die gleichen Voraussetzungen erfüllen. Jedoch ist die restriktive Anwendung der angegebenen Kriterien bei der Primerauswahl für die qPCR von größerer Bedeutung, um die Amplifikation unspezifischer Produkte und die Bildung von Primerdimeren auszuschließen.

Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

3.13 Microarray

3.13.1 Prinzip

Die verwendeten DNA-Microarrays (Mouse 10K A Array, MWG) ermöglichen die parallele Bestimmung der relativen mRNA Expression von bis zu 9853 Genen in einem Experiment. Der Microarray besteht aus einem Glas-Objektträger, auf den punktförmig Oligonukleotide (50-mere) immobilisiert sind (Spot). Die Oligonukleotide jedes Spots weisen eine spezifische, zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz auf. Die Spots haben einen Durchmesser von weniger als 200 µm und sind mit einem Abstand von 240 µm auf einer Grundfläche von 2,8 x 3,6 cm immobilisiert. Die zu vergleichenden mRNAs werden während der reversen Transkription mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Nach gleichzeitiger Hybridisierung der erhaltenen cDNAs wird die Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe für jeden Spot bestimmt. Die relative Expressionsstärke der Zielgene lässt sich anhand dieser Daten bestimmen (siehe B.3.13.3). Der Versuchsablauf wird schematisch in Abbildung 8 veranschaulicht.

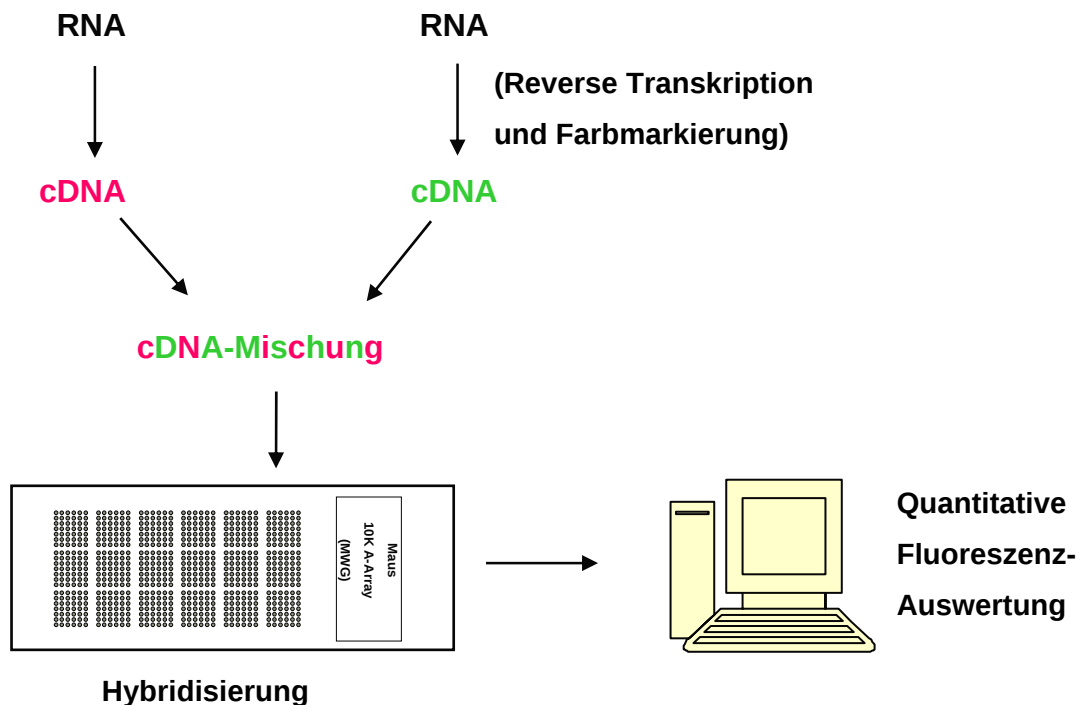


Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines Microarray-Experiments

Zur unterschiedlichen Markierung der Proben werden üblicherweise die an dCTP-gekoppelten Cyaninfarbstoffe Cy3 (orange) und Cy5 (blau) verwendet (siehe Abbildung 9). In Darstellungen von hybridisierten Microarrays werden diese üblicherweise in den Fehlfarben Rot (Cy3) und Grün (Cy5) dargestellt (vgl. Abbildung 23, Seite 82).

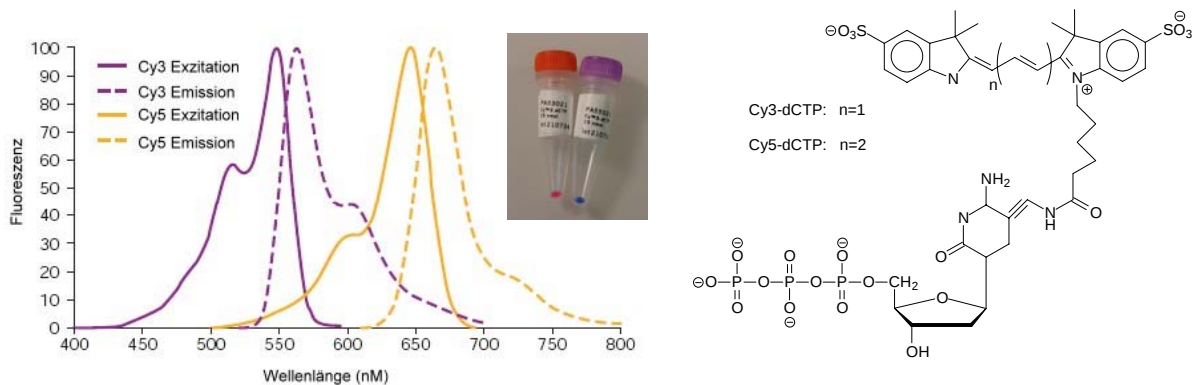


Abbildung 9: Strukturformel, Spektren (mod. nach Amersham) und Farben von Cy3-/Cy5-dCTP

3.13.2 Versuchsdurchführung

3.13.2.1 Reverse Transkription unter Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe

Die reverse Transkription unter Einbau der an dCTP gekoppelten Cyaninfarbstoffe Cy3 und Cy5 (vgl. Abbildung 9) erfolgte anhand des Manuals der Arrays (Mouse 10KA-Array) nach dem Protokoll "Direct labeling of ss cDNA by synthesis from total RNA" der Firma MWG. Da die Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurde Lichteinfall auf die Proben soweit möglich vermieden.

In zwei parallelen Ansätzen wurde Gesamthirn-RNA (siehe B.3.4.2.2, Seite 29) einer NAT^{+/+}- und einer NAT^{-/-}-Maus unter Verwendung von jeweils unterschiedlichen Farbstoffen umgeschrieben (Superscript II, Invitrogen). Hierzu wurden jeweils 100 µg der Gesamt-RNA mit 1 µg Oligo-d(T₁₈)-Primern in einem Volumen von 18,5 µl (65 °C, 10 min) denaturiert. Nach anschließendem Abkühlen auf 20 °C (10 min) wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 20,5 µl RT-Mastermix (siehe folgende Seite) und 1,0 µl (300 U) Reverser Transkriptase gestartet und 2h (39 °C) inkubiert.

RT-Mastermix:

- 8µl 5-fach RT-Puffer (Invitrogen)
- 4µl dNTPs (5 mM dACTP, dGTP, dTTP; 2 mM dCTP)
- 4µl Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP (1 mM)
- 4µl DTT (0,1 M)

Durch die Zugabe von 1 M Natronlauge (10 µl, 10 min, 65 °C) wurde die Reaktion terminiert und die RNA degradiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 µl 1 M HCl und 200 µl 1 M TE-Puffer (pH 7,5) neutralisiert. Die Entfernung der nicht inkorporierten markierten und unmarkierten Nukleotide, sowie der Primer erfolgte mit dem "PCR Purification Kit" (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die vereinigten Proben wurden unter Vakuum (Speedvac) auf ein Volumen von ca. 5 - 10 µl eingeeengt. Der Ansatz wurde bei -20 °C unter Lichtausschluss für maximal 2 Tage gelagert.

In darauffolgenden Versuchen wurde die Zuordnung der Farbstoffe jeweils getauscht (dye-swap/ Farbstoffwechsel) um eine systematische Verfälschung durch die Zuordnung der Farbstoffe zu minimieren (Übersichtsartikel: Benes und Muckenthaler 2003).

3.13.2.2 Hybridisierung und Waschen der Arrays

Um eine geschlossene Hybridisierungskammer zu gewährleisten, wurde ein Hybridisierungsrahmen aus adhesiver Folie, Geneframe (MWG), auf den Microarray aufgeklebt, so dass er die Fläche mit den immobilisierten (gespotteten) Oligonukleotiden umschließt. Die markierte cDNA wurde in 240 µl Hybridisierungspuffer (salt-based hybridisation buffer, MWG) für 3 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 3 min auf Eis abgekühlt und auf das vom Rahmen begrenzte Feld aufgegeben. Die Kammer wurde durch die Auflage einer speziellen Folie, Coverslip (MWG), unter Ausschluss von Luftblasen verschlossen und in einer feuchten Hybridisierungskammer (50 ml-Zentrifugenröhrchen) bei 42 °C für 16 h inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden Coverslip und Geneframe mit einer Pinzette entfernt und der Array wurde nach dem auf der folgenden Seite aufgeführten Protokoll unter leichtem Schütteln mittels eines Schüttelwasserbades in Färbetrögen für Objektträger gewaschen:

1. 200 ml 2 x SSC, 0,1 %SDS (5 min, 30 °C)
2. 200 ml 1 x SSC (5 min, 30 °C)
3. 200 ml 0,5 x SSC (5 min, 30 °C)

Abschließend wurde der Array durch Zentrifugation (500 g, 2 min, 20 °C) in 50 ml-Zentrifugenröhrchen getrocknet.

3.13.3 Scannen und Datenanalyse

Die Arrays wurden bei der Firma MWG mit einem konfokalen Array-Scanner (Affymetrix 428, Bedford, USA) eingelesen. Zur Erweiterung des dynamischen Bereichs des Scanners wurde der Array bei drei unterschiedlich Belichtungszeiten gescannt. Die Daten der unterschiedlichen Belichtungen wurden mit der Software Mavi 2.5 (MWG) korreliert. Die weitere Auswertung und die Zusortierung der Spots zu den Bezeichnungen der Zielsequenzen erfolgte mit der Software ImageGene 5.0 (BioDiscovery). Abschließend wurden die Werte von der Firma MWG nach Excel exportiert. Da eine manuelle Auswertung aufgrund des Datenumfangs nicht möglich war, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Excel basierende Programme zur vollautomatischen Analyse der Daten erstellt. In diese wurden die nachfolgend beschriebenen Vorgänge implementiert.

Zur Berechnung des Expressionsunterschieds zwischen den zwei Proben, wurde die Ratio aus der Fluoreszenzintensität von Cy3 und Cy5 für jede mRNA gebildet. Spots, deren Fluoreszenzsignal(e) nicht signifikant höher als das Hintergrundsignal (Rauschen) waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zur Bestimmung des Rauschniveaus wurde von 384 "leeren" Spots die Signalintensität bestimmt. Zum Ausgleich von Unterschieden in den Extinktionskoeffizienten, Einbauraten und Stabilitäten der Farbstoffe und abweichender cDNA-Konzentrationen der beiden Proben wurden die Ergebnisse normalisiert. Hierzu boten sich zwei prinzipielle Möglichkeiten an; zum einen die Standardisierung anhand von endogenen Referenzgenen (vgl. B.3.10.3, Seite 34), neun sind in Quadruplikaten auf dem Array aufgetragen, und zum anderen eine Normalisierung anhand des Verhältnisses der mittleren Signalintensität aller Spots. Letztere Normalisierungsstrategie setzt voraus, dass nur ein geringer Anteil der Gene (< 5 %) in einem Experiment differenziell exprimiert werden (Übersichtsartikel: Benes und Muckenthaler 2003). Um Verfälschungen durch Messartefakte auszuschließen,

wurden jeweils die Spots mit den tausend höchsten bzw. niedrigsten Messwerten bei der Berechnung des Normalisierungsfaktors ausgegrenzt.

Die anhand der mittleren Signalintensität normalisierten Ratios der Zielgene wurden analog zu den Ergebnissen der qPCR zur Basis 2 logarithmiert (vgl. B.3.10.3, Seite 34), um eine Normalverteilung zu gewährleisten. Es sei angemerkt, dass diese Art der Datenanalyse im Fall der Microarray-Experimente von zahlreichen Veröffentlichungen empfohlen wird (Übersichtsartikel: Quackenbush 2002; Leung und Cavalieri 2003). Nachdem diese Schritte der Auswertung für jedes Experiment separat erfolgten, wurden die Ergebnisse aller Experimente in Excel zusammengeführt und der Mittelwert und seine Standardabweichung berechnet.

Die Kategorisierung der erhaltenen Daten erforderte den Einsatz einer Datenbank (Access 2000). Diese ermöglichte eine komfortable Filterung der Daten nach verschiedenen Parametern (vgl. C.2.4.3, Seite 86).

3.14 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe (ca. 20 - 10000 Basenpaare (bp)) wurden diese auf 0,5 – 2 % Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid bei 254 nm sichtbar gemacht. Zuerst wurde die Agarose in 1x TBE aufgekocht, mit Ethidiumbromid (0,5 µg / ml) versetzt und die Lösung in einen horizontalen Gelgießstand gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und die Elektrophorese mit 1x TBE als Laufpuffer bei 1 - 5 V / cm durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurde jeweils ein Größenmarker aufgetragen. Da die Laufgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, konnte anhand des Größenmarkers eine Standardkurve erstellt werden. Diese ermöglichte relativ genaue Größenberechnung der DNA-Fragmente.

Agarosegele zur Trennung von RNA wurden auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Jedoch wurde die RNA in RNA-Probenpuffer aufgenommen, zur Denaturierung 10 min bei 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Das beschriebene Verfahren ermöglichte eine einfache Integritätskontrolle der RNA unter Vermeidung der üblichen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegele.

3.15 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das „Original TA-Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Der in dem Kit verwendete lineare Klonierungsvektor pCR2.1 ermöglicht eine direkte Klonierung von PCR-Produkten, da er am 3'-Ende einen Thymidinüberhang besitzt. Die in dieser Arbeit verwendeten, nativen, Taq-Polymerasen hängen an das 3'-Ende des amplifizierten Fragments einen zusätzlichen Adenosinrest an. Diese überlappenden Enden können sich komplementär anlagern und werden mittels der im Kit enthaltenen T4-DNA-Ligase verbunden. Die anschließende Transformation wurde unter Verwendung eines Teils des Ligationsansatzes und der im Kit enthaltenen kompetenten Bakterien (INV α F') nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Ansatz wurde auf XIA Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden zum Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen verwendet. Eine „blau-weiß“ Selektion (durch Klonierung in den open reading frame des lacZ Gens und Zugabe von IPTG und X-Gal) erleichterte die Suche nach positiven Klonen.

3.16 Bakterien-Dauerkulturen

Eine Einzelkolonie von einer XIA-Platte wurde über Nacht in 3 ml LB/Amp Medium inkubiert. In einem Einfrierröhrchen wurden 300 μ l 50 % Glycerol und 700 μ l Bakterien-Suspension vermischt und 15 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.17 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen katalysieren die Spaltung von Phosphodiesterbindungen der DNA in Abhängigkeit von bestimmten Erkennungssequenzen. Hierbei können Fragmente mit einzelsträngigen Überhängen („sticky ends“) oder überhangslose Fragmente („blunt ends“) entstehen. Restriktionen mit den(m) jeweiligen Enzym(en) wurden nach den Vorschriften des Herstellers unter Verwendung des empfohlenen Puffers durchgeführt.

3.18 DNA-Sequenzierung

Direkte Sequenzierungen von PCR-Produkten wurden von den Firmen MWG und Qiagen durchgeführt. Gereinigte PCR-Produkte (B.3.2, Seite 27) und ein passender, unmarkierter Primer wurden an die entsprechende Firma geschickt. Die Sequenzierung erfolgte dort mit farbstoffmarkierten Dideoxynukleotiden (Camacho et al. 1998) in der Kettennabbruchsequenzierung nach Sanger (1977).

Subklonierte Plasmid-DNA wurde mit farbstoffmarkierten Primern (IRD 800) nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Es wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) verwendet. Die DNA (1 µg), 2 pmol fluoreszenzmarkierter Primer (IRD 800) und 0,7 µl DMSO wurden auf 21 µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt.

Jeweils 4,5 µl dieses DNA/Primer-Master-Mix wurden zu 1,5 µl der jeweiligen A-, G-, C- oder T-Reagenz pipettiert und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsbedingungen wurden den Schmelztemperaturen der Primer angepasst:

- | | |
|-------------------|--|
| 1. Denaturierung: | 2 min, 95 °C |
| 2. Denaturierung: | 15 s, 95 °C |
| 3. Annealing: | 15 s, bei einer Temperatur die 3 °C höher
liegt als die Schmelztemperatur des Primers |
| 4. Extension: | 15 s, 70 °C |

Die Schritte 2 - 4 wurden 30x wiederholt.

Die mit 4 µl Stopppuffer versetzten Proben wurden durch Pipettieren auf Parafilm vom Mineralöl befreit und auf das nach der Vorschrift von MWG hergestellte Sequenzgel (Sequagel XR, Biozym) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung und die Detektion der markierten Fragmente erfolgte im LI-COR DNA Sequenzer 4200 bzw. 4200L (MWG) nach der Vorschrift von MWG.

4. Biochemische Methoden

4.1 Radioligandbindung an Membransuspensionen

4.1.1 Membranpräparation

Alle Präparationsschritte zur Gewinnung der Membransuspensionen aus Gesamthirnen von Mäusen erfolgten bei 4 °C. Gehirne wurden mit 0,32 M Saccharoselösung gespült, um anhaftendes Blut zu entfernen. Sie wurden dann in 2 ml der Saccharoselösung mit einem „Wheaton Potter“ Homogenisator homogenisiert (8 - 10 Hübe bei 900 Upm, 2 min). Im nächsten Arbeitsschritt wurden Zellorganellen höherer Dichte von den gewünschten, rezeptorhaltigen Membranfragmenten abzentrifugiert (1000 g, 10 min). Der Überstand wurde zentrifugiert (12000 g, 15 min) und das Pellet in 2 ml Bindungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (12000 g, 15 min). Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Bindungspuffer aufgenommen und im Homogenisator (Wheaton Potter) bei 1500 Upm homogenisiert. Das Homogenat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C bis zum Bindungsversuch gelagert.

4.1.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) mit dem „DC Protein Assay“ der Firma Bio-Rad bestimmt. Die Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls für 250 µl Ansatzvolumen. Zur Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Die Extinktion der Proben wurde unter Verwendung von „UVetten“ bei 750 nm gemessen.

4.1.3 Sättigungsexperiment

Die einzelnen, in Bindungspuffer aufgenommenen Bestandteile wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipetiert. Die Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 200 µl, enthielten 50 µl der Membransuspension und ansteigende Konzentrationen des Radioliganden [³H]RX821002. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallele Ansätze unter Zusatz von 5 µM (1000x K_D) Rauwolscin angesetzt. Die Membranen wurden 90 min unter wiederholtem Schütteln bei Raumtemperatur (20 °C) inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit einem Zell-Harvester durch mit Filtrationspuffer getränkte GF/B-Filter gesaugt. Die Filter mit den zurückgehaltenen Zellmembranen wurden 3x mit 1,5 ml

eiskaltem Filtrationspuffer gewaschen und in Zählfläschchen (Mini PolyQ Vials) überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail wurden diese über Nacht geschüttelt. Danach wurde die Tritiumaktivität (dpm-Werte) im Szintillationszähler gemessen.

Zur Berechnung der spezifischen Bindung des Radioliganden (B_L) wurde die für die entsprechende Radioligandkonzentration (L) ermittelte unspezifische Bindung von der gemessenen Gesamtbindung abgezogen. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten (K_D) und der Anzahl der spezifischen Bindungsstellen (B_{MAX}) erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse anhand der Langmuir-Isotherme (Gleichung 12) unter Verwendung des Computerprogramms GraphPad PRISM 4.0.

$$B_L = \frac{B_{MAX} \times L}{L + K_D} \quad \text{Gleichung 12}$$

Die Zahl der spezifischen Bindungsstellen wurde in fmol/mg des eingesetzten Proteins angegeben.

4.2 Autoradiografie

Die Rezeptorautografien wurden wie bei Holmberg et al. (2003) beschrieben durchgeführt. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte (siehe B.2.4, Seite 27) wurden direkt vor dem Versuch bei 20 °C aufgetaut. Schnitte von NAT^{-/-}- und NAT^{+/-}-Mäusen wurden zusammen für 20 min in Anwesenheit des Radioliganden [³H]RX821002 (0,5 nM) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4, 20 °C) inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallele Präparate der jeweils gleichen Schnittebene unter Zusatz von 5 µM Rauwolscin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in eiskaltem Phosphatpuffer (2 min) gewaschen. Die luftgetrockneten Präparate wurden zusammen mit Tritiumstandards ([³H]microscales, Amersham) auf tritiumsensitive Folien (FujiFilm) gelegt. Die Filme wurden 5 Tage unter Lichtausschluss exponiert und anschließend in einem Phosphorimager (FujiFilm BAS 5000) eingelesen.

Die Quantifizierung erfolgte mit der Software „Image Gauge 4.0“ (FujiFilm) anhand von Standardkurven der Tritiumstandards. Auftretende unspezifische Bindung wurde regionspezifisch von der Gesamtbindung abgezogen. Die Ergebnisse wurden in fmol des gebundenen Radioliganden pro mg Protein angegeben. Die

Identifikation und Nomenklatur der Strukturen erfolgte anhand des Maushirnatlasses von Paxinos und Franklin (2001).

4.3 HPLC-Bestimmung von Catecholaminen

Die entnommenen Hirnareale von nicht-perfundierten Tieren (siehe B.2.3, Seite 26) wurden genau gewogen und in 500 µl 0,4 M Perchlorsäure mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax) unter Kühlung (0 °C) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 3 h im Kühlschrank inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand bei -80 °C eingefroren. Die HPLC-Bestimmung der Konzentrationen an Noradrenalin (NA), Dopamin (DA), 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Methoxyhydroxyphenylglykol (MHPG) erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg durch Herrn Dr. Wölfel.

Laut Herrn Dr. Wölfel wurden zur Bestimmung von Noradrenalin und Dopamin die bei -80 °C gelagerten Proben aufgetaut und bei 4 °C für 15 min (10000 g) zentrifugiert. Anschließend wurden zur Bestimmung von NA, DA und DOPAC 100 µl des Überstands mit Lösung A versetzt und in spezielle Reaktionsgefäße überführt.

Lösung A:

900 µl Wasser

500 µl Puffer (12,5 % Na₂SO₃, 10 % Na₂EDTA),

300 µl Triethanolaminlösung (2 M, pH 8,2)

20 mg Al₂O₃

10 ng Dihydroxybenzoesäure (DHBA) als interner Standard

Die Gefäße wurden verschlossen und 5 min mithilfe eines Überkopfschüttlers langsam gemischt. Danach wurde ein verschlossenes Ende des Reaktionsgefäßes durch einen Filterboden ersetzt. Der Filterboden enthielt einen Glasfaser-Filter (GF 52, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Die Reaktionsgefäße wurden in Umhüllen eingehängt und bei 660 g für 1 min zentrifugiert. Der auf dem Filter befindliche Al₂O₃-Rückstand wurde nochmals mit 1 ml Wasser gewaschen. Danach wurde die Umhülle gewechselt und die Catecholamine zweimal mit je 100 µl HClO₄ (0,1 M) desorbiert. Jeder Wasch- und Desorptionsschritt wurde

durch eine Zentrifugation (660 g, 1 min) abgeschlossen. Die insgesamt 200 µl Filtrat des Desorptionsschrittes wurden in Fläschchen für die Analyse abgefüllt (Friedgen et al. 1996). Zur chromatographischen Trennung und Quantifizierung diente eine HPLC-Anlage mit elektrochemischer Detektion (amperometrischer Detektor). Das System bestand aus einer Zweikolben-Pumpe Typ 515, einem automatischen Probengeber WISP 717 (Waters, Eschborn) und einem amperometrischen Detektor (Coulchem II), bestehend aus einem dreifachen Elektrodensystem (Zellmodell 5021 und 5011; ESA, Bedford, Mass., USA). Die Daten wurden durch den Millennium 2010 Chromatographie-Manager (Waters, Eschborn) aufgezeichnet und ausgewertet. Für die chromatographische Trennung von Noradrenalin, Dopamin und DHBA wurde eine Prontosil 120-3-C18 AQ Säule (3 µm; 120 x 3 mm; Bischoff Chromatographie, Leonberg, Deutschland), die mit Hilfe eines Säulenofens auf 23 °C temperiert wurde, verwendet. Die mobile Phase bestand aus: Na-Acetat (85 mM), Citronensäure (35 mM), Na₂-EDTA (0,14 mM), Na-Octansulfonat (0,48 mM) und Methanol (6 %). Der pH-Wert war auf 4,3 eingestellt, die Lösung wurde steril filtriert und entgast. Der Fluss der mobilen Phase lag bei 0,8 ml/min. Das Oxidationspotenzial an der Guard-Zelle (1. Zelle vor dem Probengeber, um die mobile Phase elektrochemisch zu reinigen) wurde auf 350 mV, an der coulometrischen Zelle (2. Zelle nach der Trennsäule, um die Catecholamine vollständig zu oxidieren) auf 450 mV und an der analytischen Zelle (3. Zelle direkt nach der 2. Zelle, um die oxidierten Catecholamine über Reduktion zu quantifizieren) auf -350 mV eingestellt (Potenziale gemessen gegen die Palladium-Referenzelektrode). Die mittlere Wiederfindungsquote für DHBA lag bei 77 %. Die erhaltenen Ergebnisse für Noradrenalin und Dopamin wurden mit der Wiederfindungsquote für DHBA korrigiert.

Zur Bestimmung von MHPG wurden jeweils 20 µl des aufgetauten und abzentrifugierten Homogenats direkt in das HPLC-System injiziert. Bei diesen Messungen wurden die Bedingungen im HPLC-System dahingehend geändert, dass der Fluss der oben angegebenen mobilen Phase auf 0,74 ml/min gesenkt wurde und über eine zweite Pumpe reines Methanol mit einer Flussrate von 0,06 ml/min hinzugemischt wurde.

5. Verhaltenspharmakologische Methoden

5.1 Clonidin-induzierte Sedation

Der Effekt von Clonidin auf die Bewegungsaktivität von Mäusen wurde, wie bei Dziedzicka-Wasylewska et al. (2001) beschrieben, in speziellen Messkäfigen mit einem Durchmesser von 30 cm ermittelt. Die Messeinrichtung bestand aus zwei kreuzförmig angeordneten Lichtschranken mit einem jeweiligen Durchmesser von ca. 2 cm. Die Unterbrechung der Strahlengänge wurde automatisch gezählt.

Zur Messung wurde Versuchstieren in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Clonidin (0,1mg/kg) intraperitoneal injiziert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mit entsprechendem Volumen an physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Nach 30 min wurden die Tiere in die Messkäfige gesetzt und die Anzahl der Strahlengangunterbrechungen nach 45 und 60 min abgelesen.

6. Statistische Auswertung

Bei den angegebenen Mittelwerten handelt es sich um arithmetische Mittel nach:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gleichung 13

$\bar{x}$: Arithmetischer Mittelwert

x_i : Einzelmesswert

n : Anzahl der Messwerte

Als Maß der Streuung ist der Standardfehler des Mittelwerts $s_{\bar{x}}$ angegeben. Er lässt sich anhand folgender Formel ermitteln:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Gleichung 14

Die enthaltene Standardabweichung s ergibt sich aus:

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

Gleichung 15

Mittelwerte von Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten Student-t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft, unter der Voraussetzung, dass sich die Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Diese Voraussetzung wurde mittels F-Test verifiziert. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p \leq 0,05$ wird der Unterschied als signifikant (*) erachtet, bei einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$) als hoch signifikant (**) und bei $p \leq 0,001$ (***) als extrem signifikant kategorisiert.

Die beschriebenen statistischen Methoden sind nur anwendbar, wenn die Messwerte normalverteilt sind. Diese Voraussetzung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-(KS)-Test überprüft. Die Berechnung der zugehörigen p-Werte erfolgte nach Dallal und Wilkinson (1986).

C. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Versuchstiere

1.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Bestimmung des Genotyps der Mäuse erfolgte im Alter von 4 Wochen. Zusätzlich wurden die Genotypen der Versuchstiere versuchsnah bestätigt. Hierzu wurde Blut aus der Schwanzspitze entnommen und die erforderliche DNA mittels FTA-Filtern isoliert (siehe B.3.1, Seite 27).

Die PCR (siehe B.3.11, Seite 40) wurde anhand des unten aufgeführten Temperaturprofils unter Verwendung der Primer mNATEx2s (300 nM) (5'-GCT TTA TGG CAT GTA GTG TGC AC-3'), mNATEx2as (150 nM) (5'-GCT TTC TGC TTG AAC TTG AAG GC-3') und EGFPas (150 nM) (5'-GCC GGA CACGCT GAA CTT GTG3') ausgeführt. Zum Nachweis des NAT^{+/+}-Alleles wurde mit den Primern mNATEx2s und mNATEx2as ein 720 bp großes Fragment amplifiziert, welches das Exon 2 und Abschnitte der flankierenden Introns enthält. Im Fall eines NAT^{-/-}-Alleles wurde mit diesen Primern unter den angegebenen Reaktionsbedingungen kein PCR-Produkt amplifiziert, da hier in das Exon 2 ein ca. 3000 bp großes Konstrukt insertiert ist. Zum Nachweis des NAT^{-/-}-Alleles enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich den Primer EGFPas. Dieser bindet spezifisch an einen Sequenzabschnitt des Konstrukts und führt zur Amplifikation eines 530 bp großen Fragments. Lagen parallel beide Allele bei heterozygoten Mäusen in einem Ansatz vor, wurden beide Fragmente amplifiziert.

Temperaturprofil der PCR:

1. Denaturierung:	94 °C	5 min
2. Denaturierung:	94 °C	1 min
3. Annealing:	58 °C	1 min
4. Kettenverlängerung (Elongation):	72 °C	1 min

Die Schritte 2 - 4 wurden 35x wiederholt.

In Abbildung 10 wird die Lage der Primer anhand einer schematischen Darstellung der partiellen genomischen Sequenz des Noradrenalintransportergens des

Knockout- und des Wildtyp-Allels dargestellt. Die Basenfolge der relevanten Genabschnitte finden sich im Anhang dieser Arbeit (F.1, Seite 123).

Die Produkte wurden im Anschluss an die PCR gelelektrophoretisch (1 % Agarose) aufgetrennt und bei 254 nm detektiert. In Abbildung 11 ist exemplarisch das Ergebnis der Genotypisierung von jeweils zwei $\text{NAT}^{-/-}$, $\text{NAT}^{+/-}$ und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen gezeigt.

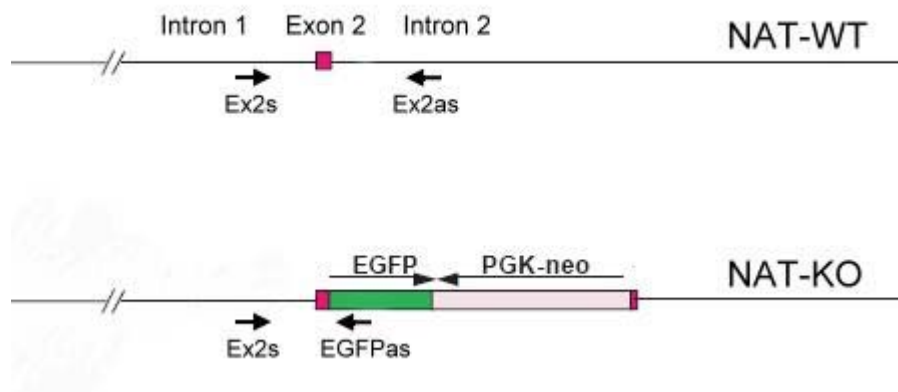


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lage der Primer Ex2s, Ex2as und EGFPas anhand der partiellen, genomischen Sequenzen des Wildtyp- und des Knockout-Allels (WT, KO) des Noradrenalintransporters (NAT).

Im $\text{NAT}^{-/-}$ -Allel ist in das Exon 2 (rot) ein 3000 bp großes Konstrukt insertiert. Dieses enthält für EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) und PGK-neo (Phosphoglycerate Promotor Kinase with Neomycin resistance gene) kodierende Sequenzen (mod. nach Xu et al. 2000).

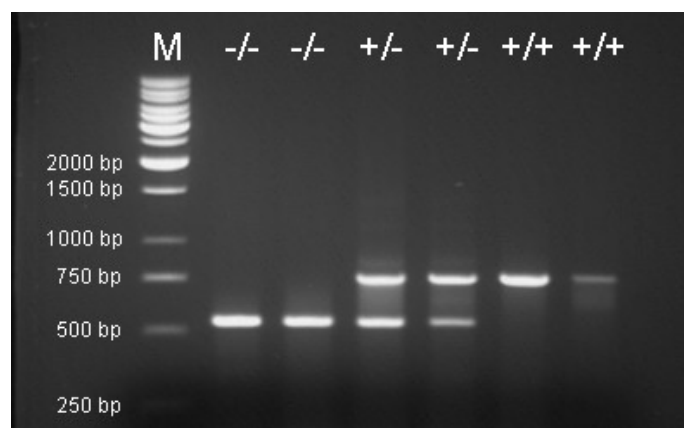


Abbildung 11: Bestimmung des Genotyps mittels PCR

Gezeigt wird ein Agarosegel (1%) mit den PCR-Ergebnissen von jeweils 2 $\text{NAT}^{-/-}$, $\text{NAT}^{+/-}$ und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen (-/-, +/-, +/+) und dem Marker „GeneRuler 1kb DNA Ladder“ (M).

1.2 Körpergewicht und Probengewichte der Versuchstiere

Die Körpergewichte männlicher NAT^{-/-}-Mäuse (24,6g ± 0,59, n=8) waren signifikant (p = 0,002) niedriger, als die von gleichaltrigen (3 Monate) NAT^{+/+}-Mäusen (27,3g ± 0,35, n=8). Dieser Unterschied (10 %) entspricht dem von Haller et al. (2002) publizierten Wert und ist etwas niedriger als der von Xu et al. (2000) publizierte Wert (20 %).

Die Feuchtgewichte der entnommen Hirnareale und Gesamthirne wiesen keine genotypspezifischen Unterschiede auf. Die gemittelten Werte beider Genotypen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Hirnareal	Feuchtgewicht [mg]	Anzahl
Bulbus olf.	22,1 ± 1,2	11
Cortex	195,1 ± 6,1	11
Cerebellum	61,2 ± 1,6	12
Hirnstamm	107,9 ± 3,3	12
Hippocampus	32,7 ± 2,2	12
Hypothalamus	11,0 ± 0,9	11
Striatum	33,8 ± 2,5	12
Gesamthirn	461,4 ± 6,9	10

Tabelle 1: Gewichte von präparierten Hirnproben der Versuchstiere

2. Ergebnisse der molekularbiologischen Versuche

2.1 Optimierung der RNA-Extraktion

Die Integrität und Reinheit der extrahierten RNA ist essenziell für die Bestimmung der Genexpression mittels Microarrays und qPCR. Insbesondere die Abwesenheit von genomischer DNA ist zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit verwendete Extraktionsmethode (siehe B.3.4, Seite 28) trug diesen Anforderungen Rechnung.

So erwies sich der DNase-Verdau direkt auf der Säule als sehr effizient. Im Gegensatz zu dem „klassischen“ DNase-Verdau in einer separaten Reaktion im

Anschluss an die Extraktion, entfiel zudem eine abschließende Aufreinigung zur Entfernung der zugesetzten DNase.

Gleichzeitig gewährleistete dieses Verfahren eine hohe Reinheit der RNAs, so dass die bestimmten 260/280 Ratios (siehe B.3.5, Seite 30) für alle Proben zwischen 1,8 und 2,1 lagen.

Die Integrität der RNAs wurde mittel Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In Abbildung 12 ist exemplarisch ein analytisches Agarosegel (1,5 %) von vier RNAs abgebildet. Die gezeigten RNAs wurden aus dem Gesamthirn von jeweils zwei NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen gewonnen. Die Intaktheit wird durch die diskreten Banden der 18S und 28S rRNA angezeigt.

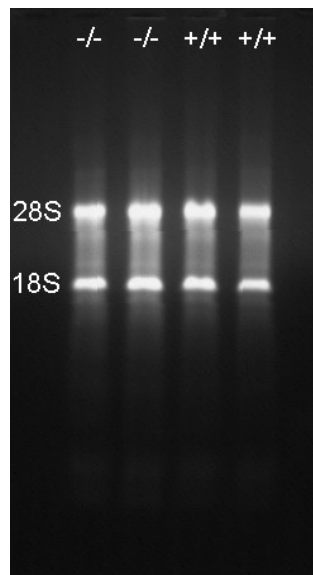


Abbildung 12: Integritätskontrolle der RNA

Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamthirn-RNAs (je 1 µg) von zwei NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen (-/-, +/+) auf einem Agarosegel (1,5%)

Die zur Extraktion der RNA aus Hirnarealen verwendete Methode (siehe B.3.4.2.1, Seite 29) erwies sich als gut reproduzierbar. In Abbildung 13 wird die extrahierte RNA-Menge mit der eingesetzten Gewebemenge korreliert. Aus den unterschiedlichen Gewebeproben (10 - 200 mg) konnten pro mg Feuchtgewicht 6 - 8 µg RNA gewonnen werden. Es sei angemerkt, dass sowohl die maximal eingesetzten Gewebemengen als auch die extrahierten RNA-Mengen die Herstellerangaben (Qiagen) um das 2-fache überstiegen. Die Methode zur

Extraktion von RNA aus dem Gesamthirn (siehe B.3.4.2.2, Seite 29) führte zu einer vergleichbaren Extraktionseffizienz von ca. 6 µg/mg Feuchtgewicht.

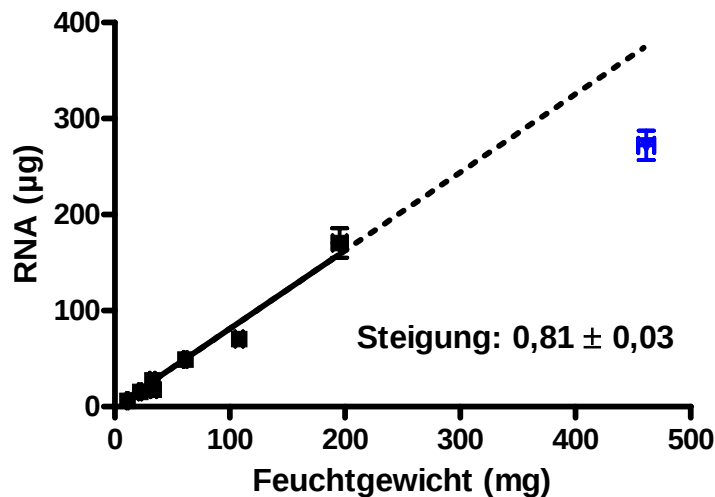


Abbildung 13: Effizienz der RNA-Extraktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Gewebemenge

Dargestellt sind die Ergebnisse von Gesamthirnen ($n = 10$; blau) und Hirnarealen ($n = 12$, schwarz).

2.2 Synthese der cRNA

Der Einsatz einer in vitro transkribierten cRNA als interner Standard eröffnete Möglichkeiten zur Charakterisierung der reversen Transkription (vgl. C.2.3.1.3, Seite 67) und zur Normalisierung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung (vgl. C.2.3.1.4, Seite 70).

Um diese Ziele zu erreichen, war es notwendig, dass die transkribierte cRNA keine Homologie zu den RNA-Sequenzen der untersuchten RNA-Proben der Maus aufwies. Diese Voraussetzung erfüllte eine Sequenz aus der Qualle *Aequorea victoria*, die für das Protein Aequorin kodiert. Für diese Wahl sprach zudem, dass das in den Vektor pcDNA 3.1/ Zeo (+) einklonierte Gen in der Arbeitsgruppe bereits vorlag.

Bei der in vitro Transkription wurde die auf der Vektorsequenz vorhandene T7-Promotor-Bindungsstelle im 5'-Bereich der Aequorinsequenz ausgenutzt (siehe B.3.7, Seite 31). Um ein definiertes Fragment von ca. 600 bp zu erhalten, wurden die Plasmide (1 µg) vor der in vitro Transkription am 3'-Ende der Aequorin

Sequenz mit Xba I (20 U, 3 h, 37 °C) eröffnet. Zur einfacheren gelelektrophoretischen Überprüfbarkeit der Restriktion, erfolgte ein zusätzlicher paralleler Verdau mit Sma I (40 U). Dieses Enzym schnitt die Vektorsequenz im anschließenden 3'-Bereich der Sequenz in einem Abstand von 1105 bzw. 1283 bp zur Xba I-Schnittstelle. Nach der erfolgreichen Transkription wurde die im Ansatz vorhandene Matrizen-DNA verdaut und die cRNA wie unter B.3.7 (Seite 31) beschrieben aufgereinigt. Mit der beschriebenen Methode konnten pro Ansatz ca. 3 µg cRNA synthetisiert werden, wobei 1 µg ca. 3×10^{15} Kopien entspricht. Die cRNA wurde aliquotiert und für maximal 6 Monate bei -80 °C gelagert.

Vor der Verwendung wurde 1 pg der cRNA mittels qPCR auf residuale DNA überprüft. Zum Nachweis der DNA wurden für die Aequorinsequenz spezifische Primer (Tabelle 2, Seite 58) verwendet.

2.3 Genexpressionsanalyse mit qPCR

2.3.1 Charakterisierung und Optimierung der Methode

2.3.1.1 Effizienz und Spezifität der qPCR

Die qPCR stellt eine schnelle und robuste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Die bestimmte Messgröße, der Ct-Wert, ist jedoch keine absolute Messgröße. Da der Wert aber über einen sehr großen Messbereich proportional zum Logarithmus der initialen Konzentration des Zielgens in der Probe ist, können parallel vermessene Proben relativ miteinander verglichen werden. Die Detektion mit dem unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen und der Einsatz universeller Reaktionsbedingungen ermöglichte die flexible Bestimmung verschiedener Zielsequenzen, da die Spezifität allein von der Wahl der Primer determiniert wurde. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der GenBank des NCBI (Tabelle 2).

Zur Optimierung wurden initial PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an sense- und antisense-Primern parallel vermessen. Anhand der Ergebnisse wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Konzentrationen ausgewählt.

Anschließend wurden die für die verschiedenen Primerpaare erhaltenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese überprüft und die erhaltenen PCR-Produkte sequenziert. Diese experimentell ermittelten Sequenzen waren in allen Fällen in Größe und Basenfolge identisch mit den theoretisch erwarteten Angaben (Tabelle

2). Zur permanenten Kontrolle der gebildeten PCR-Produkte wurde im Anschluss an das jeweilige Experiment eine Schmelzkurve aufgenommen (siehe Abbildung 14).

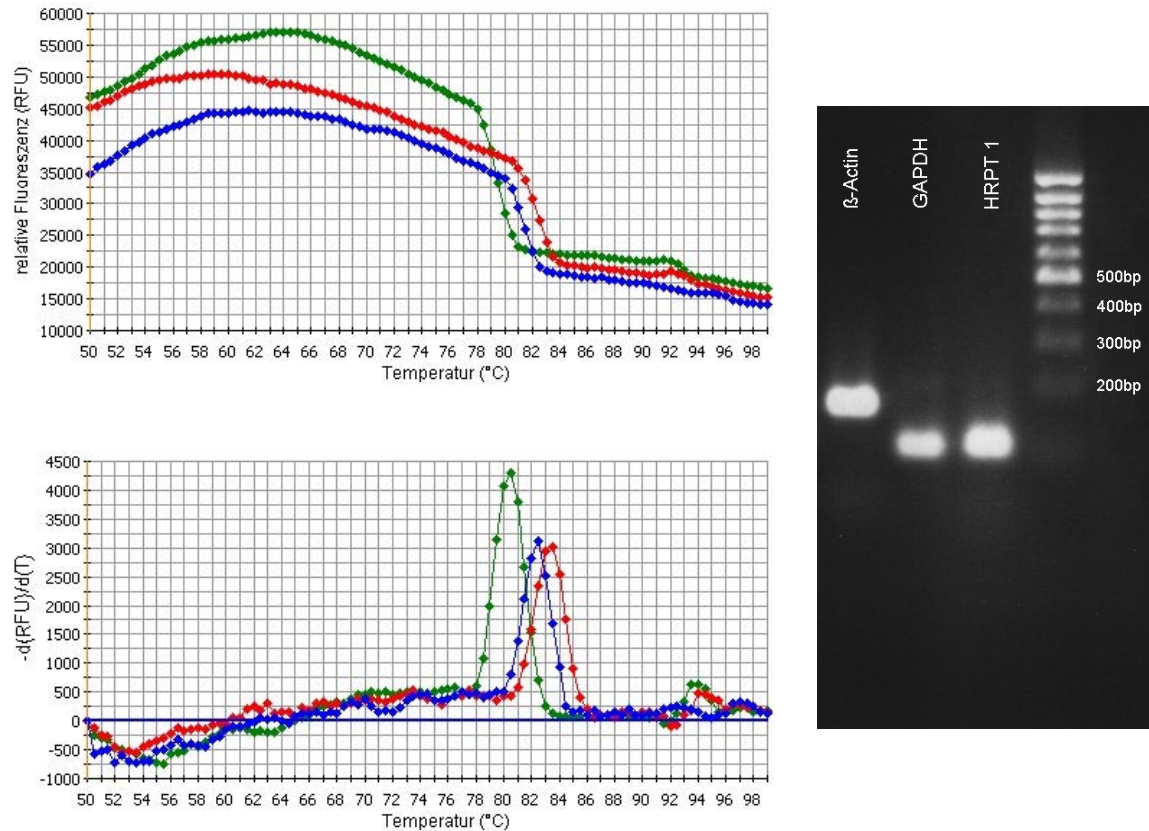


Abbildung 14: Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese und Schmelzkurve der PCR-Produkte

Gezeigt werden die Schmelzkurven der für β -Actin (blau), GAPDH (rot) und HPRT 1 (grün) erhaltenen PCR-Produkte in linearer (A) und integraler (Abszisse) Darstellung (B). Das Agarosegel (1,5%) zeigt die in der Schmelzkurve gezeigten PCR-Produkte und den Größenmarker (GeneRuler 100bp DNA Ladder)

Ergebnisse

Zielgen	SEQUENZ 5' → 3' SENSE ANTISENSE	Konz. im Ansatz (nM)	T _M (°C)	GeneBank Accession Nummer
GAPDH *	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	300 300	60 62	NM 008084
HPRT I *	TGACACTGGCAAAACAATGCA GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	900 300	60 60	BC004686
β-Actin	TCCATCATGAAGTGTGACGT GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	300 300	55 55	NM 007393
r18S *	TTGGAAGTGAAGGCCATGAT TTTCGCTCTGGTCCGCTTTG	300 300	55 59	X00686
α _{1a}	ATGTACTGTTCGAGTCTACGTGGTAG TGGATACGGAGCGTCACTTGCT	900 300	63 62	NM 013461
α _{1b}	GACACCGGCCACAACACATCA GCAGTGTGGAGTTGCTCGAG	900 300	62 61	NM 007416
α _{1d}	AGCACCACGCGCAGCCTCGA GAGCGAGCTGCGCAAGGTGT	300 300	65 63	XM 205022
α _{2a}	CAAGATCAACGACCAGAAGT GTGCGACGCTTGGCGATCT	900 300	55 61	NM 007417
α _{2b}	GCAGAGGTCTCGGAGCTAA GCCTCTCCGACAGAAGATA	900 300	59 57	NM 009633
α _{2c}	GTGCGGCCTCAACGATGA CTTGGCCACGCGGTAGAT	900 300	58 58	NM 007418
β ₁	CGCCATCACGTCGCCCTT GCAGCGGCGCGCTTCGT	300 300	60 62	NM 007419
β ₂	GAGCGACTACAAACCGTCA TCGATGCTGGCTGTGACGCA	900 300	57 61	XM 176880
D ₁	CGAGGTTGAGCAGGACATAC TTCTGATTGAGAGCATTCGAC	300 300	60 56	AK044723
D ₂	CCACCAACTACCTGATAGTCA TGGAAATTCAGCAGGATTCAC	300 300	58 56	NM 010077
D ₃	CGACGTGTGGCGCTCATGA GACACCACCGAAGAGTAAATG	300 300	61 58	NM 007877
DAT	CATCAGAGCATACCTCAGTG GTTATTGGTGAACCTATTGTAAGTGGAGAAG	300 300	57 63	AJ238309
VMAT2	TTCATCGTGTTCTCGCGCT AAGATGCTGTGGAAGCTTTCGGA	300 300	59 60	AJ555564
DBH	GAGAACGCAGATCTCATCAT ACAGGCCATCTCGAGTCCTCT	300 300	55 62	NM 138942
TH	AAACCTACCAGCCGGTGTA GCTAATGGCACTCAGTGCTT	300 300	57 57	NM 009377
Aequorin (A. victoria)	TTGACGAGATGGTCTACAAGGCATC GAAGGCTTCTACAGCATCTTTGTGTCGT	300 300	63 65	L29571

Tabelle 2: Primer für die qPCR

Aufgelistet werden die zugrunde liegenden Referenzsequenzen, die Basenfolgen, Schmelztemperaturen (T_M) und die eingesetzte Konzentration der zur Amplifikation verwendeten Oligonucleotide. Die Sequenzen der mit „*“ gekennzeichneten Primer wurden aus der Datenbank „RTPrimerDB“ (Pattyn et al. 2003) entnommen.

Die Qualität der Quantifizierung ist jedoch nicht alleinig von der Spezifität der Reaktion, sondern auch von ihrer Effizienz abhängig. Eine reproduzierbar hohe Effizienz, die über den gesamten Messbereich konstant ist, garantiert verlässliche Messwerte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Effizienz im Rahmen jedes Experiments mit einer relativen Verdünnungsserie bestimmt (vgl. Abbildung 15). Die hohe Präzision der Methode wurde durch den hohen Korrelationskoeffizienten ($> 0,985$) der nichtlinearen Regressionen in allen Experimenten angezeigt. Die ermittelten Effizienzen waren für die untersuchten Primerpaare nicht signifikant verschieden vom Idealwert 2 (vgl. Tabelle 3).

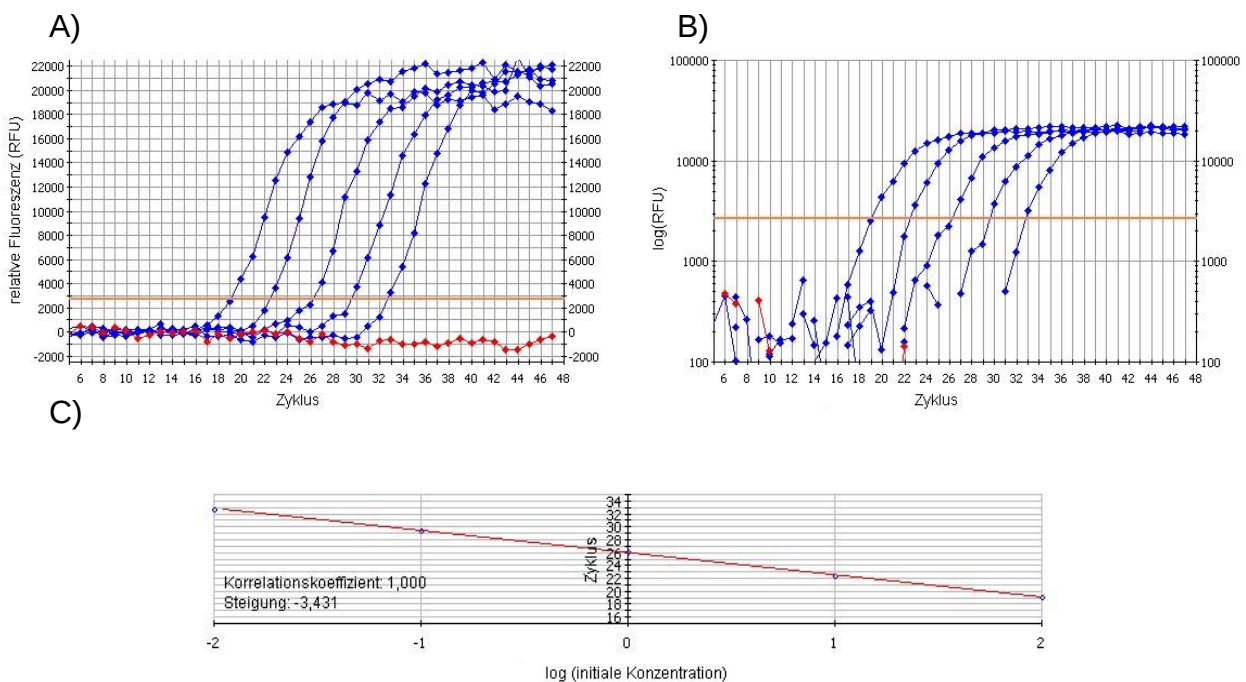


Abbildung 15: Repräsentatives Ergebnis der Bestimmung von β -Actin anhand einer 10-fachen, seriellen cDNA- Verdünnungsreihe

Gezeigt werden für β -Actin erhaltene PCR-Kurven einer seriellen cDNA-Verdünnung (50 ng - 5 pg revers transkribierte RNA) (blau) und einer negativen Kontrolle (rot) und der für die Bestimmung der Ct-Werte gewählte Schwellenwert (orange).

A) Amplifikationskurven

B) Amplifikationskurven mit logarithmischer Skalierung der Abzisse zur Veranschaulichung der exponentiellen Phase.

C) Lineare Regression anhand der ermittelten Ct-Werte und dem Logarithmus der relativen Startkonzentration.

Zielgen	Produktgröße (bp)	Effizienz	
		(E ± SEM)	n
GAPDH	86	2,01 ± 0,01	7
HPRT I	94	2,03 ± 0,01	11
β-Actin	112	1,97 ± 0,05	11
r18S *	100	1,94 ± 0,01	9
α _{1a}	104	2,04 ± 0,03	3
α _{1b}	97	1,93 ± 0,03	3
α _{1d}	153	2,19 ± 0,04	3
α _{2a}	120	1,96 ± 0,04	3
α _{2b}	130	1,83 ± 0,04	4
α _{2c}	116	2,02 ± 0,04	3
β ₁	161	1,92 ± 0,06	4
β ₂	182	2,04 ± 0,04	3
D ₁	209	1,88 ± 0,07	5
D ₂	117	1,88 ± 0,07	3
D ₃	147	1,97 ± 0,04	5
DAT	142	2,02 ± 0,13	5
VMAT 2	167	1,98 ± 0,01	4
DBH	145	1,91 ± 0,07	6
TH	219	1,98 ± 0,04	4
Aequorin (A. victoria)	100	2,04 ± 0,05	3

Tabelle 3: PCR-Effizienzen und Größe der PCR-Produkte

2.3.1.2 Optimierung des Reaktionsvolumens

Laut den Anweisungen der Hersteller von qPCR-Reagenziensets und den entsprechenden Geräten für die qPCR sollte das Reaktionsvolumen zwischen 25 und 50 µl betragen. Eine weitere Reduktion des Ansatzvolumens ermöglicht prinzipiell jedoch eine veritable Reduktion des Reagenzienverbrauchs. Insbesondere kam dies durch die hohe Probenzahl zum Tragen. In parallelen Versuchen mit verschiedenen Ansatzvolumina (25 - 10 µl) führten identische cDNA-Mengen zu deckungsgleichen PCR-Kurven in der essenziellen, exponentiellen Phase und

folglich auch zu identischen Ct-Werten. In der für die Quantifizierbarkeit unbedeutenden Plateauphase stieg das Kurvenniveau in Abhängigkeit vom Reaktionsvolumen an (vgl. Abbildung 16).

Eine exakte Beurteilung der für die unterschiedlichen Volumina entstehenden „wahren“ Fluoreszenzwerte war jedoch nicht möglich, da die Software des iCyclers keinen Zugriff auf die Rohdaten ermöglicht, sondern nur anhand des inneren Standards (Fluoreszein) normalisierte Messwerte zugänglich macht.

Ein Vergleich mit weiteren Detektionssystemen zeigte, dass nicht alle auf dem Markt verfügbaren Geräte die für ein Reaktionsvolumen von 10 µl erforderliche Sensitivität aufweisen. Mit dem iCycler vergleichbare Empfindlichkeiten wiesen z. B. die Geräte der Firma Stratagene (MX3000 und MX3005) und PE Applied Biosystems (Prism 7700) auf. Zu gering war die eines Gerätes der Firma MJ Research (Opticon 1).

Es konnte somit gezeigt werden, daß unter Verwendung eines entsprechend sensitiven Detektionssystems, das Reaktionsvolumen auf 10µl reduziert werden kann, ohne die Quantifizierbarkeit der PCR zu beeinträchtigen.

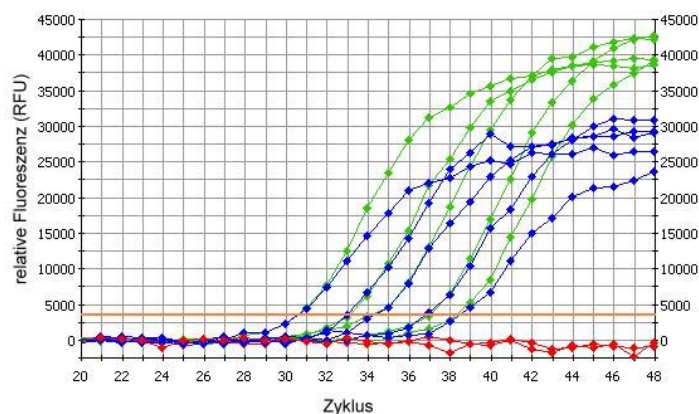


Abbildung 16: Einfluss des Reaktionsvolumens auf die qPCR

Gezeigt wird der Einfluss des Reaktionsvolumens (10 µl, blau; 20 µl, grün) auf den Verlauf der PCR-Kurven einer cDNA Verdünnungsreihe. Amplifiziert wurde jeweils eine Zielsequenz aus dem Dopamintransporter. Die Negativ-Kontrollen und der Schwellenwert zur Ermittlung der Ct-Werte sind in orange bzw. rot dargestellt. Anhand einer linearen Regression der Ergebnisse ergibt sich in beiden Fällen eine 82% PCR-Effizienz und ein Korrelationskoeffizient von 0,999.

2.3.1.3 Charakterisierung der reversen Transkription

Sowohl die qPCR als auch Microarrays stellen sehr präzise Messmethoden zur relativen mRNA-Quantifizierung dar. Um diese Methoden zur Bestimmung der Genexpression auf RNA-Ebene einzusetzen, muss die RNA jedoch zuvor revers transkribiert werden. Somit hat dieser Schritt einen direkten Einfluss auf die Aussage der Analyse. Eine einfache und präzise Kontrolle dieser Reaktion ist z. B. mittels qPCR möglich.

Zur Optimierung der in die Reaktion eingesetzten RNA-Menge wurden in parallelen Ansätzen zwischen 0,1 und 4 µg RNA aus dem Gesamthirn von Mäusen unter Anwendung der auf Seite 31 (B.3.8) beschriebenen Reaktionsbedingungen umgeschrieben. Vor der Reaktion wurden pro µg eingesetzter RNA 1×10^6 Kopien der unter C.2.2 (Seite 60) beschriebene cRNA zugesetzt. Anschließend wurden exemplarisch die cDNAs von GAPDH und der zugesetzten cRNA (Aequorin) mittels qPCR quantifiziert. Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse eines exemplarischen Versuchs veranschaulichen die lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge und des bestimmten Ct-Werts beider Gene. Die lineare Korrelation der Versuchsergebnisse ($n = 4$) ergab Effizienzen (GAPDH: $2,2 \pm 0,3$; Aequorin $2,1 \pm 0,1$; $n = 4$), die sich nicht signifikant von den Effizienzen der zugrunde liegenden PCRs unterscheiden (vgl. Tabelle 3, Seite 65). Es machte somit im betrachteten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Unterschied, ob man die RNA verdünnt oder die resultierende cDNA. Dies bedeutet, dass im untersuchten Messbereich eine Veränderung der eingesetzten RNA-Menge zu einer analogen Änderung der transkribierten cDNA-Menge führte.

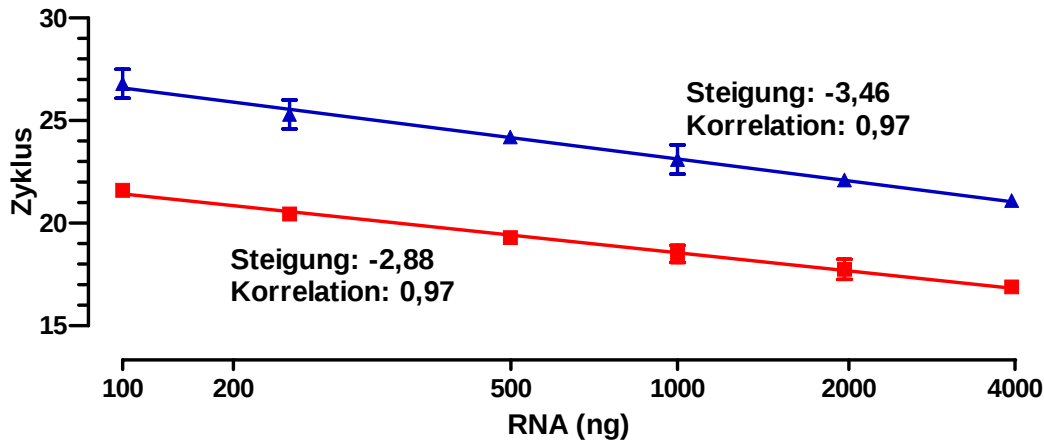


Abbildung 17: Representative Bestimmung des linearen Bereichs der reversen Transkription mittels qPCR

In parallelen Ansätzen wurden 100 ng bis 4 µg, mit cRNA (Aequorin) versetzter (1×10^6 Kopien / µg RNA) RNA in cDNA umgeschrieben. Exemplarisch wurden die cDNAs von GAPDH (rot) und Aequorin (blau) an 2 % des Ansatzes mit qPCR quantifiziert. Dargestellt wird eine lineare Regression der bestimmten Ct-Werte und dem Logarithmus der eingesetzten RNA-Mengen.

Ferner galt es zu prüfen, ob die anhand der cDNAs bestimmten relativen Expressionsunterschiede der Zielsequenzen die relativen Expressionsunterschiede in den RNA-Proben widerspiegeln. Um dies zu überprüfen wurden in parallelen Ansätzen jeweils gleiche Mengen an Gesamthirn-RNA (1 µg) mit unterschiedlichen Mengen der cRNA (5×10^2 - 5×10^6 Kopien) versetzt. Diese unterschiedlichen Konzentrationen standen für ein unterschiedlich stark exprimiertes Gen in den verschiedenen Proben. Die Quantifizierung erfolgte im Anschluss an die reverse Transkription anhand der erhaltenen cDNAs. Die Ergebnisse zeigten, dass die relative Quantifizierung mit den Relationen der eingesetzten cRNA über den gesamten Messbereich korrelierten (vgl. Abbildung 18). In Zahlen entspricht dies einer mittleren Effizienz von $2,03 \pm 0,05$ ($n = 3$), die wiederum der ermittelten PCR-Effizienz entspricht (vgl. Tabelle 3, Seite 65). Es konnte somit gezeigt werden, dass die in der cDNA vorliegenden Konzentrationsverhältnisse denen innerhalb der revers transkribierten RNA entsprechen.

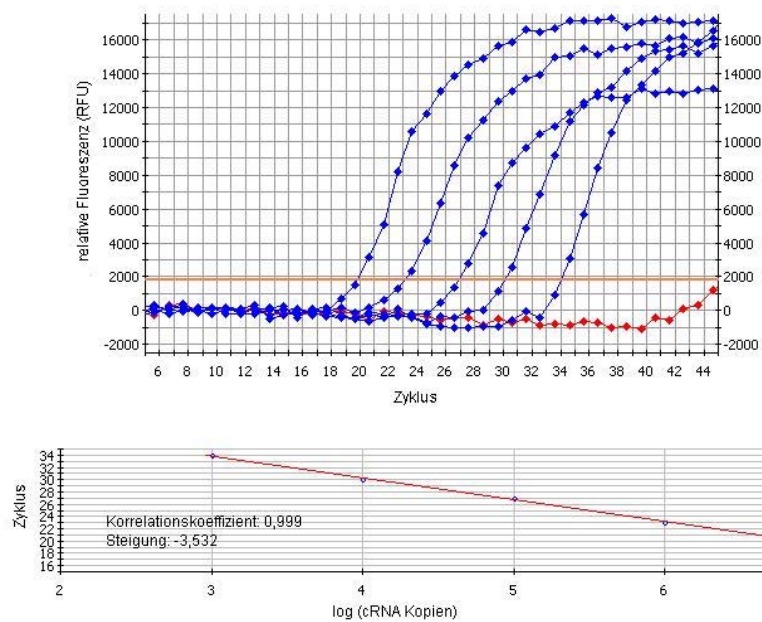


Abbildung 18: Repräsentatives Ergebnis der Bestimmung einer 10-fachen, seriellen cRNA-Verdünnungsreihe

Gezeigt werden die für die revers transkribierte cRNA (Aequorin, blau) erhaltenen PCR-Kurven und die einer negativen Kontrolle (rot). Der für die Bestimmung der Ct-Werte gewählte Schwellenwert ist in Orange eingezeichnet. Die cRNA wurde seriell (10-fach) verdünnt (5×10^4 - 5×10^8 Kopien) und unter Zusatz von jeweils 1 μ g Gesamthirn-RNA revers transkribiert. Pro PCR-Ansatz wurden, bezogen auf die Gesamthirn-RNA, 20 ng eingesetzt. Dies entsprach 10^3 - 10^7 Kopien der eingesetzten cRNA.

oberer Teil: Amplifikationskurven

unterer Teil: Lineare Regression anhand der ermittelten Ct-Werte und dem Logarithmus der initialen cRNA-Kopienzahl.

2.3.1.4 Normalisierung der Expressionsdaten

Die zur Bestimmung der relativen Expression erhobenen Messwerte bedurften der Normalisierung, denn eine genaue experimentelle Bestimmung der in die Messung eingegangenen cDNA-Mengen war nicht möglich. Da die Normalisierung somit maßgeblich an der Validität der Ergebnisse beteiligt ist, wurden initial verschiedene interne Standards verglichen. Es kamen sowohl in vitro transkribierte cRNAs, die den RNA-Proben in bekannter Konzentration zugesetzt wurden, als auch die in vivo vorhandenen RNAs von endogenen Referenzgenen zum Einsatz. Die Verwendung einer cRNA als interner Standard für die qPCR war bis zur Darlegung dieser Arbeit ein lediglich theoretisch diskutiertes Verfahren (Huggett et al. 2005).

Die Verwendung von endogenen Referenzgenen ist das in der Literatur gebräuchlichste Verfahren. Es birgt jedoch die Gefahr einer systematischen Verfälschung der Messwerte, falls diese unter den gegebenen Versuchsbedingungen reguliert würden (Vandesompele et al. 2002). Um einen solchen systematischen Fehler zu vermeiden, galt es die Stabilität der Expression verschiedener Referenzgene zu prüfen.

Hierzu wurden die Ergebnisse der Zielgene separat, auf der Basis der Messdaten der potenziellen Referenzgene bestimmt (vgl. B.3.10.3, Seite 34). Ein Vergleich der normalisierten Ergebnisse erlaubte Rückschlüsse auf die Stabilität der verwendeten Referenzgene. Führt die Normalisierung anhand verschiedener Gene aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen zum gleichen Ergebnis, wurden diese Gene als stabil exprimiert betrachtet.

So hatte eine Wahl zwischen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus der Glykolyse, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT 1) aus dem Salvage-Pathway oder β -Actin, einem Protein des Zytoskeletts, als internem Standard, keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der mRNAs aus Hirnarealen von $\text{NAT}^{-/-}$ und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen. In Abbildung 19 werden diese Ergebnisse repräsentativ für den D_1 -Rezeptor veranschaulicht.

Alternativ wurde die cRNA der für Aequorin kodierenden Sequenz (siehe C.2.2, Seite 60), die keine Homologie zu den Sequenzen der Maus aufweist, als interner Standard verwendet. Hierzu wurden die RNA-Proben photometrisch quantifiziert und vor der reversen Transkription mit der cRNA versetzt (10^6 Kopien / μg RNA).

Die revers transkribierte cRNA wurde parallel zu den Zielgenen und den Referenzgenen mit qPCR quantifiziert und die Messwerte zur Normalisierung verwendet. Die normalisierten Ergebnisse der Zielgene unterschieden sich nicht signifikant von denen, die anhand der Messwerte der Referenzgene bestimmt wurden (siehe Abbildung 19).

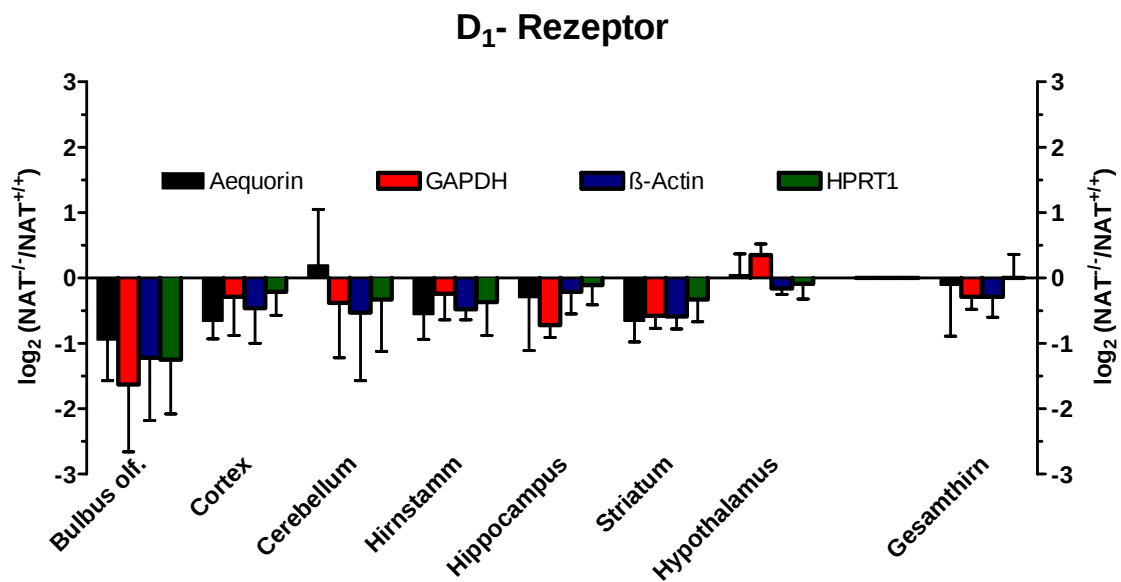


Abbildung 19: Einfluss verschiedener interner Standards auf die Ergebnisse der relativen mRNA-Expression des D₁-Rezeptors in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Extrahierte RNA wurde mit cRNA (Aequorin) versetzt (10^6 Kopien / μ g RNA), revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der cRNA und der endogenen mRNAs für β -Actin, GAPDH und HPRT1 normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+}]$) von 4 Tieren beider Genotypen.

Ribosomale 18S-rRNA wurde hingegen nicht zur Normalisierung eingesetzt, da die Expression im Hirnstamm und im Hippocampus der NAT^{-/-}-Maus um den Faktor 8 bzw. 4 ($n = 4$; $p < 0,01$) höher war als im entsprechenden Areal der NAT^{+/+}-Maus. Tendenziell, aber nicht signifikant ($p = 0,08$; $n = 3$) war dies auch im Bulbus olfactorius. (siehe Abbildung 20) der Fall.

Somit kann abschließend festgestellt werden, dass beide Strategien eine verlässliche Normalisierung der relativen Expressionsdaten der Zielgene ermöglichten. Aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes wurde eine Normalisierung anhand der stabil exprimierten Referenzgene (GAPDH, HPRT 1, β -Actin) einer Normalisierung anhand der zugesetzten cRNA vorgezogen. Der parallele Einsatz von drei Referenzgenen erhöhte zudem die Stabilität der Normalisierung.

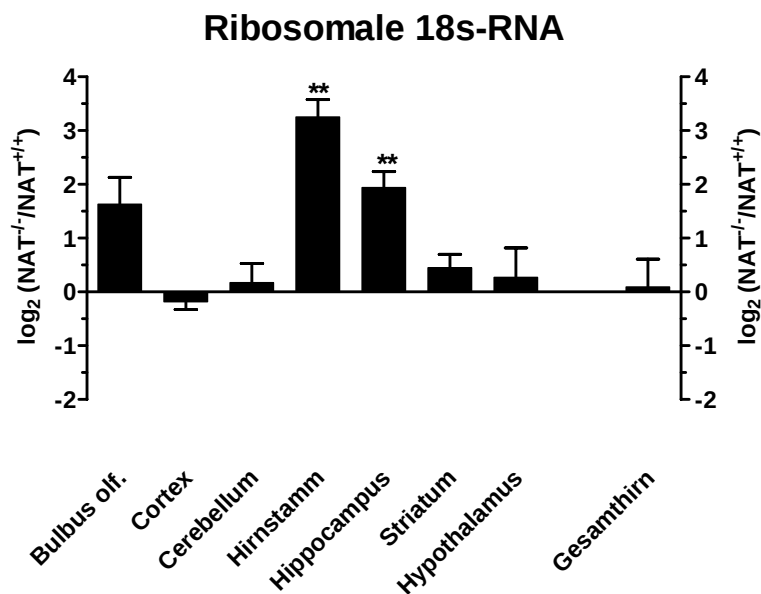


Abbildung 20: Relative Expression ribosomaler 18s-rRNA in Hirnregionen und im Gesamthirn von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+}]$) von 3 Tieren beider Genotypen. Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

2.3.1.5 Normalverteilung der relativen Expressionsdaten

Die Berechnung der relativen mRNA-Expression aus den Ergebnissen der qPCR erfolgte anhand der Gleichung 9 (Seite 35). Abschließend wurden die erhaltenen Werte zur Basis 2 logarithmiert. Aus theoretischer Sicht sollten diese Werte normalverteilt sein (vgl. B.3.10.3, Seite 34).

Die Überprüfung dieser Annahme erfolgte exemplarisch anhand der für β -Actin bestimmten Daten von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen. Da β -Actin in allen Proben stabil exprimiert wurde (vgl. C.2.3.1.4, Seite 70), gingen alle Ergebnisse gemeinsam in die statistische Auswertung ein. Zur Normalisierung wurde jeweils auf die Messwerte von GAPDH und HPRT1 zurückgegriffen.

Der Test nach Kolmogorov-Smirnov (KS-Test) ergab, dass die Verteilung der nicht logarithmierten Werte aus Gleichung 9 (Seite 35) signifikant ($P < 0,0001$; $n = 201$) von einer Normalverteilung abweicht. Die logarithmierten Ergebnisse waren hingegen erwartungsgemäß normalverteilt ($p > 0,05$; $n = 201$). Aufgrund dieses Resultats wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand von Gleichung 9 berechnete Werte zur Basis 2 logarithmiert. Es sei angemerkt, dass diese logarithmierten Verhältniszahlen die gleiche Dimension wie $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (Gleichung 10, Seite 35) aufweisen. Somit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit den Befunden von Livak und Schmittgen (2001), die eine Normalverteilung für $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (Gleichung 10, Seite 35) postulieren.

2.3.2 Vergleich der Expressionsstärke der Zielgene im Gehirn

Die relative mRNA-Expression der untersuchten Zielgene im Gesamthirn von $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen wurde mit qPCR bestimmt. Um die erhaltenen Ct-Werte direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Messungen aller Gene anhand von Aliquoten derselben cDNAs vorgenommen. Zusätzlich wurde der Fluoreszenzschwellenwert bei der Datenanalyse konstant gehalten. Die in der Tabelle 4 dargestellten, gemittelten Ct-Werte ($n = 8$) beziehen sich jeweils auf 50 ng revers transkribierte Gesamthirn-RNA.

Anhand der erhaltenen Ct-Werte wurden die Gene als extrem hoch (Ct-Wert < 15), hoch (Ct-Wert 15 - 25), moderat (Ct-Wert 25 - 30), niedrig (Ct-Wert 30 - 35) oder extrem niedrig exprimiert (Ct-Wert > 35) kategorisiert (siehe Tabelle 4). Diese recht „grobe“ Einteilung der Expressionsstärke trägt der systematischen Unsicherheit der Bestimmung Rechnung, da die Messwerte prinzipiell sequenz-spezifischen Einflüssen unterliegen. So könnten z. B. Sekundärstrukturen bestimmter RNAs die Effizienz der reversen Transkription beeinflussen.

Trotz dieser Einschränkung konnten wichtige Erkenntnisse über die RNA-Expression der Zielgene im Gehirn anhand dieser Daten erlangt werden.

So wurde ermittelt, dass die mRNAs von $\alpha_{1A,B,D}$ -Adrenozeptoren (α AR) und von $\alpha_{2A,C}$ AR in vergleichbarer, moderater Dichte exprimiert werden.

Die mRNAs der α_{2B} AR wurden hingegen in sehr viel geringerer Dichte nachgewiesen. Ein Vergleich der Ergebnisse der α_{2B} AR-mRNAs mit denen der α_{2A} - und α_{2C} AR-Subtypen zeigt, dass erstgenannte nahezu 250-fach niedriger exprimiert werden.

Zielgen	(Ct-Wert $\pm$ SEM; n = 8)	Kategorie
α_{1a}	27,5 $\pm$ 0,7	moderat
α_{1b}	26,9 $\pm$ 0,4	moderat
α_{1d}	24,1 $\pm$ 0,5	moderat
α_{2a}	26,6 $\pm$ 0,3	moderat
α_{2b}	35,2 $\pm$ 0,5	niedrig - extrem-niedrig
α_{2c}	26,9 $\pm$ 0,3	moderat
β_1	25,3 $\pm$ 0,4	moderat
β_2	31,0 $\pm$ 0,4	schwach
D1	28,5 $\pm$ 0,3	moderat
D2	28,4 $\pm$ 0,5	moderat
D3	41,7 $\pm$ 0,6	extrem niedrig
DAT	33,9 $\pm$ 0,5	schwach
VMAT 2	29,7 $\pm$ 0,5	moderat - niedrig
DBH	30,9 $\pm$ 0,8	niedrig
TH	30,7 $\pm$ 0,4	niedrig
GAPDH	*	hoch
HPRT I	25,4 $\pm$ 0,5	moderat
β -Actin	19,2 $\pm$ 0,4	hoch
r18S *	9,8 $\pm$ 0,2	extrem hoch

Tabelle 4: mRNA-Expressionsstärke im Gesamthirn von Mäusen

Gezeigt werden mit qPCR erhobene Ct-Werte. Die Werte beziehen sich auf 50 ng revers transkribierte RNA aus dem Gesamthirn von Mäusen.

* GAPDH wurde nicht vermessen. Die in weiteren Versuchen bestimmten Ct-Werte entsprachen denen von β -Actin.

Einen vergleichbaren Expressionsunterschied wiesen auch die betrachteten mRNAs der β -Adrenozeptoren (β AR) auf. Hier wurde die des β_2 -Adrenozeptors schwach und die des β_1 ARs moderat exprimiert.

Für die mRNAs der Dopaminrezeptoren D_1 und D_2 wurde eine vergleichbare moderate Expression bestimmt. Die RNA Konzentration des D_3 -Rezeptors ist hingegen extrem niedrig und befindet sich im Bereich der Nachweisgrenze der Methode. Aus diesem Grund wurde der D_3 -Rezeptor von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

In die Kategorie der Gene mit einer eher schwachen RNA-Expression fallen auch der Dopamintransporter (DAT), der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2), die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) und die Tyrosinhydroxylase (TH).

2.3.3 Durch den Knockout des Noradrenalintransporters induzierte Regulation der Zielgene

Die durch die Deletion des Noradrenalintransporters hervorgerufenen Veränderungen der mRNA-Expression der Zielgene aus dem noradrenergen und dopaminergen System wurde in den Hirnregionen Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Hypothalamus, Striatum und Gesamthirn quantifiziert. Die aus jeweils 2 μ g extrahierter Gesamt-RNA resultierenden cDNAs wurden mit qPCR vermessen. Die für den NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Genotyp erhaltenen Werte wurden in Relation zueinander gesetzt und anhand der Messwerte der Referenzgene (β -Actin, GAPDH und HPRT1) normalisiert (vgl. B.3.10.3, Seite 34).

Auf Gesamthirnebene hatte die Deletion des Noradrenalintransporters keinen signifikanten Einfluss auf die RNA-Expression der untersuchten Zielgene.

Die Analyse der extrahierten RNA aus verschiedenen Hirnarealen zeigte hingegen, dass die mRNAs einiger Zielgene hirnregionspezifisch reguliert werden. Wie aus Abbildung 21 ersichtlich wird, führt der Knockout des Noradrenalintransporters im Hirnstamm zu einer signifikanten ($p < 0,05$), 4-fachen Erhöhung der mRNA-Expression des α_{1B} -AR. In den weiteren betrachteten Hirnregionen wurden hingegen keine signifikanten Änderungen nachgewiesen. Nicht signifikant reguliert wurde auch die Expression der α_{1A} - und α_{1D} -AR (Tabelle 5).

Wie aus Abbildung 22 erkenntlich wird, induziert der NAT-Knockout die mRNA-Expression des α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptors im Hirnstamm 4-fach ($p < 0,001$).

Für den α_{2C} -Subtyp wurde des Weiteren eine signifikante ($p < 0,05$), 2-fache Erhöhung im Striatum und Hippocampus nachgewiesen. Die schwach exprimierte mRNA des α_{2B} -Adrenozeptors (vgl. Tabelle 4, Seite 74) wurde in ihrer Expression durch den Knockout nicht beeinflusst (Tabelle 6).

Die Deletion des NAT hatte in keiner der examinieren Hirnregionen einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expressionen der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (Tabelle 7), der Dopaminrezeptoren $D_{1,2}$ (Tabelle 8), der Dopamin- β -Hydroxylase, der Tyrosinhydroxylase, des Dopamintransporters und des vesikulären Monoamintransporters 2 (Tabelle 9).

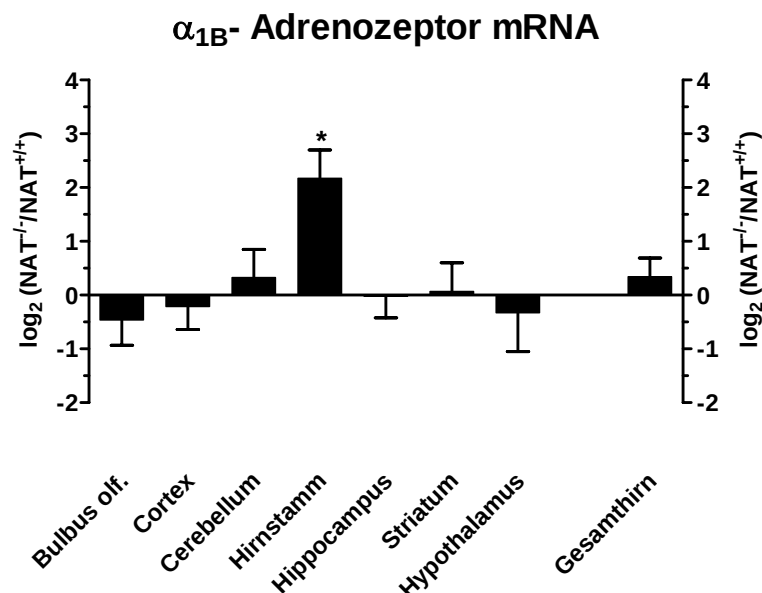


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression des α_{1B} -Adrenozeptors in Hirnregionen und im Gesamthirn von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+}]$) von 5 Tieren beider Genotypen. Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

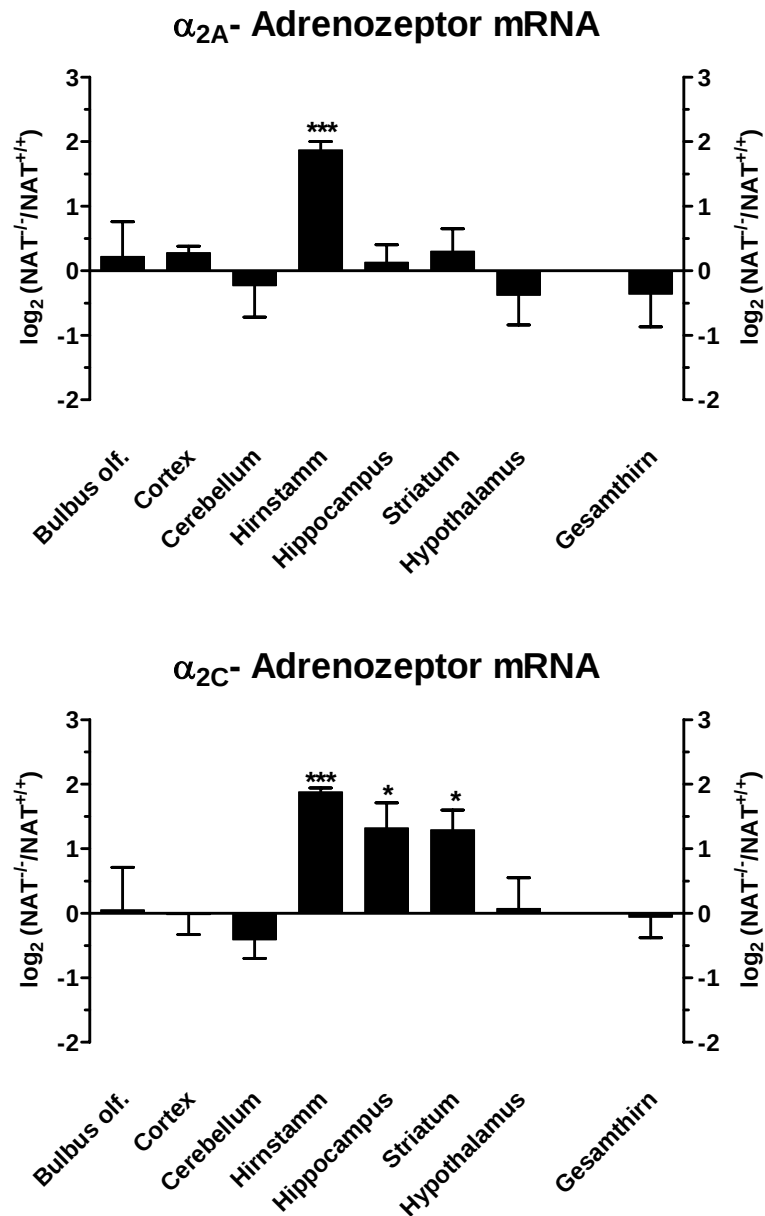


Abbildung 22: Relative mRNA-Expression der α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptorsubtypen in Hirnregionen und im Gesamthirn von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+}]$) von 5 Tieren beider Genotypen. Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

Ergebnisse

	α_{1A} -AR (n = 5)	α_{1B} -AR (n = 5)	α_{1D} -AR (n = 7)
Bulbus olf.	-0,06 ± 0,49	-0,46 ± 0,47	0,32 ± 0,25
Cortex	-0,25 ± 0,17	-0,21 ± 0,43	-0,33 ± 0,32
Cerebellum	-0,26 ± 0,51	0,33 ± 0,52	-0,01 ± 0,49
Hirnstamm	-0,47 ± 0,41	2,17 ± 0,53	0,20 ± 0,20
Hippocampus	-0,48 ± 0,30	-0,02 ± 0,40	0,28 ± 0,35
Striatum	-0,05 ± 0,69	0,07 ± 0,53	-0,19 ± 0,86
Hypothalamus	-0,11 ± 0,22	-0,33 ± 0,72	0,06 ± 0,36
Gesamthirn	0,05 ± 0,45	0,34 ± 0,35	0,13 ± 0,24

Tabelle 5: Relative mRNA-Expression der α_1 -Adrenozeptorsubtypen in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der Gene β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+}]$) von (n) Tieren beider Genotypen.

	α_{2A} -AR (n = 5)	α_{2B} -AR (n = 7)	α_{2C} -AR (n = 5)
Bulbus olf.	0,22 ± 0,54	0,03 ± 0,39	0,05 ± 0,66
Cortex	0,28 ± 0,10	-0,05 ± 0,29	-0,02 ± 0,31
Cerebellum	-0,23 ± 0,49	0,57 ± 0,25	-0,41 ± 0,29
Hirnstamm	1,87 ± 0,13	-0,03 ± 0,62	1,88 ± 0,06
Hippocampus	0,13 ± 0,27	0,40 ± 0,16	1,32 ± 0,39
Striatum	0,30 ± 0,35	0,18 ± 0,45	1,29 ± 0,31
Hypothalamus	-0,38 ± 0,46	0,41 ± 0,25	0,07 ± 0,48
Gesamthirn	-0,36 ± 0,51	-0,27 ± 0,2	-0,06 ± 0,32

Tabelle 6: Relative mRNA-Expression der α_2 -Adrenozeptorsubtypen in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 5 (Seite 78)

	β_1 -AR (n = 5)	β_2 -AR (n = 5)
Bulbus olf.	0,03 ± 0,24	0,61 ± 0,71
Cortex	-0,57 ± 0,23	0,28 ± 0,31
Cerebellum	-0,02 ± 0,46	0,59 ± 0,49
Hirnstamm	0,34 ± 0,49	0,48 ± 0,22
Hippocampus	0,27 ± 0,14	0,40 ± 0,42
Striatum	0,67 ± 0,44	0,61 ± 0,33
Hypothalamus	-0,01 ± 0,73	0,79 ± 0,57
Gesamthirn	0,03 ± 0,25	-0,09 ± 0,38

Tabelle 7: Relative mRNA-Expression der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 5 (Seite 78)

	D ₁ (n = 9)	D ₂ (n = 5)
Bulbus olf.	-0,81 ± 0,6	0,34 ± 1,12
Cortex	-0,32 ± 0,29	-0,49 ± 0,42
Cerebellum	0,12 ± 0,28	-0,84 ± 0,54
Hirnstamm	0,11 ± 0,43	-0,19 ± 0,18
Hippocampus	-0,36 ± 0,21	-0,51 ± 0,76
Striatum	-0,14 ± 0,2	0,33 ± 0,47
Hypothalamus	0,56 ± 0,24	0,20 ± 0,39
Gesamthirn	-0,15 ± 0,3	0,11 ± 0,23

Tabelle 8: Relative mRNA-Expression der D₁- und D₂-Dopaminrezeptoren in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 5 (Seite 78)

Ergebnisse

	DBH (n = 7)	TH (n = 7)	DAT (n = 9)	VMAT2 (n = 9)
Bulbus olf.	0,49 ± 0,19	0,25 ± 0,38	0,26 ± 0,4	-0,34 ± 0,78
Cortex	-0,61 ± 0,42	0,38 ± 0,41	-0,48 ± 0,9	0,23 ± 0,33
Cerebellum	-0,38 ± 0,59	0,56 ± 0,36	-0,62 ± 1,3	-0,42 ± 0,41
Hirnstamm	0,33 ± 0,21	-0,19 ± 0,34	-0,46 ± 0,33	0,09 ± 0,20
Hippocampus	-0,27 ± 0,21	0,45 ± 0,30	1,11 ± 0,69	0,44 ± 0,28
Striatum	0,83 ± 0,84	0,07 ± 0,49	-1,11 ± 1,5	-0,23 ± 0,38
Hypothalamus	-0,14 ± 0,73	-0,02 ± 0,64	0,00 ± 0,85	0,24 ± 0,35
Gesamthirn	0,21 ± 0,28	0,23 ± 0,29	0,03 ± 0,31	0,14 ± 0,17

Tabelle 9: Relative mRNA-Expression der Dopamin-β-hydroxylase (DBH), der Tyrosinhydroxylase (TH), des Dopamintransporters (DAT) und des vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT2) in Hirnregionen und im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/-}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 5 (Seite 78)

2.4 Genexpressionsanalyse mit der Microarray-Technologie

Zur Identifizierung neuer Gene, die durch die Deletion des Noradrenalintransporters in ihrer Transkriptionsaktivität reguliert werden, wurde die Microarray-Technologie genutzt. Diese Technologie ermöglichte die parallele Bestimmung der relativen Genexpression von bis zu 9853 unterschiedlichen Genen in einem Experiment. Hierzu wurde für jeden Microarray Gesamt-RNA (80- 100 µg) aus dem Hirn von einer NAT^{-/-}- und einer NAT^{+/+}-Maus (siehe B.3.4.2.2, Seite 29) eingesetzt. Diese wurden separat unter Einbau der Cy3 oder Cy5 markierten Nukleotide revers transkribiert, wobei in darauffolgenden Experimenten die Zuordnung der Farbstoffe zu den Genotypen gewechselt wurde.

Die vereinigten cDNAs wurden gegen den Array hybridisiert. Hierbei binden die cDNAs an die komplementären Oligonukleotide, die auf dem Array immobilisiert vorliegen. Anschließend wurde der Array gewaschen, um nicht gebundene, markierte Nukleinsäuren zu entfernen (siehe B.3.13.2, Seite 44). Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte separat für beide Farbstoffe mittels eines konfokalen Arrayscanners (B.3.13.3, Seite 46). In Abbildung 23 ist exemplarisch ein eingescannter Microarray dargestellt. In dieser Darstellung wurden die Bilder beider Farbstoffe übereinander gelagert. Aufgrund der gewählten Fehlfarbdarstellung sind Spots mit einer hohen Cy3-Bindung rot und solche mit einer hohen Cy5-Bindung grün. Spots mit vergleichbarer Intensität beider Farbstoffe erscheinen gelb. Da die aufgetragenen Spots nur jeweils für ein bestimmtes Gen spezifische Sequenzen aufweisen, kann jedem Spot eine bestimmte Referenzsequenz zugeordnet werden.

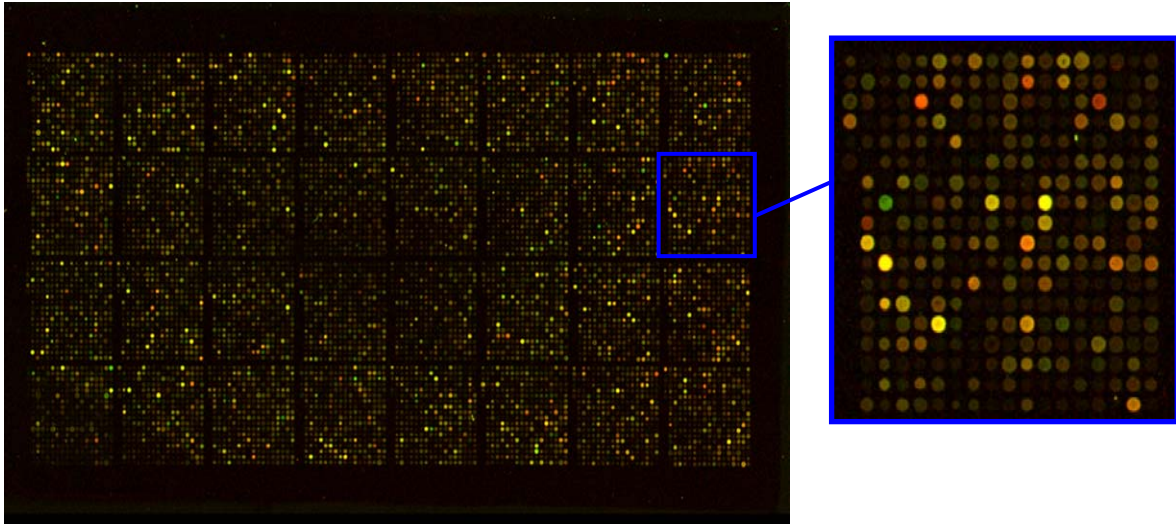


Abbildung 23: Darstellung eines eingescannten Microarrays

Hybridisiert wurden mit Cy3 bzw. Cy5 markierte cDNAs aus Gesamthirn-RNA von $\text{NAT}^{+/+}$ - und $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen. Den Farbstoffen Cy3 und Cy5 wurden die Fehlfarben Rot und Grün zusortiert. Der Array wurde mit der maximal verwendeten Expositionszeit eingescannt.

2.4.1 Analyse der Daten

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden nur Spots herangezogen, deren Signalintensitäten für beide Farbstoffe signifikant oberhalb des Rauschniveaus lagen (B.3.13.3, Seite 46). Nach der Anwendung dieses Kriteriums verblieben aus den drei Experimenten zwischen 8059 und 9593 auswertbare Spots (siehe Tabelle 1, Seite 58). Für jeden Spot wurde anschließend separat das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten berechnet. Dies entspricht jedoch nicht direkt den relativen Expressionsunterschieden zwischen den markierten RNA-Populationen, da zum Ausgleich der unterschiedlichen Markierungs- und Detektionseffizienzen der Farbstoffe und der abweichenden Konzentrationen der RNAs die Messwerte normalisiert werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Normalisierung anhand der mittleren Signalintensität vorgenommen, wenngleich eine Normalisierung anhand von acht der neun in Quadruplikaten bestimmten putativen Referenzgenen keinen signifikanten Unterschied hervorgerufen hätte. Diese Methode war jedoch aufgrund der vergleichsweise geringeren Anzahl von Messpunkten mit einer größeren Unsicherheit behaftet. Einen signifikanten Unterschied hätte allerdings eine Normalisierung anhand des neunten Referenz-

gens, dem ribosomalen s29 Protein, hervorgerufen, da es von der Deletion des Noradrenalintransporters induziert wird (vgl. Tabelle 14, Seite 89).

In allen Versuchen war die gemessene Einbaurrate von Cy3-dCTP höher als die von Cy5-dCTP. Der Unterschied begründet sich wahrscheinlich in der größeren Molekülgröße des Farbstoffs Cy5 (vgl. Abbildung 9, Seite 44). Zur weiteren Auswertung wurden die Werte logarithmiert (Basis 2), um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen. In Abbildung 24 wird exemplarisch die Verteilung der Ergebnisse des in Abbildung 23 dargestellten Microarrays mit und ohne Normalisierung gezeigt.

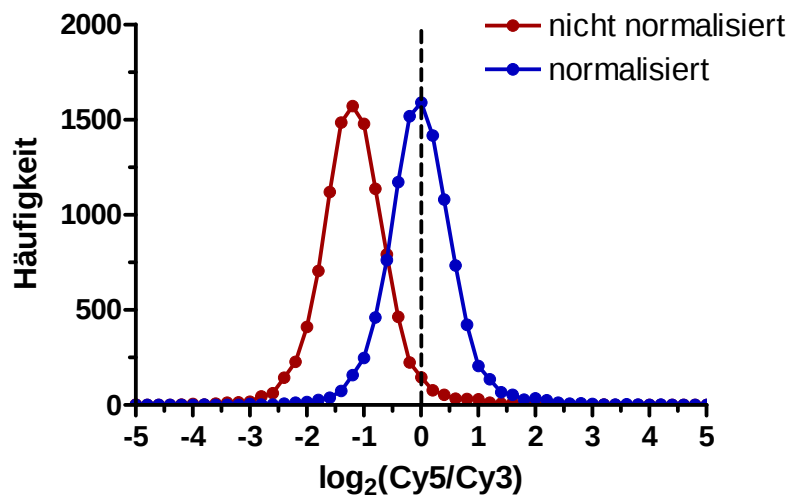


Abbildung 24: Verteilung der normalisierten und nicht normalisierten Ergebnisse des in Abbildung 23 gezeigten Microarrays

Mittels eines „Scatter Plots“ (vgl. Abbildung 25) wurde überprüft, ob diese Normalverteilung über den gesamten dynamischen Messbereich zutrifft, oder ob in einem bestimmten Messbereich der Fluoreszenzintensitäten die Ergebnisse systematisch beeinflusst werden und somit Fehlinterpretationen verursachen. Für diese Auftragung wurde separat für beide Messkanäle jeder Messwert ins Verhältnis zur mittleren Fluoreszenzintensität gesetzt und dieser Wert logarithmiert (Basis 2). Die für Cy3 erhaltenen Werte wurden auf der Ordinate und die für Cy5 auf der Abszisse aufgetragen. Messwerte, die auf der blauen Linie liegen, repräsentieren unregulierte Gene. Die zusätzlichen schwarzen Linien entsprechen 2- bzw. 4-fachen Expressionsunterschieden. Anhand dieser Darstellung wird

deutlich, dass sich im gesamten Messbereich die höchste Dichte an auswertbaren Messpunkten (schwarz) entlang der blauen Linie zu finden ist und sich beidseitig erniedrigt. Somit kann von einer Normalverteilung der Ergebnisse über den gesamten Messbereich ausgegangen werden.

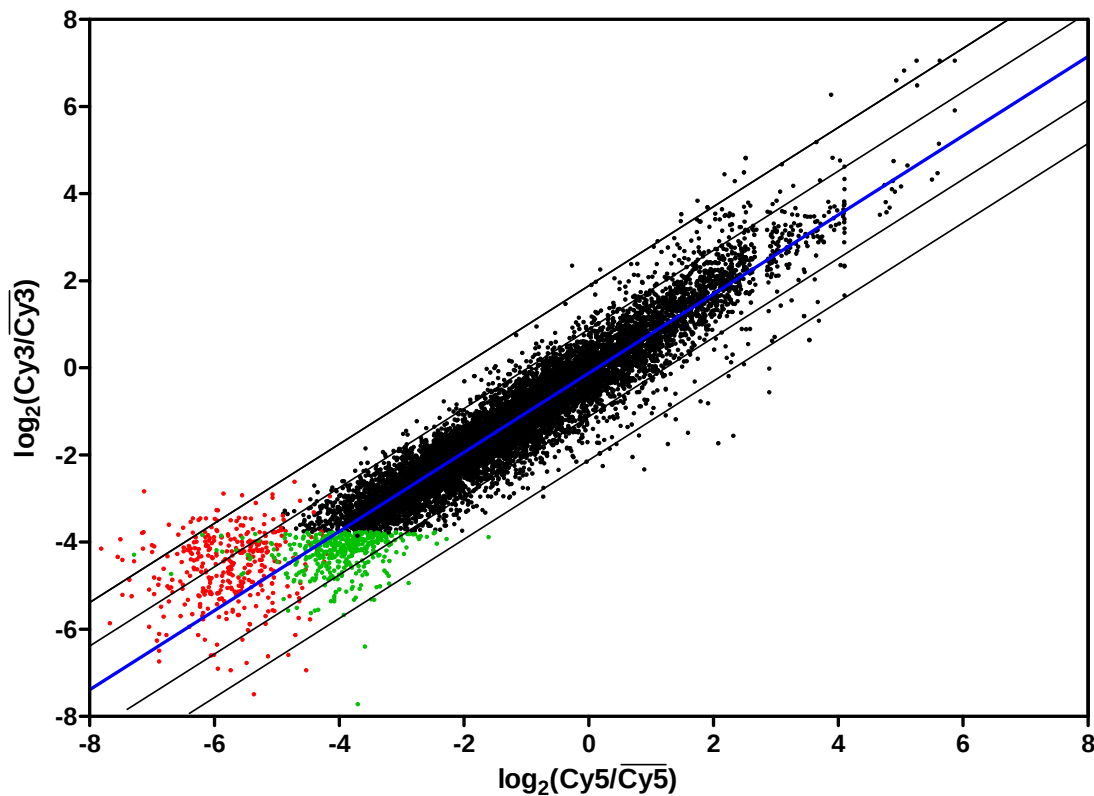


Abbildung 25: Scatter-Plot der Ergebnisse eines repräsentativen Microarray-Experiments

Rote Punkte entsprechen Messwerten von „leeren“ Spots, grüne denen von der Analyse ausgegrenzten und schwarze den ausgewerteten. Werte, die auf der blauen Linie liegen, entsprechen nicht-regulierten Genen und Werte, die auf den inneren bzw. äußeren schwarzen Linien liegen, entsprechen 2-fach bzw. 4-fach regulierten Genen.

2.4.2 Validität und Präzision der Methode

Microarrays stellen ein sehr komplexes Messsystem mit einer extrem hohen Zahl an erhobenen Messwerten dar. Zur Beurteilung der Präzision dieser Methode wurde die Varianz innerhalb eines Experiments anhand der Messwerte der 9 aufgetragenen, putativen, endogenen Referenzgene bestimmt. Diese sind, verteilt über die gesamte Arrayfläche, in Quadruplikaten auftragen. In den drei Experimenten lag der mittlere Standardfehler (SD) (Inter-Assay-Variation) der zur Basis 2 logarithmierten Werte der Quadruplikate zwischen 0,11 und 0,22 (siehe Tabelle 10). Vergleicht man hingegen die verschiedenen Experimente miteinander, resultiert ein mittlerer Standardfehler der 9 putativen Referenzgene (Intra-Assay-Variation) von 0,68 (siehe Tabelle 10). Ein Grund für diesen erhöhten Wert ist, dass in diesen Wert auch die vom Knockout unabhängige, biologische Varianz der Versuchstiere (Pritchard et al. 2001) mit eingeht, da für die drei betrachteten Experimente jeweils auch andere Tiere verwendet wurden. Ein Indiz hierfür ist, dass z. B. GAPDH in den im ersten Array verwendeten RNA-Proben signifikant unterschiedlich exprimiert wurde. In den in den folgenden Experimenten vermessen Proben war die Expression hingegen konstant.

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Inter-Assay-Variation (SD)	0,22	0,11	0,17
Intra-Assay-Variation (SD)	0,68		

Tabelle 10: Inter- und Intra-Assay-Variation von drei Microarrayexperimenten

Die Ergebnisse wurden anhand der in Quadruplikaten bestimmten 9 endogenen Referenzgenen aus drei unabhängigen Experimenten berechnet ($\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$). Die Inter-Assay-Variation entspricht dem Mittelwert der Standardfehler der Quadruplikate, die Intra-Assay-Variation dem mittleren Standardfehler der 3 Experimente.

Zur Prüfung der Validität der Methode, wurden mittels qPCR erhobene Daten mit den Ergebnissen der Microarray-Untersuchungen verglichen (Tabelle 11). Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass beide Methoden zum gleichen Ergebnis führen.

Ergebnisse

Gen	Array (n=3)	qPCR (n=6)
α_{2A} -Adrenozeptor	$-0,5 \pm 0,3$	$-0,4 \pm 0,5$
α_{1A} -Adrenozeptor	$0,3 \pm 0,4$	$0,0 \pm 0,3$
β_1 -Adrenozeptor	$0,0 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,3$
Tyrosin-Hydroxylase	$0,0 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,4$
Dopamin- β -Hydroxylase	$0,1 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,3$
Dopamin D ₂ -Rezeptor	$-0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,2$
Dopamin D ₃ -Rezeptor	$-0,5 \pm 0,4$	$-0,4 \pm 0,5$

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse der Microarray- und qPCR-Versuche

Die Ergebnisse wurden an identischen RNAs aus dem Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen bestimmt ($\log_2(\text{NAT}^{-/-} / \text{NAT}^{+/+})$).

2.4.3 Differenziell exprimierte Gene

Die drei Versuche ermöglichten den Vergleich der Expression von mehr als 8000 Genen im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen. Von diesen Genen wurde die in Tabelle 12 gezeigte Anzahl mehr als 2-fach herauf bzw. herabreguliert. Dies entspricht im gewählten Logarithmus zur Basis 2 den Grenzwerten 1 bzw. -1. Es sei angemerkt, dass sich alle weiteren Angaben auf diesen Logarithmus beziehen.

	Anzahl der auswertbaren Spots	Expressionsunterschied $\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$	
		>1	<-1
1. Versuch	9593	290	381
2. Versuch	8057	126	246
3. Versuch	9457	1203	1177

Tabelle 12: Anzahl der auswertbaren Spots und der mehr als 2-fach regulierten Gene aus drei Microarray-Experimenten

Verglichen wurde die RNA-Expression im Gesamthirn von NAT^{+/-}- und NAT^{-/-}-Mäusen.

Bei der gemeinsamen Auswertung der drei Experimente wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, die in allen drei Experimenten gleichgerichtet reguliert wurden. Zur Verwirklichung dieses Kriteriums wurden die Grenzwerte 0,5 bzw. -0,5 angewendet. Anschließend wurden die Gene herausgefiltert, deren Expressionsunterschied im Mittel einen Betrag von mehr als 1 aufwiesen. Es resultierten 90 Gene, deren RNA-Expression induziert und 3 Gene, deren RNA subprimiert wurde, wobei der maximale Expressionsunterschied im Mittel der Versuche einem Faktor von 3,5 entsprach.

Bei der Analyse der in ihrer Expression regulierten Gene zeigte sich, dass insbesondere RNAs von Genen, die für ribosomale Proteine (25) (siehe Tabelle 13) und Proteine der Atmungskette (30) (siehe Tabelle 13) kodieren, heraufreguliert werden. Die restlichen 35 bzw. 3 Gene, deren RNA-Expression herauf- bzw. herunterreguliert war (siehe Tabelle 15, Tabelle 16), entstammen unterschiedlichen physiologischen Systemen. Es sei erwähnt, dass von einigen dieser Gene die physiologische Funktion bisher nicht oder nur ansatzweise bekannt ist. Nachfolgende Untersuchungen haben zu zeigen, inwieweit die erhöhte RNA-Expression dieser Gene einen Einfluss auf deren Proteinexpression und assoziierte physiologische Funktion hat.

Ergebnisse

EMBL/GenBank Accession Nr.	Gen (englische Bezeichnung gemäß EMBL/GenBank)	Mittelwert	SEM
AK009134.1	acylphosphatase 2, muscle type	1,10	0,21
NM 020582.1	atp synthase, h+ transporting, mitochondrial f0 complex, subunit f, isoform 2; atp5j2	1,23	0,11
NM 025983.1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1complex, epsilon subunit (Atp5e)	1,47	0,15
NM 007507.1	atp synthase, h+ transporting, mitochondrial f1f0 complex, subunit e; atp5k	1,69	0,28
NM 016755.1	atp synthase, h+ transporting. mitochondrial f0 complex subunit f; atp5j	1,38	0,24
AB042432.6	atpase 6	1,35	0,41
AB047323.1	cox17p; cox17	1,26	0,23
NM 025421.1	cylophosphatase 1, erythrocyte (common) type (Acyp1)	1,07	0,13
NM 009945.1	cytochrome c oxidase subunit viia 3; cox7a3	1,39	0,18
NM 025379.1	cytochrome c oxidase subunit viib; cox7b	1,54	0,26
NM 007749.1	cytochrome c oxidase subunit viic; cox7c	1,53	0,12
NM 009942.1	cytochrome c oxidase, subunit vb; cox5b	1,17	0,36
NM 053071.1	cytochrome c oxidase, subunit vic; cox6c	1,54	0,16
AB042432.4	cytochrome oxidase subunit 2; cox2	1,56	0,28
AB042809.7	cytochrome oxidase sununit 3; cox3	1,40	0,30
AK002517.1	homolog to nadh-ubiquinone oxidoreductase pdsw subunit (ec 1.6.5.3) (ec 1.6.99.3) (ci-pdsw)	1,01	0,28
AK002389.1	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	1,25	0,37
AK017907.1	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	1,24	0,28
NM 019443.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1 (7.5kd, mwfe); ndufa1	1,28	0,14
AK005084.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4	1,17	0,25
NM 025987.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (14kd, b14); ndufa6	1,47	0,16
NM 026612.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2; Ndufb2	1,11	0,17
NM 025316.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5; Ndufb5	1,35	0,12
NM 025523.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown1; Ndufc1	1,49	0,29
NM 134104.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5; Ndufs5	1,24	0,31
AK013511.1	nadh dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	1,18	0,15
AB049357.8	nadh dehydrogenase subunit 3	1,56	0,54
NM 025650.1	ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit (Uqcr)	1,20	0,19
BC011388.1	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1,29	0,34
NM 019883.1	ubiquitin a-52 residue ribosomal protein fusion product 1; uba52	1,26	0,25

Tabelle 13: Gene aus der Atmungskette, deren RNA-Expression im Gesamthirn von NAT^{-/-}-Mäusen induziert wird.

Gezeigt werden Ergebnisse ($\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$) aus Microarray-Experimenten (n = 3).

Ergebnisse

EMBL/GenBank Accession Nr.	Gen (englische Bezeichnung gemäß EMBL/GenBank)	Mittelwert	SEM
AK014294.1	homolog to 40s ribosomal protein s27 (metallopan-stimulin 1) (mps-1) putative	1,66	0,24
AK013903.1	homolog to 40s ribosomal protein s9	1,03	0,37
AK003177.1	homolog to 60s ribosomal protein l34	1,15	0,09
AK004194.1	mitochondrial ribosomal protein l52	1,06	0,11
NM 052835.1	ribosomal protein l0; rpl10	1,33	0,22
NM 025919.1	ribosomal protein l11 (Rpl11)	1,02	0,15
NM 009076.1	ribosomal protein l12; rpl12	1,18	0,36
NM 009079.1	ribosomal protein l22; rpl22	1,08	0,21
NM 024218.1	ribosomal protein l24; rpl24	1,52	0,27
NM 009080.1	ribosomal protein l26; rpl26	1,55	0,21
AK002353.1	ribosomal protein l32	1,09	0,08
NM 025589.1	ribosomal protein l36a-like (Rpl36al)	1,07	0,25
NM 026069.1	ribosomal protein l37 (Rpl37)	1,35	0,21
NM 009084.1	ribosomal protein l37a; rpl37a	1,37	0,16
NM 023372.1	ribosomal protein l38 (Rpl38),	1,61	0,23
NM 011295.1	ribosomal protein s12; rps12	1,22	0,29
NM 026533.1	ribosomal protein s13; rps13	1,27	0,22
NM 013647.1	ribosomal protein s16; rps16	1,15	0,34
NM 009092.1	ribosomal protein s17; rps17	1,39	0,19
NM 026147.1	ribosomal protein s20; rps20	1,30	0,36
AK012696.1	ribosomal protein s25	1,40	0,15
NM 024277.1	ribosomal protein s27a; rps27a	1,53	0,18
NM 009093.1	ribosomal protein s29; rps29 (putatives Referenzgen, bestimmt in Quadruplikaten)	1,73	0,11
NM 011300.1	ribosomal protein s7; rps7	1,28	0,01
AK005564.1	similar to 60S ribosomal protein (hk1)	1,11	0,15

Tabelle 14: Gene ribosomaler Proteine, deren RNA-Expression im Gesamthirn von NAT^{-/-}-Mäusen induziert wird.

Gezeigt werden Ergebnisse ($\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$) aus Microarray-Experimenten (n = 3).

EMBL/GenBank Accession Nr.	Gen (englische Bezeichnung gemäß EMBL/GenBank)	Mittelwert	SEM
AK008333.1	6.8 kda mitochondrial proteolipid	1,42	0,14
AJ011080.1	alpha-albumin protein; alpha-albumin	1,01	0,31
NM 021272.1	brain lipid binding protein; fabp7	1,39	0,13
AK020706.1	cdna clone hypothetical protein	1,09	0,30
NM 007830.1	diazepam binding inhibitor; dbi	1,32	0,29
NM 015826.1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1; dmrt1	1,01	0,28
NM 019682.1	dynein, cytoplasmic, light peptide; dncl1	1,09	0,35
NM 019578.1	exostoses (multiple)-like 1; extl1	1,01	0,13
NM 008705.1	expressed in non-metastatic cells 2, protein (nm23b); nme2	1,20	0,18
NM 007996.1	ferredoxin 1; fdx1	1,02	0,32
NM 007990.1	finkel-biskis-reilly murine sarcoma virus (fbr-musv) ubiquitously expressed (fox derived); fau	1,13	0,32
NM 008043.1	frequently rearranged in advanced t-cell lymphomas; frat1	1,23	0,31
NM 022422.1	g gamma subunit, clone 2-35; gng13	1,23	0,19
Y17852.1	ganglioside-induced differentiation associated protein 3	1,12	0,02

Ergebnisse

EMBL/GenBank Accession Nr.	Gen (englische Bezeichnung gemäß EMBL/GenBank)	Mittelwert	SEM
NM 013525.1	growth arrest specific 5; gas5	1,18	0,27
AK003864.1	homolog to probable mitochondrial import receptor subunit tom7 homolog (translocase of outer membrane 7 kda subunit homolog) (protein ad- 014)	1,34	0,11
NM 022414.1	neuroglobin; ngb	1,00	0,25
NM 019746.1	programmed cell death 5; pdcd5	1,09	0,17
NM 008791.1	purkinje cell protein 4; pcp4	1,20	0,25
NM 025806.1	riken cdna 1100001h23; 1100001h23rik	1,16	0,18
AK016661.1	riken cdna hypothetical protein	1,20	0,30
AK008442.1	riken cdna hypothetical protein	1,15	0,02
AK008338.1	riken cdna hypothetical protein	1,07	0,22
NM 011294.1	rna polymerase ii transcriptional coactivator; rpo2tc1	1,15	0,24
NM 011312.1	s100 calcium binding protein a5; s100a5	1,22	0,32
BC004639.1	similar to riken cdna 5830413c03 gene	1,44	0,16
NM 009226.1	small nuclear ribonucleoprotein d1; snrpd1	1,17	0,21
NM 025315.1	SRB7 (supressor of RNA polymerase B) homolog (S.cerevisiae) (Surb7)	1,05	0,05
NM 016792.1	thioredoxin-like (32kd); txnl	1,05	0,24
NM 026305.1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (Tceb2)	1,12	0,33
NM 013897.1	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog b (yeast); timm8b	1,26	0,26
NM 009429.1	tumor protein, translationally-controlled 1; tpt1	1,19	0,40
BC002135.1	unknown (protein for mgc:7243)	1,02	0,33
NM 133906.1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1 (Zkscan1)	1,17	0,19
AK020104.1	zinc finger, c3hc4 type (ring finger) containing protein	1,17	0,10

Tabelle 15: Gene anderer Systeme, deren RNA-Expression im Gesamthirn von NAT^{-/-}-Mäusen induziert wird

Gezeigt werden Ergebnisse ($\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$) aus Microarray-Experimenten (n = 3).

EMBL/GenBank Accession Nr.	Gen (englische Bezeichnung gemäß EMBL/GenBank)	Mittelwert	SEM
NM 026179.1	abhydrolase domain containing 5 (Abhd5)	-1,01	0,26
NM 009441.1	tetratricopeptide repeat domain; ttc3	-1,33	0,41
AK017857.1	zn-finger cchc type containing protein	-1,27	0,16

Tabelle 16: Gene, deren RNA-Expression im Gesamthirn von NAT^{-/-}-Mäusen supprimiert wird

Gezeigt werden Ergebnisse ($\log_2(\text{NAT}^{-/-}/\text{NAT}^{+/+})$) aus Microarray-Experimente (n = 3).

2.5 Klonierung des murinen VMAT2

Die genomische Struktur des murinen, neuronalen, vesikulären Monoamintransporters (mVMAT2) wurde erstmalig von Takahashi und Uhl (1997) beschrieben. Im selben Jahr wurde von dieser Arbeitsgruppe eine Maus mit einer genetischen Deletion des mVMAT2 publiziert (Takahashi et al. 1997). Die kodierende Sequenz des mVMAT2 wurde hingegen bisher nicht experimentell bestimmt. In der EMBL/GenBank Datenbank existierte nur eine vom NIH (National Institute of Biotechnology Information, Bethesda) anhand der genomischen Sequenz annotierte mRNA-Sequenz (NVMAT2) (Accession-Nr. XM_140760). Vergleicht man diese Sequenz mit den bekannten Aminosäuresequenzen von Mensch (hVMAT) (Erickson und Eiden 1993) und Ratte (rVMAT2) (Erickson et al. 1992) zeigt sich, dass diese um 49 bzw. 50 Basen kürzer sind. Zur Überprüfung dieser Diskrepanz wurde die Sequenz im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmt. Dieses Vorgehen war erforderlich, da eine korrekte Sequenz der cDNA die Grundlage für ein erfolgreiches Primerdesign für die qPCR bildet.

2.5.1 Klonierung der kodierenden Sequenz des mVMAT2

Zur Amplifikation des mVMAT2 wurde RNA aus dem Gesamthirn einer Maus des Inzuchtstamms C57/Bl6 mit OligodT₁₈-Primern zu cDNA revers transkribiert (siehe B.3.8, Seite 31). Zur PCR-Amplifikation (siehe B.3.11, Seite 40) wurden die Primer VMAT2s (5'-CGA AGC GAA GCA AAG CTA TG-3') und VMAT2as (5'-CTG GAG ACA CAT GTA CAC AG-3') und das unten aufgeführte Temperaturprofil herangezogen. Zur Vermeidung unspezifischer PCR-Produkte wurde die Polymerase erst nach der initialen Denaturierung zugesetzt.

1. Denaturierung (initial):	94 °C, 10 min
2. Denaturierung:	94 °C, 1 min
3. Annealing	50 °C, 1 min
4. Elongation	72 °C, 1,5 min

Die Schritte 2 - 4 wurden 35x wiederholt. Eine abschließende Inkubation erfolgte für 7 min bei 72 °C.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (1 % Agarose). Die Bande mit der erwarteten Größe (ca. 1600 bp) wurde ausgeschnitten und die enthaltene DNA extrahiert (siehe B.3.2, Seite 27). Die DNA wurde in den Vektor PCR 2.1 einkloniert (siehe B.3.15, Seite 48) und nach Sanger et al. (1977) sequenziert (siehe B.3.18, Seite 49). Die erhaltene Nukleotidsequenz (siehe F.2, Seite 126) wurde in der EMBL/GenBank Datenbank unter der Accession-Nr. AJ555564 abgelegt.

2.5.2 Vergleich der ermittelten mVMAT2 Aminosäuresequenz mit publizierten Daten anderer Spezies

Die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des mVMAT2 wird in Abbildung 26 den Sequenzen NVMAT2, hVMAT2 und rVMAT2 gegenübergestellt. Durch den Vergleich wird ersichtlich, dass mVMAT2/rVMAT2 zu 95%, mVMAT2/hVMAT2 zu 91% und mVMAT2/NVMAT2 zu 91% identisch sind. Die für die Maus annotierte NVMAT2 Sequenz ist offensichtlich fehlerhaft, da sie im Gegensatz zu den anderen VMAT2-Sequenzen innerhalb von hoch konservierten Domänen zusätzliche Abschnitte aufweist (in Abbildung 26 grün gekennzeichnet).

```

mVMAT2: MALSDLVLLRWLRDSRHSRKLILFIVFLALLLDNMLLTVVVPIIPSYLYSIKHEKNTTEI 60
NVMAT2: MALSDLVLLRWLRDSRHSRKLILFIVFLALLLDNMLLTVVVPIIPSYLYSIKHEKNTTEI 60
rVMAT2: MALSDLVLLRWLRDSRHSRKLILFIVFLALLLDNMLLTVVVPIIPSYLYSIKHEKNTTEI 60
hVMAT2: MALSELALVRWLQESRRSRKLILFIVFLALLLDNMLLTVVVPIIPSYLYSIKHEKNATEI 60

mVMAT2: QTARPALTASTSESFHSIFSYYNNSTVF-TGNATGGLPGGESPKATTTQHTVTNTT-VPP 118
NVMAT2: QTARPALTASTSESFHSIFSYYNNSTVF-TGNATGGLPGGESPKATTTQHTVTNTT-VPP 118
rVMAT2: QTTIRPELVVSTSES---IFSYYNNSTVLTITGNATGTLPGGQSHKATSTQHTVANTT-VPS 116
hVMAT2: QTARPVHTASISDSFQSIFSYYDNSTMV-TGNATRDLD---TLHQTATQHMVTNASAVPS 115

mVMAT2: DCPSEDKDLLNENVQVGLLFASKATVQLLTNPFIGLLTNRIGYIPMFAGFCIMFISTV- 177
NVMAT2: DCPSEDKDLLNENVQVGLLFASKATVQLLTNPFIGLLTNRIGYIPMFAGFCIMFISTVR 178
rVMAT2: DCPSEDRDLLNENVQVGLLFASKATVQLLTNPFIGLLTNRIGYIPMFAGFCIMFISTV- 175
hVMAT2: DCPSEDKDLLNENVQVGLLFASKATVQLITNPFIGLLTNRIGYIPITFAGFCIMFVSTI- 174

mVMAT2: -----MFAFSSSYAFLLIARSLQGIGSSCSSVA----- 205
NVMAT2: PGPALLAVFAFSSSYAFLLIARSLQGIGSSCSSVADSSPAWGLREDVLSTLQSVGTNWIF 238
rVMAT2: -----MFAFSSSYAFLLIARSLQGIGSSCSSVA----- 203
hVMAT2: -----MFAFSSSYAFLLIARSLQGIGSSCSSVA----- 202

```

mVMAT2:	--GMGMLASVYTDDEERGNAMGIALGGLAMGVLVGPPFGSVLYEFVGKTAPFLVLAALVL	263
NVMAT2:	CL GMGMLASVYTDDEERGNAMGIALGGLAMGVLVGPPFGSVLYEFVGKTAPFLVLAALVL	298
rVMAT2:	--GMGMLASVYTDDEERGNAMGIALGGLAMGVLVGPPFGSVLYEFVGKTAPFLVLAALVL	261
hVMAT2:	--GMGMLASVYTDDEERGN V MGIALGGLAMGVLVGPPFGSVLYEFVGKTAPFLVLAALVL	260
mVMAT2:	LDGAIQLFVLQPSRVQPESQKGTPLTTLLKDPYILIAAGSICFANMGIAMLEPALPIWMM	323
NVMAT2:	LDGAIQLFVLQPSRVQPESQKGTPLTTLLKDPYILIAAGSICFANMGIAMLEPALPIWMM	358
rVMAT2:	LDGAIQLFVLQPSRVQPESQKGTPLTTLLKDPYILIAAGSICFANMGIAMLEPALPIWMM	321
hVMAT2:	LDGAIQLFVLQPSRVQPESQKGTPLTTLLKDPYILIAAGSICFANMGIAMLEPALPIWMM	320
mVMAT2:	ETMCSRKWQLGVAFLPASISYLGITNIFGILAHKMGRWLCALLGMIVVGISILCIPFAKN	383
NVMAT2:	ETMCSRKWQLGVAFLPASISYLGITNIFGILAHKMGRWLCALLGMIVVGISILCIPFAKN	418
rVMAT2:	ETMCSRKWQLGVAFLPASISYLGITNIFGILAHKMGRWLCALLGM V IVGISILCIPFAKN	381
hVMAT2:	ETMCSRKWQLGVAFLPASISYLGITNIFGILAHKMGRWLCALLGMI I IVGVSILCIPFAKN	380
mVMAT2:	IYGLIAPNFGVGFAI-----GMVDSSMMPIMGYLVDLRHVSVYGSVYAIADVA	431
NVMAT2:	IYGLIAPNFGVGFAI VEILFVKSEQTV GMVDSSMMPIMGYLVDLRHVSVYGSVYAIADVA	478
rVMAT2:	IYGLIAPNFGVGFAI-----GMVDSSMMPIMGYLVDLRHVSVYGSVYAIADVA	429
hVMAT2:	IYGLIAPNFGVGFAI-----GMVDSSMMPIMGYLVDLRHVSVYGSVYAIADVA	428
mVMAT2:	FCMGYAIGPSAGGAIKAIGFPWLMTIIGIIDIVFAPLCFFLRSPPAKEEKMAILMDHNC	491
NVMAT2:	FCMGYAIGPSAGGAIKAIGFPWLMTIIGIIDIVFAPLCFFLRSPPAKEEKMAILMDHNC	538
rVMAT2:	FCMGYAIGPSAGGAIKAIGFPWLMTIIGIID I AFAPLCFFLRSPPAKEEKMAILMDHNC	491
hVMAT2:	FCMGYAIGPSAGGAIKAIGFPWLMTIIGIID I LAFAPLCFFLRSPPAKEEKMAILMDHNC	488
mVMAT2:	PIKTKMYTQNNVQYPYPVGDDDEESES	517
NVMAT2:	PIKTKMYTQNNVQYPYPVGDDDEESES	564
rVMAT2:	PIKTKMYTQNNVQ S YPIGDDEESES	515
hVMAT2:	PIKTKMYTQNNI Q S P IG E DEESES	514

Abbildung 26: Aminosäuresequenz des mVMAT2 im Vergleich zu der vom NIH annotierten Sequenz (NVMAT2) und den Sequenzen des rVMAT2 und des hVMAT2. Sequenzunterschiede zum mVMAT2 sind farbig hervorgehoben.

3. Ergebnisse der biochemischen Versuche

3.1 Noradrenalintransporter-Knockout-induzierte Änderung der Expression von $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren

Mittels qPCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren im ZNS durch die genetische Deletion des Noradrenalintransporters induziert wird (vgl. C.2.3.3, Seite 75). Um zu überprüfen, ob dies konsekutiv zu einer erhöhten Rezeptordichte führt, wurden Radioligandbindungsstudien mit dem tritierten Liganden [^3H]RX821002 durchgeführt. Dieser bindet mit hoher Spezifität (O'Rourke et al. 1994) an α_2 -Adrenozeptoren. Da die Affinitäten zu allen drei Subtypen vergleichbar sind, werden sie theoretisch gemeinsam detektiert. In einer Arbeit von Bücheler et al. (2002) wurde unter Verwendung von $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptor-Knockout-Mäusen jedoch gezeigt, dass die Expression des α_{2B} -Subtyps im ZNS unterhalb der Nachweisgrenze dieses Radioliganden liegt. Somit werden in der Praxis mit diesem Radioliganden im ZNS von Mäusen nur die gewünschten Subtypen A und C erfasst.

3.1.1 Sättigung der [^3H]RX821002-Bindung an Homogenaten des Gehirns

Zur Bestimmung der Dichte der $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren in Homogenaten von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen wurden Sättigungsexperimente mit dem Radioliganden [^3H]RX821002 an Gesamthirn-Homogenaten von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen, wie unter B.4.1.3 (Seite 50) beschrieben, durchgeführt. Anhand einer nichtlinearen Regression der erhaltenen Messwerte wurde die Lage des oberen Plateaus genau bestimmt. Der so erhaltene Wert entspricht der Zahl der spezifischen Bindungsstellen (B_{MAX}). Aus der nichtlinearen Regression wurde ferner die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor erhalten. Die nachfolgende Abbildung 27 zeigt den Kurvenverlauf eines repräsentativen Experiments und die gemittelten Ergebnisse aus 9 unabhängigen Experimenten.

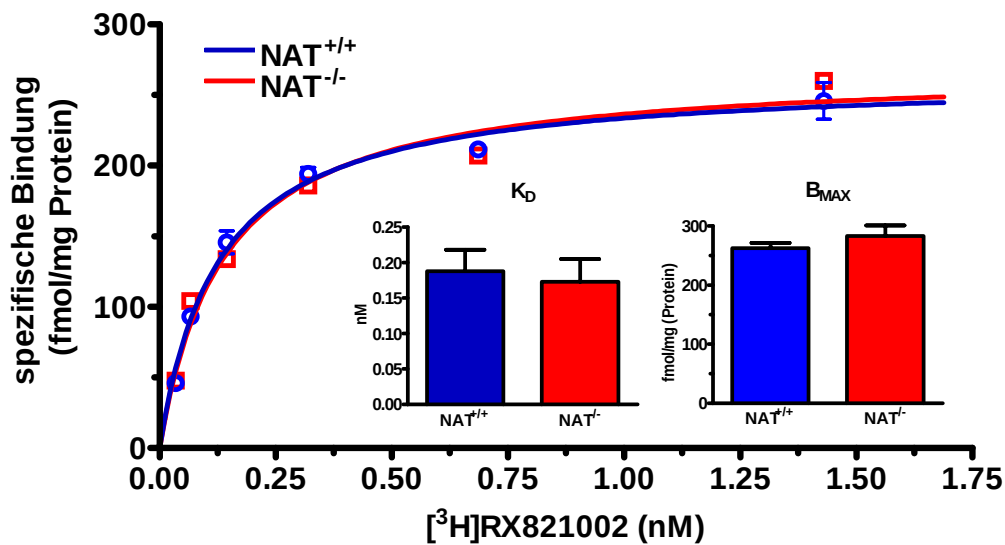


Abbildung 27: Bindung von $[^3\text{H}]\text{RX821002}$ an α_2 -Adrenozeptoren im Gehirn von $\text{NAT}^{-/-}$ und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen.

Die $[^3\text{H}]\text{RX821002}$ Bindung erfolgte an Homogenaten aus Gesamthirnen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallele Ansätze in Gegenwart von $5\ \mu\text{M}$ Rauwolscin inkubiert.

Sättigungskurve der spezifischen $[^3\text{H}]\text{RX821002}$ Bindung. Der Verlauf der Kurve wurde mittels nichtlinearer Regression ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment

Insert: B_{MAX} und K_D aus 9 unabhängigen Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM).

Die veranschaulichten Daten zeigten, dass kein Unterschied zwischen den K_D -Werten von $\text{NAT}^{-/-}$ und $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen ($0,18 \pm 0,03\ \text{nM}$; $0,17 \pm 0,03\ \text{nM}$; $n = 9$) besteht. Diese Werte stehen im Einklang mit den in der Literatur veröffentlichten Werten (O'Rourke et al. 1994).

Die Dichte der $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren im ZNS von $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen ($283 \pm 18\ \text{fmol/mg}$; $n = 9$) war im Vergleich zu $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen ($262 \pm 8\ \text{fmol/mg}$; $n = 9$) tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht. Der im Fall der $\text{NAT}^{+/+}$ -Maus erhobene Wert korrelierte gleichfalls gut mit der Literatur (Bücheler et al. 2002).

3.1.2 [³H]RX821002-Autoradiographie an koronaren Hirnschnitten

Die Ergebnisse der Sättigungsexperimente zeigten tendenziell eine vermehrte Expression von $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren im ZNS von NAT^{-/-}-Mäusen an. Zur genaueren Analyse dieses Phänomens wurden Rezeptorautoradiografien durchgeführt, da diese Methode die Quantifizierung der Rezeptordichte in definierten Hirnregionen ermöglichte. Die in dieser Arbeit dargelegten Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. Marta Dziedzicka-Wasylewska (Institut für Pharmakologie, Polnische Akademie der Wissenschaften, Krakau, Polen) durchgeführt.

Aus der Literatur war bekannt (Holmberg et al. 2003; Fagerholm et al. 2004; Happe et al. 2004), dass der verwendete Radioligand ([³H]RX821002) unter den gewählten Reaktionsbedingungen (siehe B.4.2, Seite 51) eine hohe Affinität zu $\alpha_{2A,C}$ -Adrenozeptoren, mit K_D-Werten zwischen 0,2 und 0,5 nM, aufweist. Diese Werte stehen in gutem Einklang mit dem in Sättigungsexperimenten unter anderen Pufferbedingungen bestimmten Wert von ca. 0,2 nM (C.3.1.1, Seite 94). In den Versuchen wurden die koronaren Hirnschnitte (vgl. Abbildung 28) mit einer fixen Konzentration von 0,5 nM [³H]RX821002 inkubiert. Bei dieser Konzentration werden somit ca. 50 - 75 % der α_2 -Adrenozeptoren vom Radioliganden besetzt. Die Spezifität der [³H]RX821002-Bindung erwies sich als sehr hoch, da unter Zusatz von 5 μ M Rauwolscin keine unspezifische Bindung detektierbar war. Die Schnittebenen der untersuchten Kryoschnitte werden in Abbildung 28 schematisch veranschaulicht.

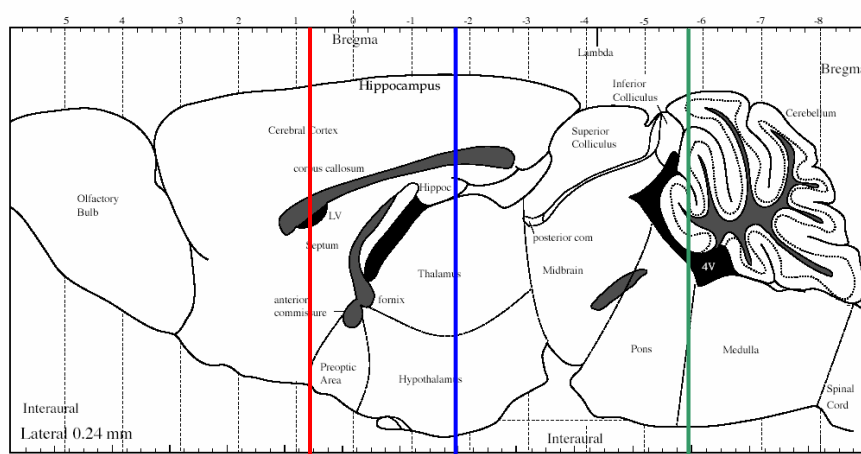


Abbildung 28: Schematische Darstellung der gewählten Schnittebenen

Legende: siehe Seite 97 oben

Schematisch dargestellt wird ein sagittaler Schnitt (Lateral 0,24 mm) eines Mäusegehirns (nach Paxinos und Franklin 2001). Die gewählten Schnittebenen sind farbig hervorgehoben: Vorderhirn (Bregma 0,7), rot; Mittelhirn (Bregma -1,7), blau; Hirnstamm (Bregma -5,7), grün.

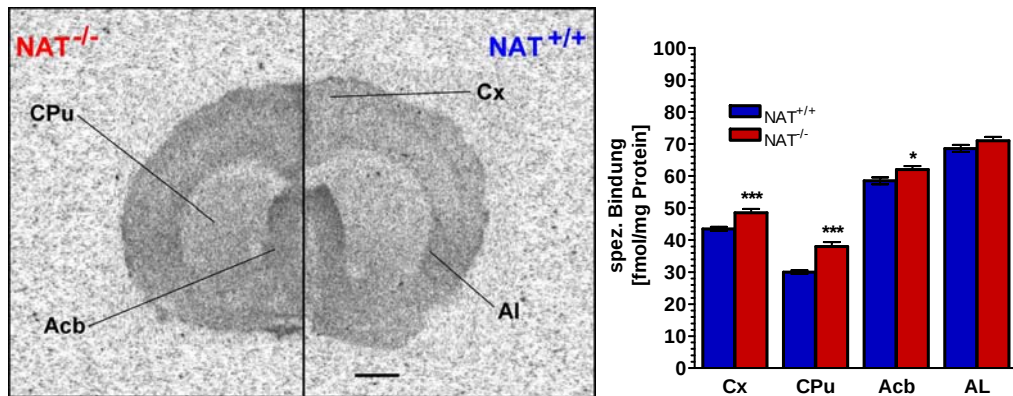
In Abbildung 29 sind repräsentative Autoradiogramme beider Genotypen dargestellt. Es wird deutlich, dass im Vorderhirn (Bregma: 0,7; Abbildung 29A) von $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren signifikant erhöhte Rezeptordichten von $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren im cerebralen Cortex (+11,5 %; $p < 0,001$) und im Striatum (caudate putamen, + 26 %, $p < 0,0001$) vorhanden waren. Auch in den rezeptorreichereren Strukturen der Basalganglien (nucleus accumbens: + 6 %, $p < 0,05$) und des Allocortex (agrar insular cortex: + 3,5 %, $p = 0,18$) war die Expression an $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren höher als in $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen.

Im Mittelhirn (Bregma: -1,7) der $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäuse (Abbildung 29B) wurden erhöhte Rezeptordichten in Bereichen des Thalamus (laterodorsal thalamic nucleus: + 17 %, $p < 0,01$; mediodorsal thalamic nucleus: + 7 %, $p < 0,05$) und Hypothalamus (dorsomedial hypothalamic nucleus: + 7 %, $p < 0,05$) bestimmt. Signifikant höhere Rezeptorexpressionen wurden auch in Strukturen des Hippocampus (lacunosum moleculare layer of the hippocampus: + 22 %, $p < 0,001$) und in der erweiterten Amygdala (bed nucleus of the stria terminalis: + 17 %, $p < 0,001$) gemessen. Wie auch im Vorderhirn war die Dichte der $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren im Cortex des $\text{NAT}^{-/-}$ -Genotyps erhöht (+ 20 %, $p < 0,001$).

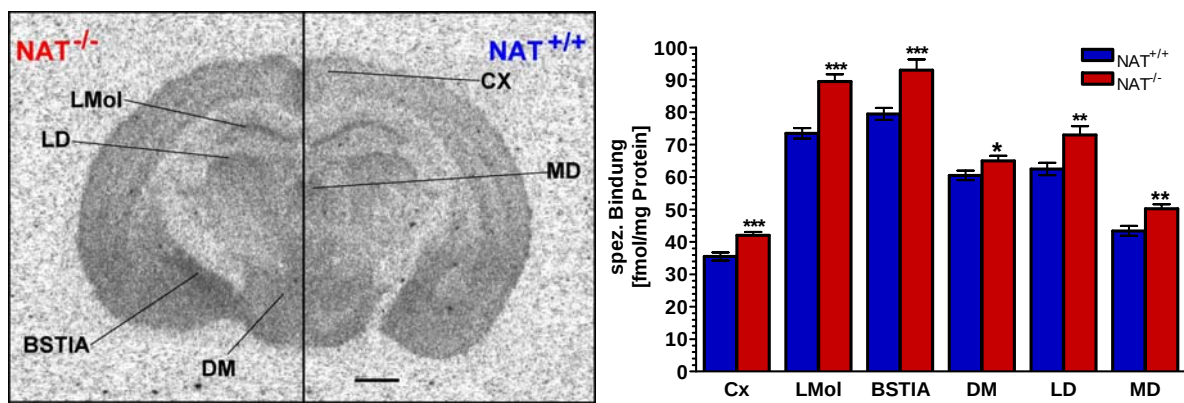
Auch im Hirnstamm (Bregma: -5,7; Abbildung 29C) war die Zahl der $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptorbindungsstellen im $\text{NAT}^{-/-}$ -Genotyp im Locus coeruleus (+ 18 %, $p < 0,01$) signifikant und im lateralen, parabrachialen Nukleus tendenziell (+ 15 %, $p = 0,06$) höher als im $\text{NAT}^{+/+}$ -Genotyp.

Somit wurde in allen untersuchten Hirnregionen von $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Expression der $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren im Vergleich zu $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen nachgewiesen.

A)



B)



C)

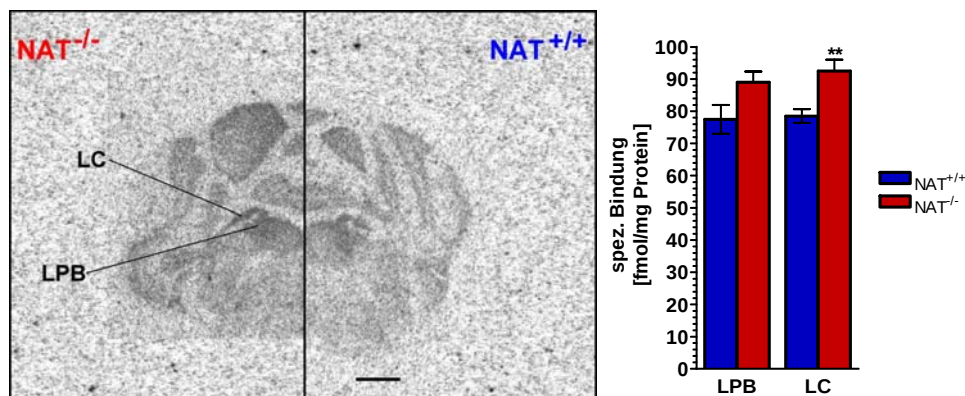


Abbildung 29: [³H]RX821002 -Bindung in koronaren Hirnschnitten von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+} Mäusen

A) Vorderhirn (Bregma 0,7)

B) Mittelhirn (Bregma -1,7)

C) Hirnstamm (Bregma -5,7)

Links: Repräsentative Autoradiogramme beider Genotypen, Skalierung 1 mm

Rechts: Densitometrisch bestimmte Ergebnisse von 9 NAT^{-/-}- und 10 NAT^{+/+}-Mäusen.

(Fortsetzung der Legende: siehe Seite 141 oben)

In den Versuchen wurde eine fixe Konzentration (0,5 nM) [³H]RX821002 eingesetzt. Ein Zusatz von 5 µM Rauwolscin reduzierte das Signal auf das Niveau des Hintergrundsignals. Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

Abkürzungen: Acb (accumbens nucleus); AI (agranular insular cortex); BSTIA (bed nucleus of the stria terminalis intraamygdaloid division); CPu (caudate putamen); Cx (cortex); DM (dorsomedial hypothalamic nucleus); LC (locus coeruleus); LD (laterodorsal thalamic nucleus); LMol (lacunosum moleculare layer of the hippocampus); LPB (lateral parabrachial nucleus); MD (mediodorsal thalamic nucleus).

[Aufgrund technischer Limitierungen weichen die Schnittebenen der repräsentativen Präparate des Hirnstamms im Randbereich marginal voneinander ab.]

3.2 Vergleich der Catecholaminspiegel von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen

In Kooperation mit Herrn Dr. Wölfel (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg) wurden mit HPLC die Konzentrationen der Catecholamine Dopamin (DA) und Noradrenalin (NA) sowie ihrer Abbauprodukte Dihydroxyphenyllessigsäure (DOPAC) und 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylglycol (MHPG) in verschiedenen Hirnarealen beider Genotypen ermittelt. Die von 4 NAT^{+/-}- und NAT^{-/-}-Mäusen erhaltenen Ergebnisse werden in Tabelle 17 zusammengefasst.

Die für Noradrenalin erhaltenen Daten werden zusätzlich in Abbildung 30 veranschaulicht. Es wird deutlich, dass die Deletion des Noradrenalintransporters zu einer signifikanten Erniedrigung der Konzentration an NA im Bulbus olfactorius (ca. -75%), Cerebellum (ca. -85%), Cortex (ca. -30%), Hirnstamm (ca. -50%) und Hippocampus (ca. -65%) führte. Die für den Cortex, Hippocampus und das Cerebellum bestimmten Konzentrationsverhältnisse stehen in gutem Einklang mit der Literatur (Xu et al. 2000). Auch im Hypothalamus (ca. -30%) war eine tendenzielle Abnahme zu verzeichnen. In dieser Region war die Bestimmung jedoch für eine abschließende Beurteilung mit einem zu großen Fehler behaftet. Im Gegensatz zu den anderen Hirnregionen war jedoch im Striatum die NA-Konzentration in beiden Genotypen vergleichbar hoch.

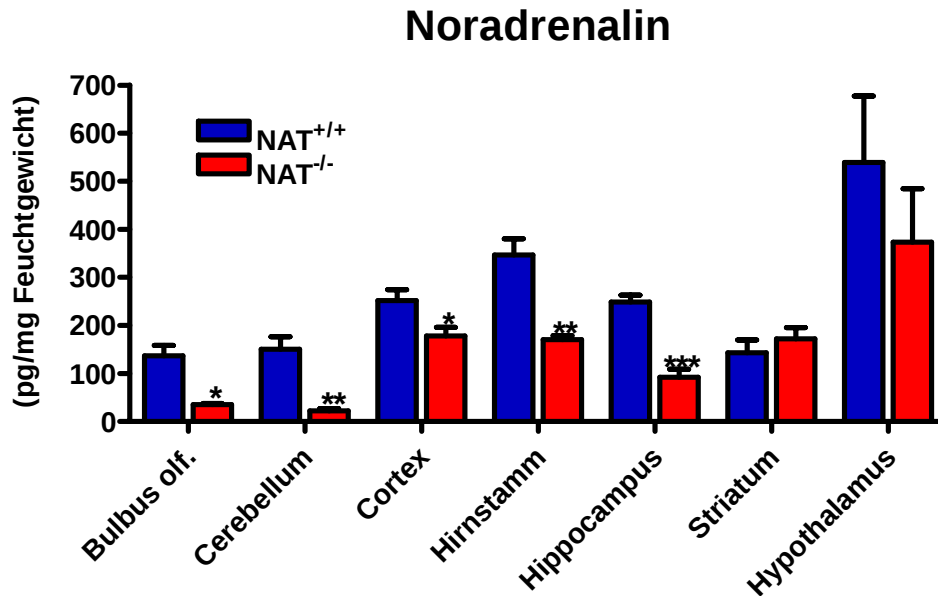


Abbildung 30: Konzentrationen von Noradrenalin in Hirnarealen von NAT^{+/+}- und NAT^{-/-}-Mäusen

Gezeigt werden die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von 4 NAT^{-/-}- und 4 NAT^{+/+}-Mäusen.

Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

Im Cerebellum war die MHPG-Konzentration der NAT^{-/-}-Tiere um mehr als 30% ($p < 0,01$) niedriger als in den NAT^{+/+}-Tieren (siehe Abbildung 17). Mit Ausnahme des Cortex zeigten alle weiteren Hirnregionen der NAT^{-/-}-Mäuse eine tendenzielle, aber wegen der Fehlerbreite nicht signifikant niedrigere MHPG-Konzentration. Am ausgeprägtesten war diese Tendenz im Hirnstamm (-30 %) und im Bulbus olfactorius (-60 %).

Im Bulbus olfactorius der NAT^{-/-}-Mäuse war der DA-Spiegel signifikant erniedrigt. In den weiteren untersuchten Arealen wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen.

Es sei angemerkt, dass die höchsten DA-Konzentrationen im Striatum vorliegen. Absolut gesehen enthielt das Striatum, das nur ca. 7% des Hirngewichts ausmacht (vgl. C.1.2, Seite 58), über 40 % des DAs des Mausgehirns.

Auch keinen Einfluss hatte der Knockout auf die DOPAC-Konzentrationen in den untersuchten Proben.

Ergebnisse

	NA		MHPG	
	NAT ^{+/+}	NAT ^{-/-}	NAT ^{+/+}	NAT ^{-/-}
Bulbus olf.	136,7 ± 21,7	35,0 ± 2,5 *	92,1 ± 42,5	31,8 ± 26,5
Cerebellum	150,1 ± 26,1	22,4 ± 4,4 **	52,2 ± 5,0	34,8 ± 2,6**
Cortex	251,8 ± 22,3	177,9 ± 18,0 *	79,6 ± 13,6	87,0 ± 6,4
Hirnstamm	346,7 ± 33,6	170,5 ± 8,3 **	90,2 ± 12,2	63,5 ± 6,3
Hippocampus	248,6 ± 14,4	92,4 ± 16,5 ***	34,1 ± 1,6	31,6 ± 2,1
Striatum	143,3 ± 26,3	172,0 ± 23,3	25,3 ± 2,5	23,0 ± 1,5
Hypothalamus	539,2 ± 138,1	276,8 ± 77,5	16,5 ± 1,9	13,6 ± 0,4

	DA		DOPAC	
	NAT ^{+/+}	NAT ^{-/-}	NAT ^{+/+}	NAT ^{-/-}
Bulbus olf.	159,9 ± 21,4	110,2 ± 11,3 *	196,1 ± 28,1	160,2 ± 12,3
Cerebellum	10,8 ± 2,4	13,4 ± 2,3	21,1 ± 7,0	26,1 ± 5,3
Cortex	613,1 ± 49,9	739,9 ± 58,3	206,9 ± 13,5	210,1 ± 21,9
Hirnstamm	27,6 ± 6,8	36,3 ± 5,2	69,4 ± 9,5	64,4 ± 13,7
Hippocampus	22,5 ± 1,1	29,5 ± 8,7	37,7 ± 4,3	55,0 ± 14,3
Striatum	3465,0 ± 825,6	3494,8 ± 389,7	1618,6 ± 218,8	1981,7 ± 268,0
Hypothalamus	121,8 ± 36,5	71,3 ± 8,5	237,7 ± 66,1	192,3 ± 14,2

Tabelle 17: Konzentrationen von DA, NA, DOPAC und MHPG in Hirnarealen von NAT^{+/+}- und NAT^{-/-}-Mäusen

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 4 NAT^{-/-}- und 4 NAT^{+/+}-Mäusen. Die Konzentrationsangaben werden in pg/mg Feuchtgewicht angegeben.

Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

4. Verhaltenspharmakologische Ergebnisse

4.1 Einfluss des Noradrenalintransporter-Knockouts auf die Clonidin-induzierte Hypoaktivität

Die funktionelle Konsequenz der erhöhten Expression von $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren wurde anhand der Wirkung des selektiven Agonisten Clonidin charakterisiert. Als Messparameter wurde die Clonidin-induzierte Hypoaktivität (Heal et al. 1989; Dziedzicka-Wasylewska et al. 2001) gemessen. Die entsprechenden Versuche wurden im Labor von Prof. Dr. Marta Dziedzicka-Wasylewska (Institut für

Pharmakologie, Polnische Akademie der Wissenschaften, Krakau, Polen) durchgeführt.

NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen wurde Clonidin (0,1 mg/kg) bzw. Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) intraperitoneal injiziert. Nach 45 min wurden die Mäuse einzeln in spezielle Messkäfige mit zwei Lichtschranken gesetzt und die Zahl der Strahlendurchgänge über einen Zeitraum von 45 min gemessen. In der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe war die Bewegungsaktivität der NAT^{-/-}-Tiere (81,3 ± 11,0; n = 15) geringfügig geringer als die der NAT^{+/+}-Tiere (93,5 ± 13,2; n = 15). Clonidin reduzierte die Zahl der Strahlendurchgänge der NAT^{-/-}-Mäusen auf 11,4 ± 3,9 (n = 15) und die der NAT^{+/+}-Tieren auf 39,4 ± 9 (n = 15). Zur Beurteilung des Effekts von Clonidin wurden diese Werte jeweils in Relation zu den genannten Werten der Kontrollgruppe des jeweiligen Genotyps gesetzt. Die prozentual in Abbildung 31 dargestellten Werte verdeutlichen, dass die Clonidin-induzierte Hypoaktivität im NAT^{-/-}-Genotyp signifikant stärker ausgeprägt war als im NAT^{+/+}-Genotyp.

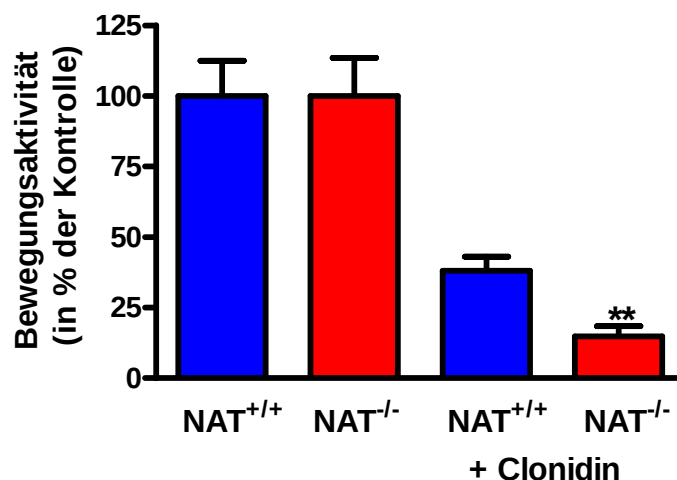


Abbildung 31: Effekt von Clonidin auf die Bewegungsaktivität von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen

Die spontane Bewegungsaktivität wurde im Zeitraum von 45 bis 60 min nach der Injektion von Clonidin (0,1 mg/kg) bzw. Kochsalzlösung (Kontrollen) gemessen. Die Ergebnisse (n = 15) sind in Prozent der jeweiligen Kontrolltiere dargestellt. Jede Gruppe bestand aus 15 Tieren. Signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet (vgl. B.6).

D. Diskussion

Der Mechanismus der antidepressiven Wirkung von klinisch eingesetzten Antidepressiva ist trotz intensiver Forschungstätigkeit nicht genau bekannt. Die Latenz zwischen der sofort zu erwartenden Primärwirkung der Antidepressiva und dem Einsetzen der antidepressiven Wirkung nach mehreren Wochen führte zu der Hypothese, dass für die antidepressive Wirkung Adaptionsvorgänge in Neurotransmittersystemen des ZNS verantwortlich sind (Lehrbuch: Aktories et al. 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäuse weisen eine genetische Deletion des Noradrenalintransporters, der die Hauptzielstruktur einer Vielzahl von Antidepressiva (z. B. Desipramin, Reboxetin) ist, auf (Übersichtsartikel: Bönisch und Brüss 1994; Leonard 1997; Ressler und Nemeroff 1999; Anand und Charney 2000; Wong et al. 2000; Page 2003). In Verhaltenstests zur Bestimmung des antidepressiven Effekts, wie dem Forced-Swim- und dem Tail-Suspension-Test (Übersichtsartikel: Cryan et al. 2002), verhalten sich diese Tiere wie $\text{NAT}^{+/+}$ -Tiere, die mit Antidepressiva behandelt wurden (Xu et al. 2000; Drozdowska et al. 2005). Im Fall des Tail-Suspension-Tests konnte zudem gezeigt werden, dass eine zusätzliche Behandlung der $\text{NAT}^{-/-}$ -Tiere mit Antidepressiva unterschiedlichster Wirkstoffklassen (Xu et al. 2000) keinen weiteren Effekt hervorruft. Dies lässt darauf schließen, dass der Knockout des Noradrenalintransporters auf molekularer Ebene die gleichen Veränderungen hervorruft wie eine antidepressive Behandlung. Somit stellen die $\text{NAT}^{-/-}$ -Tiere ein vielversprechendes Tiermodell zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Antidepressiva dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der durch den Knockout des Noradrenalintransporters hervorgerufene Einfluss auf die mRNA Expression von Adrenozeptoren, dopaminergen Rezeptoren und verschiedenen an der Noradrenalinsynthese beteiligten Enzymen mit qPCR bestimmt. Diese Untersuchungen erfolgten an selektierten Hirnregionen (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum) und Gesamthirnen von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren. Um neben den selektierten Zielgenen auch neue Zielgene zu identifizieren, wurde in Microarray-Experimenten die mRNA-Expression von mehr als 8.000 Genen von $\text{NAT}^{-/-}$ - und $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren auf Gesamthirnebene differenziell betrachtet.

Die Auswirkung der für den α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptor nachgewiesenen hirregionsspezifischen Induktion der mRNA-Expression wurde auf Proteinebene überprüft. Veränderungen der Expressionsdichte der Rezeptoren wurde in Radioligandbindungsuntersuchungen an Gesamthirnhomogenaten und Schnittpräparaten untersucht und die funktionellen Konsequenzen in einer Verhaltensstudie verifiziert.

An Proben der Hirnareale (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum) wurde zudem der Einfluss auf die Noradrenalin- und Dopaminsynthese anhand der Gewebespiegel dieser Neurotransmitter und ihrer Metaboliten, MHPG und DOPAC, mittels HPLC untersucht.

1. Noradrenalin-Homöostase in $NAT^{-/-}$ -Mäusen

Die genetische Deletion des Noradrenalintransporters der $NAT^{-/-}$ -Mäuse induziert eine generelle Veränderung der Noradrenalin-Homöostase, denn es wird der aus Freisetzung, Rückaufnahme und Speicherung bestehende Kreislauf des Noradrenalins unterbrochen.

Zur experimentellen Bestimmung des Einflusses auf die intrazelluläre Speicherung des Noradrenalins wurde näherungsweise die Gewebekonzentration herangezogen. Dieses Vorgehen wird üblicherweise in der Literatur gewählt, da der größte Anteil des Noradrenalins in den Speichervesikeln der noradrenergen Neurone und nur ein sehr geringer Teil extrazellulär vorliegt (Xu et al. 2000; Keller et al. 2004). Es ist bekannt, dass im Gehirn der $NAT^{-/-}$ -Mäuse die Gewebekonzentration an Noradrenalin um ca. 30 % niedriger ist als in den $NAT^{+/+}$ -Tieren (Keller et al. 2004). In den besonders dicht von noradrenergen Neuronen innervierten Regionen Cortex, Cerebellum und Hippocampus wurde sogar eine Reduktion um 50-75 % nachgewiesen (Xu et al. 2000). Aus der beschriebenen, erniedrigten Speicherung resultiert eine um ca. 60 % erniedrigte Noradrenalinfreisetzung (Xu et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnten die erniedrigten Gewebespiegel der erwähnten Regionen mittels HPLC-Untersuchungen bestätigt werden. Zusätzlich war eine vergleichbare Erniedrigung im Bulbus olfactorius, Hirnstamm und im Hypothalamus zu verzeichnen. Unverändert war jedoch die NoradrenalinKonzentration im Striatum der $NAT^{-/-}$ -Tiere (siehe Abbildung 30; Seite 100). Eine mögliche Erklärung

für dieses Phänomen ist die Aufnahme von Noradrenalin in Neurone anderer Neurotransmitter-Systeme. So liegen im Striatum dopaminerge Synapsen in sehr hoher Dichte vor (Übersichtsartikel: Dailly et al. 2004). Diesen Sachverhalt verdeutlicht die hohe Dopaminkonzentration in dieser Hirnregion (siehe C.3.2, Seite 99; Tabelle 17, Seite 58). Die Möglichkeit der Noradrenalinaufnahme in dopaminerge Neurone besteht, da das Noradrenalin mangels Rückaufnahme aus dem synaptischen Spalt diffundiert und damit durch „Volumentransmission“ (Callado und Stamford 2000; Cragg et al. 2001) zu den in hoher Dichte vorliegenden dopaminergen Varikositäten gelangen kann. Dort kann es in die Präsynapsen transportiert und als „falscher“ Neurotransmitter gespeichert werden, da der Dopamintransporter nicht sehr substratspezifisch ist und auch Noradrenalin effizient transportiert (Giros et al. 1994; Buck und Amara 1994). Zusätzlich zu den Befunden dieser Arbeit gibt es aus der Literatur Hinweise auf die physiologische Relevanz der Aufnahme von Noradrenalin in dopaminerge Nervenendigungen des Striatums, denn in dieser Hirnregion ist die Noradrenalinfreisetzung durch D_2/D_3 -Autorezeptorantagonisten und spezifische Inhibitoren des Dopamintransporters modulierbar (Gobert et al. 2004). Interessanterweise gibt es auch Belege für die Aufnahme von Dopamin in noradrenerge Neurone (Moron et al. 2002; Übersichtsartikel: Carboni und Silvagni 2004) und von Noradrenalin in serotonerge Neurone (Vizi et al. 2004).

Bedingt durch das Fehlen des Noradrenalintransporters ist die Clearance des Noradrenalins in $NAT^{-/-}$ -Mäusen um den Faktor 6 geringer als in den $NAT^{+/+}$ -Tieren. Aus diesem Grund liegen im synaptischen Spalt, trotz der verminderten Freisetzung, erhöhte Konzentrationen von Noradrenalin vor. Xu et al. (2000) und Vizi et al. (Vizi et al. 2004) bestimmten einen ca. 2-fach erhöhten extrazellulären Spiegel repräsentativ im Cerebellum und ventralen Hippocampus. Dieser Befund deckt sich mit den erhöhten Noradrenalinspiegeln im synaptischen Spalt nach Inhibierung des Noradrenalintransporters durch Reboxetin (Sacchetti et al. 1999; Page 2003) oder trizyklischen Antidepressiva (Übersichtsartikel: Leonard 1997). Entsprechende Befunde wurden auch für die extrazellulären Konzentrationen von Dopamin und Serotonin nach genetischer Deletion der entsprechenden Dopamin- bzw. Serotonintransporter in Mäusen ($DAT^{-/-}$; $SERT^{-/-}$) erhoben (Übersichtsartikel: Torres et al. 2003).

Catecholamine werden von neuronalen und extraneuronalen Transportern aufgenommen und danach neuronal durch die MAO und extraneuronal bevorzugt durch die COMT abgebaut (Fiebig und Trendelenburg 1978). Neuronal verstoffwechseltes Noradrenalin wird ausschließlich von der MAO zu DHPG umgesetzt (vgl. A.1.1., Seite 2). Aus der Literatur ist bekannt, dass die DHPG-Konzentration im Gesamthirn von $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren um ca. 50 % erniedrigt ist (Keller et al. 2004). Dieser Wert korreliert gut mit den genannten, erniedrigten Noradrenalinkonzentrationen der noradrenergen Neurone. Das relativ lipophile DHPG (Mack und Bönisch 1979) wird nach der Diffusion in den extrazellulären Raum in Gliazellen aufgenommen und dort von der COMT zu MHPG umgesetzt. Die MHPG-Konzentration war im Cerebellum signifikant und in den meisten anderen Hirnregionen der $\text{NAT}^{-/-}$ -Tiere tendenziell erniedrigt (siehe C.3.2, Seite 99; Tabelle 17, Seite 58). Es wäre zu erwarten gewesen, dass der Einfluss des Knockouts auf die MHPG-Werte dem auf die DHPG-Werte entspricht, da beide Metaboliten dem gleichen neuronalen Hauptabbauweg entstammen (vgl. Abbildung 3, Seite 5). Eine denkbare Erklärung für die beobachtete Diskrepanz ist, dass auch aus dem synaptischen Spalt diffundiertes, also extraneuronal aufgenommenes Noradrenalin in den Gliazellen von einer glialen MAO zu DHPG und danach durch die COMT zu MHPG metabolisiert wird. Klassischerweise wird Noradrenalin vornehmlich von der extraneuronalen COMT zu Normetanephrin umgesetzt, einem Metaboliten, der hier nicht erfasst wurde. Da Gliazellen auch MAO exprimieren, ist -wie oben beschrieben- prinzipiell auch ein enzymatischer Abbau von Noradrenalin zu MHPG möglich. In den $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren scheint es zu einer erhöhten Bedeutung dieses Abbauweges zu kommen.

Die Neusyntheserate von Noradrenalin ist in den $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren ca. um den Faktor 1,7 erhöht (Xu et al. 2000). Die aus qPCR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse verschiedenster Hirnregionen weisen darauf hin, dass dieser Regulation keine erhöhte mRNA-Expression der Tyrosinhydroxylase oder der Dopamin- β -Hydroxylase zugrunde liegt (siehe C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 22, Seite 131). Dies ist kein Widerspruch, denn einer erhöhten Proteinexpression liegt nicht zwingend eine erhöhte mRNA-Expression zugrunde, auch ein verminderter RNA-Abbau kann hierzu führen (Greenbaum et al. 2003). Die erhöhte Syntheserate kann auch auf eine erhöhte Aktivität der beteiligten Enzyme zurückzuführen sein. Die Aktivität der Tyrosinhydroxylase, welche die Noradrena-

lin-Syntheserate limitiert, wird z.B. durch Phosphorylierung und allosterische Regulationen beeinflusst (Dunkley et al. 2004). Noradrenalin verursacht auch über einen Feedback-Mechanismus eine Hemmung der Tyrosinhydroxylase (Kumer und Vrana 1996). Da Noradrenalin intraneuronal (im Zytosol) bei $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren deutlich erniedrigt ist, verursacht es bei $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren eine geringere Feedback-Inhibition der Tyrosinhydroxylase und hierdurch eine erhöhte Aktivität. Ebenfalls keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der Tyrosinhydroxylase im Locus coeruleus von Mäusen hat eine Behandlung mit dem selektiven Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor Reboxetin (Gould et al. 2003). Andererseits erniedrigen bei Ratten eine Vielzahl trizyklischer Antidepressiva, wie z. B. Imipramin oder Nortriptylin, die Expression in dieser Hirnregion (Nestler et al. 1990).

Neusynthetisiertes, aus dem synaptischen Spalt aufgenommenes und aus den Speichervesikeln diffundiertes Noradrenalin wird im ZNS vom VMAT2 aus dem Zytoplasma in die Vesikel transportiert (Peter et al. 1995; Übersichtsartikel: Eisenhofer 2001). Aus der Funktion dieses Transporters ergibt sich die Frage, ob dessen Expression durch die veränderte Homöostase $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen beeinflusst wird. Die experimentelle Bestimmung der kodierenden Sequenz des murinen Transporters (siehe C.2.5, Seite 91) ermöglichte eine Quantifizierung auf mRNA-Ebene. Mit qPCR wurde jedoch in keiner der untersuchten Hirnregionen ein Unterschied zwischen $\text{NAT}^{+/+}$ - und $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren gefunden (siehe C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 22, Seite 131). Dieser Transporter ist allerdings nicht nur für den intraneuronalen Transport von Noradrenalin, sondern auch für den vesikulären Transport anderer Neurotransmitter zuständig und wird daher nicht nur in noradrenergen Neuronen exprimiert (Johnson 1988). Es ist demnach fraglich, ob sich eine Expressionsänderung in den noradrenergen Neuronen auf die Konzentrationen in Homogenaten von Hirnregionen auswirkt. Die beschriebenen Befunde decken sich mit Untersuchungen an einem analogen Tiermodell, den $\text{DAT}^{-/-}$ -Mäusen. In diesen Tieren wurde im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls keine signifikante Änderung der mRNA- und Proteinexpression sowie der Funktion des VMAT2 gefunden (Gainetdinov et al. 1998).

2. Änderung der Genexpression der Adrenozeptoren

2.1 Regulation von α_1 -Adrenozeptoren

Mit qPCR wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression des α_{1B} -Adrenozeptorsubtyps im Hirnstamm durch die Inaktivierung des Noradrenalintransporters induziert wird (siehe C.2.3.3, Seite 75; Abbildung 21, Seite 76). In den weiteren Hirnregionen und auf Gesamthirnebene war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen $NAT^{-/-}$ - und $NAT^{+/+}$ -Tieren feststellbar. Für die weiteren Subtypen A und D wurde in keiner der untersuchten Regionen eine Veränderung der mRNA-Expression beobachtet. Vom Hirnstamm aus innervieren die noradrenergen Neurone nahezu das gesamte ZNS (Foote et al. 1983). Innervierten Regionen, die in erster Linie α_{1B} -Adrenozeptoren exprimieren sind z. B. der Hippocampus und der Cortex (Drouin et al. 2002). Im Hippocampus ist die Dichte der α_1 -Adrenozeptoren um ca. 35 % (Xu et al. 2000) und in den verschiedenen Regionen des Cortex um 25 - 50 % erniedrigt; dies wurde kürzlich auch von Drozdowska et al. (2005) bestätigt. Eine weitere innervierte Region, das verlängerte Rückenmark, weist eine um 50 % niedrigere Dichte des α_1 -Rezeptorproteins in $NAT^{-/-}$ -Tieren auf (Xu et al. 2000). Nachfolgende Studien haben zu zeigen, inwieweit die mRNA-Expression und die Proteinexpression der bisher nicht betrachteten Hirnregionen miteinander korrelieren. Es ist denkbar, dass die verschiedenen Subtypen auch auf Proteinebene regional differenziell reguliert werden. Leider liegen über die Rolle und Expression der verschiedenen Subtypen im ZNS bisher nur wenige Informationen vor (Übersichtsartikel: Engelhardt und Hein 2004). Möglicherweise wird aber auch eine veränderte Expression von einer Internalisierung der Rezeptoren infolge der beschriebenen, erhöhten Konzentration des physiologischen Agonisten Noradrenalin maskiert.

Belege für eine erhöhte Dichte der α_1 -Adrenozeptoren gibt es aus der Literatur nach Behandlung mit z. B. Imipramin oder Amitryptilin im cerebralen Cortex von Ratten (Maj et al. 1985), einem weiteren Hirnareal, in dem vornehmlich α_1 -Adrenozeptoren vom Subtyp B exprimiert werden (Drouin et al. 2002). Andererseits wurde in Studien mit dem spezifischen Inhibitor des Noradrenalintransporters, Reboxetin, in verschiedensten Hirnregionen kein Einfluss auf die Rezeptordichte beobachtet (Rogoz et al. 2002; Gould et al. 2003).

2.2 Regulation und Expression von α_2 -Adrenozeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des Noradrenalintransporters zu einer erhöhten Expression und Funktion von α_2 -Adrenozeptoren führt. Dieser Rezeptorfamilie gehören drei Subtypen an, die gewebespezifisch unterschiedlich stark exprimiert werden (Übersichtsartikel: Philipp und Hein 2004).

2.2.1 Expression der α_2 -Subtypen im Gesamthirn von Mäusen

Im Gesamthirn war die mRNA-Konzentration der α_{2B} -Adrenozeptoren extrem niedrig. Im Vergleich hierzu wurden die mRNAs der Subtypen A und C 250-fach höher exprimiert (siehe C.2.3.2, Seite 73; Tabelle 4, Seite 74). Diese Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Wang et al. (1996), der die mRNA des α_{2B} -Adrenozeptors nur im Thalamus und in den Purkinje-Zellen des Cerebellums nachweisen konnte. Die mRNA der beiden anderen Subtypen wurden in dieser Arbeit hingegen in fast allen untersuchten Hirnregionen nachgewiesen.

Die sehr schwache Expression der α_{2B} -Adrenozeptor-mRNA korrelierte mit den aus der Literatur bekannten, extrem niedrigen Rezeptordichten im ZNS. So wurde von Bücheler et al. (2002) an Mäusen mit einer genetischen Deletion des α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptors gezeigt, dass die Proteinexpression des α_{2B} -Adrenozeptors unterhalb der Nachweisgrenze von Bindungsstudien mit dem Radioliganden [3 H]RX821002 liegt. Dieser Befund traf sowohl auf Homogenate als auch auf Schnittpräparate der betreffenden Mäuse zu. Wenngleich man in diesen Tieren eine erhöhte Expression des verbleibenden α_{2B} -Subtypen postulieren würde.

In der erwähnten Studie wurde anhand von α_{2A} - und α_{2C} -Knockout Mäusen die Prädominanz des α_{2A} -Subtyps gegenüber dem α_{2C} -Subtypen im ZNS nachgewiesen. Auf mRNA-Ebene konnte diese Verteilung nicht bestätigt werden, da beide Subtypen in vergleichbarer Konzentration nachgewiesen wurden. Diese Diskrepanz ist nicht verwunderlich, da ein Genexpressionsunterschied verschiedener Gene auf mRNA-Ebene nicht zwingend mit dem auf Proteinebene korrelieren muss (Greenbaum et al. 2003; Übersichtsartikel: Howbrook et al. 2003).

2.2.2 Noradrenalintransporter-Knockout-induzierte Regulation der mRNA und des Rezeptorproteins von α_2 -Adrenozeptoren

Während der Knockout des Noradrenalintransporters die mRNA-Expression des α_{2B} -Adrenozeptorsubtyps nicht beeinflusste, wurde die des α_{2A} - und des α_{2C} -Subtyps im Hirnstamm intensiv hochreguliert (C.2.3.3, Seite 75; Abbildung 22, Seite 77). Diese Hirnregion enthält mit dem Locus coeruleus die Hirnregion mit der höchsten Dichte an noradrenergen Zellkörpern (Foote et al. 1983; Cooper et al. 2002). Von diesem Kerngebiet projizieren die noradrenergen Axone in den cerebralen Cortex, den Hippocampus, den Thalamus, das Mittelhirn, den Hirnstamm, das Cerebellum und das Rückenmark. Diese kleine Hirnregion innerviert folglich nahezu das gesamte ZNS. Es wird ersichtlich, warum eine erhöhte mRNA Expression der $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren in diesem Kerngebiet eine erhöhte Dichte der Rezeptoren in den genannten Hirnarealen zur Folge haben kann.

Signifikant erhöht war auch die mRNA-Expression des α_{2C} -Adrenozeptors im Hippocampus der NAT^{-/-}-Mäuse. Von dieser Region ist bekannt ist, dass sie α_{2C} -Adrenozeptor-mRNA in hoher Dichte im entorhinalen Cortex und in den Pyramidenzellen der Regionen CA1 und CA3 (Wang et al. 1996) exprimiert. Des weiteren wurden signifikant erhöhte Spiegel der α_{2C} -Adrenozeptor-mRNA im Striatum (Caudate Putamen) der NAT^{-/-}-Mäuse nachgewiesen.

Die Proteinexpression der α_2 -Adrenozeptoren im ZNS von NAT^{+/+}- und NAT^{-/-}-Mäusen wurde zunächst in Sättigungsexperimenten an Gesamthirnhomogenaten untersucht. Zur Detektion wurde der tritierte α_2 -Adrenozeptoragonist [³H]RX821002 verwendet, der mit vergleichbar hoher Affinität an alle drei Subtypen bindet (O'Rourke et al. 1994). Aus der Literatur ist bekannt, dass ca. 90 % der erfassten Rezeptoren dem Subtyp A und nur ca. 10 % dem Subtyp C angehören. Wie bereits erwähnt, ist der Subtyp B mit diesem Radioliganden im ZNS nicht detektierbar (Bücheler et al. 2002). In diesen Experimenten zeigte sich eine tendenzielle, nicht signifikant erhöhte Dichte von $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren im ZNS der NAT^{-/-}-Mäuse (siehe C.3.1.1, Seite 94; Abbildung 27, Seite 95).

Um diesem Befund nachzugehen, wurden quantitative Autoradiografien mit dem gleichen Radioliganden ausgeführt. Diese Methode hat den prinzipiellen Vorteil, dass auch einzelne Hirnregionen und Kerngebiete exakt quantifizierbar sind. Aus

Abbildung 29 (Seite 98) wird ersichtlich, dass in $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäusen die Dichte der $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren im Locus coeruleus und in den von dort aus innervierten Hirnregionen (Lindvall und Bjorklund 1983; Wang et al. 1997), wie dem cerebralen Cortex, dem Hippocampus (LMol), dem Thalamus (LD, MD), dem Hypothalamus (MD) und der Amygdala (BSTIA), signifikant erhöht ist.

Eine erhöhte Rezeptordichte wurde gleichfalls im Striatum (CPu), einer der wenigen Hirnregionen in denen vornehmlich α_{2C} -Adrenozeptoren exprimiert werden (Holmberg et al. 2003; Fagerholm et al. 2004), nachgewiesen. Hier ging die Erhöhung der Dichte von $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren Hand in Hand mit einer erhöhten $\alpha_{2A/C}$ -mRNA-Expression. In dieser Region agieren α_2 -Rezeptoren auch als Heterorezeptoren und modulieren somit die Exozytose anderer Neurotransmitter. So wurden z.B. α_{2C} -Adrenozeptoren auf GABAergen Neuronen nachgewiesen (Holmberg et al. 1999). Hingegen agieren in den Basalganglien (Bücheler et al. 2002) und im präfrontalen Cortex (Ihalainen und Tanila 2002) $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren als inhibitorische Heterorezeptoren der Dopamin-Freisetzung. Aber auch im serotoninergeren System des Hippocampus und des cerebralen Cortex vermögen $\alpha_{2A/C}$ -Adrenozeptoren die Freisetzung von Serotonin inhibitorisch zu modulieren (Scheibner et al. 2001).

Die beobachtete Hochregulation der α_2 -Adrenozeptoren in den unterschiedlichen Hirnregionen der $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäuse wirft die Frage auf, ob die Behandlung von Nagern mit Inhibitoren des Noradrenalintransporters, wie z. B. trizyklischen Antidepressiva oder Reboxetin, vergleichbare Effekte hervorruft. In der Literatur finden sich hierzu kontroverse Angaben. Die meisten Literaturbefunde beschreiben eine erniedrigte Dichte bzw. Funktion der α_2 -Rezeptoren nach Gabe von trizyklischen Antidepressiva (Übersichtsartikel: Green 1987; Katona et al. 1987). Andere Studien zeigen jedoch auch eine Desipramin-induzierte Hochregulation der α_2 -Adrenozeptoren (Asakura et al. 1982; Callado et al. 1999). Interessanterweise wurde nach der Gabe von selektiven Inhibitoren des Noradrenalintransporters, wie Nisoxetin oder Reboxetin, keine Änderung der bestimmten α_2 -Rezeptordichte oder der Funktion als inhibitorischer Autorezeptor in den Neuronen des Locus coeruleus beschrieben (Asakura et al. 1982; Gould et al. 2003). Im Gegensatz zu den trizyklischen Verbindungen weisen diese Substanzen keine Affinität zu anderen Rezeptorsystemen auf. Aber auch im Fall der Behandlung mit Desipramin gibt es Berichte über eine unveränderte Funktion der inhibitorischen, präsynaptischen α_2 -

Adrenozeptoren im präfrontalen Cortex (Garcia et al. 2004) und über unveränderte Rezeptordichten im Locus coeruleus (Sacchetti et al. 2001).

Eine Erklärung für dieses heterogene Bild nach der Behandlung mit Antidepressiva wäre eine regional begrenzte Regulation. Eine andere wäre ein differenzieller Effekt auf die Expression und Funktion der Auto- und Heterozeptoren. So ist bekannt, dass die von α_2 -Heterozeptoren modulierte Freisetzung von Serotonin während der Behandlung mit Antidepressiva desensitisiert wird (Mongeau et al. 1994; Yoshioka et al. 1995), während die Funktion als Autorezeptor im noradrenergen System unbeeinflusst bleibt (Mongeau et al. 1997).

Vergleichbare Befunde wurden auch von Vizi et al. (2004) für die gezeigten NAT^{-/-}-Mäuse publiziert. Einerseits war die α_2 -Heterozeptor vermittelte Modulation der Serotoninfreisetzung erniedrigt und andererseits die Funktion der α_2 -Autorezeptoren der Noradrenalinfreisetzung erhöht.

Der Forced-Swim-Test nach Porsolt (2000) ist der meist genutzte Verhaltenstest zur Begutachtung eines antidepressiven Effekts im Tiermodell (Cryan et al. 2002). Als Messparameter wird die Bewegungsaktivität der Tiere in einem mit Wasser gefüllten Zylinder bestimmt. Eine geringere Zeitspanne der Immobilität wird mit einem antidepressiven Effekt gleichgesetzt. In diesem Test verhalten sich NAT^{-/-}-Mäuse wie NAT^{+/+}-Mäuse nach akuter (Xu et al. 2000) oder chronischer Behandlung (Drozdowska et al. 2005) mit Antidepressiva.

Die Rolle der α_2 -Adrenozeptoren in diesem Paradigma ist in der Literatur ausführlich beschrieben. So reduzieren Agonisten bzw. erhöhen Antagonisten die Immobilitätszeit von Nagern nach Injektion in den Locus coeruleus (Simson et al. 1986; Weiss et al. 1986).

Die Rolle der Subtypen des α_2 -Adrenozeptor in diesem Verhaltenstest wurde an Mäusen mit genetischer Deletion der Subtypen A und C untersucht. Die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout-Mäuse zeigen eine erhöhte Immobilitätszeit, die einem depressiven Verhalten gleichgesetzt werden kann. Des Weiteren zeigt das trizyklische Antidepressivum Imipramin keinen Effekt in diesem Verhaltenstest (Schramm et al. 2001).

Im Gegensatz dazu verhalten sich α_{2C} -Adrenozeptor-Knockout-Tiere wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Tiere. Dieses könnte man als antidepressives Verhalten beschreiben (Sallinen et al. 1999). Darüber hinaus zeigen Mäuse mit

überexprimiertem α_{2C} -Adrenozeptor in entsprechenden Tests depressives Verhalten (Sallinen et al. 1999).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann das antidepressive Verhalten der NAT^{-/-}-Mäuse auf unterschiedliche Weise interpretiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine verminderte Expression der schwach exprimierten α_{2C} -Adrenozeptoren in bestimmten Hirnregionen, welche in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurden. Eine andere, von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gestützte These wäre eine erhöhte Expression von α_{2A} -Adrenozeptoren.

Die verstärkte analgetische Wirkung von Morphin im Warm-Water-Tail-Flick-Test in NAT^{-/-}-Mäusen (Bohn et al. 2000) bestärkt den letztgenannten Erklärungsansatz. Denn Bohn et al. (2000) konnten zeigen, dass der Effekt komplett durch den α_2 -Adrenozeptoragonisten Yohimbin blockiert werden kann und von einer erhöhten α_2 -Rezeptordichte (10 %) im Rückenmark begleitet wird. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass der antinozizeptive Effekt von Clonidin und trizyklischen Antidepressiva vermutlich auf der Aktivierung von α_{2A} -Adrenozeptoren beruht (Gray et al. 1999).

Die α_2 -Adrenozeptor vermittelte Freisetzung von Wachstumshormonen durch den Agonist Clonidin ist eine indirekte Methode zur klinischen Erfassung der Aktivität der α_2 -Adrenozeptoren. An depressiven Patienten wurde eine nivellierte Freisetzung dieser Wachstumshormone beobachtet, was auf eine erniedrigte Expression der α_2 -Adrenozeptoren zurückgeführt wird (Siever et al. 1992; Schatzberg und Schildkraut 1995).

In der vorliegenden Arbeit induzierte Clonidin in NAT^{-/-}-Mäusen eine signifikant stärkere Reduktion der Bewegungsaktivität als in NAT^{+/+}-Mäusen. Dies kann auf eine erhöhte Dichte an α_2 -Adrenozeptoren in bestimmten Hirnregionen zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass diese von α_2 -Adrenozeptoragonisten induzierten sedativen und hypoaktiven Effekte ausschließlich auf den α_{2A} -Subtyp zurückzuführen sind (Lakhlani et al. 1997; Ihalaenen und Tanila 2004). Von Ma et al. (2005) wurde zudem gezeigt, dass in Affen Hypoaktivität durch die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren im präfrontalen Cortex ausgelöst werden kann. Dies ist eine der Regionen, in denen die untersuchten NAT^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Rezeptorexpression aufweisen.

Die erhobenen Daten zeigen somit an, dass die Funktion und Expression der α_2 -Adrenozeptoren in den NAT^{-/-}-Tieren erhöht ist. Die erhöhte Konzentration des

physiologischen Agonisten im synaptischen Spalt (Xu et al. 2000; Bohn et al. 2000) scheint somit nicht zu einer Downregulation der Rezeptoren zu führen. Dieser Befund ist im Einklang mit der Literatur, da der α_{2A} -Adrenozeptor auch nach chronischer Exposition eines Agonisten nicht downreguliert wird (Daunt et al. 1997; Saunders und Limbird 1999).

2.3 Regulation und Expression von β -Adrenozeptoren

Trotz der Existenz von Mauslinien mit genetischer Deletion des β_1 - bzw. des β_2 -Adrenozeptors (Rohrer et al. 1996; Chruscinski et al. 1999) ist über die Funktion und Expression der Subtypen im ZNS nur wenig bekannt (Engelhardt und Hein 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des β_2 -Adrenozeptors im Gehirn der Maus wesentlich geringer ist als die des β_1 -Adrenozeptors (siehe C.2.3.2, Seite 73; Tabelle 4, Seite 74).

Eine Erniedrigung der Dichte von β -Adrenozeptoren galt lange Zeit als biochemischer Marker für die Wirksamkeit von Antidepressiva (Leonard 1997). So führt im cerebralen Cortex von Ratten die chronische Behandlung mit Reboxetin, Desipramin oder Imipramin zu einer Erniedrigung der Dichte der β -Adrenozeptoren vom Subtyp 1 (Beer et al. 1987; Hosoda et al. 1995; Dziedzicka-Wasylewska et al. 2001; Gould et al. 2003). Am Beispiel der chronischen Behandlung von Ratten mit Imipramin wurde zudem gezeigt, dass der erniedrigten Proteinexpression nach 14-tägiger Behandlung eine erniedrigte mRNA-Expression zugrunde liegt, davor ist die Expression jedoch kurzfristig erhöht (Hosoda et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss auf die mRNA Expression des β_1 -Adrenozeptors durch die Deletion des Noradrenalintransporters in den untersuchten Hirnregionen festgestellt werden (siehe C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 7, Seite 79). Es konnte auch kein Einfluss auf die mRNA-Expression des β_2 -Adrenozeptors in den untersuchten Hirngebieten festgestellt werden (siehe C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 7, Seite 79). Aus der Literatur ist bekannt, dass dieser Rezeptorsubtyp, im Gegensatz zum β_1 -Subtypen, nicht durch Antidepressiva, wie Imipramin, in seiner Expression beeinflusst wird (Beer et al. 1987). Neueste Untersuchungen der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Marta Dziedzicka-Wasylewska an den $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren zeigen, dass die Expression des β -Adrenozeptorproteins, im Vergleich zu den $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren im Cortex um ca. 10 % erniedrigt ist. Dieser Befund steht im Einklang mit den eingangs erwähnten

Befunden von antidepressiv behandelten Tieren. Im Gegensatz zu den erwähnten Untersuchungen von Hosoda et al. (1995) beruht die erniedrigte Rezeptorexpression in den NAT^{-/-}-Tieren nicht auf einer veränderten mRNA-Expression. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass bei Untersuchungen an Knockout-Tieren adaptive Änderungen bedacht werden müssen, da das entsprechende Gen schon in der Embryonalentwicklung „ausgeschaltet“ ist.

3. Regulation des dopaminergen Systems

Neben dem noradrenergen ist auch das dopaminerge System in die Wirkung von Antidepressiva involviert (Übersichtsartikel: Dailly et al. 2004; Willner et al. 2005).

Aus den mit qPCR erhaltenen Daten konnte jedoch kein Hinweis auf eine Regulation im dopaminergen System der NAT^{-/-}-Mäuse erhalten werden.

So zeigten die Ergebnisse von qPCR-Experimenten, dass die mRNA-Expression des Dopamintransporters in keiner der untersuchten Hirnregionen signifikant von der Ausschaltung des Noradrenalintransporters beeinflusst wurde (C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 9, Seite 80).

Im Gegensatz zu den moderat exprimierten mRNAs des D₁- und D₂-Rezeptors konnte der Einfluss des Knockouts auf die Expression der mRNA des D₃-Rezeptors nicht quantifiziert werden, da die mRNA-Konzentration im Bereich der Nachweisgrenze der sehr sensitiven qPCR lag (siehe C.2.3.2, Seite 73; Tabelle 4, Seite 74). Dieser Expressionsunterschied der drei Rezeptoren wird auch in der Literatur beschrieben (Jaber et al. 1996).

Zwischen NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen bestand in keiner der untersuchten Hirnregionen ein Unterschied bezüglich der Expression der mRNA des D₁- oder des D₂-Rezeptors (C.2.3.3, Seite 75; Tabelle 8, Seite 79). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression dieser Rezeptoren auch auf Proteinebene nicht vom Knockout des Noradrenalintransporters beeinflusst wird (Xu et al. 2000). Diese anhand der NAT^{-/-}-Tiere erhaltenen Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen auf Protein- und mRNA-Ebene an chronisch mit Reboxetin behandelten Tieren überein (Rogoz et al. 2002). In der Studie von Xu et al. (2000) wurde interessanterweise gezeigt, dass der D₂/D₃-Rezeptor in den NAT^{-/-}-Tieren effizienter an seine G-Proteine koppelt und folglich supersensitiv erregbar ist. Dieser Befund deckt sich mit Befunden an mit Antidepressiva behandelten Tieren (Übersicht: Willner et al. 2005).

Die Ergebnisse der HPLC-Bestimmung (siehe C.3.2, Seite 99; Tabelle 17, Seite 101) von Dopamin und dem neuronalen Metaboliten DOPAC (vgl. A.1.2, Seite 7) aus den verschiedenen Hirnregionen weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Genotypen auf. Identische Befunde wurden auch von Keller et al. (2004) an Gesamthirnextrakten erhoben. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten berichten Xu et al. (2000) über 20 % erniedrigte Spiegel des extra- und intrazellulären Dopamins sowie der Metaboliten im Striatum. Möglicherweise beruht diese Diskrepanz auf abweichend präparierten Hirnarealen.

4. Genexpressionsanalyse mit Microarrays

Der Einsatz dieser relativ neuen Methode (Schena et al. 1995) erlaubte im Gegensatz zu klassischen „ein Zielgen ein Experiment“ Versuchen, wie z.B. der qPCR, die parallele Bestimmung der relativen Genexpression von mehr als 8000 Genen in einem Experiment. Der große Vorteil dieses globalen Ansatzes war, dass die Aussagekraft des Experiments nicht durch eine initiale Auswahl der untersuchten Zielgene limitiert wurde. Dem gegenüber standen der hohe experimentelle Aufwand und die, aufgrund der erzeugten Datenmenge, komplexe Datenanalyse. So fielen pro Versuch mehr als 20.000 Messwerte an. Die Spezifität der einzelnen Reaktionen hinsichtlich verschiedener Zielgene kann bei dieser Methode nicht experimentell überprüft werden, wie dies z.B. bei der qPCR üblich ist. Hinzu kam, dass auch eine theoretische Überprüfung entfiel, da die Sequenzen der immobilisierten Oligonukleotide vom Hersteller (MWG) nicht veröffentlicht werden. Die parallel in Microarray- und qPCR-Experimenten erhobenen Messwerte von sechs repräsentativen Zielgenen zeigten, dass beide Methoden eine valide Quantifizierung mit vergleichbarer Präzision ermöglichen (siehe C.2.4.2, Seite 85; Tabelle 11, Seite 86).

Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurden anhand der unter C.2.4.3 (Seite 86) beschriebenen Filterkriterien die im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren differenziell regulierten Gene selektiert. Von diesen Genen wurden 90 durch die Deletion des Noradrenalintransporters induziert und 3 subprimiert (siehe C.2.4.3, Seite 86). Da der größte Anteil der Gene mit induzierter Genexpression im Gehirn der NAT^{-/-}-Mäuse funktionell der Atmungskette oder den ribosomalen Proteinen zuzuordnen ist, wird auf diese Gene in den folgenden zwei Kapiteln näher eingegangen.

Die auf mRNA-Ebene regulierten Gene, die nicht diesen funktionellen Gruppen zuzuordnen sind, entstammen sehr unterschiedlichen physiologischen Systemen oder sind nach heutigem Erkenntnisstand nicht funktionell charakterisiert. Zukünftige Studien haben die Auswirkung ihrer Regulation auf die Proteinexpression im ZNS und die physiologische Relevanz zu klären.

4.1 Regulation der RNA-Expression von ribosomalen Proteinen

Die 25 ribosomalen Proteine mit im Vergleich zu den NAT^{+/+}-Tieren signifikant erhöhter mRNA-Expression im ZNS der NAT^{-/-}-Tiere gehören zur Gruppe der ribosomalen Proteine, die bei Säugern ca. 80 unterschiedliche Proteine umfasst (Übersichtsartikel: Wool 1979). Zusammen mit den 4 ribosomalen RNAs (28S, 18S, 5,8S und 5S) bilden sie die Ribosomen, die der Proteinsynthese dienen. Eine typische Zelle eines Säugers enthält ca. 4×10^6 Ribosome, deren ribosomale Proteine 5 - 10 % des zellulären Proteins und deren ribosomale RNA ca. 80 % der zellulären RNA ausmachen (Übersicht: Kenmochi et al. 1998). Die Expression der ribosomalen RNAs konnte in den Microarray-Experimenten allerdings nicht erfasst werden, da ribosomale RNAs nicht polyadenyliert sind. Dies ist jedoch Voraussetzung für die verwendete reverse Transkription mit Oligo-d(T₁₈)-Primern. In qPCR-Experimenten konnte aber gezeigt werden, dass die Expression ribosomaler 18s-rRNA in den Hirnregionen Bulbus olfactorius, Hippocampus und Striatum der NAT^{-/-}-Tiere gleichfalls erhöht war (siehe C.2.3.1.4, Seite 70; Abbildung 20, Seite 72). Der Knockout des Noradrenalintransporters induziert also neben der mRNA-Expression ribosomaler Proteine auch die Expression ribosomaler 18s-rRNA. Die Inaktivierung des Noradrenalintransporters löst demnach wahrscheinlich eine erhöhte Bereitstellung von Ribosomen aus, die eine erhöhte Proteinsyntheserate ermöglichen. Da es aus der Literatur bisher keine vergleichbaren Befunde gibt, stellt die Regulation ribosomaler Proteine ein neuartiges Prinzip dar, dessen Relevanz in nachfolgenden Studien zu klären ist.

4.2 Regulation der RNA-Expression von Proteinen der Atmungskette

Die Ergebnisse der Microarray-Experimente zeigten, dass die genetische Deletion des Noradrenalintransporters im ZNS der Mäuse eine mehr als 2-fach erhöhte mRNA-Expression von 30 Proteinen der Atmungskette auslöst. Hierzu gehören unter anderem die mitochondrialen Enzyme NADH-Dehydrogenase, Cytochrom-C-Reduktase, Cytochrom-C-Oxidase und die ATP-Synthase. Von diesen Enzymen wurden jeweils verschiedene Untereinheiten erfasst, die vergleichbar reguliert wurden. Die Expression dieser basalen Zellstoffwechselvorgänge scheint in das Krankheitsgeschehen psychischer Erkrankungen involviert zu sein. In Microarray-Studien an post-mortem entnommenen Hirnproben wurde gezeigt, dass die genannten mRNAs der genannten Enzyme im präfrontalen Cortex (Middleton et

al. 2002) und im Hippocampus (Altar et al. 2005) von schizophrenen Patienten niedriger exprimiert wurden als in den Proben der Kontrollgruppe. In der letztgenannten Studie wurden auch Proben aus dem Hippocampus von 10 depressiven Patienten untersucht. Diese Proben zeigten keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihres Expressionsmusters. Möglicherweise ist die betrachtete Hirnregion, der Hippocampus, nicht primär in die Entwicklung des Krankheitsgeschehens der Depression involviert. Ein für die Aussagekraft dieser Studie kritischer Punkt ist, dass die Ergebnisse durch die nicht näher erläuterte medikamentöse Therapie der Patienten beeinflusst waren. Neben dieser Problematik wird die Aussagekraft der an post-mortem entnommenen Proben vorgenommenen Analysen auch durch den abweichenden genetischen Hintergrund und Lebensstil der verstorbenen Patienten begrenzt (Übersichtsartikel: Mirnics und Pevsner 2004).

Falls die erhöhte RNA-Expression der Stoffwechselenzyme eine erhöhte Expression auf Proteinebene zur Folge hat, könnte dies die Ursache für die im Vergleich zu NAT^{+/+}-Mäusen um ca. 10% niedrigeren Körpergewichte der NAT^{-/-}-Tiere sein. Es stellte sich die Frage, ob die Erniedrigung des Gewichts nicht auf einer erhöhten Bewegungsaktivität beruht, wie sie z. B. durch Psychostimulanzien ausgelöst wird. Die Ergebnisse der Verhaltensstudie (siehe C.4.1, Seite 101) und Befunde aus der Literatur (Xu et al. 2000) zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen vorliegt. Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass neben der genetischen Deletion des Noradrenalintransporters im Mausmodell auch die Inhibierung des Noradrenalintransporters mit Reboxetin zu einer Gewichtsreduktion führt (Poyurovsky et al. 2003; Lu et al. 2005).

E. Zusammenfassung

Die Wirkung aller klinisch relevanten Antidepressiva tritt erst nach mehreren Wochen auf. Diese Latenzzeit legt nahe, dass weniger die akuten pharmakologischen Effekte als vielmehr adaptive Veränderungen auf Rezeptorebene und anderen Ebenen den antidepressiven Effekt auslösen.

Der Wirkmechanismus einer Vielzahl von antidepressiv wirksamen Verbindungen ist die Hemmung des Noradrenalintransporters, der physiologisch für die schnelle Rückaufnahme von Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt noradrenerger Neurone verantwortlich ist. Diese Antidepressiva erhöhen die Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt.

Mäuse, bei denen der Noradrenalintransporter durch homologe Rekombination inaktiviert (Knockout) wurde ($\text{NAT}^{-/-}$ -Mäuse), können als Modell für mit Antidepressiva behandelte Tiere angesehen werden. Diese $\text{NAT}^{-/-}$ -Mäuse verhalten sich in relevanten Verhaltenstests wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Tiere ($\text{NAT}^{+/+}$). Die Untersuchung der durch die Inaktivierung des Noradrenalintransporters induzierten adaptiven Veränderung der Genexpression im ZNS der Tiere kann zum Verständnis des antidepressiven Wirkmechanismus beitragen.

Der Einfluss des Knockouts des Noradrenalintransporters auf die Gewebekonzentrationen von Noradrenalin und Dopamin sowie ihrer Metaboliten MHPG und DOPAC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels HPLC in den Hirnregionen Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum bestimmt. Die so ermittelten Noradrenalin-Gewebespiegel zeigten, außer im Striatum, einen Verlust der intraneuronalen Noradrenalin-Speicherung von 30-85 % in den $\text{NAT}^{-/-}$ -Tieren. Die Gewebespiegel des Noradrenalinmetaboliten MHPG wiesen nur im Cerebellum der $\text{NAT}^{-/-}$ -Tiere einen im Vergleich zu $\text{NAT}^{+/+}$ -Tieren um 20 % erniedrigten Wert auf.

Ferner war die Konzentration an Dopamin ausschließlich im Bulbus olfactorius der $\text{NAT}^{-/-}$ -Tiere signifikant erniedrigt. Keinen Einfluss hatte die Inaktivierung des Noradrenalintransporters auf die Konzentration des Dopaminmetaboliten DOPAC in den betrachteten Hirnregionen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung der differentiellen Genexpression im ZNS von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Mäusen.

Hierzu wurde eine umfassende Genexpressionsanalyse mit der Microarray-Technologie an Gesamthirnen von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren vorgenommen. Von den mehr als 8000 quantifizierten Genen wurden 90 Gene maßgeblich in ihrer mRNA-Expression durch den Knockout des Noradrenalintransporters induziert und lediglich 4 supprimiert. Unter den Genen mit erhöhter Expression befinden sich vornehmlich solche, die den ribosomalen Proteinen (30 %) oder den Proteinen der Atmungskette (27 %) zuzuordnen sind. Die erhöhte Expression der ribosomalen Proteine korreliert gut mit den aus der qPCR erhaltenen Ergebnissen für die ribosomale 18S-rRNA, welche im Bulbus olfactorius, Hippocampus und Striatum durch den Knockout induziert wurde. Die erhöhte Expression der für Enzyme der Atmungskette kodierenden mRNAs ist ein Hinweis auf einen erhöhten allgemeinen Grundumsatz in diesen Tieren, der ursächlich an dem im Vergleich zu NAT^{+/+}-Tieren erniedrigten Körpergewicht beteiligt sein könnte.

Zusätzlich zu der umfassenden Analyse der Genexpression auf Gesamthirnebene wurde die Genexpression von fünfzehn selektierten Zielgenen der definierten Hirnregionen Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus und Striatum sowie im Gesamthirn von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren mit quantitativer real-time PCR (qPCR) untersucht. Auf Gesamthirnebene wurde weder die mRNA-Expression der Noradrenalin-Synthesenzyme (Dopamin- β -Hydroxylase und Tyrosinhydroxylase), der Neurotransmittertransporter (Dopamintransporter und vesikulärer Monoamintransporter 2), der adrenergen Rezeptoren (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 und β_2), noch der Dopaminrezeptoren (D_1 , D_2 und D_3) durch die Inaktivierung des Noradrenalintransporters signifikant beeinflusst. Die Untersuchungen an den genannten Hirnregionen zeigten nur für die mRNA-Expression des α_{1B} -, α_{2A} und α_{2C} -Adrenozeptors einen regional begrenzten Einfluss an. So war die mRNA-Expression dieser drei Rezeptoren im Hirnstamm der NAT^{-/-}-Tiere um den Faktor 4 höher als in den NAT^{+/+}-Tieren. Außerdem war die Expression des α_{2C} -Adrenozeptors im Striatum und Cerebellum der NAT^{-/-}-Tiere 2-fach erhöht. In quantitativen Autoradiografien mit dem tritiierten Radioliganden [³H]RX821002 wurde nachgewiesen, dass die erhöhte mRNA-Expression der

α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren auch zu einer erhöhten Expression der Rezeptorproteine in allen untersuchten Hirnregionen der $NAT^{-/-}$ -Tiere führte. Die ausgeprägteste Expressionserhöhung (+15-26 %) wurde in den Regionen Cortex, Striatum, Hippocampus, erweiterte Amygdala, Locus coeruleus und lateraler parabrachialer Nukleus bestimmt.

Die funktionelle Konsequenz der erhöhten Expression der α_2 -Adrenozeptoren im ZNS der $NAT^{-/-}$ -Tiere zeigte sich auch in einem Verhaltenstest. In diesem Test war die vom α_2 -Agonisten Clonidin vermittelte Hypoaktivität in den $NAT^{-/-}$ -Tieren signifikant ausgeprägter als in den $NAT^{+/+}$ -Tieren.

Somit weisen die $NAT^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu den $NAT^{+/+}$ -Tieren eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression, sowie eine erhöhte Funktion der zentralen α_2 -Rezeptoren auf.

F. Anhang

1. Partielle genomische Sequenz des Noradrenalintransportergens von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren

Die Generierung der in dieser Arbeit untersuchten NAT^{-/-}-Mäuse wurde erstmalig von Wang et al. (1999) beschrieben. Sie erfolgte durch homologe Rekombination eines Vektorkonstrukts (Thomas und Capecchi 1987). Hierdurch wurde ein ca. 3000 Basenpaar großes Konstrukt im 3' Bereich der Bgl II-Schnittstelle des zweiten Exons des Noradrenalintransporters inseriert. Dieses Konstrukt (siehe Abbildung 10, Seite 57) enthält im 5' Bereich die kodierende Sequenz von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), einem Photoprotein. Allerdings wurde weder die genaue Basenfolge des Konstrukts noch die der resultierenden genomischen Sequenz veröffentlicht. Die Kenntnis der genomischen Sequenz war jedoch für die Auswahl von Primern zur Genotypisierung (C.1.1, Seite 56) hilfreich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sequenzübergang vom Exon 2 des Noradrenalintransportergens zur kodierenden Sequenz des EGFPs sequenziert (siehe B.3.18, Seite 49). Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mittels der bekannten Sequenzen von EGFP (GenBank (NCBI) Accession-Nummer U57608) und dem Gen des Noradrenalintransporters (Ensembl. Transcript ID: ENSMUST00000072939) abgeglichen. Die partiellen genomischen Sequenzen von NAT^{-/-}- und NAT^{+/+}-Tieren sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt.

```

1   ATGCAATGAT CCCGATTTCT CATGGGTTTC TGTGACAATC TGGGGGAATT CAGTAAAATT
61  AGGCTTGGGG AAGCCATGTG AAGCCTTACA ATGATACCAG TGTGAGAAAA TGAGACTCCA
121 CCTGTCACCT TAGGCACTGT CCCTCCCTGT CTGGTCTCAG TCATCTTGCC TGAGGAAAGG
181 AAAGGCTGGC CTTACATGGG AGTTTTCAGA GTTTTCACCT TCATGAAAGG AAAGGTTCTG
241 GGTTGAGGTG TGTTAGGTGG AAGTTGTATC TGGTGGTGCT TTATGGCATG TAGTGTGCAC
301 TGAAGGCTAG GAGAAGCTGT GGGAACACAG CTCTGTCCCT GTGCTTCACG CAAACCTTAC
361 TTCCTCTGAG GACAGATGAG CATTATTATG ATTATGAACA CTATGACCGC ACATGCTTAC
421 TGCTATGCCA ATCAAGTGTT CTACATAACC ATTACCACAG ATCATCTCCT GGGAAATGGG
481 CAAGAGGTAG ATGAACAAGG ATCCACGCAG CTATTGTAGA GAGGTGACTA CAGCCCTCTG
541 AGGGGTGTCC ATCCTGCAGG TCTGAGGTTG CCTCTATGTC TTGTAGGTGC CTTCCTGATT
601 CCATACACGC TGTTCTTCAT CATTGCTGGG ATGCCTCTGT TTTACATGGA GCTGGCTCTG
661 GGGCAATACA ACCGAGAGGG GGCAGCCACA GTGTGGAAGA TCCACCGGCG GTGCGCACCA
721 TGGTGAGCAA GGGCGAGGAG CTGTTCACCG GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG
781 GCGACGTAAA CGGCCACAAG TTCAGCGTGT CCGGCGAGGG CGAGGGCGAT GCCACCTACG
841 GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT GCCCGTGCCC TGGCCCACCC
901 TCGTGACCAC CCTGACCTAC GGCGTGAGT GCTTCAGCCG CTACCCCGAC CACATGAAGC
961 AGCACGACTT CTTCAAGTCC GCCATGCCCC AAGGCTACGT CCAGGAGCGC ACCATCTTCT
1021 TCAAGGACGA CGGCAACTAC AAGACCCGCG CCGAGGTGAA GTTCGAGGGC GACACCCTGG
1081 TGAACCGCAT CGAGCTGAAG GGCATCGACT TCAAGGAGGA CGGCAACATC CTGGGGCACA
1141 AGCTGGAGTA CAACTACAAC AGCCACAACG TCTATATCAT GGCCGACAAG CAGAAGAACG
1201 GCATCAAGGT GAAGTTCAAG ATCCGCCACA ACATCGAGGA CGGCAGCGTG CAGCTCGCCG
1261 ACCACTACCA GCAGAACACC CCCATCGGCG ACGGCCCCGT GCTGCTGCCC GACAACCACT
1321 ACCTGAGCAC CCAGTCCGCC CTGAGCAAAG ACCCCAACGA GAAGCGCGAT CACATGGTCC
1381 TGCTGGAGTT CGTGACCGCC GCCGGGATCA CTCTCGGCAT GGACGAGCTG TACAAGTAA

```

Abbildung 32: Genomische Sequenz der flankierenden Regionen der Bgl II-Schnittstelle im Exon 2 des Noradrenalintransporters von NAT^{-/-}-Tieren.

Die Genabschnitte der Intron- (blau unterstrichen) und Exonsequenzen (gelb unterstrichen) des Noradrenalintransporters und die für EGFP kodierende Sequenz (grün unterstrichen; Start- und Stopcodon, grün hinterlegt) sind farblich hervorgehoben. Gleiches gilt für die Bgl II-Schnittstelle (rot) und die Bindungsstellen der Primer für die Genotypisierung (mNATEx2s, gelb hinterlegt; EGFPas, grau hinterlegt; vgl. C.1.1, Seite 56).

1 ATGCAATGAT CCCGATTTCT CATGGGTTTC TGTGACAATC TGGGGGAATT CAGTAAAATT
 61 AGGCTTGGGG AAGCCATGTG AAGCCTTACA ATGATACCAG TGTGAGAAAA TGAGACTCCA
 121 CCTGTCACCT TAGGCACTGT CCCTCCCTGT CTGGTCTCAG TCATCTTGCC TGAGGAAAGG
 181 AAAGGCTGGC CTTACATGGG AGTTTTCAGA GTTTTCACCT TCATGAAAGG AAAGGTTCTG
 241 GGTTGAGGTG TGTTAGGTGG AAGTTGTATC TGGTGGT**GCT** **TTATGGCATG** **TAGTGTGCAC**
 301 TGAAGGCTAG GAGAAGCTGT GGGAACACAG CTCTGTCCCT GTGCTTCACG CAAACTTTAC
 361 TTCCTCTGAG GACAGATGAG CATTATTATG ATTATGAACA CTATGACCGC ACATGCTTAC
 421 TGCTATGCCA ATCAAGTGTT CTACATAACC ATTACCACAG ATCATCTCCT GGGAAATGGG
 481 CAAGAGGTAG ATGAACAAGG ATCCACGCAG CTATTGTAGA GAGGTGACTA CAGCCCTCTG
 541 AGGGGTGTCC ATCCTGCAGG TCTGAGGTTG CCTCTATGTC TTGTAGGTGC CTTCTGATT
 601 CCATACACGC TGTTCCCTCAT CATTGCTGGG ATGCCTCTGT TTTACATGGA GCTGGCTCTG
 661 GGGCAATACA ACCGAGAGGG GGCAGCCACA GTGTGGAAG**A** **TCT**GGCCCTTT CTTCAAAGGT
 721 AGGAATGATC TGAGGCAAGG CCAATATTTT CTCCAAAGTC TTCCTTGGA TATCCTGAAG
 781 AATCTTCTCC CAAGGTGAGA CTTAAGGTAG ACCAACTCTT ACCTGGGGCT ATGGGCACTG
 841 GTGATGTCAA GATTGCCAC CATTCAAATT TACACAAAGA AACTAGGATA CATGAAGTGT
 901 AGCCTGAAAT TCGAGCTCCA GCTTAGGCCT CACTATGGGA AATACAAAGA TAGCAGGGAC
 961 TTCAGTACAC ATTCCTCTGC TCTCACTTCT TTCTCTCATG GCAGGCATGG CAAGTTGATC
 1021 ACAGAT**GCCT** **TCAAGTTCAA** **GCAGAAAGCC** GCCTTAGAAA TCTTGACCCA ACAGCTAGGA
 1081 CTGCTGTAAG GTTAACTTGT ACTTGAATTT AGAGCAGGTC TGTGGGAACT AGCCATGACA
 1141 GCTACCATTC TCCATCCCCT AGACTATTAG GAGAAGGATG AGGAACAAGG CCAGTATCTC
 1201 CCAAAAACTG GTTACAAGAA ATGGAGACAG TAAGTACAAG TGTGTCTCCC ATGATCCTCT
 1261 CCTTAAGAGG CGAGAGTCTC CTCAGCACCT TGTATATACT GGCTCAGTGA TGAGGAGGGC
 1321 AGGCTGACAT AAAAGTCTTA CAAGACACAT GGTTAGCATC TTTTCTGTTA AGTCACCTGA
 1381 GATCCAGCTC ATGATGGTTT CATTTTATTA TTTTATATGT TTTAAAAATT ATGACTAATT

Abbildung 33: Genomische Sequenz der flankierenden Regionen der Bgl II-Schnittstelle im Exon 2 des Noradrenalintransporters von NAT^{+/-}-Tieren

Die Genabschnitte der Intron- (blau unterstrichen) und Exonsequenzen (gelb unterstrichen) des Noradrenalintransporters sind farblich hervorgehoben. Gleiches gilt für die Bgl II-Schnittstelle (rot) und die Bindungsstellen der Primer für die Genotypisierung (mNATEx2s, gelb hinterlegt; mNATEx2as, hellblau hinterlegt; vgl. C.1.1, Seite 56).

2. cDNA-Sequenz des murinen VMAT2

```

1   CGAAGCGAAG CAAAGCTATG GCCCTGAGCG ATCTGGTGCT GCTGCGATGG CTGCGGGACA
61  GCCGCCACTC GCGCAAGCTG ATCCTGTTCA TCGTGTTCCT CGCGCTGCTG CTAGACAACA
121 TGCTGCTCAC CGTCGTAGTT CCCATCATTC CCAGCTACCT GTACAGCATT AAGCACGAGA
181 AAAATACTAC GGAAATCCAG ACTGCCAGGC CAGCGCTCAC AGCCTCCACT TCCGAAAGCT
241 TCCACAGCAT CTTCTCTTAC TATAACAACT CTACTGTGTT CACGGGGAAT GCCACGGGGG
301 GCCTCCCAGG AGGGGAGTCA CCCAAGGCTA CCACCACACA GCACACTGTG ACCAACACGA
361 CTGTCCCTCC CGACTGCCCC AGTGAAGACA AAGACCTTCT AAATGAGAAT GTGCAAGTTG
421 GGCTGCTGTT TGCCTCCAAA GCCACTGTCC AGCTCCTCAC CAACCCATTG ATAGGACTTC
481 TAACCAACAG AATTGGCTAT CCAATTCCCA TGTGCTGCTG ATTCTGCATT ATGTTTATCT
541 CAACAGTTAT GTTTGCCTTC TCCAGCAGCT ATGCCTTCCT GCTGATCGCC AGGTCCCTGC
601 AGGGAATCGG CTCCTCTTGC TCATCTGTGG CTGGGATGGG CATGCTGGCC AGCGTGATCA
661 CAGATGATGA AGAGAGGGGT AACGCCATGG GGATTGCTCT GGGGGGCCTG GCCATGGGGG
721 TCTTAGTGGG ACCCCCCTTT GGAAGTGTGC TCTATGAGTT TGTGGGGAAG ACAGCTCCTT
781 TCCTGGTGCT TGCTGCCTTG GTGCTCTTGG ATGGAGCTAT TCAGCTCTTT GTGCTCCAGC
841 CATCCCGAGT GCAGCCAGAA AGTCAGAAGG GGACACCTCT TACGACCTTG CTGAAGGACC
901 CATAATTCT CATCGCTGCA GGCTCCATCT GCTTTGCAAA CATGGGGATA GCCATGCTGG
961 AGCCCGCCCT GCCCATCTGG ATGATGGAGA CCATGTGTTT CCGAAAGTGG CAGCTGGGCG
1021 TTGCCTTCCT GCCAGCGAGC ATCTCTTATC TCATTGGAAC CAATATTTTT GGGATACTTG
1081 CACACAAAAT GGGAAAGGTGG CTGTGTGCTC TTCTGGGAAT GATAGTTGTT GGGATCAGCA
1141 TTTTATGTAT TCCTTTTGCA AAAAATATCT ACGGACTCAT CGCTCCCAAC TTTGGAGTTG
1201 GTTTTGCCAT TGGGATGGTG GACTCCTCCA TGATGCCTAT CATGGGCTAC CTGGTGGACC
1261 TGCGGCACGT GTCTGTCTAT GGGAGTGTGT ATGCCATTGC AGATGTAGCC TTCTGCATGG
1321 GGTATGCTAT CGGTCCCTCT GCTGGTGGTG CTATTGCAAA GGCAATTGGC TTTCTTGGC
1381 TCATGACAAT TATTGGGATA ATTGATATTG TTTTGTCTCC ACTCTGCTTT TTTCTTCGAA
1441 GTCCACCTGC TAAGGAAGAA AAAATGGCTA TCCTCATGGA CCACAACCTGC CCCATTAAGA
1501 CAAAGATGTA CACTCAGAAT AATGTCCAGC CGTACCCCGT CGGTGATGAT GAAGAATCTG
1561 AGAGTGACTG AGCCCCTCTA ACGTTGCCCA ATGTTTAACT GTGTACATGT GTCTCCAG

```

Abbildung 34: cDNA-Sequenz des vesikulären Monoamintransporters 2 (slc18a2)

Die Sequenz wurde in der GenBank des NCBI unter der Accession-Nummer AJ555564.1 abgelegt. Das Start- und Stoppcodon des kodierenden Bereichs der Sequenz (Base 18-1571) ist jeweils farbig (rot) unterstrichen.

3. mRNA-Expressionsprofile der Zielgene

Die mit der qPCR erhobenen Messwerte (vgl. C.2.3.2, Seite 73) erlaubten einen Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Hirnareale (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Hypothalamus, Striatum). Anhand der Daten der Wildtyp-Mäuse (NAT^{+/+}) konnten für die verschiedenen Zielgene Expressionsprofile erstellt werden, die in den Tabellen 18-23 zusammengefasst werden. Es sollte bedacht werden, dass aufgrund der makroskopischen Präparation nur ein sehr grober Vergleich möglich war. Da das Gehirn jedoch ein sehr komplexes physiologisches System darstellt, war eine exakte Expressionsanalyse anhand der untersuchten Proben nicht möglich. Für eine solche Zielsetzung wäre zumindest die Analyse einzelner Kerngebiete erforderlich gewesen. Berücksichtigt man diese Einschränkungen bei der Begutachtung der Daten, so lassen die in den Tabellen 18-23 gezeigten Daten doch gewisse Rückschlüsse über die Expressionshöhe der Gene in den bestimmten Hirnarealen zu.

Es wurden jeweils 2 µg extrahierte Gesamt-RNA revers transkribiert und Aliquote der resultierenden cDNAs mit qPCR vermessen. Die relative Quantifizierung erfolgte jeweils im Vergleich zum Cortex, dem größten untersuchten Hirnareal (siehe C.1.2, Seite 58). Eine Quantifizierung auf Basis der Gesamthirndaten war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da die Daten in unterschiedlichen Experimenten erhoben wurden (vgl. B.3.10.7, Seite 38).

Initial wurde die Stabilität der zur Normalisierung der Daten verwendeten Referenzgene, wie im Kapitel C.2.3.1.4 (Seite 70) beschrieben, überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl die verschiedenen Referenzgene (β-Actin, GAPDH und HPRT1) als auch die in dieser Arbeit vorgestellte cRNA eine valide Normalisierung der Ergebnisse ermöglichte. In Abbildung 35 wird dies repräsentativ für die Ergebnisse des D₁-Rezeptors veranschaulicht.

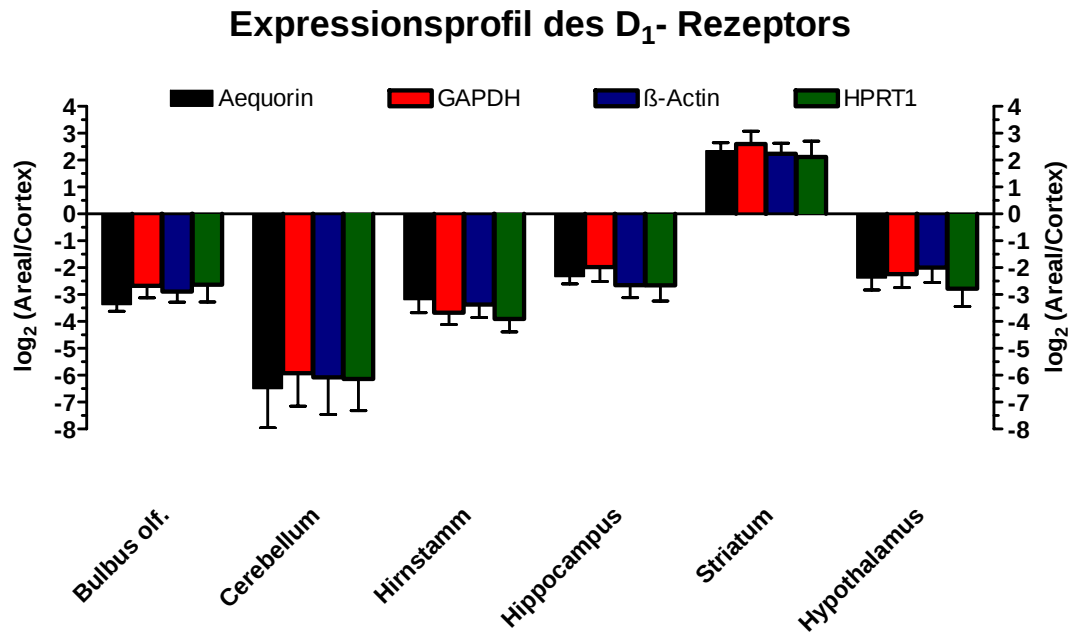


Abbildung 35: Einfluss verschiedener interner Standards auf das relative mRNA-Expressionsprofil des D₁-Rezeptors in NAT^{+/+}-Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde mit cRNA (Aequorin) versetzt (10^6 Kopien / μg RNA), revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der cRNA und der endogenen β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{Hirna real/Cortex}]$) von 4 Tieren beider Genotypen.

	α_{1A}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)	α_{1B}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)	α_{1D}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 7)
Bulbus olf.	3,42 ± 0,56	-0,84 ± 0,32	-1,72 ± 0,27
Cerebellum	-0,16 ± 0,66	-1,36 ± 0,48	-2,16 ± 0,48
Hirnstamm	0,9 ± 0,54	-0,94 ± 0,49	-2,82 ± 0,5
Hippocampus	0,4 ± 0,41	-1,76 ± 0,3	-0,82 ± 0,43
Striatum	-0,31 ± 0,56	-1,46 ± 0,58	-4,23 ± 0,65
Hypothalamus	1,45 ± 0,25	-0,18 ± 0,72	-4,33 ± 0,46

Tabelle 18: Relative mRNA-Expression der α_1 -Adrenozeptorsubtypen der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert und die Zielsequenzen mit qPCR quantifiziert. Die Messwerte wurden anhand der β -Actin-, GAPDH- und HPRT1-mRNAs normalisiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung ($\pm$ SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ($\log_2[\text{Hirnareal/Cortex}]$) von (n) Tieren.

	α_{2A}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)	α_{2B}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 7)	α_{2C}-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)
Bulbus olf.	-0,76 ± 0,25	-0,09 ± 0,69	-2,22 ± 0,68
Cerebellum	0,18 ± 0,13	1,23 ± 0,33	-0,05 ± 1
Hirnstamm	-1,54 ± 0,59	1,71 ± 0,9	-3,76 ± 0,87
Hippocampus	-1,19 ± 0,55	-1,25 ± 0,97	-2,72 ± 0,94
Striatum	-2,54 ± 0,41	2,21 ± 0,63	-0,91 ± 1,34
Hypothalamus	-1,26 ± 0,67	1,91 ± 1,58	-3,58 ± 0,55

Tabelle 19: Relative mRNA-Expression der α_2 -Adrenozeptorsubtypen der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 18 (Seite 129)

	β_1-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)	β_2-AR $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)
Bulbus olf.	-2 ± 0,31	-0,61 ± 0,37
Cerebellum	-3,04 ± 0,49	1,05 ± 0,38
Hirnstamm	-1,93 ± 0,34	-0,57 ± 0,42
Hippocampus	-1,38 ± 0,19	-0,96 ± 0,86
Striatum	-1,76 ± 0,61	-1,46 ± 0,48
Hypothalamus	-3,13 ± 0,73	-0,39 ± 0,72

Tabelle 20: Relative mRNA-Expression der β_1 - und β_2 -Adrenozeptorsubtypen der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 18 (Seite 129)

	D₁ $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 9)	D₂ $\log_2(\text{Areal/Cortex})$ (n = 5)
Bulbus olf.	-2,95 ± 0,36	-3,84 ± 0,81
Cerebellum	-6,22 ± 1,32	-2,04 ± 0,32
Hirnstamm	-3,54 ± 0,41	-1,18 ± 0,26
Hippocampus	-2,44 ± 0,4	-3,43 ± 0,54
Striatum	2,3 ± 0,42	2,2 ± 0,53
Hypothalamus	-2,4 ± 0,51	-2,11 ± 0,45

Tabelle 21: Relative mRNA-Expression der D₁- und D₂-Dopaminrezeptoren der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 18 (Seite 129)

	DBH log₂(Areal/Cortex) (n = 7)	TH log₂(Areal/Cortex) (n = 7)
Bulbus olf.	0,33 ± 0,46	5,49 ± 0,86
Cerebellum	1,95 ± 1,11	1,72 ± 0,41
Hirnstamm	3,27 ± 0,73	2,05 ± 0,61
Hippocampus	-1,02 ± 1	-2,96 ± 0,29
Striatum	-4,83 ± 1,21	0,56 ± 0,69
Hypothalamus	-2,14 ± 0,75	2,98 ± 0,31

Tabelle 22: Relative mRNA-Expression der Dopamin-β-Hydroxylase und der Tyrosinhydroxylase der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 18 (Seite 129)

	DAT log₂(Areal/Cortex) (n = 9)	VMAT2 log₂(Areal/Cortex) (n = 9)
Bulbus olf.	3,48 ± 0,57	6,11 ± 1,05
Cerebellum	-0,97 ± 1,5	3,00 ± 0,93
Hirnstamm	5,87 ± 0,55	4,94 ± 0,62
Hippocampus	-1,58 ± 0,99	4,60 ± 1,19
Striatum	0,9 ± 1,05	1,85 ± 0,43
Hypothalamus	4,27 ± 0,78	5,08 ± 0,84

Tabelle 23: Relative mRNA-Expression des Dopamintransporters und des vesikulären Monoamintransporters 2 der untersuchten Hirnareale im Vergleich zum Cortex von NAT^{+/+}-Mäusen.

Legende: siehe Tabelle 18 (Seite 129)

4. Der qCalculator

Zur Berechnung der qPCR-Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit ein auf VBA (Visual Basic for Applications) basiertes Programm (qCalculator) für Excel erstellt, das unter der Adresse (http://www.pharmakologie.uni-bonn.de/frames/index_fr.htm) heruntergeladen werden kann. In dieses ca. 7 MB große Programm sind die in den Kapiteln B.3.10.3 (Seite 34) und B.3.10.2 (Seite 34) dargestellten Berechnungen integriert.

Der qCalculator ermöglicht die folgenden Berechnungen:

- Die Berechnung der relativen Expression anhand ermittelter Ct-Werte, nach Livak und Schmittgen (2001, $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) oder nach Pfaffl et al. (2001). Hierbei können die zu vergleichenden Proben frei gewählt und jederzeit variiert werden.
- Erfasst werden die Ergebnisse von bis zu 32 verschiedenen Proben aus bis zu 20 Experimenten. Dabei kann der Umfang der betrachteten Experimente und Proben dynamisch an die jeweiligen Gegebenheiten angepasst werden.
- Zur Normalisierung können bis zu 10 Referenzgene herangezogen werden.
- Die auf der Grundlage der unterschiedlichen Referenzgene erhaltenen Ergebnisse werden statistisch miteinander verglichen (T-Test, F-Test).
- Jedes Gen kann als Referenzgen oder Zielgen fungieren, da die Daten aller Gene separat in identischen Dateien vorliegen.
- Die Proben können zusätzlich anhand von Standardkurven quantifiziert werden.
- Extremwerte können an jedem Punkt der Analyse ausgeschlossen werden.
- Alle erhobenen Daten und veränderten Einstellungen gehen direkt in die Berechnungen ein und werden instantan berücksichtigt.

In den folgenden Abschnitten werden die Grundfunktionen der Software anhand von Bildschirmfotos (Screenshots) erklärt. Aus Gründen der Anschaulichkeit stammen die Screenshots von unterschiedlichen Datensätzen. Um die Funktionsweise des qCalculators zu verstehen, sollte bedacht werden, dass jedes Gen in einer separaten Datei gespeichert wird. Da alle Dateien (Arbeitsmappen) identisch aufgebaut sind, kann jedes Gen bei der Analyse als Zielgen oder Referenzgen (interner Standard) fungieren.

Bei der Erstellung der Software wurde Wert auf die Vermeidung möglicher Bedienfehler gelegt. Hierzu wurde eine Bedienoberfläche erstellt, die ausschließlich den Zugriff auf die erforderlichen Schaltflächen und Eingabefelder (grau hinterlegt) erlaubt. Ferner wurden die Excel-Befehlsleisten durch die in Abbildung 36 dargestellte Befehlsleiste ersetzt. Neben einer begrenzten Zahl von Excel-Standardschaltflächen enthält sie das Auswahlmenü zur Wahl der verschiedenen Arbeitsblätter der aktuellen Arbeitsmappe (Datei).



4.2 Das „Setup“-Arbeitsblatt

Das „Setup“-Arbeitsblatt enthält die zentralen Informationen zu dem jeweiligen Versuch. Generell können alle Daten und Angaben jederzeit bearbeitet werden. Um die Bedienung der Software zu erleichtern, sollte zu Beginn die folgende Reihenfolge eingehalten werden.

- Der qCalculator wird geöffnet und es erscheint automatisch das „Setup“-Arbeitsblatt (siehe Abbildung 37).
- Der Name eines der untersuchten Gene wird anstelle von „gene name“ (A) eingetragen.
- Die Bezeichnungen der untersuchten Proben werden in die grauen Felder unterhalb von „sample“ (B) eingetragen. In Abbildung 37 wird anhand der Pfeile verdeutlicht, wie die relativ zu quantifizierenden Proben ausgewählt werden. Die gewählten Kombinationen werden auf der rechten Seite und in allen nachfolgenden Analyseschritten angezeigt. Diese Wahl kann jederzeit verändert werden und alle Ergebnisse werden dementsprechend neu kalkuliert! Natürlich werden hierbei auch die Daten der internen Standards berücksichtigt.
- Um die Übersichtlichkeit der Anwendung zu erhöhen, sollte in den mit dem Buchstaben C markierten Feldern die Zahl der Proben und Experimente angegeben und anschließend die Schaltfläche „update experimental design“ betätigt werden. Die nicht erforderlichen Arbeitsblätter (Experimente) und Bereiche (Proben) werden nun ausgeblendet. Ausgeblendete Daten werden nicht gelöscht. Sie werden aber von den Berechnungen in dieser Arbeitsmappe ausgenommen. Natürlich kann der Umfang des experimentellen Designs jederzeit wieder expandiert bzw. reduziert werden.
- Jetzt kann in der Befehlsleiste das „Data“-Arbeitsblatt für z. B. das erste Experiment „n=1“ gewählt werden (vgl. Abbildung 36). In dieses und in die weiteren „Data“-Arbeitsblätter werden die Messwerte der Experimente eingetragen (siehe F.4.3).

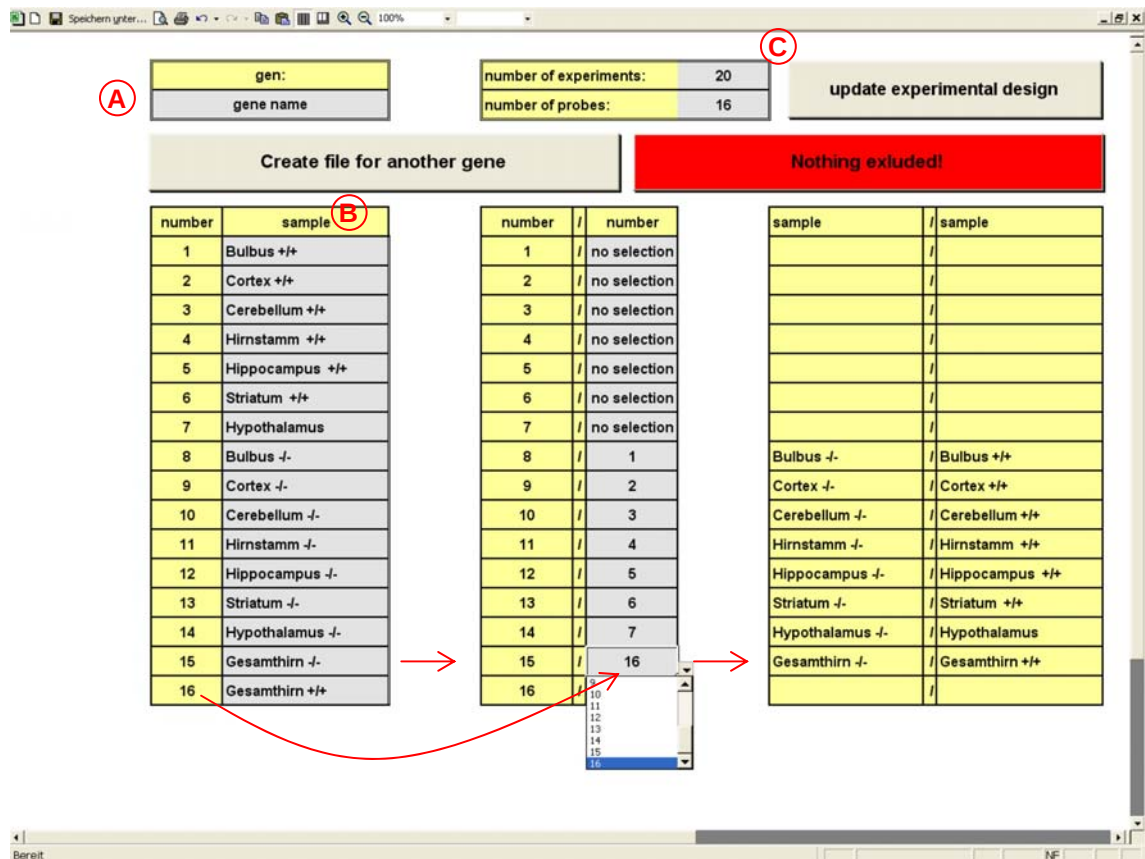


Abbildung 37: Screenshot des „Setup“-Arbeitsblatts des qCalculators

- Nachdem die Daten für das erste Gen eingetragen sind, wird erneut das „Setup“-Arbeitsblatt aufgerufen. Das Betätigen der Schaltfläche „Create file for another gene“ generiert eine leere Datei für das nächste Gen. Hierbei wird ein Dialog geöffnet, der die Bezeichnung des Gens und den Speicherort der neuen Datei abfragt. Für eine optimale Funktionsweise sollten alle Dateien einer Versuchsreihe im selben Verzeichnis gespeichert werden. Selbstverständlich müssen die Daten aller Gene eines Projekts nach dem gleichen Schema in die Arbeitsblätter eingetragen werden. Um dies zu erleichtern, werden die Informationen des Setup-Arbeitsblatts automatisch aus der Ursprungsdatei übernommen.
- Nachdem die Dateien der verschiedenen Gene erstellt wurden, können für jedes Zielgen die internen Standards im „Internal Standard“-Arbeitsblatt selektiert werden (siehe Kapitel 4.5). Die resultierenden Ergebnisse werden im „Diagram“- und „Result“-Arbeitsblatt dargestellt.

Angemerkt sei, dass nach dem Betätigen der Schaltfläche „Nothing excluded“ im „Setup“-Arbeitsblatt alle zuvor in den diversen Arbeitsblättern von der Berechnung ausgenommenen Messwerte wieder in die Auswertung einbezogen werden.

4.3 Die „Data“-Arbeitsblätter

Entsprechend der im „Setup“-Arbeitsblatt gewählten Zahl an Experimenten ist eine entsprechende Zahl an „Data“-Arbeitsblättern innerhalb der Datei angelegt. Die Daten (Ct-Werte) der Experimente werden in die jeweiligen ($n = 1 - n = 20$) Arbeitsblätter wie in Abbildung 38 dargestellt, eingetragen. Es ist vorgesehen, dass die Bestimmungen maximal in Triplikaten durchgeführt werden. Von diesen Replikaten wird automatisch das arithmetische Mittel und die zugehörige Standardabweichung berechnet. Extremwerte können manuell durch Eingabe einer Null in das jeweils rechts angrenzende Feld von der Analyse ausgeschlossen werden (siehe roter Pfeil in Abbildung 38 unten).

Wie aus Abbildung 38 zu entnehmen ist, dient die rechte Seite des Arbeitsblatts der Analyse der Messwerte einer Standardkurve (B). Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse werden unterhalb angezeigt (C) und im Diagramm veranschaulicht. In dem Diagramm werden neben der Regressionsgerade die Messpunkte der Standardkurve (blau) und die der Proben (rot) dargestellt.

Auf der linken Seite des Arbeitsblatts werden die Ergebnisse der verschiedenen Proben eingetragen (A). Zur leichteren Orientierung sind die Felder jeweils mit der im „Setup“ angegebenen Probenbezeichnung versehen. Sofern eine Standardkurve vorhanden ist, wird der Gehalt der Proben anhand der Ergebnisse der linearen Regression berechnet.

Anhang

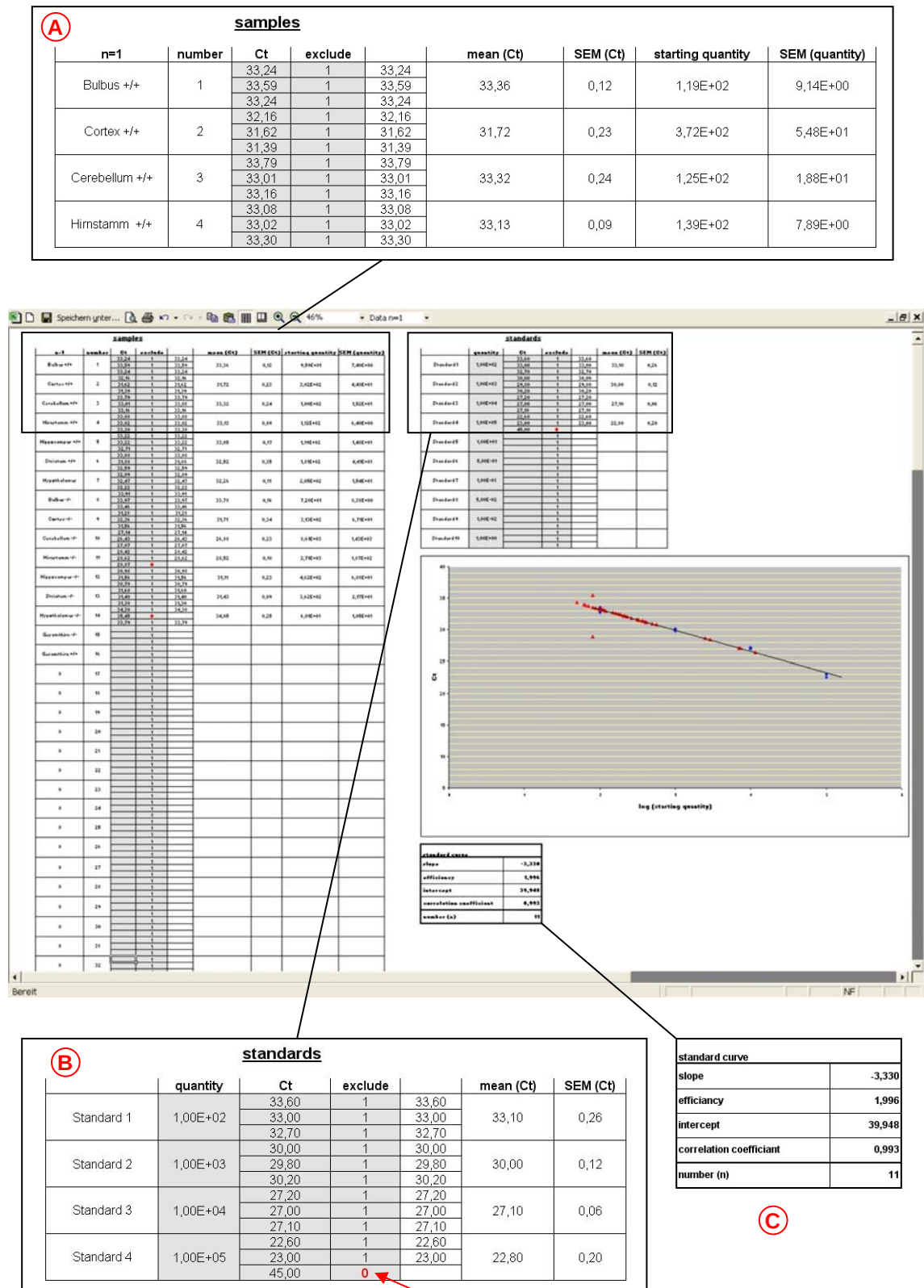


Abbildung 38: Screenshots eines der „Data“-Arbeitsblätter des qCalculators

4.4 Das „Efficiency“-Arbeitsblatt

Im „Efficiency“-Arbeitsblatt wird der Rechenweg (vgl. B.3.10.3) für die relative Quantifizierung festgelegt. Trägt man in das mit A gekennzeichnete Feld eine 0 ein erfolgt die Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (siehe Gleichung 10, Seite 35; Livak and Schmittgen 2001). Setzt man hingegen eine 1 ein, dann erfolgt die Berechnung effizienzkorrigiert (Gleichung 9, Seite 35, Pfaffl 2001). Wie im Kapitel B.3.10.3 beschrieben, werden die erhaltenen Verhältniszahlen abschließend zur Basis 2 logarithmiert. Bei der Verwendung multipler interner Standards werden die Ergebnisse anhand jedes einzelnen internen Standards separat berechnet und die logarithmierten Werte abschließend arithmetisch gemittelt.

Ferner werden in diesem Arbeitsblatt die für die letztgenannte Berechnung erforderlichen Effizienzen (E) verwaltet. Hierbei werden sowohl die Ergebnisse der in den „Data“-Arbeitsblättern ausgewerteten Standardkurven als auch extern ermittelte Werte „external 1-16“ (D) berücksichtigt. In der Spalte „choice“ (C) kann für jedes Experiment individuell bestimmt werden, ob die im selben Experiment bestimmte oder die mittlere Effizienz (E) für die relative Quantifizierung herangezogen wird. Extremwerte können wiederum durch die Eingabe einer 0 in der Spalte „exclude“ (B) von der Mittelwertbildung (E) ausgeschlossen werden.

Ist kein Wert angegeben, wird eine Effizienz von 2 angenommen.

Speichern unter... 85% Efficiency

C3 = 1

qCalculator 1.0

A 1 **Efficiency based calculation**

Pratfl M.V.V. (2001)

	measured efficiencie	B exclude		C choice	used efficiency
n=1	1,98	1	1,98	1	1,98
n=2	4,00	0		0	1,96
n=3		1		1	1,96
n=4		1		1	1,96
n=5		1		1	1,96
n=6		1		1	1,96
n=7		1		1	1,96
n=8		1		1	1,96
n=9		1		1	1,96
n=10		1		1	1,96
n=11		1		1	1,96
n=12		1		1	1,96
n=13		1		1	1,96
n=14		1		1	1,96
n=15		1		1	1,96
n=16		1		1	1,96
n=17		1		1	1,96
n=18		1		1	1,96
n=19		1		1	1,96
n=20		1		1	1,96
D external 1	1,99	1	1,99		
external 2	1,87	1	1,87		
external 3	1,92	1	1,92		
external 4	1,82	1	1,82		
external 5	2,20	1	2,20		
external 6		1			
external 7		1			
external 8		1			
external 9		1			
external 10		1			
external 11		1			
external 12		1			
external 13		1			
external 14		1			
external 15		1			
external 16		1			
mean	1,96				
SEM	0,05				
n	6				

E

Bereit 17/21 MB

Abbildung 39: Screenshot des „Efficiency“-Arbeitsblatts des qCalculators

4.5 Das „Internal Standard“-Arbeitsblatt

Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse des Zielgens müssen die Ergebnisse von mindestens einem internen Standard¹ (Seite 141, unten) in die Analyse einbezogen werden. Insgesamt können bis zu 10 interne Standards unabhängig voneinander importiert werden. Die Daten der verschiedenen internen Standards müssen, wie eingangs erwähnt, in separaten Dateien vorliegen. Für den Import werden ausschließlich mit diesem Programm generierte Dateien akzeptiert.

Bevor die Daten importiert, werden sollten alle geöffneten Excel-Dateien zwischengespeichert werden, da sonst vorgenommene Änderungen verloren gehen können.

Der Dialog zum Import (upload of internal standard data) der Daten des internen Standards wird durch die Betätigung einer der zehn Schaltflächen (IS1-10) in der Spalte „activate“ (A) des „Internal Standard“-Arbeitsblatt (siehe Abbildung 40) der Datei des Zielgens ausgelöst. Der Dialog fordert zum Öffnen der Datei auf, welche die Daten des internen Standard enthält. Die Daten des internen Standards sind nach dem erfolgreichen Importieren weiterhin mit der Ursprungsdatei verknüpft, sodass Veränderungen in der Datei des internen Standards sich auch auf die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Zielgens auswirken. Die Verknüpfung der Daten kann unter bestimmten Umständen unterbrochen werden. In diesem Fall meldet Excel das Fehlen der Datei des internen Standards nach dem Öffnen der Datei des Zielgens.

Um die importierten Daten zu deaktivieren, muss die entsprechende Schaltfläche (IS1-10) in der Spalte „deactivate“ (B) betätigt werden.

Der qCalculator kann die Endergebnisse der relativen Quantifizierung parallel auf Grundlage von 4 verschiedenen Kombinationen der internen Standards berechnen. Welche Kombinationen betrachtet werden, wird in den mit C gekennzeichneten Felder festgelegt (Abbildung 40). Hierbei umfasst die erste Kombination (blau) grundsätzlich alle importierten internen Standards, während die Kombinationen „selection 1“ (grün), „selection 2“ (gelb) und „selection 3“ (hellblau) frei wählbar sind. Wie man aus Abbildung 40 entnehmen kann, wird ein interner Standard jeweils durch die Eingabe einer 1 aktiviert und durch die einer 0 deaktiviert (roter Pfeil).

Extremwerte, die im „Result“-Arbeitsblatt von der Analyse ausgeschlossen sind, werden bei der statistischen Analyse trotzdem mit einbezogen. Sie sollten daher vorzugsweise an anderer Stelle ausgeschlossen werden.

4.6 Das „Result“- und das „Diagram“-Arbeitsblatt

Die Ergebnisse der Experimente werden im „Result“-Arbeitsblatt zusammengefasst und im „Diagram“-Arbeitsblatt (Abbildung 41) graphisch dargestellt. Die anhand der verschiedenen Kombinationen der internen Standards erhaltenen Daten sind hierbei getrennt aufgeführt und farblich voneinander abgesetzt. Die Beschriftung der einzelnen Tabellen wird permanent aktualisiert und enthält die auf die Berechnung zutreffenden Informationen aus dem „Setup“- und „Internal Standard“-Arbeitsblatt. Ferner wird die Ergebnistabelle im „Result“-Arbeitsblatt und die Grafik im „Diagram“-Arbeitsblatt dynamisch an den Umfang des Versuchs (Zahl der Experimente und Proben) angepasst.

Im „Result“-Arbeitsblatt (siehe Abbildung 41) können Extremwerte wie in den „Data“-Arbeitsblättern von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, haben Ausschlüsse in diesem Arbeitsblatt aber keinen Einfluss auf die statistischen Angaben im „Internal Standard“-Arbeitsblatt. Im Allgemeinen ist anzuraten, die Extremwerte bereits in den „Data“-Arbeitsblättern von der Analyse auszunehmen.

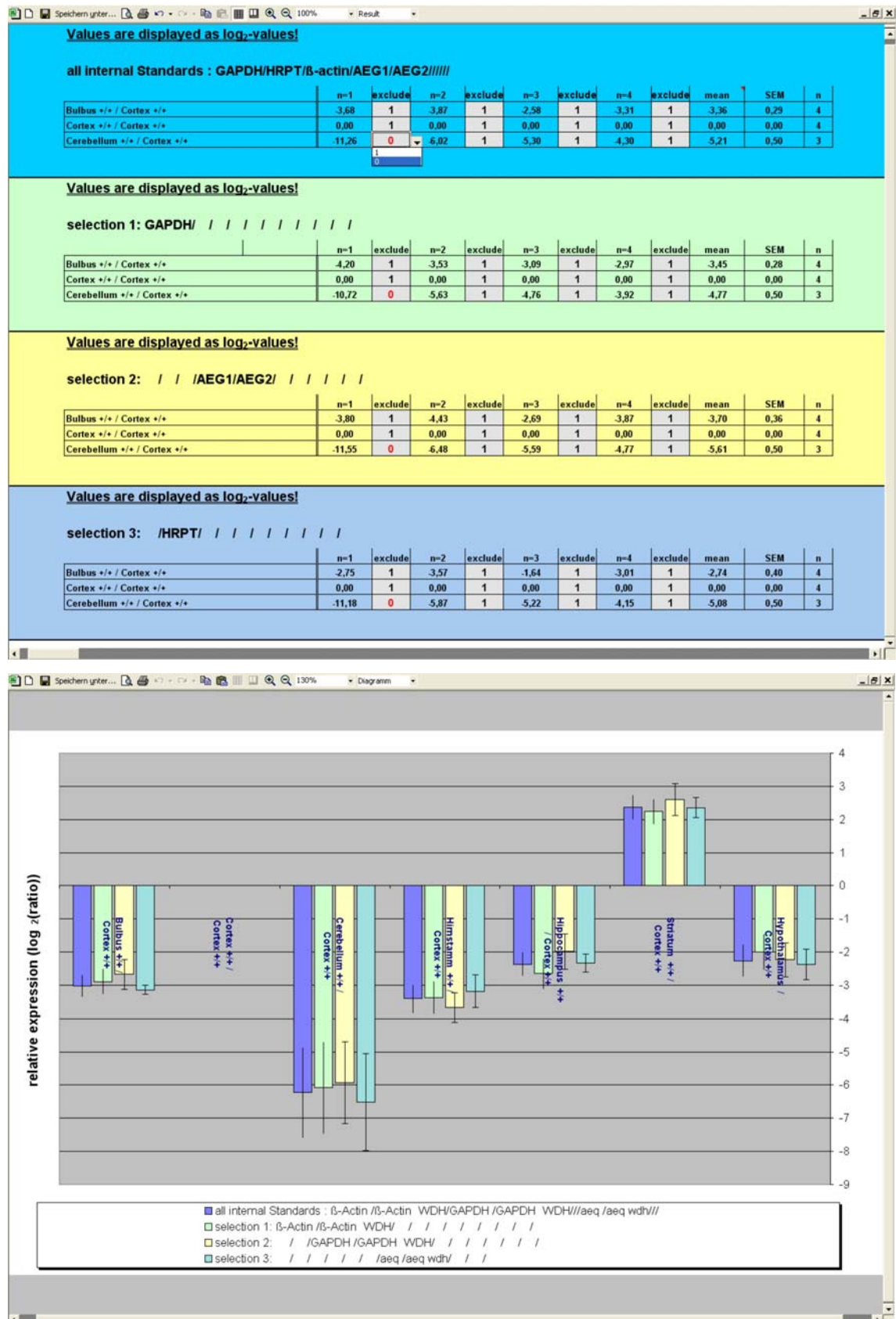


Abbildung 41: Screenshot des „Result“- und „Diagram“-Arbeitsblatts des qCalculators (von unterschiedlichen Datensätzen!)

4.7 Die „IS“-Arbeitsblätter

Bei der Verwendung von mehr als 3 internen Standards ermöglichen die „IS“-Arbeitsblätter eine detaillierte Analyse des Einflusses der verschiedenen internen Standards auf die Ergebnisse der einzelnen Experimente.

Hierzu wird von der Software zu jedem „Data“-Arbeitsblatt ein zugehöriges „IS“-Arbeitsblatt erstellt (siehe Abbildung 42). Sie enthalten die normalisierten Ergebnisse der relativen Quantifizierung aufgeschlüsselt nach den internen Standards. Die jeweils höchsten (rot) bzw. niedrigsten (blau) Werte sind farbig markiert, um Extremwerte leichter identifizieren zu können.

Values are displayed as log₂-values!

n=1		GAPDH	exclude	HRPT	exclude	β-actin	exclude	18s Endau	exclude	0	exclude
Bulbus +/+	/ Cortex +/+	-4,2	1	-2,8	1	-3,9	1	0,1	1		1
Cortex +/+	/ Cortex +/+	0,0	1	0,0	1	0,0	1	0,0	1		1
Cerebellum +/+	/ Cortex +/+	-10,7	1	-11,2	1	-11,3	1	-9,1	1		1
Hirnstamm +/+	/ Cortex +/+	-5,5	1	-5,1	1	-5,4	1	-0,5	1		1
Hippocampus +/+	/ Cortex +/+	-2,6	1	-3,5	1	-3,7	1	-0,4	1		1
Striatum +/+	/ Cortex +/+	2,3	1	2,2	1	2,2	1	3,4	1		1
Hypothalamus +/+	/ Cortex +/+	-3,0	1	-3,3	1	-2,7	1	1,2	1		1
Bulbus -/-	/ Bulbus +/+	-0,4	1	-1,1	1	-0,7	1	-0,3	1		1
Cortex -/-	/ Cortex +/+	-0,5	1	-0,1	1	-0,2	1	0,3	1		1
Cerebellum -/-	/ Cerebellum	3,9	1	5,1	1	4,7	1	-1,1	1		1
Hirnstamm -/-	/ Hirnstamm	1,8	1	2,6	1	2,0	1	-4,6	1		1
Hippocampus -/-	/ Hippocampus	-0,8	1	1,0	1	0,3	1	-2,9	1		1
Striatum -/-	/ Striatum +/+	0,2	1	0,1	1	-0,2	1	-2,6	1		1
Hypothalamus -/-	/ Hypothalamus	-0,1	1	0,5	1	-0,3	1	-0,2	1		1
Gesamthirn -/-	/ Gesamthirn	0,1	1	0,4	1	0,4	1		1		1
	/		1		1		1		1		1

Abbildung 42: Screenshots eines der „IS“-Arbeitsblätter des qCalculators

G. Literaturverzeichnis

1. Referenzen

- Aktories K, Förstermann U., Hofmann F, Starke K (2004) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage edn. München
- Altar CA, Jurata LW, Charles V, Lemire A, Liu P, Bukhman Y, Young TA, Bullard J, Yokoe H, Webster MJ, Knable MB, Brockman JA (2005) Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol Psychiatry* 58:85-96
- Anand A, Charney DS (2000) Norepinephrine dysfunction in depression. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 10:16-24
- Asakura M, Tsukamoto T, Hasegawa K (1982) Modulation of rat brain alpha 2- and beta-adrenergic receptor sensitivity following long-term treatment with antidepressants. *Brain Res* 235:192-197
- Ausubel MA, Brent R, Kingston RE, Moore DJ, Seidman J.D., Struhl K (2004) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken (USA)
- Beer M, Hacker S, Poat J, Stahl SM (1987) Independent regulation of beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 92:827-834
- Benes V, Muckenthaler M (2003) Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. *Trends Biochem Sci* 28:244-249
- Blier P (2001) Crosstalk between the norepinephrine and serotonin systems and its role in the antidepressant response. *J Psychiatry Neurosci* 26 Suppl:S3-10
- Bohn LM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG (2000) Potentiated opioid analgesia in norepinephrine transporter knock-out mice. *J Neurosci* 20:9040-9045
- Bönisch H, Brüss M (1994) The noradrenaline transporter of the neuronal plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* 733:193-202
- Brüss M, Kunz J, Lingen B, Bönisch H (1993) Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Hum Genet* 91:278-280
- Brüss M, Pörzgen P, Bryan-Lluka LJ, Bönisch H (1997) The rat norepinephrine transporter: molecular cloning from PC12 cells and functional expression. *Brain Res Mol Brain Res* 52:257-262
- Bücheler MM, Hadamek K, Hein L (2002) Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109:819-826

- Buck KJ, Amara SG (1994) Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12584-12588
- Callado LF, Gabilondo AM, Meana JJ (1999) Differential modulation of alpha2-adrenoceptor subtypes in rat kidney by chronic desipramine treatment. *Life Sci* 64:2327-2339
- Callado LF, Stamford JA (2000) Spatiotemporal interaction of alpha(2) autoreceptors and noradrenaline transporters in the rat locus coeruleus: implications for volume transmission. *J Neurochem* 74:2350-2358
- Camacho NP, Dow D, Toledano TR, Buckmeyer JK, Gertner JM, Brayton CF, Raggio CL, Root L, Boskey AL (1998) Identification of the oim mutation by dye terminator chemistry combined with automated direct DNA sequencing. *J Orthop Res* 16:38-42
- Carboni E, Silvagni A (2004) Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol* 16:121-128
- Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 274:16694-16700
- Cooper JR, Bloom FE, Roth HR (2002) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Eight Edition edn. Oxford University Press, Oxford
- Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113:1237-1264
- Cragg SJ, Nicholson C, Kume-Kick J, Tao L, Rice ME (2001) Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol* 85:1761-1771
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29:571-625
- Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M (2004) Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 18:601-607
- Dallal GE, Wilkinson L (1986) An analytic approximation to the distribution of Lilliefors test statistic for normality. *American Statistician* 40:294-296
- Daunt DA, Hurt C, Hein L, Kallio J, Feng F, Kobilka BK (1997) Subtype-specific intracellular trafficking of alpha2-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 51:711-720

- Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP (2002) Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* 22:2873-2884
- Drozdowska E, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Rogoz Z, Siwanowicz J, Caron MG, Bönisch H, Dziedzicka-Wasylewska M (2005) Effect of antidepressant drugs in mice lacking the noradrenaline transporter. *Neuropsychopharmacology* (submitted)
- Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91:1025-1043
- Dziedzicka-Wasylewska M, Rogoz Z, Margas W, Dlaboga D, Goralska M (2001) Some behavioural effects of antidepressant drugs are time-dependent. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:373-393
- Eisenhofer G (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 91:35-62
- Engelhardt S, Hein L (2004) Adrenergic System. In: Offermanns S, Hein L (eds) *Transgenic Models in Pharmacology*. Heidelberg,
- Erickson JD, Eiden LE (1993) Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *J Neurochem* 61:2314-2317
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10993-10997
- Fagerholm V, Philipp M, Hein L, Scheinin M (2004) [Ethyl-3H]RS-79948-197 alpha2-adrenoceptor autoradiography validation in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 497:301-309
- Fiebig ER, Trendelenburg U (1978) The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of 3H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 303:21-35
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844-914
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-115
- Friedgen B, Wolfel R, Russ H, Schomig E, Graefe KH (1996) The role of extraneuronal amine transport systems for the removal of extracellular catecholamines in the rabbit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354:275-286

- Fritz JD, Jayanthi LD, Thoreson MA, Blakely RD (1998) Cloning and chromosomal mapping of the murine norepinephrine transporter. *J Neurochem* 70:2241-2251
- Gainetdinov RR, Jones SR, Fumagalli F, Wightman RM, Caron MG (1998) Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. *Brain Res Brain Res Rev* 26:148-153
- Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Caron MG (2002) Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. *Trends Pharmacol Sci* 23:367-373
- Garcia AS, Barrera G, Burke TF, Ma S, Hensler JG, Morilak DA (2004) Autoreceptor-mediated inhibition of norepinephrine release in rat medial prefrontal cortex is maintained after chronic desipramine treatment. *J Neurochem* 91:683-693
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG (1994) Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269:15985-15988
- Gobert A, Billiras R, Cistarelli L, Millan MJ (2004) Quantification and pharmacological characterization of dialysate levels of noradrenaline in the striatum of freely-moving rats: release from adrenergic terminals and modulation by alpha2-autoreceptors. *J Neurosci Methods* 140:141-152
- Gould GG, Pardon MC, Morilak DA, Frazer A (2003) Regulatory effects of reboxetine treatment alone, or following paroxetine treatment, on brain noradrenergic and serotonergic systems. *Neuropsychopharmacology* 28:1633-1641
- Gray AM, Pache DM, Sewell RD (1999) Do alpha2-adrenoceptors play an integral role in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds? *Eur J Pharmacol* 378:161-168
- Green AR (1987) Evolving concepts on the interactions between antidepressant treatments and monoamine neurotransmitters. *Neuropharmacology* 26:815-822
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4:117
- Hahn MK, Robertson D, Blakely RD (2003) A mutation in the human norepinephrine transporter gene (SLC6A2) associated with orthostatic intolerance disrupts surface expression of mutant and wild-type transporters. *J Neurosci* 23:4470-4478

- Haller J, Bakos N, Rodriguiz RM, Caron MG, Wetsel WC, Liposits Z (2002) Behavioral responses to social stress in noradrenaline transporter knock-out mice: effects on social behavior and depression. *Brain Res Bull* 58:279-284
- Happe HK, Coulter CL, Gerety ME, Sanders JD, O'Rourke M, Bylund DB, Murrin LC (2004) Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience* 123:167-178
- Heal DJ, Prow MR, Buckett WR (1989) Clonidine-induced hypoactivity and mydriasis in mice are respectively mediated via pre- and postsynaptic alpha 2-adrenoceptors in the brain. *Eur J Pharmacol* 170:19-28
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-1030
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280
- Holmberg M, Fagerholm V, Scheinin M (2003) Regional distribution of alpha(2C)-adrenoceptors in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the alpha(2C)-subtype: an autoradiographic study with [(3)H]RX821002 and [(3)H]rauwolscine. *Neuroscience* 117:875-898
- Holmberg M, Scheinin M, Kurose H, Miettinen R (1999) Adrenergic alpha2C-receptors reside in rat striatal GABAergic projection neurons: comparison of radioligand binding and immunohistochemistry. *Neuroscience* 93:1323-1333
- Hosoda K, Fitzgerald LR, Vaidya VA, Feussner GK, Fishman PH, Duman RS (1995) Regulation of beta 2-adrenergic receptor mRNA and gene transcription in rat C6 glioma cells: effects of agonist, forskolin, and protein synthesis inhibition. *Mol Pharmacol* 48:206-211
- Howbrook DN, van der Valk AM, O'Shaughnessy MC, Sarker DK, Baker SC, Lloyd AW (2003) Developments in microarray technologies. *Drug Discov Today* 8:642-651
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279-284
- Ihalainen JA, Tanila H (2002) In vivo regulation of dopamine and noradrenaline release by alpha2A-adrenoceptors in the mouse prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 15:1789-1794
- Ihalainen JA, Tanila H (2004) In vivo regulation of dopamine and noradrenaline release by alpha2A-adrenoceptors in the mouse nucleus accumbens. *J Neurochem* 91:49-56

- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-1519
- Johnson RG (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68:232-307
- Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* 18:1979-1986
- Katona CL, Theodorou AE, Horton RW (1987) Alpha 2-adrenoceptors in depression. *Psychiatr Dev* 5:129-149
- Keller NR, Diedrich A, Appalsamy M, Tuntrakool S, Lonce S, Finney C, Caron MG, Robertson D (2004) Norepinephrine transporter-deficient mice exhibit excessive tachycardia and elevated blood pressure with wakefulness and activity. *Circulation* 110:1191-1196
- Kenmochi N, Kawaguchi T, Rozen S, Davis E, Goodman N, Hudson TJ, Tanaka T, Page DC (1998) A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* 8:509-523
- Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-462
- Lakhlani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M, Limbird LE (1997) Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9950-9955
- Leonard BE (1997) The role of noradrenaline in depression: a review. *J Psychopharmacol* 11:S39-S47
- Leung YF, Cavalieri D (2003) Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 19:649-659
- Lindvall O, Bjorklund A (1983) *Chemical Neuroanatomy*. Raven Press Ltd, New York
- Lingen B, Brüss M, Bönisch H (1994) Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Lett* 342:235-238
- Liprando LA, Miner LH, Blakely RD, Lewis DA, Sesack SR (2004) Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse* 52:233-244

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lu TY, Kupa A, Easterbrook G, Mangoni AA (2005) Profound weight loss associated with reboxetine use in a 44-year-old woman. *Br J Clin Pharmacol* 60:218-220
- Ma CL, Arnsten AF, Li BM (2005) Locomotor hyperactivity induced by blockade of prefrontal cortical alpha2-adrenoceptors in monkeys. *Biol Psychiatry* 57:192-195
- Mack F, Bönisch H (1979) Dissociation constants and lipophilicity of catecholamines and related compounds. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 310:1-9
- Maj J, Klimek V, Nowak G (1985) Antidepressant drugs given repeatedly increase binding to alpha 1-adrenoceptors in the rat cortex. *Eur J Pharmacol* 119:113-116
- Marcotte ER, Srivastava LK, Quirion R (2001) DNA microarrays in neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 22:426-436
- Masson J, Sagne C, Hamon M, el Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:439-464
- Middleton FA, Mirnics K, Pierri JN, Lewis DA, Levitt P (2002) Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J Neurosci* 22:2718-2729
- Millan MJ, Lejeune F, Gobert A (2000) Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. *J Psychopharmacol* 14:114-138
- Mirnics K, Pevsner J (2004) Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat Neurosci* 7:434-439
- Molecular Probes (2004) *The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th edn.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1997) The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev* 23:145-195
- Mongeau R, de Montigny C, Blier P (1994) Electrophysiologic evidence for desensitization of alpha 2-adrenoceptors on serotonin terminals following long-term treatment with drugs increasing norepinephrine synaptic concentration. *Neuropsychopharmacology* 10:41-51

- Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22:389-395
- Morrison C, Gannon F (1994) The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1219:493-498
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962
- Motulsky HJ (2003) *GraphPad Prism 4 Statistics Guide - Statistical analyses for laboratory and clinical researchers*. GraphPad Software Inc., San Diego CA
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB (1998) The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 55:580-592
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25
- Nestler EJ, McMahon A, Sabban EL, Tallman JF, Duman RS (1990) Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7522-7526
- O'Rourke MF, Blaxall HS, Iversen LJ, Bylund DB (1994) Characterization of [3H]RX821002 binding to alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1362-1367
- Pacher P, Kecskemeti V (2004) Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? *Curr Med Chem* 11:925-943
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350:350-354
- Paczkowski FA, Bönisch H, Bryan-Lluka LJ (2002) Pharmacological properties of the naturally occurring Ala(457)Pro variant of the human norepinephrine transporter. *Pharmacogenetics* 12:165-173
- Page ME (2003) The promises and pitfalls of reboxetine. *CNS Drug Rev* 9:327-342
- Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J (2003) RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res* 31:122-123

- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (2nd edition). ACADEMIC PRESS, San Diego
- Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 15:6179-6188
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Philipp M, Hein L (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 101:65-74
- Porsolt RD (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci* 11:53-58
- Pörzgen P, Bönisch H, Brüss M (1995) Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 215:1145-1150
- Poyurovsky M, Isaacs I, Fuchs C, Schneidman M, Faragian S, Weizman R, Weizman A (2003) Attenuation of olanzapine-induced weight gain with reboxetine in patients with schizophrenia: a double-blind, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 160:297-302
- Pritchard CC, Hsu L, Delrow J, Nelson PS (2001) Project normal: defining normal variance in mouse gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13266-13271
- Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32 Suppl:496-501
- Ressler KJ, Nemeroff CB (1999) Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry* 46:1219-1233
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-1223
- Rogoz Z, Margas W, Skuza G, Solich J, Kusmider M, Dziedzicka-Wasylewska M (2002) Effect of repeated treatment with reboxetine on the central alpha 1-adrenergic and dopaminergic receptors. *Pol J Pharmacol* 54:593-603
- Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK (1996) Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7375-7380
- Sacchetti G, Bernini M, Bianchetti A, Parini S, Invernizzi RW, Samanin R (1999) Studies on the acute and chronic effects of reboxetine on extracellular noradrenaline and other monoamines in the rat brain. *Br J Pharmacol* 128:1332-1338

- Sacchetti G, Bernini M, Gobbi M, Parini S, Pirona L, Mennini T, Samanin R (2001) Chronic treatment with desipramine facilitates its effect on extracellular noradrenaline in the rat hippocampus: studies on the role of presynaptic alpha2-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:66-72
- Sallinen J, Haapalinna A, MacDonald E, Viitamaa T, Lahdesmaki J, Rybnikova E, Peltto-Huikko M, Kobilka BK, Scheinin M (1999) Genetic alteration of the alpha2-adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. *Mol Psychiatry* 4:443-452
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Saunders C, Limbird LE (1999) Localization and trafficking of alpha2-adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol Ther* 84:193-205
- Schatzberg A, Schildkraut D (1995) Recent studies on norepinephrine system in mood disorders. In: Bloom F, Kupfer D (eds) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press Ltd, New York, pp. 911-920
- Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K (2001) Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol* 132:925-933
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522
- Schramm NL, McDonald MP, Limbird LE (2001) The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *J Neurosci* 21:4875-4882
- Shannon JR, Flattem NL, Jordan J, Jacob G, Black BK, Biaggioni I, Blakely RD, Robertson D (2000) Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *N Engl J Med* 342:541-549
- Siever LJ, Trestman RL, Coccaro EF, Bernstein D, Gabriel SM, Owen K, Moran M, Lawrence T, Rosenthal J, Horvath TB (1992) The growth hormone response to clonidine in acute and remitted depressed male patients. *Neuropsychopharmacology* 6:165-177
- Simson PG, Weiss JM, Hoffman LJ, Ambrose MJ (1986) Reversal of behavioral depression by infusion of an alpha-2 adrenergic agonist into the locus coeruleus. *Neuropharmacology* 25:385-389
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Uhl GR (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes dis-

- play reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9938-9943
- Takahashi N, Uhl G (1997) Murine vesicular monoamine transporter 2: molecular cloning and genomic structure. *Brain Res Mol Brain Res* 49:7-14
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4:13-25
- Trendelenburg U, Langeloh A, Bönisch H (1987) Mechanism of action of indirectly acting sympathomimetic amines. *Blood Vessels* 24:261-270
- Valentini V, Frau R, Di Chiara G (2004) Noradrenaline transporter blockers raise extracellular dopamine in medial prefrontal but not parietal and occipital cortex: differences with mianserin and clozapine. *J Neurochem* 88:917-927
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
- Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J (1999) A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem* 276:59-64
- Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP (2004) Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 24:7888-7894
- Wang R, MacMillan LB, Fremeau RT, Jr., Magnuson MA, Lindner J, Limbird LE (1996) Expression of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 5' regulatory sequence for the alpha 2A AR-receptor gene in transgenic animals. *Neuroscience* 74:199-218
- Wang YM, Gainetdinov RR, Fumagalli F, Xu F, Jones SR, Bock CB, Miller GW, Wightman RM, Caron MG (1997) Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* 19:1285-1296
- Wang YM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG (1999) Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biol Psychiatry* 46:1124-1130

- Weinshenker D, Szot P (2002) The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol Ther* 94:213-233
- Weiss JM, Simson PG, Hoffman LJ, Ambrose MJ, Cooper S, Webster A (1986) Infusion of adrenergic receptor agonists and antagonists into the locus coeruleus and ventricular system of the brain. Effects on swim-motivated and spontaneous motor activity. *Neuropharmacology* 25:367-384
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22:474-481
- Willner P, Hale AS, Argyropoulos S (2005) Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. *J Affect Disord* 86:37-45
- Wong EH, Sonders MS, Amara SG, Tinholt PM, Piercey MF, Hoffmann WP, Hyslop DK, Franklin S, Porsolt RD, Bonsignori A, Carfagna N, McArthur RA (2000) Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry* 47:818-829
- Wool IG (1979) The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem* 48:719-754
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants¹. *Nat Neurosci* 3:465-471
- Yoshioka M, Matsumoto M, Numazawa R, Togashi H, Smith CB, Saito H (1995) Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by α_2 -adrenoceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur J Pharmacol* 294:565-570
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-3415

2. Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit:

2.1 Originalarbeiten:

- Gilsbach R, Faron-Górecka A, Rogóż Z, Brüss M, Caron MG, Dziedzicka-Wasylewska M, Bönisch H (2005) Norepinephrine transporter knockout-induced upregulation of brain $\alpha_{2A/C}$ -adrenergic receptors. *J Neurochem* (in press)

Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H and Brüss M (2005) A comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of quantitative real-time PCR data. *Biotechniques* (in press)

2.2 Vortrag:

Gilsbach R, Faron-Gorecka A, Caron MG, Przegalinski E, Bönisch H, Dziedzicka-Wasylewska M (2004) Regulation of α_2 -adrenoceptors in the brain of noradrenaline transporter-knockout mice. *Pol J Pharmacol* 56 (Suppl): 88. [XV International Congress of the Polish Pharmacological Society, Poznan, Poland]

2.3 Poster:

Loebbe S, Gilsbach R, Brüss M, Caron MG, Bönisch H (2004) Noradrenaline transporter knockout-mediated regulation of serotonin receptors in mice brain. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* 23:335--336 [11th Meeting on Adrenergic Mechanisms: Porto, Portugal 25-27 September 2003]

Gilsbach R, Loebbe S, Brüss M, Caron MG, Bönisch H (2004) Brain region-specific regulation of adrenergic receptor messenger RNAs caused by knockout of the noradrenaline transporter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1): R25 [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Loebbe S, Gilsbach R, Brüss M, Caron MG, Bönisch H (2004) Knockout of the noradrenaline transporter gene induces changes in mRNA expression of serotonergic genes in mice brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1): R26 [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Gilsbach R, Rogoz Z, Loebbe-Werner S, Brüss M, Caron MG, Dziedzicka-Wasylewska M, Bönisch H (2004) Regulation of brain α_2A/C adrenoceptors in noradrenaline transporter knockout mice. *Fund Clin Pharmacol* 18 (Suppl 1): 35 (P 04.14) [EPHAR, Porto, Portugal]

Loebbe-Werner SY, Gilsbach R, Brüss M, Caron MG, Bönisch H (2004) Regulation of 5-HT₄-receptor expression in the brain of norepinephrine transporter knockout mice. *Progr No 167.9 Abstract Viewer Itinerary Plan-*

ner, Washington, DC: Society for Neuroscience [34th Annual Meeting of the SfN San Diego, USA]

Gilsbach R, Loebbe S, Brüss M, Caron MG, Bönisch H (2004) Norepinephrine transporter knockout-mediated regulation of adrenergic receptor mRNAs in mice brain. 1st International qPCR Symposium & Application Workshop Symposium Abstracts: 25 (P63) www.wzw.tum.de/gene-quantification/qpcr2004/pub/qpcr-poster-abstracts.pdf [1st International qPCR Symposium & Application Workshop, Weihenstephan]

Klessascheck M, Djoufack PC, Gilsbach R, Caron MG, Bönisch H and Fink KB: Attenuated blood pressure increase after indirect sympathomimetic drugs in noradrenaline transporter-deficient mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 371 Suppl 1, R86. 46. [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

2.4 Im Rahmen dieser Arbeit in der GenBank-Datenbank (NCBI) abgelegte Nukleinsäuresequenzen:

AJ555564: Mus musculus mRNA for vesicular monoamine transporter 2 (slc18a2 gene)