

**Untersuchung von adenosinergen
Regulatorproteinen der zirkadianen Rhythmik
im Gehirn der Ratte und deren Veränderungen
durch Schlafentzug und chronische
Koffeineinnahme**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stefanie Laskowski

aus Düren

Bonn, 2018

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

1.Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bauer
2.Gutachterin: Prof. Dr. Christa Müller

Tag der Promotion: 28.09.2018
Erscheinungsjahr: 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Schlaf.....	1
1.1.1 Was ist Schlaf?.....	1
1.1.2 Funktionen des Schlafes.....	2
1.1.3 Schlafregulation	7
1.1.4 Auswirkungen von gestörtem Schlaf.....	9
1.2 Koffein	10
1.2.1 Vorkommen und Verwendung.....	10
1.2.2 Pharmakokinetik.....	11
1.2.3 Einfluss von chronischer Koffeineinnahme auf Schlaf und die Schlaf-Wach- Regulation	13
1.2.4 Neuroprotektive Effekte des Koffeins.....	15
1.3 Das adenosinerge System.....	16
1.3.1 Adenosin	16
1.3.2 Adenosinrezeptoren	18
1.3.3 Das adenosinerge System und die Schlaf-Wach-Regulation	20
1.3.4 Das adenosinerge System und Koffein.....	23
1.4 Ziel der Arbeit	26
2 Material	28
2.1 Chemikalien.....	28
2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer.....	29
2.3 Versuchstiere.....	31
2.4 Primer	31
2.5 Antikörper	32
2.6 Größenstandards.....	32
2.7 Geräte.....	33
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	34

3	Methoden	35
3.1	Molekularbiologische Arbeiten	35
3.1.1	Isolierung von RNA aus Rattengewebe	35
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
3.1.3	Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen.....	36
3.1.4	Reverse Transkription	37
3.1.5	Primer-Design	37
3.1.6	Semi-quantitative real-time PCR.....	38
3.1.6.1	Validierungsexperiment für die vergleichende C _T -Methode.....	40
3.1.6.2	Die vergleichende C _T -Methode ($\Delta\Delta C_T$).....	40
3.2	Biochemische Arbeiten	41
3.2.1	Dissektion von Rattengehirnen	41
3.2.2	Herstellung von Gewebehomogenaten.....	42
3.2.3	Proteinbestimmung	42
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.5	Western Blot nach dem Semi Dry Verfahren	44
3.2.6	Coomassie- Färbung von SDS-Gelen	46
3.3	Tierexperimentelle Arbeiten	46
3.3.1	Allgemeine Tierhaltung	46
3.3.2	Allgemeiner Versuchsablauf	46
3.3.3	Chronische Koffeinapplikation.....	48
3.3.4	Gewöhnung an das Aktivierungsrad	48
3.3.5	Schlafentzug und motorische Aktivierung.....	49
3.3.6	Tötung und Gehirnentnahme	49
3.4	Statistik	50
3.4.1	Deskriptive Statistik.....	50
3.4.2	Explorative Datenanalyse	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Vorversuche	52
4.1.1	Real-time PCR	52
4.1.2	Western Blot.....	55
4.2	Chronische Koffeinapplikation	56
4.3	Untersuchung des A ₁ -Adenosinrezeptors.....	57
4.3.1	Untersuchung der A ₁ AR-mRNA	57
4.3.1.1	Untersuchung der A ₁ AR-mRNA in der zirkadianen Rhythmik	57
4.3.1.2	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf die A ₁ AR-mRNA ..	58
4.3.1.3	Auswirkung von Schlafentzug auf die A ₁ AR-mRNA	60

4.3.1.4	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A ₁ AR-mRNA.....	62
4.3.2	Untersuchung des A ₁ AR-Proteins.....	64
4.3.2.1	Untersuchung des A ₁ AR in der zirkadianen Rhythmik	64
4.3.2.2	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf den A ₁ AR.....	68
4.3.2.3	Auswirkung von Schlafentzug auf den A ₁ AR	72
4.3.2.4	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A ₁ AR	78
4.4	Untersuchung des A _{2A} -Adenosinrezeptors	85
4.4.1	Untersuchung der A _{2A} AR-mRNA	85
4.4.1.1	Untersuchung der A _{2A} AR-mRNA in der zirkadianen Rhythmik.....	85
4.4.1.2	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf die A _{2A} AR-mRNA	88
4.4.1.3	Auswirkung von Schlafentzug auf die A _{2A} AR-mRNA.....	91
4.4.1.4	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A _{2A} AR-mRNA	93
4.4.2	Untersuchung des A _{2A} AR-Proteins	95
4.4.2.1	Untersuchung des A _{2A} AR in der zirkadianen Rhythmik.....	95
4.4.2.2	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf den A _{2A} AR.....	98
4.4.2.3	Auswirkung von Schlafentzug auf den A _{2A} AR	102
4.4.2.4	Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A _{2A} AR.....	108
5	Diskussion.....	115
5.1	Zirkadiane Veränderung der A ₁ AR- und A _{2A} AR-mRNA sowie der Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine.....	115
5.2	Die Auswirkungen von Schlafentzug auf die A ₁ AR- und A _{2A} AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine.....	117
5.3	Die Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation auf die A ₁ AR- und A _{2A} AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine	122
5.4	Die Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A ₁ AR- und A _{2A} AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine.....	128
6	Zusammenfassung	132
7	Literatur	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Das Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation	7
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Konvertierung von synaptischer Aktivität in schlafregulierende Substanzen	9
Abbildung 1.3: Intra- und extrazelluläre Entstehung und Metabolisierung von Adenosin	17
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren	19
Abbildung 3.1: Platzierung eines Rattengehirns in der Brain Slicer Matrix	41
Abbildung 3.2: Herstellung koronaler Gehirnscheiben mittels Brain Slicer Matrix	42
Abbildung 3.3: Zeitlicher Versuchsablauf	47
Abbildung 3.4: Haltungskäfig (Typ III) mit angebautem Aktivierungsrad	49
Abbildung 4.1: Vergleich der PCR-Effizienz der Zielgene mit der PCR-Effizienz des Haushaltsgens	52
Abbildung 4.2: Schmelzkurvenanalyse der Zielgene und des Haushaltsgens	53
Abbildung 4.3: DNA-Gel der PCR-Produkte und Negativkontrollen	54
Abbildung 4.4: ΔC_T -Werte der Zielgene als Funktion der logarithmisch dargestellten Verdünnung	54
Abbildung 4.5: Western Blot der Expression der Zielproteine im Neocortex, Thalamus und Hippocampus	55
Abbildung 4.6: Zirkadianer Verlauf der relativen Expression der A_1AR -mRNA	58
Abbildung 4.7: Tagesprofil der relativen Expression der A_1AR -mRNA unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe	59
Abbildung 4.8: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die A_1AR -mRNA-Expression im Neocortex	61
Abbildung 4.9: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A_1AR -mRNA-Expression im Neocortex	63
Abbildung 4.10: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf die A_1AR -mRNA-Expression im Neocortex	64
Abbildung 4.11: Western Blot der zirkadianen Expression von A_1AR	65
Abbildung 4.12: Zirkadianer Verlauf der relativen Expressionslevel des A_1AR	66
Abbildung 4.13: Zirkadiane Expression des A_1AR differenziert nach Schlaf- und Wachphase	67
Abbildung 4.14: Western Blot der Expression von A_1AR unter chronischer Koffeinapplikation	68
Abbildung 4.15: Tagesprofil der relativen Expressionslevel von A_1AR unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe	70

Abbildung 4.16: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die Proteinexpression des A ₁ AR in Neocortex, Hippocampus und Thalamus der Ratte differenziert nach Wach- und Schlafphase.....	72
Abbildung 4.17: Western Blot der Expression von A ₁ AR nach Schlafentzug und Schlafentzug mit anschließender Erholungsschlafphase.....	73
Abbildung 4.18: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A ₁ AR im Neocortex	76
Abbildung 4.19: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A ₁ AR im Thalamus	77
Abbildung 4.20: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A ₁ AR im Hippocampus.....	78
Abbildung 4.21: Western Blot der Expression von A ₁ AR nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug	79
Abbildung 4.22: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die Proteinexpression des A ₁ AR in Neocortex, Thalamus und Hippocampus	80
Abbildung 4.23: Der Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A ₁ AR im Neocortex	83
Abbildung 4.24: Der Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A ₁ AR im Thalamus.....	84
Abbildung 4.25: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A ₁ AR im Hippocampus	85
Abbildung 4.26: Zirkadianer Verlauf der relativen Expression der A _{2A} AR-mRNA.....	86
Abbildung 4.27: Zirkadiane Expression der A _{2A} AR-mRNA differenziert nach Schlaf- und Wachphase.....	87
Abbildung 4.28: Tagesprofil der relativen Expression der A _{2A} AR-mRNA unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe	89
Abbildung 4.29: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die mRNA-Expression des A _{2A} AR im Neocortex differenziert nach Wach- und Schlafphase	90
Abbildung 4.30: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die A _{2A} AR-mRNA-Expression im Neocortex.....	92
Abbildung 4.31: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A _{2A} AR-mRNA-Expression im Neocortex.....	94
Abbildung 4.32: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf die A _{2A} AR-mRNA-Expression im Neocortex.....	95
Abbildung 4.33: Western Blot der zirkadianen Expression von A _{2A} AR	96

Abbildung 4.34: Zirkadianer Verlauf der relativen Expressionslevel von A _{2A} AR.....	97
Abbildung 4.35: Western Blot der Expression von A _{2A} AR unter chronischer Koffeinapplikation	98
Abbildung 4.36: Tagesprofil der relativen Expressionslevel von A _{2A} AR unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe	100
Abbildung 4.37: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die Proteinexpression des A _{2A} AR in Neocortex, Hippocampus und Thalamus der Ratte differenziert nach Wach- und Schlafphase.....	102
Abbildung 4.38: Western Blot der Expression von A _{2A} AR nach Schlafentzug und Schlafentzug mit anschließender Erholungsschlafphase	103
Abbildung 4.39: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A _{2A} AR im Neocortex.....	106
Abbildung 4.40: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A _{2A} AR im Hippocampus	107
Abbildung 4.41: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A _{2A} AR im Thalamus	107
Abbildung 4.42: Western Blot der Expression von A _{2A} AR nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug	108
Abbildung 4.43: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die Proteinexpression des A _{2A} AR in Neocortex, Thalamus und Hippocampus	109
Abbildung 4.44: Einfluss von chronischem Kaffeekonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A _{2A} AR im Neocortex	112
Abbildung 4.45: Einfluss von chronischem Kaffeekonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A _{2A} - AR im Hippocampus	113
Abbildung 4.46: Einfluss von chronischem Kaffeekonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A _{2A} - AR im Thalamus.....	113
Abbildung 4.47: Einfluss von chronischem Kaffeekonsum und/oder 12 h Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A _{2A} AR	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Koffeingehalt in Getränken und Lebensmitteln nach European Food Safety Authority	11
Tabelle 1.2: Molekulare Eigenschaften von humanen Adenosinrezeptoren	18
Tabelle 2.1: Chemikalien	28
Tabelle 2.2: Allgemeine Lösungen und Puffer.....	29
Tabelle 2.3: Primer	31
Tabelle 2.4: Primär- und Sekundärantikörper.....	32
Tabelle 2.5: Größenstandard für die Proteinanalyse.....	32
Tabelle 2.6: Größenstandard für die DNA-Analyse	32
Tabelle 2.7: Geräte	33
Tabelle 2.8: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 3.1: Reaktionsansatz Reverse Transkription	37
Tabelle 3.2: Reaktionsansatz real-time PCR.....	39
Tabelle 3.3: Programm real-time PCR	39
Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
Tabelle 4.1: Gewicht, Trinkmenge und durchschnittliche Koffeinaufnahme	56
Tabelle 4.2: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A ₁ AR-mRNA zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	57
Tabelle 4.3: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A ₁ AR-mRNA der Koffein- und der Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten.....	59
Tabelle 4.4: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A ₁ AR-mRNA der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe im Neocortex.....	60
Tabelle 4.5: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A ₁ AR-mRNA der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe im Neocortex	62
Tabelle 4.6: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A ₁ AR zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	66
Tabelle 4.7: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A ₁ AR der Koffein- und Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	69
Tabelle 4.8: Gepoolte mittlere A ₁ AR-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase	71

Tabelle 4.9: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A ₁ AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus.....	74
Tabelle 4.10: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A ₁ AR der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus.....	80
Tabelle 4.11: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A _{2A} AR-mRNA zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	86
Tabelle 4.12: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A _{2A} AR-mRNA der Koffein- und der Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten.....	88
Tabelle 4.13: Gepoolte mittlere A _{2A} AR-mRNA-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase	90
Tabelle 4.14: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A _{2A} AR-mRNA der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe im Neocortex	91
Tabelle 4.15: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A _{2A} AR-mRNA der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe im Neocortex	93
Tabelle 4.16: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A _{2A} AR zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	97
Tabelle 4.17: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A _{2A} AR nach chronischer Koffeinapplikation zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten	99
Tabelle 4.18: Gepoolte mittlere A _{2A} AR-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase	101
Tabelle 4.19: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A _{2A} AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus	104
Tabelle 4.20: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A _{2A} AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus	110
Tabelle 5.1: Koffeinplasmaspiegel zu Beginn der Hell- bzw. Dunkelphase	126

Abkürzungsverzeichnis

A ₁ AR	A ₁ -Adenosinrezeptor
A _{2A} AR	A _{2A} -Adenosinrezeptor
A _{2B} AR	A _{2B} -Adenosinrezeptor
A ₃ AR	A ₃ -Adenosinrezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
C _T	Cycle Treshold
Cyc. A	Cyclophilin A
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EEG	Elektroenzephalogramm
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IL-1 β	Interleukin 1 β
IW	Intensitätswert
Lsg.	Lösung
P ₂ X ₇	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PET	Positronen-Emissionstomografie
p-Wert	Signifikanzwert
mRNA	Messenger RNA
Nf- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
REM	Rapid Eye Movement
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosylhomocystein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHY	Synaptic Homeostasis Hypothesis
SNARE	Soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachment receptor
SWS	Slow-Wave-Sleep

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem
α	Statistisches Signifikanzniveau
σ	Standardabweichung
\bar{x}	Mittelwert
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Gewicht pro Volumen

verwendete Einheiten

g	Gramm
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
d	Tag
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde

l	Liter
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimolar
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
\times g	Erdbeschleunigung
kDa	Kilodalton
nm	Nanometer
V	Volt
A	Ampere
mA	Milliampere
Hz	Hertz

1 Einleitung

1.1 Der Schlaf

1.1.1 Was ist Schlaf?

Schlaf ist ein physiologischer und umkehrbarer Bewusstseinszustand, der u. a. bei allen Wirbeltieren einschließlich des Menschen auftritt (Cirelli und Tononi, 2008). Charakteristisch für den Schlafzustand sind Immobilität, eine eingeschränkte sensorische Aktivität und eine verminderte Wahrnehmung äußerer Reize (Porkka-Heiskanen et al., 2013). Der Schlaf von Säugetieren lässt sich in REM- (Rapid Eye Movement) und Non-REM-Schlaf unterteilen. Beide Schlafphasen zeichnen sich durch spezifische EEG-Rhythmen aus, anhand derer sie zu unterscheiden sind.

Das EEG des REM-Schlafes ist mit seinen niedrigen Amplituden und hohen Frequenzen (8-12 Hz) dem EEG eines wachen Menschen sehr ähnlich, weshalb der REM-Schlaf auch als paradoxer Schlaf bezeichnet wird (Bear et al., 2009). Charakteristisch für den REM-Schlaf ist, neben der schnellen Augenbewegung bei geschlossenen Lidern (Aserinsky und Kleitman, 1953) und der hohen Gehirnaktivität, eine fast vollständige Atonie der Muskulatur, von der lediglich die Atem- und Augenmuskulatur ausgenommen sind. Weitere physiologische Merkmale sind eine erhöhte Herz- und Atemfrequenz, sowie ein erhöhter Blutdruck (Bear et al., 2009). Während der Anteil des REM-Schlafes nur etwa 25% des Gesamtschlafes ausmacht, nimmt der Non-REM-Schlaf ca. 75% in Anspruch.

Der Non-REM-Schlaf lässt sich laut der American Academy of Sleep Medicine in zwei Leichtschlafstadien (N1 und N2) und ein Tiefschlafstadium N3 unterteilen (Iber et al., 2007). Das Stadium N1 kennzeichnet den Übergang zwischen Wach- und Schlafzustand und somit den Prozess des Einschlafens. Im EEG ist dieses Stadium am Übergang der für das Wachsein typischen Alpha-Wellen (8-13 Hz) in kleine Theta-Wellen mit Frequenzen von 4-7 Hz zu erkennen. Das Stadium N2 stellt den eigentlichen Beginn des Schlafes dar und wird auch als stabiler Schlaf bezeichnet. Neben Theta-Rhythmen treten in diesem Stadium auch die sogenannten K-Komplexe und Schlafspindeln auf (Bear et al., 2009). K-Komplexe sind niederfrequente, biphasische Wellen mit hoher Amplitude und können sowohl spontan auftreten als auch durch äußere Reize (Geräusche, Licht, etc.) hervorgerufen werden (Colrain, 2005). Als Schlafspindeln werden gelegentlich auftretende 10-15 Hz Oszillationen mit einer Dauer

von bis zu 3 sec bezeichnet (Beenhakker und Huguenard, 2009). Das Stadium N3 kennzeichnet die eigentliche Tiefschlafphase. Im EEG treten langsame, große Delta-Rhythmen mit Frequenzen < 2 Hz auf. Aufgrund der Delta-Wellen wird dieses Schlafstadium auch als „Slow-Wave-Sleep“ (SWS) bezeichnet. Während die einzelnen Stadien des Non-REM-Schlafes durchlaufen werden, lässt die Muskelspannung immer weiter nach und Bewegungen erfolgen nur noch gelegentlich. Herz- und Atemfrequenz werden verlangsamt und der Energieverbrauch des Gehirns erreicht seinen Tiefpunkt (Bear et al., 2009).

Während des Schlafens werden die einzelnen Schlafphasen zyklisch aneinandergereiht. Innerhalb eines Zyklus werden zunächst die einzelnen Stadien des Non-REM-Schlafes durchlaufen, bevor eine Phase des REM-Schlafes eintritt. Jeder Zyklus hat eine Dauer von ca. 90 Minuten und wiederholt sich zwischen 3 und 5 Mal, dabei nimmt der Anteil des Non-REM-Schlafes ab und der der REM-Schlafphase zu (Bear et al., 2009).

1.1.2 Funktionen des Schlafes

Der Mensch verbringt rund ein Drittel seines Lebens schlafend. Eine der Kernfragen der Schlafforschung ist daher die Frage nach der Bedeutung bzw. Funktion des Schlafes. Obwohl diese Frage bisher nicht eindeutig beantwortet werden konnte, gibt es verschiedene Theorien, deren Hauptaussagen sich in vier Kategorien einteilen lassen:

a) Schlaf, neuronale Plastizität und Erinnerung

Während des Tages erfolgen ein permanenter Austausch mit der Umwelt und eine ständige Aufnahme von Informationen. Eine wichtige Grundlage für die Informationsverarbeitung im Nervensystem ist die Veränderbarkeit und Anpassungsfähigkeit von Synapsen, die als synaptische Plastizität bezeichnet wird. Die Verarbeitung der eingehenden Informationen im Gehirn während des Wachseins führt zu einem Nettoanstieg der synaptischen Stärke und der Zahl der Synapsen (Diekelmann und Born, 2010) und erfordert Energie und extrazellulären Raum. Eine ununterbrochene Informationsaufnahme würde zu einer Erschöpfung der Energie- und Platzreserven des Gehirns und zu einer Sättigung der synaptischen Plastizität führen (Tononi und Cirelli, 2014). Laut der Hypothese zur synaptischen Homöostase (synaptic homeostasis hypothesis, SHY) von Giulio Tononi und Chiara Cirelli ist Schlaf nötig, um die Nettostärke (und Anzahl) der Synapsen wieder zu normalisieren. Dadurch wird die

synaptische Homöostase wiederhergestellt und synaptische Plastizität gewährleistet (Tononi und Cirelli, 2014). Die neuronale Plastizität bildet die Grundlage für Lernprozesse und das Gedächtnis (Tetzlaff et al., 2012). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Schlaf einen positiven Effekt auf die Gedächtnisbildung hat und das Lernvermögen verbessert (Mednick et al., 2003; Peigneux et al., 2001; Stickgold et al., 2000; Stickgold und Walker, 2013; Takeuchi et al., 2014). Laut SHY ist die Festigung von Erinnerungen ein Nebeneffekt der Reduzierung der allgemeinen Aktivität der Synapsen während des Schlafes (Tononi und Cirelli, 2014). Die meisten synaptischen Verbindungen werden geschwächt und manche sogar ganz abgebaut. Nur die funktional wichtigsten Synapsen bleiben bestehen oder werden gestärkt. Demnach ist ein verbessertes Gedächtnis die Folge eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses nach der Renormalisierung der synaptischen Kapazität (Diekelmann und Born, 2010; Tononi und Cirelli, 2006).

Während SHY eher die grundsätzliche Funktion des Schlafes in den Blick nimmt, gibt es weitere Hypothesen, die sich ausschließlich mit dem Zusammenhang zwischen Schlaf und dem Gedächtnis beschäftigen. Im Wachzustand werden neue Informationen und Gedächtnisspuren im Gehirn kodiert. Im Schlaf, wenn das Gehirn kaum von externen Reizen beeinflusst wird, werden diese neuen, teilweise instabilen Gedächtnisspuren in eine stabile Form umgewandelt und in die bestehenden Erinnerungen integriert. Dieser Prozess wird als Erinnerungs-Konsolidierung bezeichnet (Diekelmann und Born, 2010).

b) Schlaf und Immunabwehr

Zu wenig Schlaf schwächt das Immunsystem und erhöht die Infektanfälligkeit (Cohen et al., 2009), während eine ausreichende Schlafdauer nicht nur hilft Infektionen vorzubeugen, sondern auch für einen höheren Antikörpertiter nach Impfungen sorgt (Lange et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass entzündungsfördernde Cytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) oder der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), schlaffördernd (vgl. Kapitel 1.1.3) sind, während entzündungshemmende Moleküle wie Interleukin-4, eine inhibierende Wirkung auf den Schlaf haben (Krueger et al., 2007). IL1- β und TNF- α erhöhen die Dauer des Non-REM-Schlafes selbst unter physiologischen Bedingungen, d. h. auch ohne Reaktion auf eine Infektion oder als Folge einer Immunreaktion, wohingegen eine Inhibierung dieser Stoffe das Schlafbedürfnis verringert (Opp, 2005). Infektionen, wie Erkältungskrankheiten, beeinflussen den Schlaf-Wach-Rhythmus,

Dauer und Intensität des Non-REM-Schlafes werden erhöht, während zugleich der REM-Schlaf unterdrückt wird (Fang et al., 1995). Es wird vermutet, dass die erhöhte Schlafdauer nach einer Immunreaktion hauptsächlich durch entzündungsfördernde Cytokine vermittelt wird. Krankheitserreger beeinflussen teilweise die gleichen inflammatorischen zellulären Prozesse, Cytokine und andere schlafregulierende Substanzen, die auch durch das Wachsein beeinflusst werden. Das erhöhte Schlafbedürfnis, das oft mit Infektionen einhergeht, kann demzufolge durch eine Verstärkung der physiologischen Mechanismen der Schlafregulation erklärt werden (Zielinski und Krueger, 2011).

Viele immunologische Parameter, wie naive T-Zellen, Leukozyten und Cytokine haben einen zirkadianen Rhythmus (vgl. Kapitel 1.1.3) und zeigen systematische Veränderungen über den 24-stündigen Schlaf-Wach-Rhythmus (Lange et al., 2010). Schlafstörungen beeinflussen den zirkadianen Rhythmus, eine Desynchronisation der zirkadianen Uhr führt zu einer Beeinträchtigung der Immunreaktion (Bollinger et al., 2010). Schlaf und das zirkadiane System regulieren viele immunologische Prozesse, während umgekehrt das Immunsystem auch einen Einfluss auf die Schlafregulation und die Schlafarchitektur hat. Grundlage dieses Einflusses ist eine Kommunikation zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Immunsystem, die durch Neurotransmitter, Hormone und Cytokine vermittelt wird (Besedovsky et al., 2012; Zielinski und Krueger, 2011).

c) Schlaf und der Energiestoffwechsel des Gehirns

Für alle physiologischen Prozesse wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt (Pontes et al., 2015). Das Gehirn benötigt Energie, um die Informationsverarbeitung und Signalübertragung gewährleisten zu können (Attwell und Gibb, 2005; Harris et al., 2012). Benington und Heller formulierten 1995 die These, dass Schlaf notwendig ist, um die während des aktiven Wachseins verbrauchten Energiereserven des Gehirns wieder aufzufüllen (Benington und Heller, 1995). Sie postulierten, dass während des Wachzustandes ein Abbau des astrozytischen Glykogens erfolgt, der zu einem Anstieg der Adenosinkonzentration führt und Müdigkeit hervorruft. Die Änderungen in der Glykogen- und Adenosinkonzentration spiegeln laut Benington und Heller den erhöhten Energiebedarf des Gehirns im Wachzustand sowie die dadurch bedingten metabolischen Änderungen wieder. Der Non-REM-Schlaf wäre demzufolge notwendig, um die zerebralen Glykogenvorräte aufzufüllen (Benington und

Heller, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass endogenes Adenosin nach verlängertem Wachsein den Einschlafprozess induziert (Basheer et al., 2004; McCarley, 2007). Dabei steigt seine Konzentration an, um mit Einsetzen des Erholungsschlafs wieder zu sinken (Porkka-Heiskanen et al., 1997; Strecker et al., 2000). Weiterhin führt verlängertes Wachsein zu einer signifikanten Abnahme der Glykogenspiegel sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz des Gehirns (Kong et al., 2002). Obwohl die These von Benington und Heller durch einige experimentelle Beweise gestützt wird, gibt es auch Befunde, die zu einer Erweiterung der These führten und über die Funktion von Schlaf lediglich zum Auffüllen der Energiereserven des Gehirns hinausgeht. So konnte gezeigt werden, dass die ATP-Konzentration während des Schlafens ansteigt, allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede der ATP-Konzentration zu Beginn und zum Ende der Wachphase festgestellt werden (Dworak et al., 2010). Das Gehirn hat während des Non-REM-Schlafes einen niedrigen ATP-Verbrauch. Dies führt nicht nur zu einer Wiederherstellung, sondern zu einer Erhöhung der Energiereserven des Gehirns, wodurch im Schlaf anabolische Prozesse wie die Synthese von Glykogen und Fettsäuren stattfinden können. Im Wachzustand hat das Gehirn wiederum einen hohen ATP-Bedarf und es geht in einen katabolischen Zustand über (Dworak et al., 2010; Scharf et al., 2008). Diese Theorie ist insofern in Einklang mit der Theorie der synaptischen Homöostase (Tononi und Cirelli, 2006).

Mit dem Energieverbrauch während des Wachseins lässt sich auch das Phänomen des lokalen und nutzungsbedingten Schlafes („local and use-dependent“ sleep) erklären. Neuronen, die im Wachzustand die höchste Aktivität aufweisen, benötigen mehr Erholung als weniger aktive Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass aktivere Teile des neuronalen Netzwerkes, sogenannte kortikale Säulen, in einen schlaf-ähnlichen Zustand übergehen können, während sich andere noch in einem wach-ähnlichen Zustand befinden. Diese unterschiedlichen Zustände treten lokal auf und sind abhängig von vorheriger Aktivität und dem damit einhergehenden Energieverbrauch (Krueger et al., 2008; Rector et al., 2005). Sowohl für Menschen als auch für Tiere konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung und Aktivierung einer bestimmten Gehirnregion während des Wachseins beim darauf folgenden Schlaf verstärkte EEG-Delta-Aktivität in der gleichen Gehirnregion induziert (Iwasaki et al., 2004; Nir et al., 2011; Vyazovskiy et al., 2000).

d) Schlaf und glymphatisches System

Das Gehirn verbraucht fast 20 % der Energie, die der gesamte Körper täglich benötigt (Herculano-Houzel, 2012). Durch den hohen Energieverbrauch und den damit einhergehenden Stoffwechselumsatz entstehen große Mengen überflüssiges und schädliches Material. Im Gegensatz zu fast allen anderen Organen des menschlichen Körpers verfügt das Gehirn über kein konventionelles lymphatisches System (Abbott, 2004), was zu der Frage führt, wie das Gehirn den Abtransport von verbrauchten oder schädlichen Stoffen bewältigt. Im Jahr 2012 entdeckte eine Forschergruppe um Maiken Nedergaard das sogenannte glymphatische System, ein gehirnweites Netz von Transportwegen, das den Austausch von Liquor und Interstitialflüssigkeit und somit den Abtransport von interstitiell gelösten Stoffen ermöglicht (Iliff et al., 2013; Iliff und Nedergaard, 2013; Iliff et al., 2012).

Ein Teil des Liquors gelangt über den perivaskulären Raum, der die Arterien umgibt, aus dem Subarachnoidalraum in das Gehirn und durchströmt langsam das gesamte Interstitium des Gehirns. Die so angereicherte Interstitialflüssigkeit wird mit den darin enthaltenen Schadstoffen über die die Venen umgebenden perivaskulären Räume aus dem Gehirn abtransportiert und in das lymphatische System eingespeist. Der Flüssigkeitstransport durch das Gehirn wird durch die in den Fortsätzen der Astrozyten enthaltenen Aquaporine unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass der Abtransport von schädlichen und überflüssigen Stoffen aus dem Gehirn durch Schlaf begünstigt wird (Xie et al., 2013). Grund dafür ist eine schlafassoziierte Vergrößerung des Zellzwischenraums um ca. 60 %, so dass im Schlaf deutlich mehr Volumen für den Flüssigkeitstransport zur Verfügung steht als im Wachzustand und der Abtransport von neurotoxischen Stoffen, wie z.B. das Protein beta-Amyloid, begünstigt wird. Dies führte zu der Annahme, dass eine weitere Funktion des Schlafes in der Beseitigung von Schadstoffen liegen könnte, die während des Wachzustandes angereichert wurden. Interessanterweise hat eine Narkose den gleichen Effekt in Bezug auf die Aufweitung der glymphatischen Volumina wie regulärer Schlaf (Xie et al., 2013). Es scheint demnach keine Rolle zu spielen, ob der Schlaf natürlich ist oder künstlich herbeigeführt wurde.

1.1.3 Schlafregulation

Schlaf ist ein präzise regulierter Prozess, der durch das „Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation“ beschrieben werden kann und in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Das Modell wurde von Alexander Borbély im Jahre 1982 postuliert (Borbély, 1982).

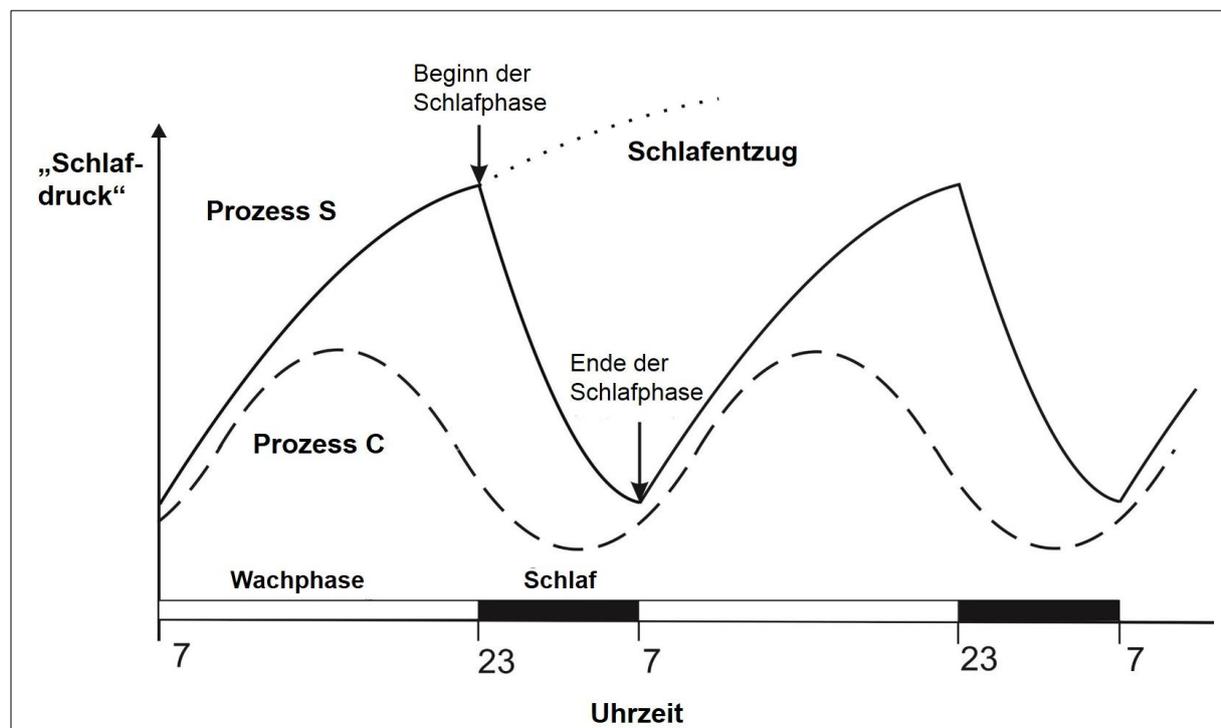


Abbildung 1.1: Das Zwei-Prozess-Modell der Schlafregulation

Prozess S (durchgezogene Linie) beschreibt den homöostatischen Faktor der Schlafregulation, der durch das vorherige Wachsein beeinflusst wird und den Schlafbedarf widerspiegelt. Der Schlafdruck steigt während des Wachseins an und nimmt während des Schlafens wieder ab. Verlängertes Wachsein oder Schlafentzug (gepunktete Linie) führt dazu, dass der Schlafdruck immer weiter ansteigt. Prozess C (gestrichelte Linie) beschreibt den zirkadianen Faktor der Schlafregulation und spiegelt den zirkadianen Rhythmus und den täglichen Wechsel von Licht und Dunkelheit wieder.

Nach Borbély wird die Schlafregulation durch zwei unterschiedliche Prozesse gesteuert. Prozess S beschreibt den homöostatischen Schlafdruck und spiegelt den Zusammenhang zwischen Wachheit und der anschließenden Tiefschlafphase wieder. Mit zunehmender Wachheit steigt der Schlafdruck an und proportional dazu nimmt auch die Menge des Tiefschlafes zu. Prozess C beschreibt die zirkadiane Schlafbereitschaft, die als schlafunabhängig gilt und angepasst an den äußeren Licht-Dunkel-Zyklus den optimalen Zeitraum für den Schlaf angibt. Beide Prozesse finden nicht unabhängig voneinander statt, sondern beeinflussen sich gegenseitig (Borbély et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Nacht ohne Schlaf der homöostatische Schlafdruck weiter ansteigt. Der anschließende Erholungsschlaf wird dadurch

intensiver, unterscheidet sich in seiner Dauer aber nur minimal vom Normalschlaf. So bleibt die Tagesperiodik des Schlaf-Wach-Rhythmus erhalten (Borbély und Achermann, 1999; Brunner et al., 1993).

Die Schlafhomöostase wird auf molekularer Ebene von sogenannten schlafregulierenden Substanzen beeinflusst. Die Konzentration dieser Substanzen variiert im Gehirn mit dem Schlaf-Wach-Rhythmus und beeinflusst die Schlafbereitschaft. Die Verabreichung von schlafregulierenden Substanzen induziert Schlaf, wohingegen eine Inhibierung dieser Substanzen die spontane Schlaftrate verringert (Borbély und Tobler, 1989; Brown et al., 2012). Inzwischen konnten einige Substanzen als schlafregulierend klassifiziert werden, darunter der Neuromodulator Adenosin, die Cytokine IL-1 β und TNF- α , sowie Stickstoffmonoxid und das Prostaglandin-D2 (Brown et al., 2012; Porkka-Heiskanen et al., 2013). Der homöostatische Schlafdruck ist abhängig von der vorherigen Aktivität. Dabei stellt sich die Frage, über welche neurochemischen Prozesse das Gehirn die Dauer des Wachseins ermitteln und messen kann. Die ATP-Cytokin-Adenosin-Hypothese (Abb. 1.2) postuliert eine direkte Beziehung zwischen neuronaler Aktivität und extrazellulärer ATP-Freisetzung (Krueger et al., 2008; Krueger et al., 2010). Die Freisetzung von extrazellulärem ATP erfolgt während der Neurotransmission und initiiert eine Reihe von Prozessen, die zu einem selbstregulierenden Mechanismus führen, der synaptische Aktivität in schlafregulierende Substanzen konvertiert. ATP bindet an P₂X₇-Rezeptoren in Gliazellen, was zu einer Freisetzung der schlafregulierenden Substanzen IL-1 β und TNF- α führt (Bianco et al., 2005; Suzuki et al., 2004). Diese aktivieren in benachbarten Neuronen Nf- κ B, einen Transkriptionsfaktor für einige mit der Schlafregulation in Zusammenhang stehende Gene (z.B. A₁AR, IL-1 β , TNF- α) (Clinton et al., 2011). Die Aktivierung von Nf- κ B führt beispielsweise zu einer erhöhten Expression des A₁AR. Änderungen in der Expression des A₁AR führen wiederum zu einer Änderung der Sensitivität der postsynaptischen Neuronen gegenüber Adenosin (Sengupta et al., 2011). Ein Teil des ATP wird zu Adenosin umgewandelt, welches ebenfalls eine schlafregulierende Substanz ist (Bjorness und Greene, 2009). Die ATP-Cytokin-Adenosin-Hypothese basiert auf der Annahme, dass Schlaf auf lokaler Ebene als Folge von vorheriger Zellaktivität initiiert wird (Krueger et al., 2008).

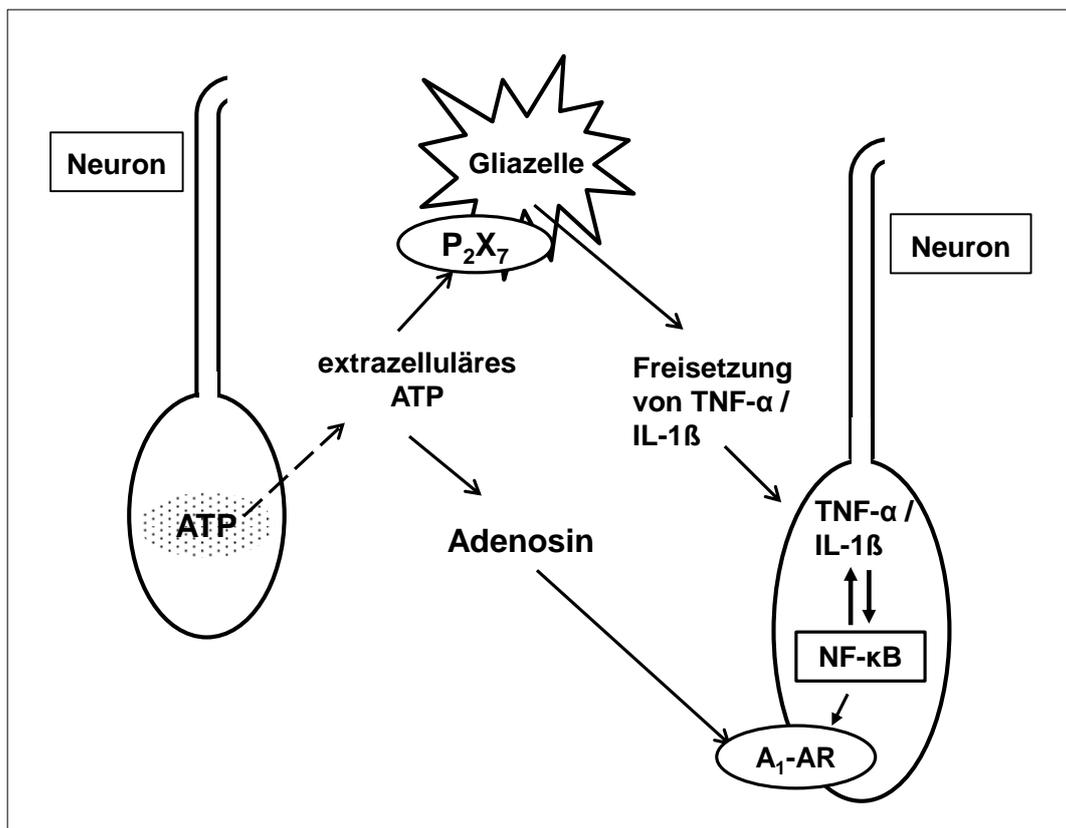


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Konvertierung von synaptischer Aktivität in schlafregulierende Substanzen

1.1.4 Auswirkungen von gestörtem Schlaf

Die optimale Schlafdauer kann von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlich sein. So haben etwa Säuglinge einen höheren Schlafbedarf als Kinder und diese wiederum einen höheren Bedarf als Erwachsene (Williams et al., 2013). Neben dem Alter hat auch das Geschlecht einen Einfluss auf das Schlafbedürfnis (Reyner et al., 1995). Daneben variiert der individuelle Schlafbedarf mit der Dauer der vorherigen Wachphase und wird darüber hinaus auch von Faktoren wie Stress und dem Gesundheitszustand beeinflusst. Durch die homöostatische Schlafregulation wird die Dauer und Intensität des Schlafes an den Schlafbedarf angepasst (vgl. Kapitel 1.1.3). Wird das Schlafbedürfnis dauerhaft nicht erfüllt, kann dies weitreichende Folgen in Bezug auf den Gesundheitszustand und die Leistungsfähigkeit haben. Es wurde gezeigt, dass Übermüdung zu Unfällen und Fehlentscheidungen führt (Goel et al., 2009; Van Dongen et al., 2003), langfristiger Schlafmangel die kognitive Leistungsfähigkeit beeinträchtigt und darüber hinaus Stimmungsschwankungen und Depressionen begünstigt (Lo et al., 2016; Roberts und Duong, 2014; Utge et al., 2011). Es konnte eine Verbindung zwischen Schlafmangel und Übergewicht hergestellt werden. Schlafmangel regt den

Appetit an und führt zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme (Knutson, 2012; Spiegel et al., 2004). Schlafstörungen begünstigen die Entstehung von chronischen Krankheiten wie Diabetes Typ 2 und Bluthochdruck und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Buxton und Marcelli, 2010; Knutson, 2012). In Extremfällen kann eine inadäquate Schlafdauer zu einer erhöhten Sterblichkeit führen (Cappuccio et al., 2010; Hall et al., 2015).

1.2 Koffein

1.2.1 Vorkommen und Verwendung

Koffein ist ein Purinalkaloid aus der Stoffgruppe der Xanthine und kommt am häufigsten in den Samen der Kaffeepflanzen *Coffea arabica* und *Coffea robusta*, sowie in den Blättern der Teepflanze *Camelia siniensis* (grüner und schwarzer Tee) vor. Weitere Quellen sind die Kolanuss (*Cola acuminata*), der Matestrauch (*Ilex paraguariensis*), Guarana (*Paullinia cupana*) und die Kakaobohne (*Theobroma cacao*). Insgesamt konnte Koffein aus über 60 Pflanzen extrahiert werden (Heckman et al., 2010). Im Jahre 1820 wurde von Friedlieb Ferdinand Runge erstmals reines Koffein aus Kaffeebohnen isoliert. Es tritt als weißes, kristallines, geruchneutrales Pulver mit einem bitteren Geschmack auf. Emil Fischer gelang im Jahre 1895 die erste Koffeinsynthese und er konnte dadurch die bereits seit 1875 von Ludwig Medicus vermutete chemische Struktur von Koffein als 1,3,7- Trimethylxanthin bestätigen (Fischer, 1907).

Koffein ist die am häufigsten konsumierte stimulierende Substanz auf der Welt und wird vor allem in Form von Kaffee (Fredholm et al., 1999) genossen. Kaffee ist das beliebteste Getränk in Deutschland. Im Jahr 2015 lag der Pro-Kopf-Konsum von Kaffee in Deutschland bei 162 Litern, was einer Tagesmenge von 2-3 Tassen entspricht und deutlich über dem EU-Durchschnitt von jährlich 112 Litern liegt (Deutscher Kaffeeverband, 2016). Weitere Quellen für Koffein sind zum Beispiel Tee, Cola und Energy-Drinks, wobei der Koffeingehalt in den verschiedenen Produkten variiert. Der Koffeingehalt der gängigsten koffeinhaltigen Produkte ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Laut der European Food Safety Authority gilt für gesunde Erwachsene eine Tageskoffeindosis von bis zu 400 mg als gesundheitlich unbedenklich. Kinder und Jugendliche sollten pro Tag nicht mehr als 3 mg/kg Körpergewicht Koffein aufnehmen (EFSA NDA Panel, 2015). Die durchschnittlich aufgenommene Koffeinmenge liegt in Deutschland in der Altersgruppe der 14- bis 80-jährigen bei 2,1 mg pro kg

Körpergewicht pro Tag. Der höchste Koffeinkonsum konnte mit 2,5 mg/kg Körpergewicht in der Altersgruppe der 35- bis 50-jährigen nachgewiesen werden (Lachenmeier et al., 2013).

Tabelle 1.1: Koffeingehalt in Getränken und Lebensmitteln nach European Food Safety Authority (EFSA NDA Panel, 2015)

Koffeinhaltiges Produkt	Portionsgröße	Koffein pro Portion	Koffeingehalt (g/L)
Kaffee	eine Tasse (200 ml)	90 mg	0,45
Espresso	eine Tasse (60 ml)	80 mg	1,33
Schwarzer Tee	eine Tasse (200 ml)	45 mg	0,22
Grüner Tee	eine Tasse (200 ml)	30 mg	0,15
Cola	ein Glas (250 ml)	27 mg	0,10
Energy-Drink	eine Dose (250 ml)	80 mg	0,32
Zartbitterschokolade	halbe Tafel (50g)	25 mg	0,50
Vollmilchschokolade	halbe Tafel (50g)	10 mg	0,20

1.2.2 Pharmakokinetik

Koffein wird nach oraler Aufnahme schnell und beinahe vollständig über den Gastrointestinaltrakt absorbiert (Magkos und Kavouras, 2005; Marks und Kelly, 1973). Die Absorption erfolgt im Menschen zu 99 % innerhalb von 45 min nach der Einnahme (Blanchard und Sawers, 1983a; Bonati et al., 1982). Interessanterweise ist die Pharmakokinetik des Koffeins unabhängig von der Applikationsart. Die Koffein-Plasma-Kurven nach oraler oder intravenöser Applikation sind sowohl im Menschen als auch im Tier größtenteils kongruent und ein Anzeichen dafür, dass Koffein keinem hepatischen First-Pass-Effekt unterliegt (Arnaud, 1987, 1993; Bonati et al., 1984). Die Gabe von 5 - 8 mg Koffein/kg Körpergewicht führt zu einer Plasma-Koffeinkonzentration von 8 bis 10 mg/L (Arnaud und Welsch, 1982; Bonati et al., 1982). Die maximale Koffeinkonzentration im Plasma wird 15 bis 120 min nach der oralen Applikation erreicht (Arnaud und Welsch, 1982; Bonati et al., 1982). Mögliche Gründe für diese zeitlichen Schwankungen können Magenentleerungen oder andere aufgenommene Nahrungsmittel, wie z.B. Ballaststoffe sein (Arnaud, 1987).

Koffein hat einen hydrophoben Charakter, der es ermöglicht, leicht alle biologischen Membranen zu passieren (Fredholm et al., 1999). Dazu gehören sowohl die Blut-Hirn- (Lachance et al., 1983; McCall et al., 1982) als auch die Plazentaschranke (Ikeda et al., 1982). Eine spezifische Anreicherung in Organen oder Geweben tritt nicht auf (Arnaud, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Koffeinkonzentration im Plasma mit der Koffeinkonzentration der Zerebrospinalflüssigkeit übereinstimmt. Für Ratten beträgt der Liquor-Plasma-Quotient ebenso 1,0 (Liu et al., 2006) wie für neugeborene Kinder (Somani et al., 1980), während für Erwachsene der Liquor-Plasma-Quotient ungefähr 0,8 beträgt (Soto et al., 1994). Koffein weist mit 10-30 % eine geringe Plasmaeiweißbindung auf, wodurch dessen Einfluss auf Verteilung und Elimination des Koffeins vernachlässigbar ist (Arnaud, 1993). Im Menschen beträgt das apparente Verteilungsvolumen von Koffein 0,5 bis 0,7 l/kg und in Ratten 0,9 l/kg, demnach wird Koffein über das Gesamtkörperwasser verteilt (Bonati et al., 1984; Patwardhan et al., 1980).

Die biologische Plasmahalbwertszeit von Koffein im Menschen beträgt ca. 2,5 bis 4,5 h (Arnaud, 1987). Bei Erwachsenen treten keine altersbedingten Unterschiede bezüglich der Elimination von Koffein auf (Blanchard und Sawers, 1983b), wohingegen bei Neugeborenen eine deutlich erhöhte Halbwertszeit von bis zu 100 h auftritt (Aranda et al., 1979). Dies ist auf das noch nicht vollständig ausgereifte CYP-Enzymsystem zurückzuführen, welches für die Metabolisierung von Koffein verantwortlich ist (Aranda et al., 1979). Innerhalb der ersten Lebensmonate werden die Plasma-Halbwertszeiten wieder kürzer und entsprechen ab dem 5. Lebensmonat denen von Erwachsenen (Aldridge et al., 1979; Aranda et al., 1979). Es gibt keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf die Metabolisierung von Koffein (Arnaud, 1987). Jedoch verdoppelt sich die biologische Plasmahalbwertszeit bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen (Patwardhan et al., 1980). Eine Verlängerung (15 h) konnte ebenfalls im letzten Trimester einer Schwangerschaft beobachtet werden (Aldridge et al., 1981; Brazier et al., 1983). Im Gegensatz dazu haben Raucher eine um 30-50 % reduzierte Koffeinhalbwertszeit (Parsons und Neims, 1978). Die biologische Plasmahalbwertszeit von Koffein in Ratten ist im Gegensatz zum Menschen dosisabhängig. Bis zu einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht beträgt die Halbwertszeit 0,7 - 1,2 h (Bortolotti et al., 1990; Choi et al., 2013), ab einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht erfolgt eine nicht-lineare Erhöhung auf 2-4 h (Bortolotti et al., 1990; Latini et al., 1978; Liu et al., 2005). Daneben treten bei Ratten auch altersbedingte Veränderungen in den Koffein-

Plasmahalbwertszeiten auf. Während bei 40 Tage alten Ratten die Halbwertszeit ungefähr eine Stunde beträgt, erhöht sich diese bei 105 Tage alten Ratten auf ca. 1,5 h. Dieser Effekt tritt aufgrund von altersbedingter Abnahme der Koffein-Demethylierung in der Leber auf (Latini et al., 1980).

Koffein wird in der Leber durch ein mikrosomales Enzymsystem zu Mono- und Dimethylxanthinen, Mono- und Dimethylharnsäure, Di- und Trimethylallantoin und Uracilderivaten metabolisiert. Eine signifikante Beteiligung anderer Organe an der Metabolisierung konnte bisher nicht gezeigt werden (Arnaud, 1987; Arnaud, 1998). Speziesbedingt treten Unterschiede in der Metabolisierung von Koffein auf. Während in Ratten ca. 40 % aller Koffeinmetabolite zu den Trimethylderivaten gehören, treten diese im Menschen nur zu 6 % auf (Arnaud, 1987; Arnaud, 1998).

Koffein wird sowohl im Menschen als auch im Tier hauptsächlich renal eliminiert. Aufgrund einer hohen renal-tubulären Reabsorption, die ca. 98 % beträgt, werden nur 2-4 % des Koffeins in unveränderter Form ausgeschieden (Arnaud, 1987). Im Menschen werden ca. 2-5 % (Callahan et al., 1982) und in Ratten ca. 8 % (Arnaud, 1976) mit den Fäzes eliminiert. Daneben wird Koffein in die Galle (Arnaud und Welsch, 1980), Samenflüssigkeit (Beach et al., 1984), Muttermilch (Bailey et al., 1982; Ryu, 1985) und Speichelflüssigkeit (Cook et al., 1976) sezerniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Koffeinkonzentration im Speichel etwa 65-80 % der Koffein-Plasmakonzentration erreicht (Cook et al., 1976).

1.2.3 Einfluss von chronischer Koffeineinnahme auf Schlaf und die Schlaf-Wach-Regulation

Koffein ist in erster Linie für seine anregende Wirkung auf das Zentralnervensystem bekannt, wodurch auch der Schlaf und die Schlaf-Wach-Regulation beeinflusst werden (Landolt et al., 1995a; Nehlig et al., 1992). Diese Effekte treten bereits ab einer eher geringen Dosis von 100 mg Koffein (ca. 1 Tasse Kaffee) auf (Dorfman und Jarvik, 1970). Die Einnahme dieser Dosis kurz vor dem Schlafengehen erhöht die Schlaflatenz, führt zu einer Verlängerung der Leichtschlafphase (N2), zu einer Verkürzung der Tiefschlafphase (N3) innerhalb des ersten non-REM-Stadiums und zu einer gestörten Schlafeffizienz (Landolt et al., 1995a). Von diesen Effekten des Koffeins auf den Schlafrhythmus sind allerdings eher sporadische Kaffeetrinker als regelmäßige Kaffeetrinker betroffen (Colton et al., 1968; Curatolo und Robertson, 1983). Weiterhin

ist eher die Koffeintagesdosis und nicht der zeitliche Abstand zwischen Koffeineinnahme und Zubettgehen entscheidend für die nächtliche Schlaflosigkeit (Karacan et al., 1976; Landolt et al., 1995b). Mittels EEG-basierten Studien konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 3 - 4 Stunden nach der Koffeineinnahme eine verminderte Schlafqualität auftritt, was ungefähr mit der Metabolisierungszeit von Koffein in der Leber übereinstimmt (Muller-Limmroth, 1972). Es wird vermutet, dass die erhöhte Sensitivität einiger Patienten für die Effekte von Koffein auf Schlaf mit einer längeren Metabolisierungszeit von Koffein zusammenhängt (Levy und Zylber-Katz, 1983). Ob das Ausbleiben von koffeinbedingten Effekten auf den Schlaf bei gewohnheitsmäßigen Kaffeetrinkern auf eine Toleranzentwicklung oder auf interindividuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Koffein zurückzuführen ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (Bonnet und Arand, 1992; Colton et al., 1968; Fredholm et al., 1999; Goldstein et al., 1965). Auf der Verhaltensebene führt Koffein zu einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit sowie zu gesteigerter Aufmerksamkeit während verlängertem Wachsein, Schlafrestriktion oder durch Schicht- und Nachtarbeit hervorgerufener Umkehrung des normalen Schlaf-Wach-Rhythmus (Bonnet et al., 2005; Roehrs und Roth, 2008; Schweitzer et al., 2006).

Eine Koffeinapplikation im Dosisbereich zwischen 12,5 und 25 mg/kg Körpergewicht führt in Ratten zu einer Erhöhung der Schlaflatenz und zu einer kürzeren Gesamtschlafdauer bei Verkürzung aller Schlafphasen (Nehlig et al., 1992). Geringere Dosen (0,125-1,25 mg/kg Körpergewicht) haben eine Verlängerung der Leichtschlafphase und eine Verkürzung der Tiefschlafphase zur Folge, während keine signifikanten Effekte auf die Dauer des REM-Schlafes und die Gesamtschlafdauer auftreten (Yanik et al., 1987). Unter Schlafentzug reduziert die Gabe von 12,5 mg/kg Körpergewicht Koffein insgesamt die Anzahl der Einschlafversuche im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Mit dem Fortschreiten des Schlafentzugs steigt die Anzahl der Einschlafversuche bei den behandelten Tieren jedoch an. Koffein mildert den Aufbau des Schlafdrucks ab, kann ihn jedoch nicht vollständig unterdrücken (Wurts und Edgar, 2000). Weiterhin konnte sowohl im Tier, als auch im Menschen gezeigt werden, dass Koffein die Architektur des Erholungsschlafes nach verlängertem Wachsein beeinflusst (Landolt et al., 2004; Schwierin et al., 1996; Wurts und Edgar, 2000). Dies stützt die Vermutung, dass Koffein den Aufbau eines Schlafdrucks während des Wachseins reduziert und dadurch die homöostatische Schlaf-Wach-Regulation beeinflusst.

1.2.4 Neuroprotektive Effekte des Koffeins

In den vergangenen Jahren wurde neben der schlafbeeinflussenden Wirkung von Koffein auch eine potentielle prophylaktische Wirkung von chronischem Koffeinkonsum in Bezug auf neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass sich durch regelmäßigem Koffeinkonsum das Risiko, eine Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung zu entwickeln, signifikant zu verringern scheint (Hu et al., 2007; Maia und de Mendonca, 2002; Qi und Li, 2014). Der langjährige Konsum von 3-5 Tassen Kaffee pro Tag reduzierte das Risiko für Demenz (einschließlich der Alzheimer-Krankheit) um 65 % (Eskelinen et al., 2009).

Morbus Alzheimer gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und führt zu einer progressiven Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen (Cunha und Agostinho, 2010). Die Krankheit ist durch die Anhäufung von Plaques gekennzeichnet, die durch extrazelluläre Ablagerung des Amyloid- β Proteins entstehen und zum Absterben der betroffenen Neuronen führen (Selkoe, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein chronischer Koffeinkonsum im Mausmodell sowohl zu einer Reduzierung von löslichen Amyloid- β -Fragmenten, als auch zu einer Reduzierung von Amyloid- β -Ablagerungen im Hippocampus und Cortex führt und gleichzeitig die kognitiven Beeinträchtigungen abschwächt (Arendash et al., 2009; Arendash et al., 2006; Cao et al., 2009). Darüber hinaus wird durch chronische Koffeinapplikation die für Morbus Alzheimer charakteristische abnorme Tau-Phosphorylierung verringert (Laurent et al., 2014). Morbus Parkinson ist durch eine Degeneration von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn und Striatum und einem damit einhergehenden Dopaminmangel gekennzeichnet, was u.a. zu einer Einschränkung der motorischen Fähigkeiten führt (Prediger, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine chronische Koffeinbehandlung der Degeneration von dopaminergen Neuronen entgegenwirkt sowie die motorischen Fähigkeiten von Parkinson-Patienten verbessert (Kalda et al., 2006; Sonsalla et al., 2012).

1.3 Das adenosinerge System

1.3.1 Adenosin

Adenosin ist ein Purinnukleosid, welches aus der Nukleobase Adenin und dem Zucker β -D-Ribose besteht, und ubiquitär exprimiert wird (Huang et al., 2011). Adenosin wird hauptsächlich durch den Abbau von Adeninnukleotiden im Inneren und an der Oberfläche der Zellen gebildet (Zimmermann, 2000). Adeninnukleotide bestehen aus Adenosin und einer definierten Anzahl von Phosphatgruppen. Die energiereiche Verbindung ATP gehört zu den wichtigsten Energieträgern im Zellmetabolismus. Daneben gibt es noch die energieärmeren Verbindungen Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Die Generierung von Adenosin erfolgt sowohl intra- als auch extrazellulär durch die hydrolytische Spaltung von ATP über ADP und AMP. Die enzymatische Spaltung von AMP zu Adenosin erfolgt dabei intrazellulär durch das Enzym 5'-nukleotidase und extrazellulär durch die Ekto-5'-nukleotidase (Dunwiddie und Masino, 2001; Huang et al., 2011). Eine weitere Quelle zur Bildung von Adenosin bildet cAMP. Dieses wird intrazellulär durch das Enzym Phosphodiesterase und extrazellulär durch das entsprechende Ektoenzym in AMP umgewandelt, woraus danach wiederum Adenosin entstehen kann (Brundege et al., 1997; Rosenberg und Li, 1995). Darüber hinaus wird Adenosin intrazellulär in Form von S-Adenosylhomocystein (SAH) gespeichert. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Hydrolyse von SAH zu Adenosin im Gehirn nicht signifikant für die intrazelluläre Bildung von Adenosin ist (Latini und Pedata, 2001).

Adenosin wird nicht durch vesikuläre Ausschüttung, sondern durch Transporter in den extrazellulären Raum abgegeben (Burnstock, 2007). Damit gehört Adenosin im Gegensatz zu ATP nicht zu den klassischen Neurotransmittern, sondern zählt zur Gruppe der Neuromodulatoren. Der Transport des Adenosins durch die Zellmembran erfolgt entlang seines Konzentrationsgradienten durch bidirektionale Nukleosidtransporter, die somit die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärem Adenosin vermitteln (Gu et al., 1995; Huang et al., 2011). Adenosin kann intrazellulär durch das Enzym Adenosinkinase reversibel in AMP oder durch das Enzym Adenosindeaminase irreversibel in Inosin umgewandelt werden. Die extrazelluläre Metabolisierung erfolgt entweder über Nukleosidtransporter oder durch die irreversible Umwandlung von Adenosin zu Inosin durch das Enzym Ekto-Adenosindeaminase (Fredholm et al., 2005; Huang et al., 2011). Eine Übersicht über

die intra- und extrazelluläre Entstehung und Metabolisierung von Adenosin ist in Abbildung 1.3 gezeigt.

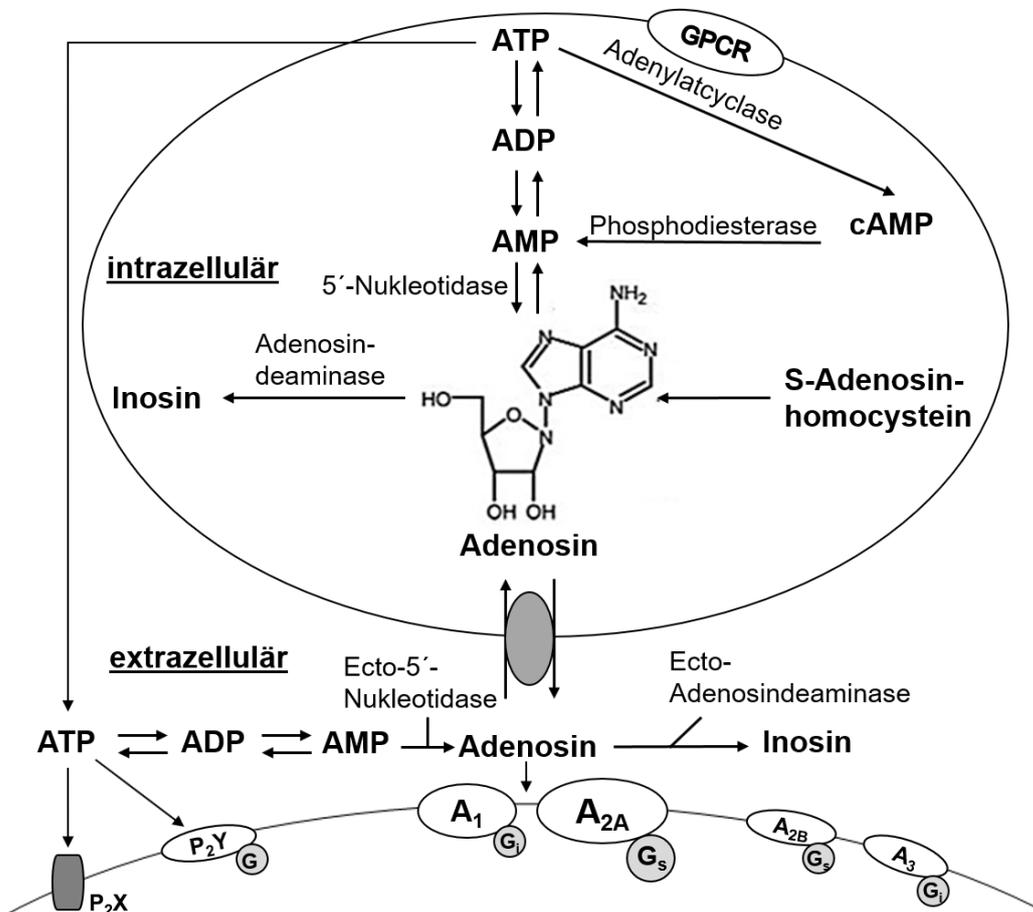


Abbildung 1.3: Intra- und extrazelluläre Entstehung und Metabolisierung von Adenosin (modifiziert nach Huang et al., 2011).

Im Zellinneren wird Adenosin aus ATP, cAMP oder SAH gebildet. Das Vorkommen von extrazellulärem Adenosin beruht zum einen auf der gleichgewichtsbedingten Freisetzung von intrazellulärem Adenosin durch Nukleosidtransporter und zum anderen auf der Metabolisierung von ATP und cAMP.

Neben Neuronen sind auch Gliazellen eine Quelle für Adenosin (Halassa et al., 2009). Neuronale Aktivität und die Freisetzung von Neurotransmittern führen zu einem Calciumanstieg in Astrozyten (Verkhratsky und Kettenmann, 1996), wodurch die Freisetzung von Gliotransmittern wie Glutamat und ATP ausgelöst wird (Guthrie et al., 1999; Parpura et al., 1994). Die Freisetzung kann unter anderem durch Exozytose erfolgen (Jourdain et al., 2007; Zhang et al., 2007), die auf der Bildung eines SNARE-Komplexes (Soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachment receptor) beruht, der wiederum die Fusion zwischen Vesikeln und Membran vermittelt (Kreutzmann et

al., 2015; Scales et al., 2000). Nach seiner Freisetzung wird ATP schnell und enzymatisch in Adenosin umgewandelt (Dunwiddie und Masino, 2001).

1.3.2 Adenosinrezeptoren

Die neuromodulatorischen Eigenschaften des Adenosins im Zentralnervensystem (ZNS) werden über Adenosinrezeptoren vermittelt. Adenosinrezeptoren sind membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und gehören zur Gruppe der P₁-Purinrezeptoren. Bisher konnten vier Subtypen von Adenosinrezeptoren charakterisiert werden: der A₁-, der A_{2A}-, der A_{2B}- und der A₃- Adenosinrezeptor (Fredholm et al., 2001a). Ein gemeinsames Strukturelement aller G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind 7 membrandurchspannende α -Helices, die durch extrazelluläre und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind (LeVine, 1999). Adenosinrezeptoren besitzen einen extrazellulären N-Terminus und einen zytosolischen C-Terminus. Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der einzelnen Subtypen beträgt im Menschen zwischen 31 % und 46 % (Pirainen et al., 2011). Auch die Subtypen unterschiedlicher Spezies weisen eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf. Der größte Unterschied (ca. 30 %) besteht zwischen dem humanen A₃AR und dem A₃AR in Ratten (Fredholm et al., 2001a).

Tabelle 1.2: Molekulare Eigenschaften von humanen Adenosinrezeptoren (Pirainen et al., 2011)

Subtyp	vorhergesagtes Molekulargewicht [kDa]	Länge (Anzahl der Aminosäuren)	G-Protein-Kopplung
A ₁	36,5	326	G _i
A _{2A}	44,7	412	G _s
A _{2B}	36,3	332	G _s
A ₃	36,2	318	G _i

Tabelle 1.2 zeigt die Länge der Primärstruktur, das Molekulargewicht, und die G-Protein-Kopplung der humanen Adenosinrezeptor-Subtypen. Die Subypen A₁AR und A₃AR sind an G_i-Proteine gekoppelt. Aktivierte A₁AR bzw. A₃AR vermitteln über diese G_i-Proteine eine Inhibierung der Adenylatcyclase, was zu einer Verringerung der cAMP-Synthese führt (vgl. Abbildung 1.4). Außerdem führt die Aktivierung der Rezeptoren zu einer Aktivierung verschiedener Typen von K⁺-Kanälen (Fredholm et al., 2005; Landolt et al., 2012). Die Aktivierung von A_{2A}AR bzw. A_{2B}AR stimuliert über G_s-Proteine die Adenylatcyclase, was zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führt. Die

Freisetzung von cAMP führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Diese löst durch Phosphorylierung bestimmter Proteine weitere Zellreaktionen aus (Gubitzi et al., 1996; Hasko et al., 2008; Landolt et al., 2012).

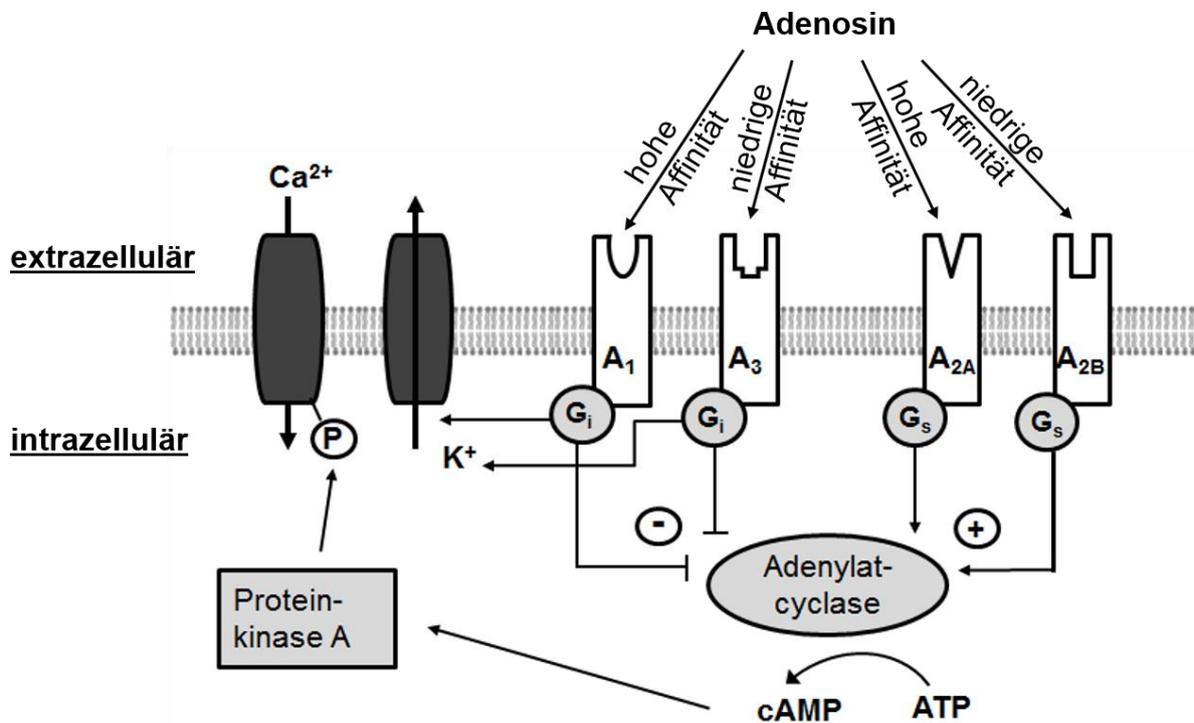


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren

Die Aktivierung der Adenosinrezeptoren stimuliert (A_{2A}AR) oder inhibiert (A₁AR und A₃AR) die Adenylatcyclase und die Synthese von cAMP.

Neben den molekularen Unterschieden weisen die Adenosinrezeptor-Subtypen Unterschiede bezüglich ihrer Affinität für Adenosin und ihrer Verteilung auf. Adenosin bindet mit hoher Affinität an den A₁AR und A_{2A}AR, wohingegen der A_{2B}AR erst unter pathophysiologischen Bedingungen (bspw. in einem Tumor) aktiviert wird. Im Menschen ist der A₃AR ein hochaffiner Rezeptor, allerdings wird er in den meisten Geweben nur mit geringer Dichte exprimiert. Daher wird auch diesem Rezeptor eher eine Rolle bei pathophysiologischen Zuständen zugeschrieben, die jedoch weitestgehend noch ungeklärt ist (Dunwiddie und Masino, 2001; Fredholm et al., 2001b; Ribeiro und Sebastiao, 2010; Sebastiao und Ribeiro, 2009; Zhou et al., 2017).

Der A₁AR wird im ZNS ubiquitär, aber nicht homogen exprimiert. In hoher Dichte findet sich der A₁AR im Hippocampus, Kortex, und Zerebellum und mit einem mittleren Expressionslevel in den anderen Gehirnregionen. Darüber hinaus wird der A₁AR in

peripheren Geweben wie Leber, Lunge und Kolon exprimiert (Bauer und Ishiwata, 2009; Huang et al., 2011; Wei et al., 2011). Der A_{2A}AR wird mit hoher Dichte im Striatum und Riechkolben exprimiert und es wurde lange Zeit eine Beschränkung der Rezeptorexpression auf diese Gehirnregionen vermutet. Inzwischen wurde gezeigt, dass der A_{2A}AR auch in anderen Gehirnregionen wie Hippocampus, Kortex und Thalamus exprimiert wird, wenngleich mit geringerer Dichte als im Striatum. Neben dem ZNS wird der A_{2A}AR auch in den Nieren, der Lunge und weiteren Geweben exprimiert (Cunha et al., 1994; Sebastiao und Ribeiro, 2009; Wei et al., 2011). Der A_{2B}-Rezeptor wird im ZNS nicht signifikant exprimiert. Bisher konnten höhere Level dieses Rezeptor-Subtyps lediglich in Blase, Kolon und Zäkum nachgewiesen werden (Fredholm et al., 2000; Wei et al., 2011). Der A₃AR wird im menschlichen Gehirn mit mittlerer Dichte hauptsächlich in Hippocampus und Zerebellum exprimiert. Generell ist die Expression des A₃AR im Gehirn der meisten Spezies niedrig. Eine hohe Rezeptordichte wurde in Mastzellen und im Testikel der Ratte gefunden (Fredholm et al., 2001a). Aufgrund der geringen Relevanz des A_{2B}- und des A₃AR für die neuromodulatorischen Eigenschaften des Adenosins im ZNS, fokussiert sich diese Dissertation auf A₁AR sowie A_{2A}AR.

Neben seiner Funktion als Schlaffaktor löst Adenosin im ZNS über A₁AR und A_{2A}AR eine Reihe weiterer Reaktionen aus. So konnte gezeigt werden, dass Adenosin unter anderem an der Regulation von Schmerz (Fredholm et al., 2005; Sawynok und Liu, 2003) und an der Entstehung und Regulation von Angst beteiligt ist (Correa und Font, 2008; Jain et al., 1995). Daneben inhibiert Adenosin auf molekularer Ebene die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter wie Dopamin, Acetylcholin und γ -Aminobuttersäure, was zu einer Verringerung der neuronalen Erregbarkeit führt (Cunha, 2001; Dunwiddie und Masino, 2001).

1.3.3 Das adenosinerge System und die Schlaf-Wach-Regulation

Wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 1.1.3), stellt Adenosin eine der bedeutendsten schlafregulierenden Substanzen (Borbély und Tobler, 1989) für die Steuerung des Einschlafprozesses dar (Kalinchuk et al., 2011; Porkka-Heiskanen et al., 2002). Innerhalb der Wachphase steigt die Konzentration von extrazellulärem Adenosin an, wodurch der homöostatische Schlafdruck erhöht wird, und sinkt während der Schlafphase wieder ab (Chagoya de Sanchez et al., 1993; Huston et al., 1996; Nabbi, 2016). Endogenes Adenosin induziert nach verlängertem Wachsein den

Einschlafprozess (Basheer et al., 2004; McCarley, 2007). Dabei steigt seine Konzentration zunächst im basalen Vorderhirn und anschließend zeitversetzt im Kortex weiter an, um mit Einsetzen des Erholungsschlafs wieder zu sinken (Porkka-Heiskanen et al., 1997; Strecker et al., 2000). Dies führt zu einem inhibitorischen Nettoeffekt, welcher primär auf wach-aktive Neurone im basalen Vorderhirn zielt (Porkka-Heiskanen et al., 2002; Strecker et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Zerstörung von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn den exponentiellen Anstieg von Adenosin während des verlängerten Wachseins deutlich verringert und darüber hinaus auch die Intensität des anschließenden Erholungsschlafes reduziert (Kalinchuk et al., 2008). Die Infusion von Adenosin ins basale Vorderhirn führte zu einer Verringerung der Wachheit um 50 % und zu einem Anstieg des REM-Schlafes (Portas et al., 1997)

Adenosin vermittelt seine schlafinduzierende Wirkung vorwiegend über A_1 AR und A_{2A} AR (Landolt et al., 2012). Diese sind an gegensätzliche G-Proteine gekoppelt (vgl. Abbildung 1.4), wodurch die Aktivierung der beiden Rezeptorsubtypen zu unterschiedlichen elektrophysiologischen Effekten führt. So werden im lateralen präoptischen Areal durch Aktivierung des A_1 AR die schlafaktiven Neurone inhibiert und Wachheit induziert, während durch die A_{2A} AR-vermittelte Stimulierung derselben Neurone Schlaf erzeugt wird (Methippara et al., 2005).

Die Verabreichung von selektiven A_1 AR-Agonisten ins basale Vorderhirn oder den präfrontalen Kortex erhöht die Schlafbereitschaft (Brown et al., 2012; Thakkar et al., 2003a), während die Verabreichung von selektiven A_1 AR-Antagonisten den gegenteiligen Effekt erzeugen (Gass et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Infusion des selektiven A_1 AR-Antagonisten 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthin (CPDX) eine Aktivierung der wach-aktiven Neuronen im basalen Vorderhirn hervorgerufen wird (Alam et al., 1999) und eine Unterdrückung der A_1 AR-Expression in derselben Gehirnregion zu einer erhöhten Wachheit führt (Thakkar et al., 2003b). Ein bis zu sechsständiger Schlafentzug führt im basalen Vorderhirn zu einem Anstieg der A_1 AR-mRNA, während im Zingulum keine schlafentzugsbedingte Veränderung beobachtet werden konnte (Basheer et al., 2001). Darüber hinaus führt ein 24-stündiger Schlafentzug zu einer Hochregulation des A_1 AR-Proteins. Der schlafentzugsbedingte Anstieg des A_1 AR konnte beim Menschen in kortikalen und subkortikalen Regionen (Elmenhorst et al., 2007) und bei Ratten im basalen Vorderhirn (Basheer et al., 2007)

sowie im Kortex, Thalamus und Striatum (Elmenhorst et al., 2009) beobachtet werden. Durch die Hochregulation des A₁AR wird dem Anstieg der Adenosinkonzentration während des Schlafentzugs entgegengewirkt und die Wiederherstellung der homöostatischen Bedingungen unterstützt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des A₁AR notwendig ist.

Jüngste Studien lassen vermuten, dass auch der A_{2A}AR an der Vermittlung der schlafinduzierenden Effekte des Adenosins beteiligt ist. Durch die lokale Verabreichung des selektiven A_{2A}AR-Agonisten CGS21680 in den an das basale Vorderhirn angrenzenden Subarachnoidalraum wird non-REM-Schlaf induziert (Scammell et al., 2001). Grund dafür ist, dass durch die Stimulierung des A_{2A}ARs die schlafaktiven ventro-lateralen präoptischen Neurone aktiviert werden (Gallopín et al., 2005). In A_{2A}AR-defizienten Mäusen hatte die Verabreichung von CGS21680 keine Auswirkungen auf den Schlaf und nach Schlafentzug war die Tiefe des Erholungsschlafes deutlich reduziert (Hayaishi et al., 2004; Urade et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der schlaffördernde Effekt von Prostaglandin D₂ (PGD₂), welches ebenfalls zur Gruppe der schlafregulierenden Substanzen zählt (Hayaishi, 1991), durch die Verabreichung eines A_{2A}AR Antagonisten inhibiert wird. Dies führte zu der Vermutung, dass der A_{2A}AR an der Vermittlung der schlaffördernden Wirkung von PGD₂ beteiligt ist (Mizoguchi et al., 2001; Satoh et al., 1996; Scammell et al., 2001). Intrazerebroventrikuläre Injektionen des selektiven A_{2A}AR-Agonisten CGS21680 führten zu einer Erhöhung des non-REM- und des REM-Schlafes (Kumar et al., 2013). Darüber hinaus wird vermutet, dass Adenosin im Riechkolben der Ratte über den A₂AR den REM-Schlaf unterdrückt (Wang et al., 2017). Die lokale Verabreichung des selektiven A_{2A}AR-Agonisten CGS21680 in den Riechkolben der Ratte führt zu einer Abnahme des REM-Schlafes, während die Verabreichung des selektiven Antagonisten SCH58261 zu einem Anstieg des REM-Schlafes führte. Dieser Anstieg konnte ebenfalls in A_{2A}AR-defizienten Mäusen beobachtet werden (Wang et al., 2017). Intrazerebroventrikuläre Injektionen des selektiven A_{2A}AR-Antagonisten ZM-241385 während der letzten 2h eines dreistündigen Schlafentzuges führten zu einer Abnahme des Erholungsschlafes (Kumar et al., 2013). Sowohl ein 3-stündiger als auch ein 6-stündiger Schlafentzug führten zu einer Verringerung der A_{2A}AR-mRNA im Riechkolben der Ratte. Darüber hinaus konnte nach 3-stündigem Schlafentzug eine signifikante Abnahme der Rezeptorbindung festgestellt werden. Im Striatum wurde keine Veränderung der A_{2A}AR-mRNA oder der Rezeptorbindung nach Schlafentzug

festgestellt (Basheer et al., 2001). Weitere Studien, die die schlafentzugsbedingten Veränderungen des A_{2A}AR untersuchen, sind bisher nicht bekannt.

1.3.4 Das adenosinerge System und Koffein

Die Auswirkungen von Koffein auf den Schlaf (vgl. Kapitel 1.2.3) sind auf eine Blockade der Adenosinrezeptoren zurückzuführen. Koffein ist ein nicht-selektiver Adenosin-antagonist und bindet hochaffin an die Rezeptorsubtypen A₁AR und A_{2A}AR (Fredholm et al., 1999; Ribeiro und Sebastiao, 2010). In einigen Studien wurde daher der Einfluss einer Koffeinapplikation auf diese Rezeptoren untersucht, deren Ergebnisse allerdings inkonsistent sind. So führte die Applikation von Koffein mit einer Dosis, die dem täglichen Kaffeekonsum von 3-5 Tassen beim Menschen entspricht, zu einer Hochregulierung des A₁AR im Vorderhirn und im Mittelhirn der Ratte (Boulenger et al., 1983; Chou et al., 1985). Auch nach höheren Dosen (≥ 50 mg/kg/Körpergewicht, entspricht ca. 9 Tassen Kaffee) konnte eine regionenspezifische Hochregulation des A₁AR vorwiegend im Kortex, Zerebellum, Thalamus und Hippocampus beobachtet werden (Daval et al., 1989; Hawkins et al., 1988; Johansson et al., 1993; Marangos et al., 1984; Ramkumar et al., 1988; Shi et al., 1993). In weiteren Studien hingegen konnte nach Koffeingabe in höheren und niedrigeren Dosen keine Veränderung des A₁AR festgestellt werden (Espinosa et al., 2013; Georgiev et al., 1993; Traversa et al., 1994). Die Applikation von Koffein mit einer moderaten Dosis (1g/L) für zwei Wochen führte in Mäusen zu einer Hochregulation des A_{2A}AR im Striatum (Johansson et al., 1997). Dies konnte auch bei Ratten beobachtet werden, allerdings erst bei einer wesentlich höheren Koffeindosis (75 mg/kg Körpergewicht/Tag) (Hawkins et al., 1988). Im Gegensatz dazu blieb die A_{2A}AR Expression nach chronischer Koffeingabe in anderen Studien unverändert (Espinosa et al., 2013; Johansson et al., 1993; Shi et al., 1993).

Unter chronischer Koffeingabe konnte keine Veränderung der Rezeptor-mRNA festgestellt werden (Espinosa et al., 2013; Johansson et al., 1993). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass nicht eine transkriptionelle Regulation der Grund für die Hochregulierung des A₁AR und des A_{2A}AR ist, sondern diese durch lokale Inhibition der adenosinergen Effekte hervorgerufen wird (Johansson et al., 1993). Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass Adenosinagonisten zu einer Verringerung des A₁AR führen und dass diese Herunterregulierung mittels eines posttranslationalen Mechanismus erfolgt (Johansson et al., 1997; Ramkumar et al., 1991).

Da sowohl unter Schlafentzug als auch unter chronischer Koffeingabe eine regionenspezifische Hochregulation des A_1AR beobachtet werden konnte, wird vermutet, dass Koffein den Effekt verlängerter Wachphasen imitiert. Wie bereits erwähnt, steigt mit anhaltender Wachheit der Adenosinspiegel an. In einer Dissertation unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch unter chronischem Koffeinkonsum die Adenosinkonzentration im frontalen Kortex signifikant erhöht ist (Nabbi, 2016). Gleichzeitig ist der Adenosinplasmaspiegel unter chronischem Koffeinkonsum um das Zehnfache erhöht (Conlay et al., 1997).

Koffein führte in Wildtyp-Mäusen und A_1AR -defizienten Mäusen zu einer Verlängerung der Wachphase, während dieser Effekt in $A_{2A}AR$ -defizienten Mäusen nicht beobachtet werden konnte. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Koffein-induzierte Wachheit durch den $A_{2A}AR$ vermittelt wird (Huang et al., 2005). Im Einklang damit ist auch der jüngste Befund, dass eine genetische Variation des $A_{2A}AR$ -Gens für die individuelle Ansprechbarkeit auf Koffein und die Effekte von Koffein auf den Schlaf mitverantwortlich ist (Retey et al., 2007).

Auch in Bezug auf die potentiell neuroprotektive Wirkung des Koffeins wurde die Rolle der Adenosinrezeptor-Subtypen A_1AR und $A_{2A}AR$ untersucht (Madeira et al., 2017; Ribeiro und Sebastiao, 2010; Rivera-Oliver und Diaz-Rios, 2014). Während der A_1AR aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung allgemein als neuroprotektiv dargestellt wird, wird der $A_{2A}AR$ aufgrund seiner exzitatorischen Wirkung als neurodegenerativ beschrieben (Cunha, 2005; Stockwell et al., 2017). Eine Aktivierung des A_1AR (durch Adenosin) führt zu einer Herabsetzung der synaptischen Transmission und der neuronalen Erregbarkeit (Dunwiddie und Masino, 2001; Phillis und Wu, 1981). Es konnte gezeigt werden, dass die akute Gabe von selektiven A_1AR -Agonisten zu einer Verringerung von ischämischen neuronalen Schäden führt (de Mendonca et al., 2000; Evans et al., 1987; von Lubitz et al., 1988), wohingegen die akute Gabe von A_1AR -Antagonisten, darunter auch Koffein, die neuronalen Schädigungen verschlimmerte (de Mendonca et al., 2000; Phillis, 1995; Von Lubitz et al., 1994). Interessanterweise führte die chronische Gabe von Koffein als unselektivem Adenosinrezeptor-Antagonisten zu einer Verminderung der neuronalen Ischämie (Jacobson et al., 1996). Wie bereits erwähnt, bindet Koffein hochaffin sowohl an den A_1AR als auch an den $A_{2A}AR$ (Fredholm et al., 1999). Daher werden für einen molekularen Wirkungsmechanismus, der den in Kapitel 1.2.4 beschriebenen prophylaktischen Eigenschaften von Koffein

zugrunde liegt, vor allem diese beiden Rezeptorsubtypen diskutiert (Cunha und Agostinho, 2010; Madeira et al., 2017; Rivera-Oliver und Diaz-Rios, 2014).

Die alzheimerspezifischen kognitiven Beeinträchtigungen konnten sowohl durch Koffein, als auch durch die Gabe selektiver A_{2A}AR-Antagonisten vermindert werden (Canas et al., 2009; Cunha et al., 2008; Dall'Igna et al., 2007). Die neuronalen Schädigungen, die durch Amyloid- β -Fragmente ausgelöst werden, können ebenfalls durch die Gabe selektiver A_{2A}AR-Antagonisten vermindert werden, wohingegen selektive A₁AR-Antagonisten keine Wirkung zeigen (Dall'Igna et al., 2003). Darüber hinaus wurden durch die direkte intrazerebrale Infusion von Amyloid- β -Fragmenten in A_{2A}AR-defizienten Mäusen keine kognitiven Beeinträchtigungen ausgelöst (Canas et al., 2009). Weiterhin konnte im Alzheimer-Mausmodell gezeigt werden, dass durch eine genetische oder pharmakologische Blockade des A_{2A}ARs der abnormen Tau-Phosphorylierung entgegengewirkt werden kann (Laurent et al., 2016).

Auch die Degeneration dopaminerger Neuronen, wie sie in Zusammenhang mit M. Parkinson auftritt (vgl. Kapitel 1.2.4) (Prediger, 2010), kann nicht nur durch die chronische Gabe von Koffein, sondern auch durch die Gabe selektiver A_{2A}AR-Antagonisten verhindert werden, wohingegen die Gabe eines selektiven A₁AR-Antagonisten zu keiner Veränderung führt (Chen et al., 2001; Ikeda et al., 2002; Kalda et al., 2006). Inzwischen befinden sich selektive A_{2A}AR-Antagonisten in der klinischen Prüfung, um gegebenenfalls als zusätzliche Medikation bei M. Parkinson eingesetzt werden zu können (Dungo und Deeks, 2013; Hauser et al., 2015; Weiss et al., 2003). Obwohl eine Blockade des A_{2A}AR die neuroprotektiven Effekte des Koffeins nachzuahmen scheint (Cunha und Agostinho, 2010; Madeira et al., 2017), kann dies nicht als Beweis dafür angesehen werden, dass die neuroprotektive Wirkung des Koffeins grundsätzlich über den A_{2A}AR vermittelt wird (Gomes et al., 2011). Vielmehr müssen auch die Auswirkungen einer chronischen Koffeingabe auf das adenosinerge System selbst berücksichtigt werden.

Im Alzheimer-Mausmodell lag ein signifikant reduzierter Adenosinspiegel vor, der durch eine 18-tägige Koffeinbehandlung beseitigt werden konnte (Arendash et al., 2006). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung zu einer Reduzierung der membrangebundenen A₁AR im Hippocampus führen (Deckert et al., 1998; Kalaria et al., 1990; Ulas et al., 1993). Dieser

Abnahme des A₁AR könnte durch die bereits erwähnte koffeinbedingte Hochregulierung des A₁AR entgegengewirkt werden. Im frontalen Kortex hingegen konnte sowohl im frühen als auch fortgeschrittenen Stadium der Alzheimerkrankheit eine Hochregulierung der Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR gezeigt werden (Albasanz et al., 2008). Die intrazerebroventrikuläre Verabreichung von Streptozocin, die eine Beeinträchtigung des Gedächtnisses und neuronale Schädigungen auslöst, wie sie auch in Zusammenhang mit M. Alzheimer auftreten, führte zu einer erhöhten Gesamtexpression des A_{2A}AR im Hippocampus, wohingegen die Expression des A₁AR unverändert blieb (Espinosa et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass eine chronische Koffeinbehandlung in diesem Tiermodell nicht nur die kognitive Beeinträchtigung und die neuronale Schädigung, sondern auch die beobachtete erhöhte A_{2A}AR-Expression verhindert. Dennoch bedarf es zur Aufklärung der adenosinbedingten neuroprotektiven Rolle des Koffeins weiterer Untersuchungen.

1.4 Ziel der Arbeit

Koffein ist die weltweit am häufigsten konsumierte stimulierende Substanz. Es vermittelt seine biologischen Effekte primär über eine Verdrängung von Adenosin an den verschiedenen Subtypen der Adenosinrezeptoren. Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass eine chronische Koffeineinnahme nicht nur einen dauerhaften Einfluss auf die Schlaf-Wach-Regulation, sondern auch eine neuroprotektive Wirkung haben könnte. Um das Potenzial von koffeinbasierten Wirkstoffen auf Schlafstörungen und neurodegenerative Erkrankungen besser verstehen zu können, ist es notwendig, das Zusammenspiel der beteiligten Komponenten des adenosinergen Systems aufzuklären.

Das Ziel dieser Arbeit besteht daher in der Untersuchung des A₁AR und des A₂AR im Hinblick auf ihre Rolle bei der Schlaf-Wach-Regulation und ihre Veränderungen durch den Einfluss einer chronischen Koffeineinnahme. Vor dem Hintergrund möglicher protektiver Effekte des Koffeins auf neurodegenerative Erkrankungen sollen dabei nicht nur der Neocortex und der Thalamus – zwei Gehirnregionen die wichtig für den Einfluss des adenosinergen Systems auf die Schlafregulation sind (Elmenhorst et al., 2009) – sondern auch der Hippocampus, der eine zentrale Rolle bei Lernen und Gedächtnisbildung spielt (Bartsch und Wulff, 2015; Diekelmann und Born, 2010), untersucht werden.

Da Adenosin einem zirkadianen Konzentrationsverlauf unterliegt (Chagoya de Sanchez et al., 1993; Huston et al., 1996), soll zunächst untersucht werden, ob auch die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR im ZNS einer zirkadianen Kontrolle gehorchen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird dann der Einfluss einer chronischen Koffeineinnahme auf die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR und deren schlafentzugsbedingten Veränderungen untersucht. Ergänzend wird schließlich im Neocortex auch die mRNA der beiden Rezeptoren untersucht, um Einblicke in das Ineinandergreifen der zugrunde liegenden Regulationsprozesse gewinnen zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle werden alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
dNTP Mix (10mM)	Life Technologies
2-Propanol für die Molekularbiologie	AppliChem
Agarose	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform BioChemica	AppliChem
DTT	Sigma
DNA Gel Loading Dye (6X)	Life Technologies
EDTA	Sigma
Essigsäure	VWR
Ethanol absolut für die Molekularbiologie	AppliChem
GelGreen Nucleic Acid Gel Stain	Biotinum
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
HEPES	Carl Roth
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad
Kaliumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad
Natriumhydroxid	AppliChem
Oligo(dT)12-18 Primer	Life Technologies

Chemikalie	Hersteller
PAGE Blue Staining Solution	Thermo Scientific
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies
RNase-ExitusPlus™	AppliChem
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Salzsäure	VWR
Sucrose	AppliChem
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Life Technologies
Taq DNA Polymerase, native	Life Technologies
TEMED	Carl Roth
Tris	BioRad
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X- 100	Triton-X
TRizol Reagent	Life Technologies
Tween-20	Sigma
UltraPure™ DEPC-Treated Water	Life Technologies

2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Die folgende Auflistung gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen. Soweit nicht anders angegeben, werden alle Puffer und Lösungen in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.2: Allgemeine Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung
10 % APS	1g APS	In 10 ml ddH ₂ O lösen
Blockierlösung	1X TBS	2,5 g Milchpulver
	5 % Magermilchpulver (w/v)	in 50 ml TBS lösen

Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % MeOH (v/v)	Substanzen in 450 ml ddH ₂ O lösen und mit MeOH auf 500 ml auffüllen
Homogenisierungs-Puffer für Gewebe	20 mM HEPES pH 7,4 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,3 M NaCl 10 % Glycerol 0,1 % SDS (v/v) 1 mM EDTA 1 mM DTT Protease Inhibitor Cocktail Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	DTT, Protease- und Phosphatase-inhibitoren frisch zusetzen
10 % Natriumdesoxycholat	100 mg Natriumdesoxycholat	in 1 ml ddH ₂ O lösen, Lichtgeschützt bei RT
10 % SDS	10 g SDS	bei 65° C in 100 ml ddH ₂ O lösen
3x SDS- Probenpuffer nach Lämmli	180 mM Tris-HCl pH 6,8 5 % SDS (w/v) 15 % Glycerol (v/v) 12,5 % Bromphenolblau-Lsg. (v/v) 5 % β-Mercaptoethanol (v/v)	Substanzen in ddH ₂ O lösen und pH 6,8 einstellen
10X SDS-Laufpuffer	250 mM Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % SDS (w/v)	Mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Tris-HCl in ddH ₂ O lösen und den pH auf 6,8 einstellen
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	Tris in ddH ₂ O lösen und den pH mit HCl auf 8,6 ein stellen
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50X TAE-Puffer)	2 M Tris 100 mM EDTA 1 M Eisessig	Substanzen in ddH ₂ O lösen und mit Eisessig auf pH 8,3 einstellen

Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung
10x Tris gepufferte Saline (10x TBS)	100 mM Tris 1,5 M NaCl	In 800 ml ddH ₂ O gelöst; pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit ddH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Tris gepufferte Saline /Tween	1x TBS 0,1 % Tween (v/v)	10x TBS 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen. Zugabe von 0,1 % Tween

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten vom Stamm Sprague-Dawley verwendet. Alle Tiere wurden von der Firma Charles River bezogen.

2.4 Primer

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer:

Tabelle 2.3: Primer

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
A ₁ sense	ATC CCT CTC CGG TAC AAG AC	RT-PCR
A ₁ antisense	CAC TCA GGT TGT TCC AGC CA	RT-PCR
A _{2A} sense	CCA TCC CCT TCG CTA TCA CC	RT-PCR
A _{2A} antisense	ACC AAG CCA TTG TAC CGG AG	RT-PCR
Cyc. A sense	GCA GAC GCC GCT GTC TCT TT	RT-PCR
Cyc. A antisense	GCA CGA AAG TTT TCT GCT GTC TT	RT-PCR

2.5 Antikörper

Die Detektion von Proteinen im Western Blot erfolgte mittels folgender Antikörper:

Tabelle 2.4: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper

Name	Ursprung	Hersteller	Konzentration
Anti-A ₁ Adenosinrezeptor	Kaninchen	Sigma	1:1.500
Anti-A _{2A} Adenosinrezeptor	Kaninchen	Merck	1:3.000
Anti- α -Tubulin Antikörper	Maus	Sigma	1:40.000 - 1:60.000

Sekundärantikörper

Name	gekoppelt mit	Hersteller	Konzentration
Esel-anti-Kaninchen	IRDye® 800CW	LI-COR	1:15.000
Esel-anti-Maus	IRDye® 680RD	LI-COR	1:15.000

2.6 Größenstandards

Für die Proteinanalyse wurde der folgende Größenstandard verwendet:

Tabelle 2.5: Größenstandard für die Proteinanalyse

Name	Größe [kDa]	Hersteller
PageRuler™	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70,	Fermentas
Prestained Protein Ladder	100, 130, 170	

Folgender Größenstandard wurde für DNA-Analysen verwendet:

Tabelle 2.6: Größenstandard für die DNA-Analyse

Name	Fragmente [bp]	Hersteller
GeneRuler	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400,	Thermo
50bp DNA Ladder	300, 250, 200, 150, 100, 50	Scientific

2.7 Geräte

Tabelle 2.7: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	AJ100	Mettler Toledo
Brain Slicer Matrix	BSRLS001-1	Zivic Instruments
Digitales pH-Meter	S220 SevenCompact™	Mettler-Toledo
Eismaschine	AF 100-AS	Scotsman
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mini Protean 3	BioRad
Elektrophoresekammer für Agarosegele	RuneOne™	EmbiTec
Fluoreszenzscanner	Odyssey Fc	Li-Cor
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C	HERAfreeze™ HFC Series	Thermo Scientific
Geldokumentationssystem	DOC-PRINT VX5	Vilber
Heizblock	5355 Comfort	Eppendorf
Heizplatte		Medax
Kreisschüttler	KS 130 basic	IKA
Kühlschrank 4°C		AEG
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge X3	Thermo Scientific
Rotoren:	Rotor F15-8x50cy Microliter 48 x 2	
Laufräder für Ratten	Rat Tethered Motorized Wheel	Lafayette Instruments
Magnetrührer	IKAMAG®	IKA
Mikroplattenleser	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Mikrowelle		AEG
Photometer	NanoDrop® ND1000	Thermo Scientific
Pipetten	Research Plus	Eppendorf
Real-time PCR Cyclor	CFX 96	BioRad
Semy Dry Western Blotter	Transblot SD Cell	BioRad
Stickstoff-Tank		tec-lab
Stromversorgung	PowerPac 200	BioRad
Teflon-Pistill	Micro Centrifuge Sample Pestles	Thomas Scientific
Tischzentrifuge	Galaxy 14D	VWR

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Ultraschallwasserbad	Sonorex	Bandelin
UV-Tisch	ETX - Intense Signal	Vilber
Waage	440-47	Kern
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Millipore

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.8: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Abdichtfolie für PCR-Platten	Bio-Budget Technologies
Einmalspritzen (2,5,10, 20, 50 ml)	B.Braun
Faltenfilter	GE Healthcare
Kanülen 20G	B.Braun
Kryoröhrchen	Sarstedt
Nitrozellulose Membran	Roth
Pipettenspitzen weiß, gelb, blau	Eppendorf
Rasierklingen, einseitig	Zivic Instruments
Reagenz- und Zentrifugationsröhren 15 ml und 50 ml	VWR
Reagiergefäße 0,2- 2,0 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL)	VWR
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Millipore
Uvetten®	Eppendorf
Whatman- Papier	VWR
96-Well Mikroplatte	Greiner
96-Well PCR-Platte	BioRad

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeiten

3.1.1 Isolierung von RNA aus Rattengewebe

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den untersuchten Geweben erfolgte mittels TRIzol[®]-Reagenz. Dabei handelt es sich um eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (Chomczynski und Sacchi, 1987). TRIzol[®] ermöglicht die Homogenisierung des Gewebes und die Lyse der Zellen, während gleichzeitig eine Degradation der RNA durch RNAsen verhindert wird.

Die Gehirnentnahme erfolgte am Ende der Experimente nach Dekapitation. Die für die weitere Analyse ausgewählten Gehirnregionen wurden zügig herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -80°C. Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden gewogen und mit 1 ml TRIzol[®] pro 100 mg Gewebe (mindestens jedoch 1 ml TRIzol[®]) versetzt. Anschließend wurden die mit TRIzol[®] versetzten Gewebeproben mit einem Teflon-Pistill homogenisiert und für eine effektivere Homogenisierung zehn Mal durch eine 20G Kanüle aufgezogen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Homogenate mit 1/5 des Volumens des verwendeten TRIzols[®] an Chloroform versetzt und zur vollständigen Durchmischung mehrmals invertiert. Im Anschluss an eine dreiminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Homogenate für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Nach Überführung der oberen, klaren und wässrigen Phase in ein neues Reagiergefäß wurde die Gesamt-RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml verwendetem TRIzol[®] gefällt. An eine zehnminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 12.000 x g und 4°C an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol (hergestellt mit nukleasefreiem Wasser) versetzt und durch vorsichtiges Schütteln gewaschen. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 7500 x g und 4°C. Nach Wiederholung des Waschschrilles wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Zugabe von 20-50 µl nukleasefreiem Wasser wurde das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren resuspendiert und mittels anschließender Inkubation für 15 min bei 55 °C vollständig gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die RNA wurde aliquotiert (5 µL) und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren beruht auf deren Eigenschaft, Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$ zu absorbieren. Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop® ND1000 bei $\lambda = 260\text{ nm}$ (entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und $\lambda = 280\text{ nm}$ (entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen) gegen nuklease-freies Wasser. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann aus der optischen Dichte bei 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}}$) die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet werden. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$) entspricht einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger bzw. $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA oder RNA. Der Quotient aus $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Für reine RNA sollte dieser Wert größer als 1,8 sein, bei reiner DNA liegt dieser Wert zwischen 1,6 und 1,8.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden nach der Kalibrierung $1\text{ }\mu\text{l}$ Nukleinsäure-lösung auf den NanoDrop® aufgetragen.

3.1.3 Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen Auftrennung von Nukleinsäuren. Die Auftrennung erfolgt auf einer Gel-Matrix aus Agarose. Durch Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die von der polymerisierten Agarose gebildeten Gelmaschen zur Anode (Pluspol). Dabei wandern kleine DNA-Fragmente schneller durch die Maschen als größere Fragmente, wodurch eine Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe möglich wird. Die Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Für DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 50 und 1000 bp konnte durch eine Agarosekonzentration von $2,5\%$ (w/v) eine gute Auftrennung erzielt werden. Durch Zugabe von GelGreen™, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert, kann unter UV-Licht bis zu 1 ng DNA nachgewiesen werden.

Die erforderliche Agarose-Menge wurde durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen auf 80°C mit GelGreen™ versetzt (Verdünnung: $1:10.000$). Die Agarose wurde in eine entsprechende Form gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und das entstandene Agarosegel in die Elektrophorese-Kammer überführt. Jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ der Proben wurden mit $2\text{ }\mu\text{l}$ 6x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 3-4 V/cm Elektrodenabstand.

3.1.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für diesen Reaktionsschritt wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen verwendet. Zunächst wurde in einem nuklease-freien Reagiergefäß der folgende Reaktionsansatz hergestellt:

Tabelle 3.1: Reaktionsansatz Reverse Transkription

1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (550 µg/mL)
1 µl	dNTP Mix (10mM)
ad 13 µl	DEPC-Wasser
13µl	

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, abzentrifugiert und direkt danach auf Eis gestellt. Dem gekühlten Reaktionsansatz wurden 4 µl 5X First-Strand Buffer und 2 µl 0,1M DTT hinzugefügt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz durchmischt und anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl des Enzyms SuperScript™ II Reverse Transkriptase erfolgte die Transkription der RNA bei 42°C für 50 min. Als Startpunkt für die cDNA-Synthese benötigt das Enzym spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer. Die zugefügten Oligo-dT-Primer binden spezifisch an die Poly-A-Region der mRNA, so dass ausschließlich mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Im Anschluss an die Synthese erfolgten die Inaktivierung des Enzyms und die Denaturierung des RNA/cDNA-Hybridstrangs durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 70°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

3.1.5 Primer-Design

Die Wahl der richtigen Primer und die Etablierung dieser ist für den Erfolg von PCR-Reaktionen von besonderer Bedeutung. Ein nicht optimal funktionierender Primer führt entweder zu keinen oder zu unspezifischen Produkten. Die einzelnen Primer sollten

eine Länge von 18 bis 24 Nukleotiden haben und eine größtmögliche Spezifität für das entsprechende PCR-Produkt aufweisen. Wird cDNA als Template eingesetzt, so sollten die Primer so gewählt werden, dass die amplifizierte Gensequenz Intron-überspannend ist. Dies bedeutet, dass die Primer-Sequenzen in der genomischen DNA durch ein Intron getrennt sind, um eine unerwünschte Amplifikation von ggf. kopurifizierter genomischer DNA zu verhindern. Des Weiteren sollte bei der Wahl der Primer darauf geachtet werden, dass beide Primer eines Primerpaares eine ähnliche Schmelztemperatur haben, die zwischen 57°C und 63°C liegen sollte.

Die für die real-time PCR verwendeten Primer (vgl. Kapitel 2.4) wurden mit dem Programm Primer-BLAST des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entworfen. Hierzu wurde in der National Library of Medicine (Pubmed) nach den entsprechenden mRNA-Sequenzen gesucht und diese anschließend in das Programm eingegeben. Bei der Auswahl geeigneter Primer wurde auf die vorher beschriebenen Kriterien geachtet.

3.1.6 Semi-quantitative real-time PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction: PCR) dient dazu, Nucleinsäuren mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase exponentiell zu amplifizieren. Durch die Verwendung spezifischer Primer wird die Amplifizierung genau definierter DNA-Fragmente möglich. Die real-time PCR ermöglicht darüber hinaus eine relative Quantifizierung der amplifizierten DNA. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der amplifizierten DNA zu und wird nach jedem Zyklus in Echtzeit gemessen.

Als Fluorochrom wurde SYBR[®] Green I verwendet, welches in die DNA interkaliert. Während freies SYBR[®] Green I nur minimal fluoresziert, absorbiert der entstehende DNA - SYBR[®] Green I-Komplex blaues Licht einer Wellenlänge von $\lambda=498$ nm und emittiert grünes Licht einer Wellenlänge von $\lambda= 522$ nm. Die Quantifizierung erfolgt während des exponentiellen Anstiegs der Produktmenge durch Bestimmung des C_T-Wertes (= Cycle Threshold). Dieser gibt den PCR-Zyklus an, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Der C_T-Wert wird sowohl für das Ziel-Gen als auch für das Haushalts-Gen Cyclophilin A bestimmt. Cyclophilin A ist ein konstitutiv exprimiertes Gen und konnte daher als Referenz genutzt werden.

Durchführung

Die real-time PCR wurde mit dem iQ™ SYBR® Green Supermix von BioRad entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Durchführung erfolgte für jede Probe als Freifachbestimmung.

Tabelle 3.2: Reaktionsansatz real-time PCR

5 µl	cDNA (10ng/µl)
0,25 µl	Primer sense (10 µmol/µl)
0,25 µl	Primer antisense (10 µmol/µl)
10 µl	iQ™ SYBR® Green Supermix
4,5 µl	DEPC-Wasser
20µl	

Die real-time PCR wurde mit folgendem Programm im CFX96 Cycler von BioRad durchgeführt:

Tabelle 3.3: Programm real-time PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Schmelzkurven-Analyse	55°C-95°C (in 0,5°C-Schritten)	30 sec	1

Schmelzkurven-Analyse

Im Anschluss an die real-time PCR erfolgte eine Schmelzkurven-Analyse. Diese ist zur Überprüfung der Produktspezifität notwendig, da SYBR® Green I in jede DNA interkaliert und daher eine Unterscheidung zwischen korrektem PCR-Produkt und Artefakten (z.B. Primer-Dimeren) nicht möglich ist. Eine schrittweise Erhöhung der Temperatur von 55°C auf 95°C führt zu einer Denaturierung der DNA Doppelstränge. Die Temperatur, bei der die DNA-Doppelstränge denaturieren, hängt dabei maßgeblich von ihrer Basenpaar-Länge und ihrem CG-Gehalt ab. Durch die Denaturierung der DNA-Doppelstränge wird SYBR® Green I freigesetzt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Da die spezifischen PCR-Produkte meist länger sind und somit einen

höheren Schmelzpunkt haben als unspezifisch entstehende Primer-Dimere ist eine Unterscheidung möglich. Zur weiteren Überprüfung der Reinheit des Produktes kann der PCR- Ansatz auf ein 2,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung beschreibt die Expressionsänderung des Zielgens relativ zu einem Kalibrator. Als Kalibrator wurden im Rahmen dieser Arbeit die Proben der Kontrollgruppe (naiv) verwendet. Die relative Quantifizierung erfolgte mit der vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$). Diese kann verwendet werden, wenn zuvor nachgewiesen wurde, dass Zielgen und endogene Kontrolle (Cyclophilin A) die gleiche Amplifikationseffizienz aufweisen. Dies wurde für alle Zielgene ausgetestet und bestätigt.

3.1.6.1 Validierungsexperiment für die vergleichende C_T -Methode

Zunächst musste von der cDNA der Zielgene und der endogenen Kontrolle eine Verdünnungsreihe über 5 Zehnerpotenzen erstellt werden. Um die Effizienz der Gene zu vergleichen, wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe gegen den entsprechenden C_T -Wert aufgetragen. Die Geradensteigung ist ein Maß für die Effizienz der PCR und sollte ungefähr zwischen -3,2 und -3,4 liegen. Dies entspricht der optimalen PCR-Effizienz von $100\% \pm 5\%$.

Berechnet man für jeden Punkt der beiden Geraden den ΔC_T -Wert, so bleibt dieser konstant. Dies resultiert aus der Parallelität der Geraden, bedingt durch die gleich hohe PCR-Effizienz. Im Falle gleich starker PCR-Effizienzen trägt man nun den dekadischen Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den errechneten ΔC_T -Wert auf. Um die $\Delta\Delta C_T$ -Methode anwenden zu können, muss die Steigung der resultierenden Kurve zwischen 0,1 und -0,1 liegen.

3.1.6.2 Die vergleichende C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$)

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression werden die C_T -Werte vom Zielgen mit den C_T -Werten für das Referenzgen Cyclophilin A normiert:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenz}$$

Anschließend berechnet man die Differenz zwischen den normierten C_T -Werten der behandelten Tiere und der unbehandelten Tiere (Kalibrator):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ behandeltes Tier} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$$

Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Über- oder Unterexpression mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes angegeben und wie folgt berechnet:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

3.2 Biochemische Arbeiten

3.2.1 Dissektion von Rattengehirnen

Vor Beginn der Arbeit wurden alle benötigten Arbeitsgeräte und Gefäße für mindestens 60 min im Kühlschrank vorgekühlt. Das Gehirn wurde unmittelbar nach der Entnahme auf einer auf Eis platzierten Metallplatte für 2 min gekühlt. Nach Entfernung des Bulbus wurde das Gehirn vorsichtig in einer anatomisch geformten, metallischen Halterung, der sog. Brain Slicer Matrix platziert, welche eine reproduzierbare koronale Dissektion gestattet (Abb. 3.1). Das Gehirn wurde dabei bündig an die Aussparung für den Bulbus angelegt.

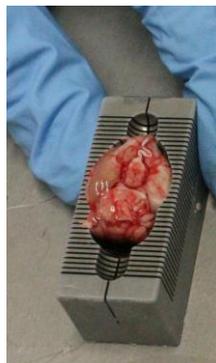


Abbildung 3.1: Platzierung eines Rattengehirns in der Brain Slicer Matrix

Im Anschluss wurden, beginnend mit dem zweiten Schnittkanal hinter dem Bulbusansatz, die vorgekühlten Rasierklingen ca. 3 mm in die vorgegebenen Schnittkanäle gesteckt. Dabei wurde jeder zweite Schnittkanal sowie das Cerebellum ausgespart. Durch das gleichzeitige Herunterdrücken aller Rasierklingen konnten acht koronale Gehirnscheiben hergestellt werden (Abb. 3.2).

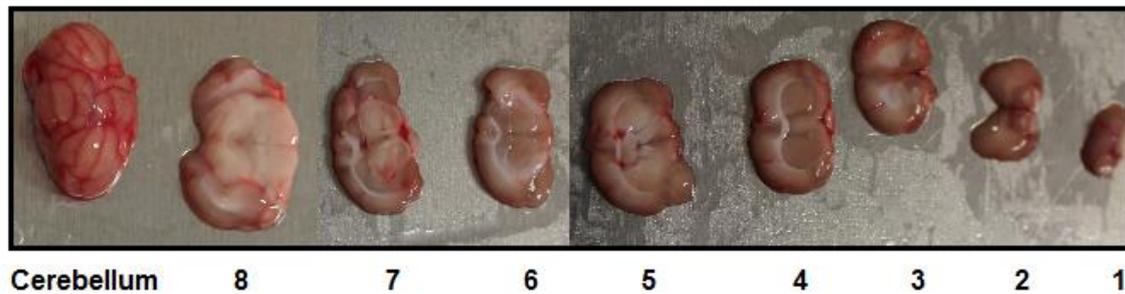


Abbildung 3.2: Herstellung koronaler Gehirnscheiben mittels Brain Slicer Matrix

Aus den Gehirnscheiben wurde je ein Präparat des Neocortex, des Thalamus und des Hippocampus mit Hilfe eines Skalpell hergestellt, in ein gekühltes Reagiergefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gehirnpräparate erfolgte bei -80°C .

3.2.2 Herstellung von Gewebehomogenaten

Vor Beginn der Arbeit wurden alle benötigten Puffer und Gefäße gekühlt. Die nach der Entnahme bei -80°C gelagerten Gewebepreparate wurden zunächst gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebepreparat wurde in ein Reagiergefäß überführt und nach Zugabe der entsprechenden Menge an Homogenisierungspuffer (500 μl pro 100 mg Gewebe) mittels eines Teflon-Pistills homogenisiert. Für eine effektivere Homogenisierung wurde das Homogenat mehrmals mit einer 200 μl Eppendorf-Pipette aufgezogen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nachdem das Homogenat erneut mehrmals mit einer 200 μl Eppendorf-Pipette aufgezogen wurde, erfolgte eine dreißigminütige Inkubation auf Eis. Zur Abtrennung von Geweberesten erfolgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 4°C und $18.000 \times g$. Der Überstand wurde in ein sauberes Reagiergefäß überführt. Nach Bestimmung des Proteingehalts wurden die Homogenate aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebehomogenaten wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Dieses beruht auf dem Protokoll von Smith (Smith et al., 1985). Bei jeder Messung wurde eine Standardgerade erstellt, bei der ausgehend von 10 mg/ml folgende Verdünnungen an BSA vermessen wurden: 1,5 mg/ml, 1 mg/ml,

0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte zu erzielen, wurde zur Herstellung der Stammlösung BSA im gleichen Puffer gelöst wie die zu untersuchenden Proben.

Von den Standardlösungen und den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 10 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikroplatte pipettiert. Die Analyse erfolgte als Dreifachbestimmung. Zu jeder Probe wurden 200 µl Arbeitsreagenz, bestehend aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 (Reagenz A:B), gegeben. Im Anschluss wurde die Mikroplatte für 30 Sekunden vorsichtig geschüttelt und danach für 30 min bei 37°C unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikroplattenleser vermessen.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer Größe (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgt auf einer diskontinuierlichen Gel-Matrix aus Polyacrylamid unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS ist ein anionisches Tensid und bindet an Proteine, wodurch die Eigenladung der Proteine aufgrund der negativen Ladung des SDS überdeckt wird. Die Porengröße des Gels kann durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 5%ige Sammelgele und 10%ige Trenngele mit einer Stärke von 1 mm verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.1 gezeigt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Sammelgel	Trenngel
	5%	10%
ddH ₂ O	0,604 ml	2,4 ml
40% Acrylamid Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	0,125 ml	1,25 ml
SDS-Sammelgelpuffer	0,25 ml	-
SDS-Trenngelpuffer	-	1,25 ml
10% SDS	0,01 ml	0,05 ml
10% APS	0,01 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,01 ml
Gelvolumen	1 ml	5 ml

Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge an dreifachkonzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Nachdem die Proteine auf diese Weise denaturiert wurden, wurden sie zusammen mit einem Größenstandard (PPL) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 180-200 V.

3.2.5 Western Blot nach dem Semi Dry Verfahren

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung (englisch: blotting) von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Durch Anlegung eines senkrecht zum SDS-Gel gerichteten elektrischen Feldes wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Nach der Übertragung können mittels entsprechender Antikörper spezifische Proteine detektiert werden.

Der Western Blot wurde nach dem Semi Dry Verfahren durchgeführt (Kyhse-Andersen, 1984). Hierfür wurden 12 Lagen Whatman-Papier sowie eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Danach wurden sowohl das Whatman-Papier als auch die Membran für je 30 min im Blotpuffer inkubiert. Das zu blottende Gel wurde für 15 min im Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurden 6 Lagen Whatman-Papier auf der Anode der Blotvorrichtung platziert, gefolgt von der angefeuchteten Nitrozellulosemembran und dem zu blottenden Gel. Bei dem Aufbau des Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befanden. Nach Platzierung von weiteren 6 Lagen Whatman-Papier wurde die Blotvorrichtung mit der Kathode verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA pro Quadratcentimeter Membran für 90 min.

Immundetektion der Proteine

Bei der Immundetektion wird das zu untersuchende Protein mittels spezifischer Antikörper auf der Membran detektiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Zur Blockierung noch freier Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rotation mit 10 ml Blocklösung inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBS für 5 min erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper für das zu untersuchende Protein und als Kontrolle zusätzlich mit

einem Primärantikörper gegen α -Tubulin. Diese wurden zuvor den Angaben entsprechend in TBS-T + 0,5% Magermilch verdünnt. Anschließend wurde die Membran fünfmal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Die korrespondierenden Sekundärantikörper wurden in TBS-T verdünnt und die Inkubation der Membran erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rotation in einer lichtundurchlässigen Inkubationsbox. Anschließend wurde die Membran jeweils 10 min zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Da die Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wurde die Inkubation in einem lichtgeschützten Behältnis durchgeführt. Auch die anschließenden Waschschriffe (2x für 10 min in TBS-T und 1x für 10 min in TBS) mussten in diesen Behältern erfolgen. Die Membran kann bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C in TBS aufbewahrt werden. Für die Auswertung wurde das Infrarot-Analysesystem von Odyssey (Li-Cor) genutzt. Durch zwei verschiedene Diodenlaser werden die Fluoreszenzfarbstoffe der Sekundärantikörper getrennt angeregt. Durch zwei Detektoren kann das jeweilige Fluoreszenzsignal von dem Gerät registriert und gescannt werden. Die beiden unabhängigen Detektionskanäle erlauben die gleichzeitige Aufzeichnung zwei verschiedener Proteinbanden auf derselben Membran. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda = 700 \text{ nm}$ und $\lambda = 800 \text{ nm}$.

Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsstärke eines Proteins relativ zu einem internalen Referenzprotein bestimmt. Das Referenzprotein dient als Ladekontrolle für Schwankungen bezüglich der eingesetzten Gesamtproteinmenge und zum Normalisieren der Proben. Als Referenzprotein wurde das Haushaltsgen α -Tubulin gewählt, das konstitutiv exprimiert wird. Um eine Vergleichbarkeit sowohl unter den verschiedenen Western Blots, als auch unter den einzelnen Proben zu gewährleisten, wurde des Weiteren bei jeder Elektrophorese zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben ein Kalibrator auf das Gel aufgetragen. Als Kalibrator wurde ein Proteinhomogenat aus Gehirngewebe eingesetzt.

Mit Hilfe der Image Studio Software der Firma Li-Cor wurden zunächst die Werte für die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proteinbanden integriert, wobei das Hintergrundleuchten abgezogen wurde. Zur Quantifizierung wurde für jede Probe der Intensitätswert (IW) des Zielproteins (Z_p) durch den jeweiligen Intensitätswert von α -

Tubulin dividiert. Dieser Wert wurde anschließend auf den Kalibrator (K) normiert. Daraus ergibt sich die folgende Formel:

$$\text{Relative Fluoreszenzintensität} = (IW_{Zp} / IW_{\alpha\text{-Tubulin (Zp)}}) / (IW_K / IW_{\alpha\text{-Tubulin (K)}})$$

3.2.6 Coomassie- Färbung von SDS-Gelen

Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können durch Anfärben mit Coomassie Brillant Blau sichtbar gemacht werden. Coomassie Brillant Blue ist ein Triphenylmethanfarbstoff. Durch Anlagerung dieses Farbstoffs an die basischen Seitenketten der Proteine werden diese gefärbt.

Die Coomassie-Färbung dient zur Überprüfung der Transfereffizienz des Western Blots. Nach Durchführung des Western Blots wurden die SDS-Gele dreimal für 10 min mit ddH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte eine mindestens einstündige Inkubation der Gele mit der PageBlue™-Proteinfärbelösung von Fermentas. Zur vollständigen Entfärbung wurden die Gele mehrmals mit ddH₂O gewaschen.

3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

3.3.1 Allgemeine Tierhaltung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A349 genehmigt. Für die Studie wurden adulte, männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 418 ± 22 g verwendet. Jeweils 2-3 Tiere wurden zusammen in Typ IV – Standardkäfigen bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 h gehalten und mit Trinkwasser und Standardfutter *ad libitum* versorgt.

3.3.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Der zeitliche Versuchsablauf ist in Abbildung 3.3 dargestellt und wird im Folgenden nur allgemein beschrieben. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Interventionen findet sich in den nachfolgenden Kapiteln.

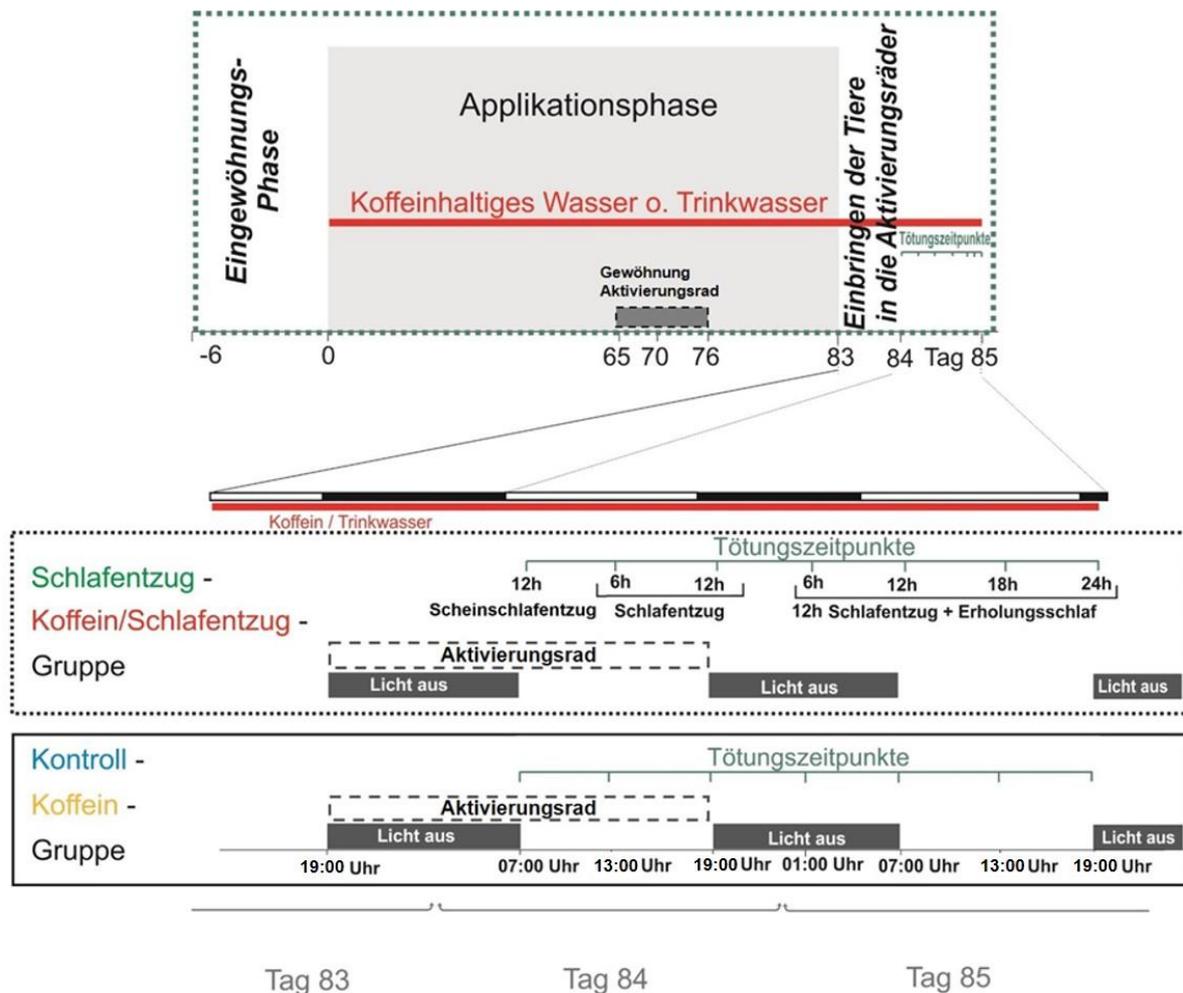


Abbildung 3.3: Zeitlicher Versuchsablauf.

Im oberen Teil der Abbildung ist die gesamte Laufzeit der Studie dargestellt, im Ausschnitt darunter ist die Interventionsphase vergrößert und detaillierter dargestellt.

Die Versuchstiere wurden unmittelbar nach ihrer Anlieferung an den Licht-Dunkel-Rhythmus der Versuchstierhaltung gewöhnt. Die Lichtphase begann um 07:00 Uhr morgens und die Dunkelphase um 19:00 Uhr abends. Die Versuchstiere wurden in zwei Versuchsgruppen mit jeweils zwei Subgruppen aufgeteilt:

- Koffeingruppe, bestehend aus
 - Subgruppe *ohne* Schlafentzug (Koffein) und
 - Subgruppe *mit* Schlafentzug (Koffein-Schlafentzug).
- Kontrollgruppe, bestehend aus
 - Subgruppe *ohne* Schlafentzug (Kontrolle) und
 - Subgruppe *mit* Schlafentzug (Schlafentzug).

Nach sechstägiger Eingewöhnung wurde mit der chronischen Koffeinapplikation begonnen, die 12 Wochen andauerte (Tag 0). Nach 9 Wochen erfolgte die Gewöhnung der Tiere an die Aktivierungsräder (Tag 65 - 76). Am Ende der dreimonatigen Phase der chronischen Koffeinapplikation (Tag 83/84) wurden die Tiere der Schlafentzugs- bzw. Koffein-Schlafentzugs-Gruppe einem bis zu 12-stündigen Schlafentzug unterzogen, während die Tiere der Subgruppen ohne Schlafentzug für die gleiche Zeit in den Laufrädern motorisch aktiviert wurden. Anschließend wurden die Tiere der einzelnen Gruppen unter tiefer Isoflurannarkose durch Dekapitation getötet. Die Tötung erfolgte zu genau definierten Zeitpunkten.

3.3.3 Chronische Koffeinapplikation

Die Tiere der Verumgruppe erhielten Koffein *per os* über das Trinkwasser (Alhaider et al., 2010b). Die Dosierung wurde an einen humanen Kaffeeconsum von 4-5 Tassen pro Tag angepasst. Dies entspricht einer Koffeinaufnahme von 400-500 mg, was für eine 70kg schwere Person eine Dosis von ca. 7,14 mg/kg Körpergewicht ergibt (Fredholm et al., 1999). Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben erfolgt die Metabolisierung des Koffeins bei Ratten schneller als beim Menschen. Um die unterschiedliche Metabolisierungsrate auszugleichen und die Koffeindosis von Ratte und Mensch vergleichbar zu machen, wird die Dosis bei Ratten um den Faktor 3,6 erhöht (Shukitt-Hale et al., 2013). Somit ergab sich die verwendete Zieldosierung von 30 mg Koffein pro kg Körpergewicht pro Tag. Die Dosierung wurde wöchentlich an das aktuelle Gewicht und die Trinkmenge der Tiere angepasst. Die Applikation fand unter regulären Haltungsbedingungen statt.

3.3.4 Gewöhnung an das Aktivierungsrad

Um den Stress der Tiere während des Schlafentzugs bzw. der motorischen Aktivierung zu minimieren, wurden die Tiere vorab an die Aktivierungsräder gewöhnt. Dazu wurden die Tiere vereinzelt und die Räder für eine Zeit von ca. 9 Tagen so an den Haltungskäfig (Typ III) angebaut, dass die Tiere die Möglichkeit hatten das frei bewegliche Rad zu explorieren. Der Aufbau ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

Die entsprechenden Aktivitäten (Laufradumdrehungen) der Tiere wurden dabei protokolliert. Nach Beendigung der Gewöhnungsphase wurden die Tiere in ihren ursprünglichen Gruppen in die regulären Haltungskäfige zurückgesetzt.

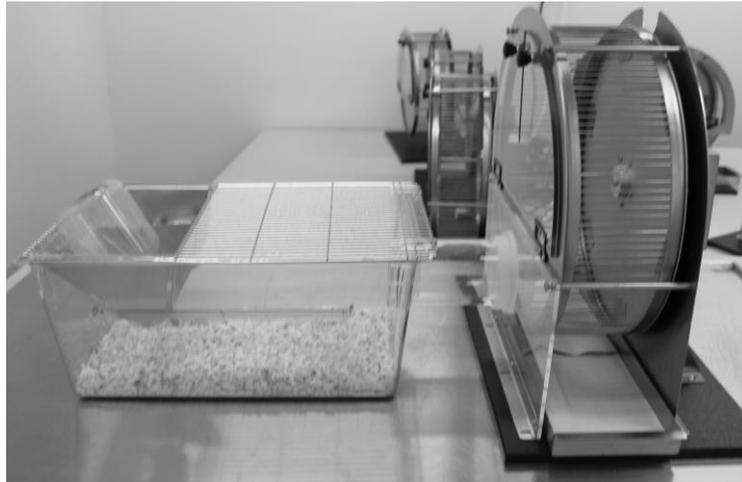


Abbildung 3.4: Haltungskäfig (Typ III) mit angebautem Aktivierungsrad

3.3.5 Schlafentzug und motorische Aktivierung

Für den Schlafentzug bzw. die motorische Aktivierung wurden die Tiere zu Beginn der Dunkelphase (siehe Abbildung 3.3, Tag 83 19:00 Uhr) in die Aktivierungsräder gesetzt und für 24 Stunden dort belassen. Da Ratten nachtaktive Tiere sind und während dieser Phase (Dunkelphase) nur ca. 35% der Zeit schlafend verbringen (Basheer et al., 2007) stellt ein Schlafentzug während der Dunkelphase tatsächlich einen Scheinschlafentzug dar. Der eigentliche Schlafentzug begann somit erst 12 Stunden, nachdem die Tiere der entsprechenden Versuchsgruppen in die Räder gesetzt wurden, mit Beginn ihrer inaktiven Phase (Hellphase, Tag 84 07:00 Uhr, siehe Abbildung 3.3). Für den (Schein)-Schlafentzug wurden die Laufräder so programmiert, dass sie sich in festen Zeitabständen bewegten und somit standardisiert das Einschlafen der Tiere verhinderten (Christie et al., 2008). Bei den Tieren, deren Schlaf-Wach-Rhythmus nicht beeinflusst werden sollte, wurde das Rad in Intervallen so programmiert, dass die Tiere zwar die gleiche motorische Aktivierung erfuhren wie die Tiere der Schlafentzugsgruppen, ihr Schlaf jedoch nicht gestört wurde (Christie et al., 2008). Die programmierte Lichtschaltung (Licht an – Licht aus) wurde während der Zeit im Schlafentzugsrad beibehalten.

3.3.6 Tötung und Gehirnentnahme

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran tief narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Schädelkalotte und des dorsalen Neuralkanals in der Mittellinie erfolgte die vorsichtige Hirnentnahme mit Pinzette und Spatel. Das entnommene Gehirn

wurde unmittelbar nach der Entnahme für die Dissektion einzelner Hirnregionen verwendet.

3.4 Statistik

Für die Verwaltung der erhobenen Daten und die statistischen Datenanalysen wurden die Programme Microsoft® Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmont, USA) und SPSS® für Windows (Version 24, SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

3.4.1 Deskriptive Statistik

Die erhobenen Daten wurden durch den Mittelwert \bar{x} zusammengefasst und Abweichungen davon jeweils als Standardabweichung σ dargestellt. Zur Bewertung der Heterogenität innerhalb und zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurde der relative Variationskoeffizient berechnet.

3.4.2 Explorative Datenanalyse

Die Ergebnisse wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft. Für die Überprüfung wurden der Shapiro-Wilk-Test und Normalverteilungsdiagramme verwendet. Im Anschluss wurden dementsprechend parametrische bzw. nichtparametrische Verfahren ausgewählt. In dieser Arbeit wurden die folgenden statistischen Testverfahren angewendet:

Parametrische Methoden

Klassischer Levenetest:

Prüfung auf Varianzhomogenität

Student's ungepaarter t-Test:

Mittelwert-Vergleich zweier unabhängiger und normalverteilter Stichproben

Einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA):

Varianzanalyse von mehr als zwei unabhängigen und normalverteilten Stichproben unter Verwendung einer Gruppierungsvariablen

Zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA):

Varianzanalyse von mehr als zwei unabhängigen und normalverteilten Stichproben unter Verwendung zweier Gruppierungsvariablen

Nichtparametrische DatenMann-Whitney-U-Test:

Vergleichender Rangsummentest bei zwei unabhängigen Stichproben

Kruskal-Wallis-Test

Vergleichender Rangsummentest bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben

Post Hoc - Analyse

Bei signifikanten Unterschieden und Mehrfachvergleichen wurde post-hoc das Bonferroni-Verfahren durchgeführt. Dabei wird um die Anzahl der durchgeführten Testverfahren korrigiert. Das neue Signifikanzniveau wird berechnet, indem man das ursprüngliche Signifikanzniveau (0,05) durch die Anzahl der durchgeführten Testverfahren (n) teilt:

$$\alpha' = 0,05 / n$$

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Real-time PCR

Vor Versuchsbeginn mussten zunächst die Primer für die real-time PCR etabliert und die $\Delta\Delta C_T$ -Methode validiert werden. Zu diesem Zweck wurde für jedes Primer-Paar eine PCR-Analyse mit einer cDNA-Verdünnungsreihe über 7 Verdünnungsstufen von 100ng cDNA bis 0,1ng cDNA durchgeführt. Anschließend wurde der dekadische Logarithmus der jeweiligen cDNA-Menge gegen den C_T -Wert des jeweiligen Gens aufgetragen, um die Effizienz der jeweiligen PCR zu überprüfen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

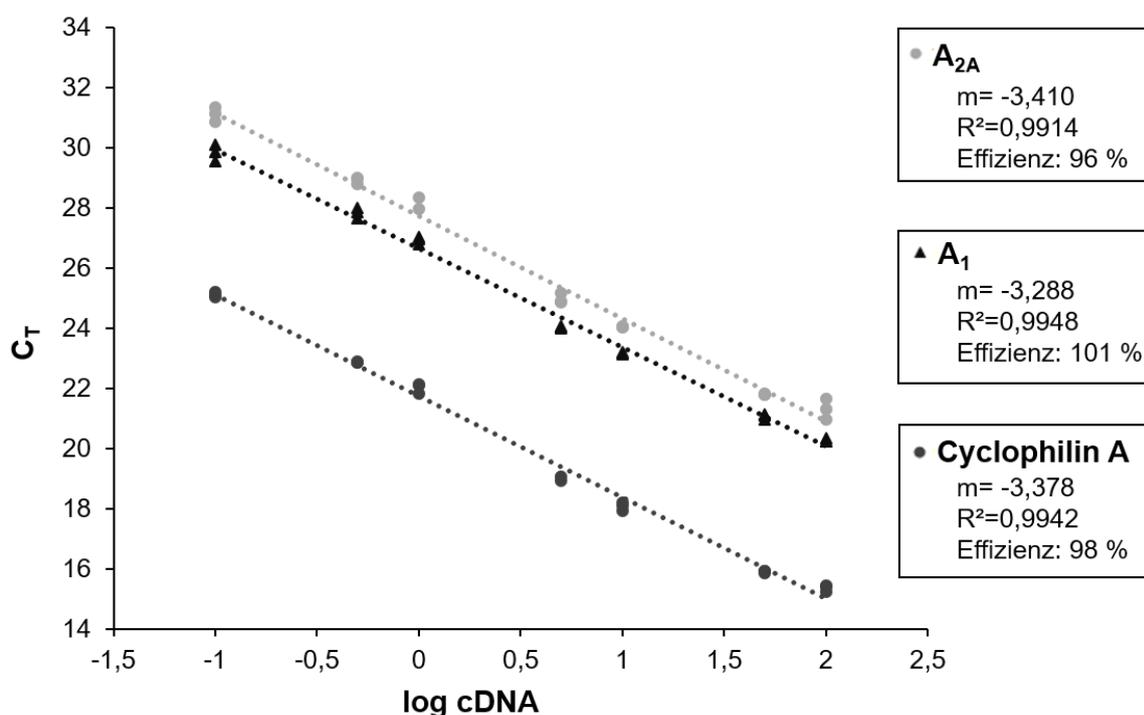


Abbildung 4.1: Vergleich der PCR-Effizienz der Zielgene mit der PCR-Effizienz des Haushaltsgens

Die Geradensteigung lag für alle Gene im optimalen Bereich zwischen 3,2 und 3,4. Die daraus ermittelten PCR-Effizienzen betragen für A_1 AR 101 %, für A_{2A} AR 96 % und für Cyclophilin A 98 %. Zur Überprüfung der Produktspezifität wurde für jedes Gen im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 4.2). Für alle untersuchten Gene wurde jeweils nur ein spezifischer Schmelzpeak detektiert. In den jeweiligen Negativkontrollen fehlte der produktspezifische Schmelzpeak, allerdings wiesen die Negativkontrollen für A_1 AR und Cyclophilin A einen Schmelzpeak bei einer

geringeren Temperatur auf. Dies deutete auf die Bildung von sogenannten Primer-Dimeren hin.

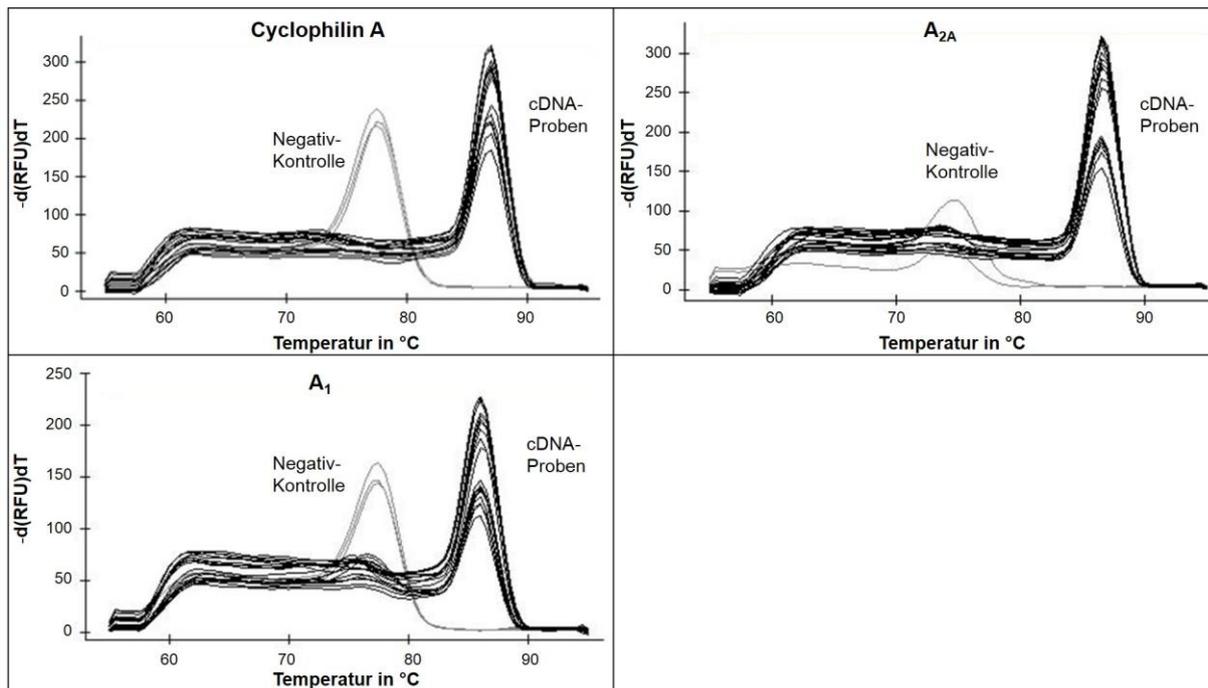


Abbildung 4.2: Schmelzkurvenanalyse der Zielgene und des Haushaltsgens

Zur weiteren Überprüfung wurde jeweils ein PCR-Produkt und die dazugehörige Negativkontrolle auf ein 2,5 %-iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.3) Für alle Gene zeigte das DNA-Gel nur eine spezifische Bande, die jeweils dem erwarteten PCR-Produkt entsprach. In den entsprechenden Negativkontrollen traten diese Banden nicht auf. In den Negativkontrollen für A₁AR und Cyclophilin A wurde dafür jeweils eine schwache Bande bei ca. 50 bp detektiert. Dies bestätigte die Vermutung der Bildung unspezifischer Primer-Dimere. Da diese jedoch nur in den Negativ-Kontrollen auftraten und somit die Produktspezifität der Primer gewährleistet war, konnten die Primer-Paare für die geplante Studie verwendet werden.

Zur abschließenden Validierung der vergleichenden C_T-Methode wurde der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufen gegen den ΔC_T -Wert des jeweiligen Gens aufgetragen. Die resultierende Steigung der Graphen sollte zwischen 0,1 und -0,1 liegen. Abbildung 4.4 zeigt, dass dies bei beiden Genen der Fall ist. Die Methode ist somit valide und die $\Delta\Delta C_T$ -Methode konnte für die nachfolgende Studie verwendet werden.

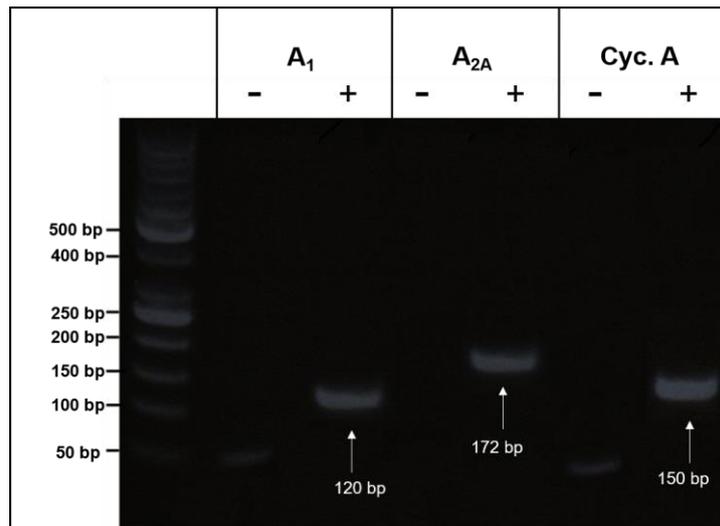


Abbildung 4.3: DNA-Gel der PCR-Produkte und Negativkontrollen

Zur Überprüfung der Produktspezifität der verwendeten Primer wurde für jedes Primer-Paar eine PCR-Analyse mit einer c-DNA-Verdünnungsreihe durchgeführt. Für jedes Gen wurde ein PCR-Produkt mit der dazugehörigen Negativkontrolle auf ein 2,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Zur Identifikation der Banden wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Für A_1 AR konnte eine DNA-Bande bei ca. 120 bp detektiert werden. Diese Bande entspricht dem spezifischen PCR-Produkt für A_1 AR. Die Negativkontrolle zeigte eine schwache Bande bei 50 bp, die einem unspezifischen Primer-Dimer entspricht. Für A_{2A} AR konnte eine DNA-Bande bei ca. 172 bp detektiert werden. Diese Bande entspricht dem spezifischen PCR-Produkt für A_{2A} AR. Die Negativkontrolle zeigte keine Banden. Für Cyclophilin A konnte eine DNA-Bande bei 150 bp detektiert werden. Diese Bande entspricht seinem spezifischen PCR-Produkt. Die Negativkontrolle zeigt eine schwache Bande bei 50 bp, die einem unspezifischen Primer-Dimer entspricht.

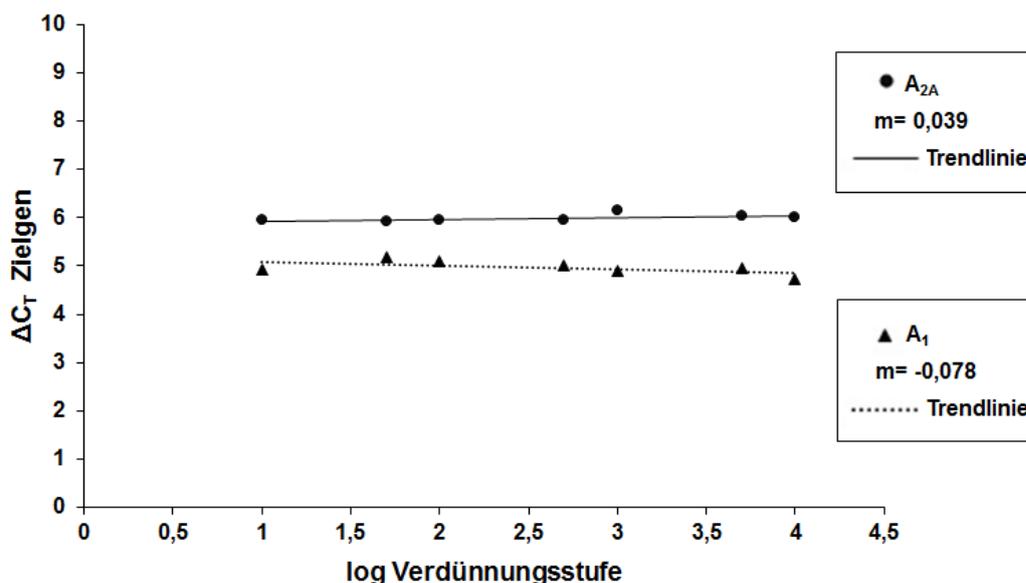


Abbildung 4.4: ΔC_T -Werte der Zielgene als Funktion der logarithmisch dargestellten Verdünnung

Die Geradensteigung muss im Bereich zwischen 0,1 und -0,1 liegen, damit die $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die relative Quantifizierung angewendet werden darf. Dies war sowohl für A_1 AR, als auch für A_{2A} AR der Fall.

4.1.2 Western Blot

Vor Versuchsbeginn musste zunächst überprüft werden, ob ein immunologischer Nachweis der Zielproteine in den zu untersuchenden Gehirnregionen möglich ist. Darüber hinaus musste die Spezifität der verwendeten Antikörper überprüft und der gleichzeitige Nachweis von Zielprotein und Referenzprotein etabliert werden. Abbildung 4.5 zeigt das Endergebnis der Vorversuche.

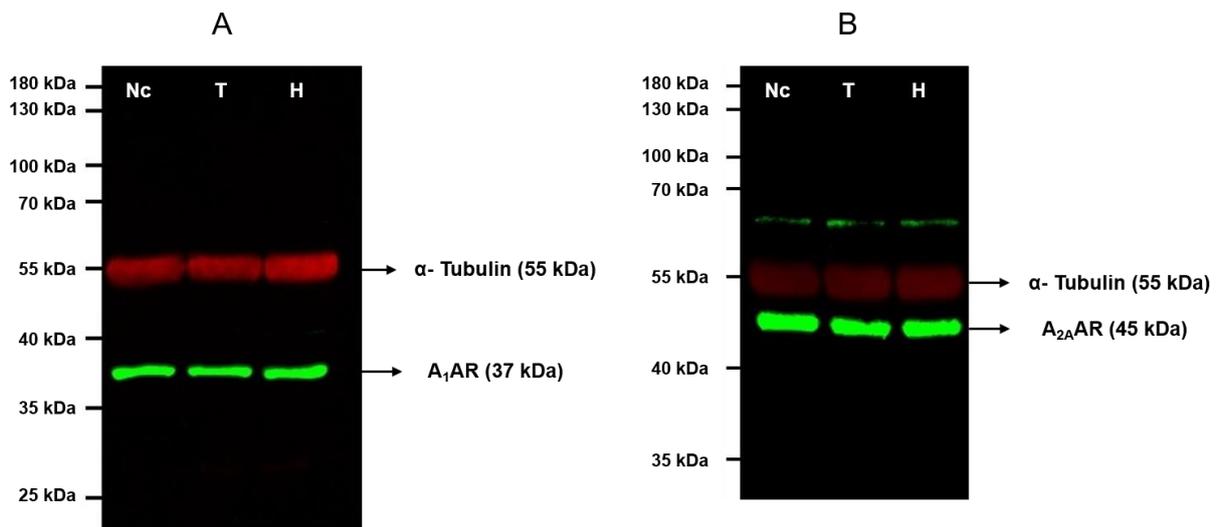


Abbildung 4.5: Western Blot der Expression der Zielproteine im Neocortex, Thalamus und Hippocampus

Zur Etablierung der Western Blot-Versuche wurden eine Neocortex-, eine Thalamus- und eine Hippocampus-Probe homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jede Region auf 10 % SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag entsprach 50 μ g Gesamtprotein. Für die spätere Identifikation der Banden wurde Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. **Western Blot A** wurde mit Antikörpern gegen A_1 AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. Der Antikörper gegen α -Tubulin detektierte in jeder Probe eine einzelne charakteristische Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm). Der Antikörper gegen A_1 AR detektierte in jeder Probe eine charakteristische Fluoreszenzbande bei ca. 37 kDa ($\lambda=800$ nm). **Western Blot B** wurde mit Antikörpern gegen A_{2A} AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. Der Antikörper gegen α -Tubulin detektierte in jeder Probe eine einzelne charakteristische Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm). Der Antikörper gegen A_{2A} AR detektierte in jeder Probe eine charakteristische Fluoreszenzbande bei ca. 45 kDa ($\lambda=800$ nm). Darüber hinaus detektierte der Antikörper in jeder Probe eine schwache Bande bei ca. 62 kDa ($\lambda=800$ nm). Diese Bande wurde bereits beschrieben und ist vermutlich auf eine Glykosylierung des Rezeptors zurückzuführen.

In allen zu untersuchenden Gehirnregionen war ein immunologischer Nachweis des A₁AR und des A_{2A}AR möglich. Auch die gleichzeitige Aufzeichnung der Proteinbanden für Ziel- und Referenzprotein auf einer Membran war erfolgreich. Der Antikörper gegen A₁AR detektierte eine einzelne Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa, welches dem Molekulargewicht für A₁AR entspricht (Perez-Buira et al., 2007). Ebenso detektierte der Antikörper gegen α -Tubulin nur eine charakteristische Bande bei 55 kDa. Mit dem Antikörper gegen A_{2A}AR wurde eine Hauptbande bei ca. 45 kDa und eine sehr schwache Bande bei ca. 62 kDa detektiert, die beide dem A_{2A}AR zugeschrieben werden können. Die 45 kDa-Bande entspricht dem Molekulargewicht für A_{2A}AR. In der Literatur wird eine Glykosylierung des Rezeptors als Ursache für die 62 kDa-Bande diskutiert (Brooke et al., 2004).

4.2 Chronische Koffeinapplikation

Die Koffeinapplikation erfolgte wie beschrieben *per os* über das Trinkwasser. Die durchschnittlich aufgenommene Koffeinmenge betrug $29,34 \pm 1,47$ mg/kg Körpergewicht/d (vgl. Tabelle 4.1) und entsprach damit der angestrebten Zielmenge von 30mg/kg Körpergewicht/d.

Tabelle 4.1: Gewicht, Trinkmenge und durchschnittliche Koffeinaufnahme

Parameter	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
Anfangsgewicht [g]	Kontrolle	416,77 \pm 23,53	0,798
	Koffein	415,93 \pm 18,94	
Gewicht über Applikationszeitraum [g]	Kontrolle	616,61 \pm 50,71	0,0004*
	Koffein	590,38 \pm 53,76	
Trinkmenge [mL]	Kontrolle	44,60 \pm 4,98	0,001*
	Koffein	48,96 \pm 7,00	
Koffeinmenge [mg/kg KG/ d]	Koffein	29,34 \pm 1,47	

Anmerkung: Die p-Werte wurden über einen Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben ermittelt ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet.

Bei der täglichen Wasseraufnahme konnten signifikante Unterschiede zwischen Koffein- und Kontrollgruppe festgestellt werden. So war die durchschnittliche Trinkmenge der Koffeintiere ca. 9% höher als bei den Kontrolltieren. Auch die Gewichtsveränderung der Tiere war signifikant unterschiedlich. Während das Gewicht der Kontrolltiere am Ende des Versuchszeitraumes durchschnittlich $616 \pm 50,71$ g

betrug, erreichten die Kaffeintiere ein durchschnittliches Gewicht von $590 \pm 53,76\text{g}$. Die Tiere der Kaffeegruppe waren somit um ca. 4% leichter, als die Tiere der Kontrollgruppe.

4.3 Untersuchung des A₁-Adenosinrezeptors

4.3.1 Untersuchung der A₁AR-mRNA

4.3.1.1 Untersuchung der A₁AR-mRNA in der zirkadianen Rhythmik

Um mögliche Veränderungen der A₁AR-mRNA innerhalb der zirkadianen Rhythmik im Neocortex zu untersuchen, wurde ein Tagesprofil der mRNA erstellt. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden jeweils Tiere der Kontrollgruppe getötet und die Gehirne entnommen. Nach der Gehirnentnahme wurde der Neocortex herauspräpariert. Die erste Tötung fand mit dem Lichtwechsel zu Beginn der Schlafphase der Tiere (Z₀, 07:00 Uhr) statt, die weiteren Tötungen erfolgten im Abstand von jeweils sechs Stunden. Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Untersuchung (Tabelle 4.2 und Abbildung 4.6) zeigt, dass im Neocortex keine Unterschiede in der relativen Expression der A₁AR-mRNA über einen Zeitraum von 36 h festgestellt werden konnten.

Tabelle 4.2: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A₁AR-mRNA zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

	Neocortex	
	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Werte
07:00 Uhr (Z ₀)	0,914 \pm 0,145	0,287
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	0,900 \pm 0,141	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	1,067 \pm 0,258	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	1,094 \pm 0,167	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	0,947 \pm 0,140	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	0,876 \pm 0,178	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	0,900 \pm 0,257	

Anmerkung: Der p-Wert wurde über eine einfache Varianzanalyse ermittelt ($p < 0,05$), $n=7$ Tiere pro Zeitpunkt

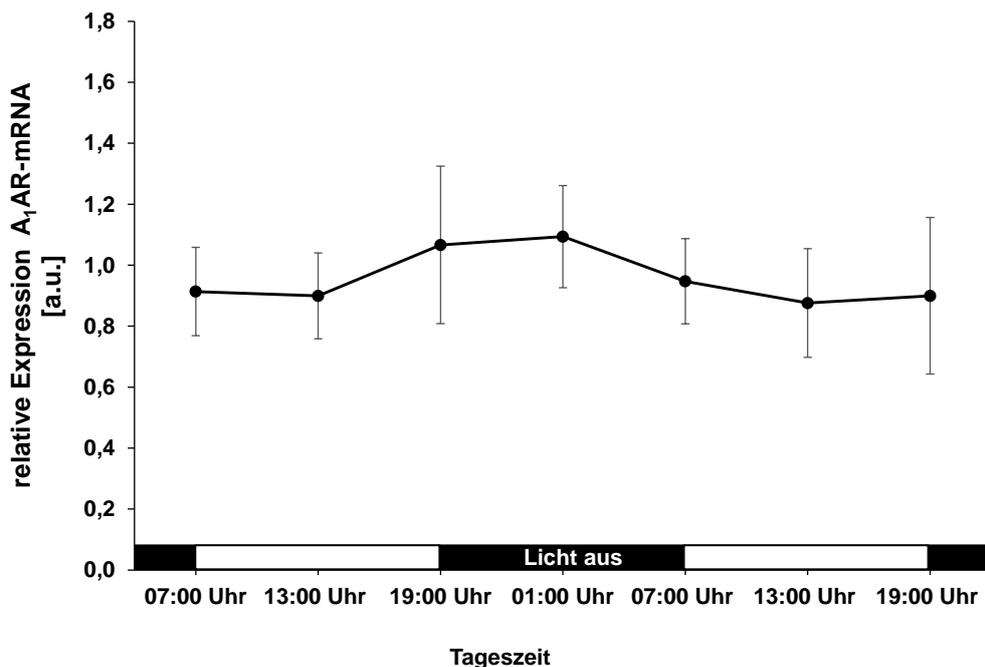


Abbildung 4.6: Zirkadianer Verlauf der relativen Expression der A₁AR-mRNA

Dargestellt wird die relative Expression der A₁AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) zu den unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere verwendet (n=7). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

4.3.1.2 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf die A₁AR-mRNA

Neben möglichen zirkadianen Effekten sollte auch der Einfluss einer 12-wöchigen chronischen Koffeinapplikation auf die Expression der A₁AR-mRNA im Neocortex untersucht werden. Wie bei der Kontrollgruppe wurde ein Tagesprofil der mRNA unter chronischer Koffeinapplikation erstellt. Die Tiere der Koffeingruppe wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden getötet und die Gehirne entnommen. Nach der Gehirnentnahme wurde der Neocortex herauspräpariert. Die erste Tötung fand mit dem Lichtwechsel zu Beginn der Schlafphase der Tiere (Z₀, 07:00 Uhr) statt, die weiteren Tötungen erfolgten im Abstand von jeweils sechs Stunden. Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Analyse wird in Tabelle 4.3 gezeigt. In Abbildung 4.7 ist das Tagesprofil der auf die Kontrollgruppe genormten, relativen A₁AR-mRNA-Level im Neocortex dargestellt. Es konnte keine signifikante Veränderung der A₁AR-mRNA nach chronischer Koffeinapplikation festgestellt werden.

Tabelle 4.3: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A₁AR-mRNA der Koffein- und der Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

		Neocortex	
		$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
07:00 Uhr (Z ₀)	Kontrolle	0,914 \pm 0,145	0,175
	Koffein	1,042 \pm 0,157	
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	Kontrolle	0,900 \pm 0,141	0,21
	Koffein	0,991 \pm 0,107	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	Kontrolle	1,067 \pm 0,258	0,316
	Koffein	1,179 \pm 0,161	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	Kontrolle	1,094 \pm 0,167	0,369
	Koffein	1,220 \pm 0,264	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	Kontrolle	0,947 \pm 0,140	0,942
	Koffein	0,974 \pm 0,225	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	Kontrolle	0,876 \pm 0,178	0,434
	Koffein	0,795 \pm 0,163	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	Kontrolle	0,900 \pm 0,257	0,635
	Koffein	0,830 \pm 0,161	

Anmerkung: Die p-Werte wurden mit einem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet (n=7 Tiere pro Zeitpunkt).

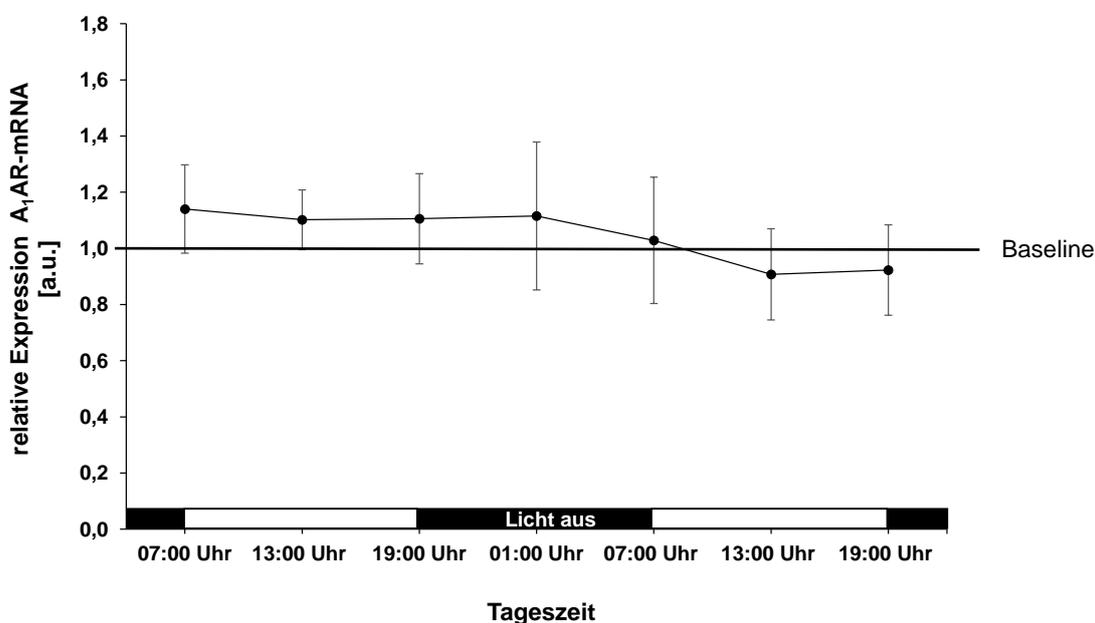


Abbildung 4.7: Tagesprofil der relativen Expression der A₁AR-mRNA unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relative Expression der A₁AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex zu unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere pro Gruppe verwendet (n=7). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

4.3.1.3 Auswirkung von Schlafentzug auf die A₁AR-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von Schlafentzug auf die A₁AR-mRNA wurde zunächst ein 12-stündiger Scheinschlafentzug (vgl. Abbildung 3.3 und Kapitel 3.3.5) während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet (n=7). Danach wurden die übrigen Tiere der Gruppe dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug, sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden (vgl. Abb. 3.3). Im Anschluss an die Tötungen wurden die Gehirne der Tiere entnommen und der Neocortex herauspräpariert. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR (Abbildung 4.8 und Tabelle 4.4).

Der 12-stündige Scheinschlafentzug führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der A₁AR-mRNA. Im weiteren Verlauf des Schlafentzuges konnte ein Absinken des mRNA-Levels festgestellt werden, welches allerdings ebenfalls nicht signifikant war. Während des Erholungsschlafes stieg die mRNA-Expression wieder an. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe festgestellt werden.

Tabelle 4.4: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A₁AR-mRNA der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe im Neocortex

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,914 \pm 0,145	11,66	0,397
			Schlafentzug	1,020 \pm 0,228		
		6 h	Kontrolle	0,900 \pm 0,141	-2,35	0,739
			Schlafentzug	0,878 \pm 0,205		
		12 h	Kontrolle	1,067 \pm 0,258	-16,97	0,21
			Schlafentzug	0,886 \pm 0,250		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,094 \pm 0,167	10,59	0,339
			Schlafentzug	1,210 \pm 0,220		

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	12 h	Kontrolle	0,947 ± 0,140	-14,62	0,09
			Schlafentzug	0,809 ± 0,133		
		18 h	Kontrolle	0,876 ± 0,178	0,89	0,979
			Schlafentzug	0,884 ± 0,223		
		24 h	Kontrolle	0,900 ± 0,257	11,19	0,278
			Schlafentzug	1,000 ± 0,122		

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe wurden mit einem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet.

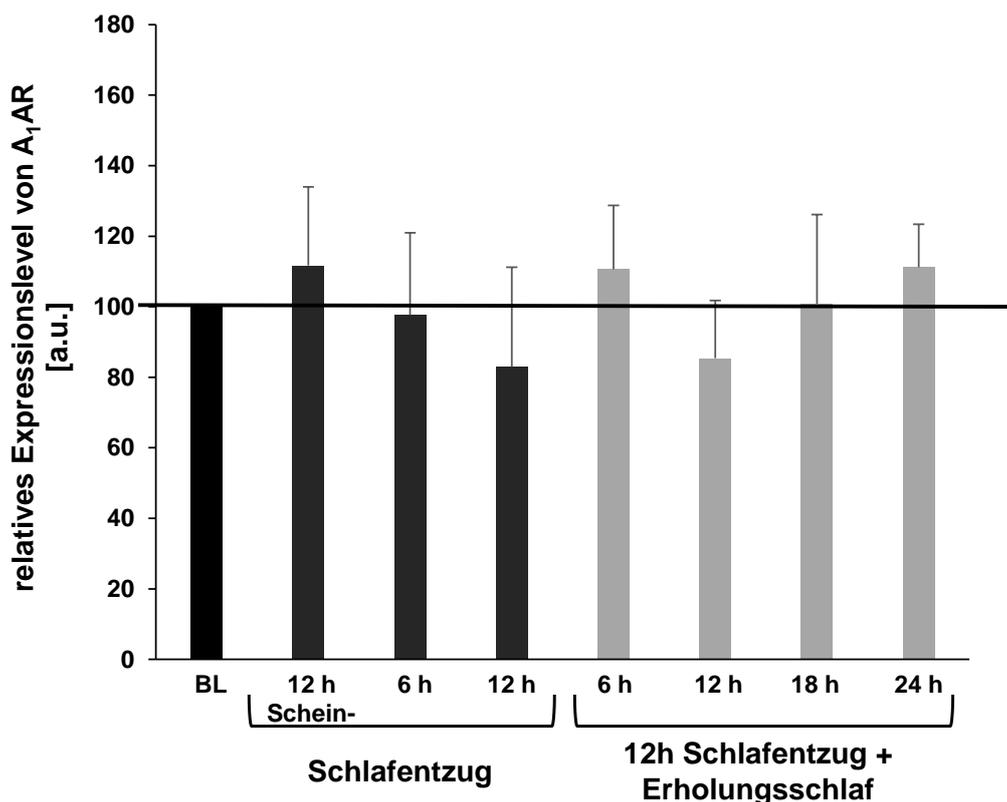


Abbildung 4.8: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die A₁AR-mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die relative Expression der A₁AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt.

4.3.1.4 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A₁AR-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A₁AR-mRNA wurde zunächst über einen Zeitraum von 12 Wochen Koffein verabreicht. Im Anschluss wurden die gleichen Schlafentzugsexperimente durchgeführt wie in Kapitel 4.3.1.3. Die Koffeinapplikation wurde während der Schlafentzugsexperimente fortgeführt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Analyse wird in Tabelle 4.5 gezeigt.

Tabelle 4.5: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A₁AR-mRNA der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe im Neocortex

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,914 \pm 0,145	-0,19	0,99
			Koffein-Schlafentzug	0,912 \pm 0,122		
		6 h	Kontrolle	0,900 \pm 0,141	11,59	0,336
			Koffein-Schlafentzug	1,004 \pm 0,189		
		12 h	Kontrolle	1,067 \pm 0,258	-0,76	0,902
			Koffein-Schlafentzug	1,059 \pm 0,137		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,094 \pm 0,167	-5,57	0,537
			Koffein-Schlafentzug	1,033 \pm 0,199		
		12 h	Kontrolle	0,947 \pm 0,140	-3,04	0,64
			Koffein-Schlafentzug	0,918 \pm 0,266		
		18 h	Kontrolle	0,876 \pm 0,178	-4,22	0,702
			Koffein-Schlafentzug	0,839 \pm 0,218		
	24 h	Kontrolle	0,900 \pm 0,257	0,62	0,851	
		Koffein-Schlafentzug	0,905 \pm 0,163			

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse der beiden Gruppen wurden mit einem t-Test für unabhängigen Stichproben berechnet.

Im Neocortex (Abbildung 4.9) konnte keine signifikante Veränderung der A₁AR-mRNA nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug festgestellt werden.

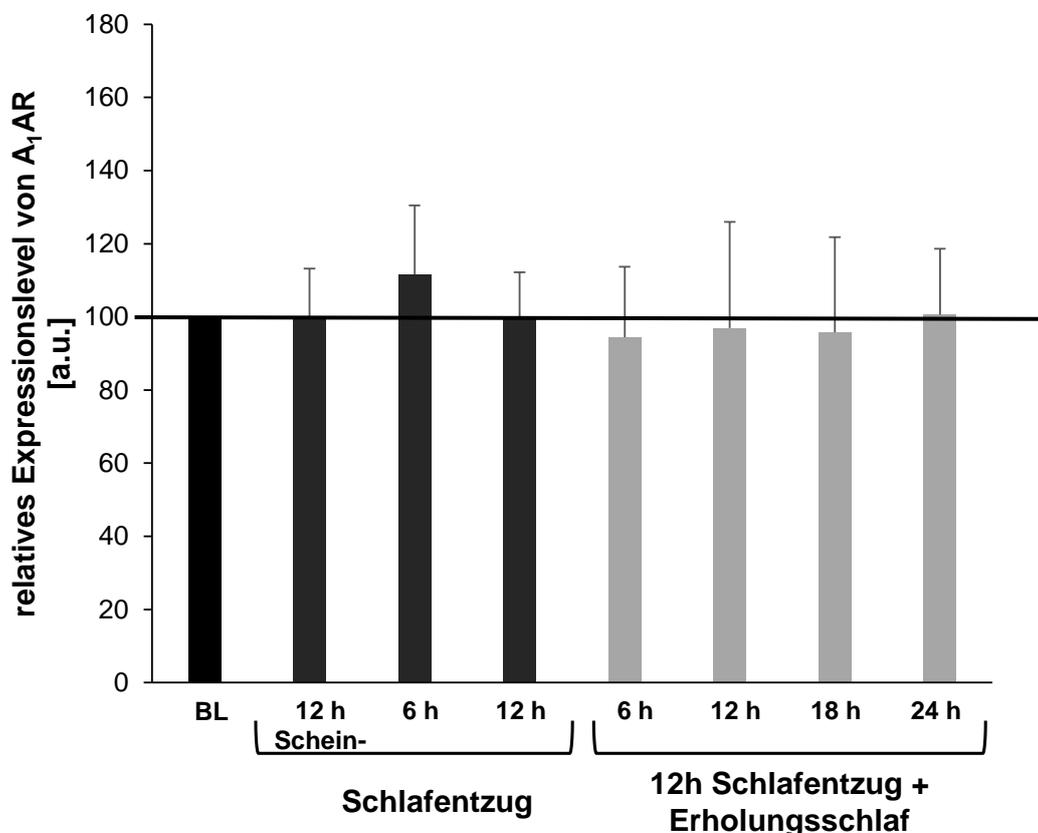


Abbildung 4.9: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A₁AR-mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die relative Expression der A₁AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100%). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt.

Ein Vergleich aller Versuchsgruppen ist in Abbildung 4.10 gezeigt. Es konnte nach keiner der Behandlungen eine signifikante Auswirkung auf die A₁AR-mRNA festgestellt werden.

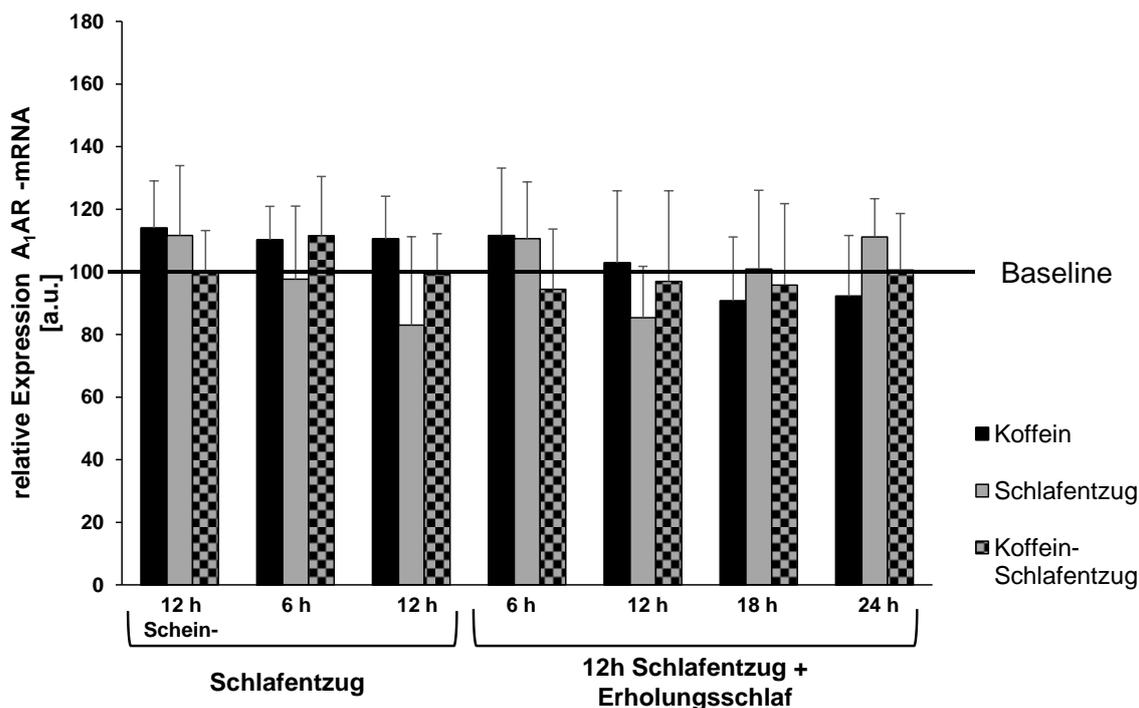


Abbildung 4.10: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf die A_1AR -mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird die relative Expression der A_1AR -mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

4.3.2 Untersuchung des A_1AR -Proteins

4.3.2.1 Untersuchung des A_1AR in der zirkadianen Rhythmik

Um den A_1AR innerhalb der zirkadianen Rhythmik zu untersuchen, wurde ein Tagesprofil des Rezeptors erstellt. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden die Tiere der Kontrollgruppe getötet und die Gehirne entnommen. Nach der Gehirnentnahme wurden Neocortex, Hippocampus und Thalamus herauspräpariert. Die erste Tötung fand mit dem Lichtwechsel zu Beginn der Schlafphase der Tiere (Z_0 , 07:00 Uhr) statt, die weiteren Tötungen erfolgten im Abstand von jeweils sechs Stunden. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Abbildung 4.11 zeigt repräsentativ eine Western Blot-Analyse der zirkadianen Expression von A_1AR .

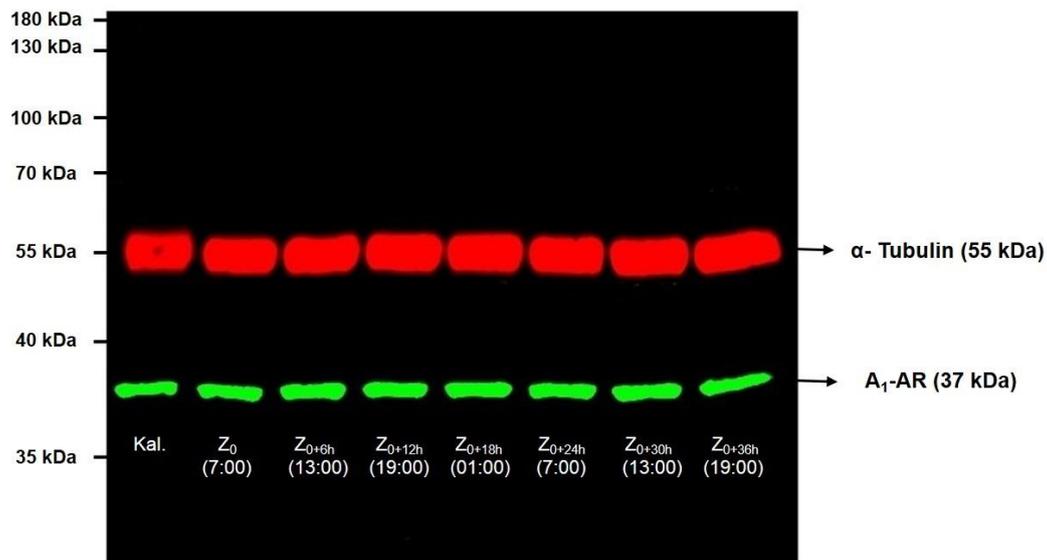


Abbildung 4.11: Western Blot der zirkadianen Expression von A₁AR

Die Tiere der Kontrollgruppe (n=49) wurden in Abständen von sechs Stunden getötet (n=7 pro Zeitpunkt). Der erste Tötungszeitpunkt war der Beginn der Schlafphase (Z₀, 07:00 Uhr). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeprobe wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt (n=1) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 µg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A₁AR und α-Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von λ=700 nm und λ=800 nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa (λ=700 nm) und eine bei ca. 37 kDa (λ=800 nm) detektiert. Die 37 kDa-Banden entsprechen dem A₁AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α-Tubulin sind.

Die Auswertung der einzelnen Western Blots (Tabelle 4.6 und Abbildung 4.12) zeigt, dass im Neocortex keine Unterschiede in den relativen Expressionsleveln des A₁AR über einen Zeitraum von 36 h festgestellt werden konnten. Im Thalamus sind die A₁AR-Level während der Dunkelphase höher als während der Hellphase, wohingegen im Hippocampus die Expression in der Mitte der Dunkelphase am niedrigsten ist.

Für eine vereinfachte Betrachtung in Bezug auf die Wach- und Schlafphase der Tiere wurden die gemittelten Expressionslevel des A₁AR in die entsprechenden Phasen zusammengefasst (Abbildung 4.13). Dabei ist die Wachphase der nachtaktiven Tiere als Zeitspanne zwischen 19 Uhr und 7 Uhr (Dunkelphase) und die Schlafphase als Zeitspanne zwischen 7 Uhr und 19 Uhr (Hellphase) definiert.

Tabelle 4.6: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A₁AR zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

	Neocortex		Thalamus		Hippocampus	
	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Werte	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Werte	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Werte
07:00 Uhr (Z ₀)	0,912 \pm 0,108	0,639	0,793 \pm 0,156	0,173	0,727 \pm 0,135	0,082
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	0,946 \pm 0,172		0,812 \pm 0,134		0,786 \pm 0,162	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	0,920 \pm 0,171		0,972 \pm 0,128		0,725 \pm 0,114	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	1,019 \pm 0,120		0,870 \pm 0,103		0,678 \pm 0,109	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	0,952 \pm 0,160		0,766 \pm 0,100		0,784 \pm 0,127	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	1,093 \pm 0,175		0,766 \pm 0,141		0,803 \pm 0,120	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	1,018 \pm 0,249		0,845 \pm 0,217		0,931 \pm 0,115	

Anmerkung: Die p-Werte wurden über einen Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ermittelt ($p < 0,05$), $n=7$ Tiere pro Zeitpunkt. Signifikante p-Werte wurden *post-hoc* einer Bonferroni-Korrektur unterzogen ($p < 0,5/3$).

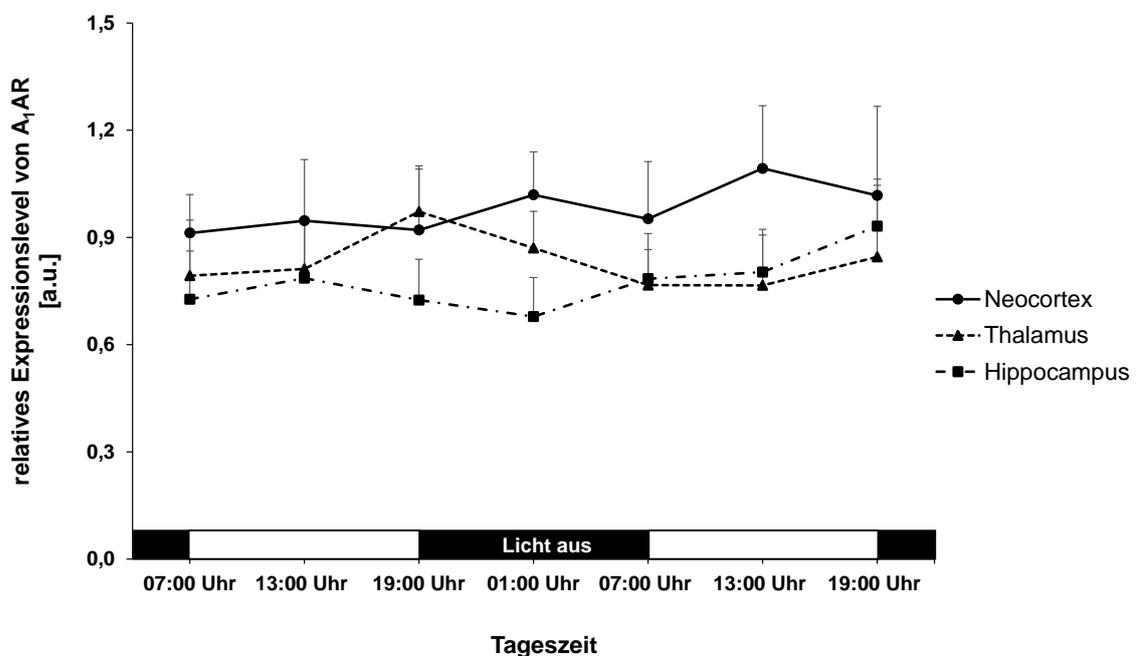


Abbildung 4.12: Zirkadianer Verlauf der relativen Expressionslevel des A₁AR

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) zu den unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere verwendet ($n=7$). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

Es wird zwischen dem Beginn der Wachphase (19 Uhr) und dem Beginn der Schlafphase (7 Uhr) unterschieden. Darüber hinaus erfolgt eine Betrachtung der Mitte der Wach- (1 Uhr) bzw. Schlafphase (13 Uhr).

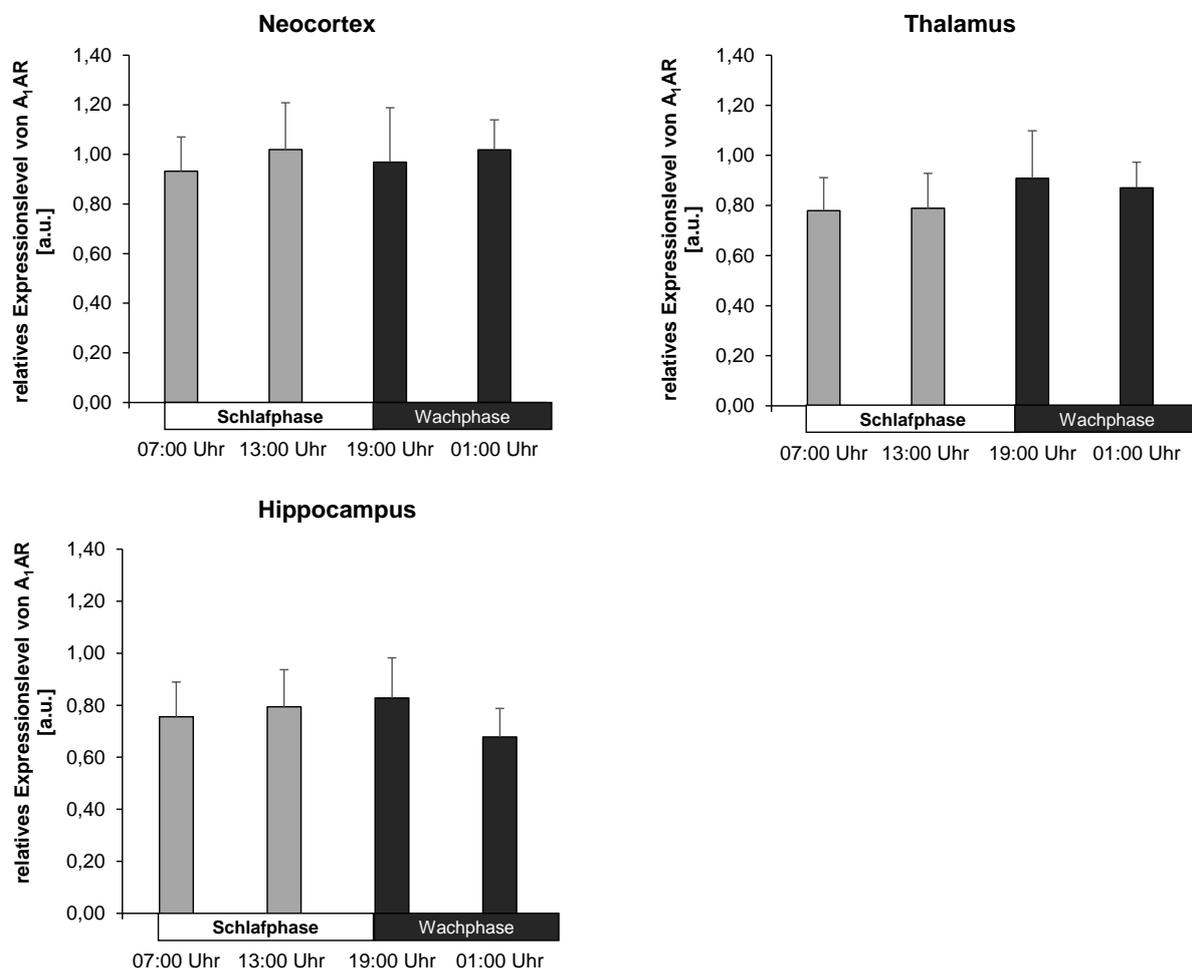


Abbildung 4.13: Zirkadiane Expression des A₁AR differenziert nach Schlaf- und Wachphase

Dargestellt wird der Einfluss der zirkadianen Rhythmik (Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase) auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Thalamus und Hippocampus. Für die Zeitpunkte 7 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr wurden pro Gruppe 14 Tiere (n=14) und für den Zeitpunkt 1 Uhr wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

Im Neocortex waren die A₁AR-Level in der Mitte der Wach- und Schlafphase höher, als zu Beginn der jeweiligen Phase, allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede. Im Thalamus konnte ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des A₁AR zum Ende der Schlafphase festgestellt werden. Im Hippocampus wurde ein leichtes Absinken des A₁AR vom Beginn bis zur Mitte der Wachphase beobachtet. Der Unterschied war ebenfalls nicht signifikant. Insgesamt konnte in keiner Region ein signifikanter zirkadianer Einfluss auf die Expression der Rezeptoren beobachtet werden.

4.3.2.2 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf den A₁AR

Neben möglichen zirkadianen Effekten sollte auch der Einfluss einer 12-wöchigen chronischen Koffeinapplikation auf die Expression des A₁AR untersucht werden. Wie bei der Kontrollgruppe wurde ein Tagesprofil des Rezeptors unter chronischer Koffeinapplikation erstellt. Die Tiere der Koffeingruppe wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden getötet und die Gehirne entnommen. Nach der Gehirnentnahme wurden Neocortex, Hippocampus und Thalamus herauspräpariert. Die erste Tötung fand mit dem Lichtwechsel zu Beginn der Schlafphase der Tiere (Z₀, 07:00 Uhr) statt, die weiteren Tötungen erfolgten im Abstand von jeweils sechs Stunden. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Abbildung 4.14 zeigt repräsentativ eine Western Blot-Analyse der Expression von A₁AR unter chronischer Koffeinapplikation.

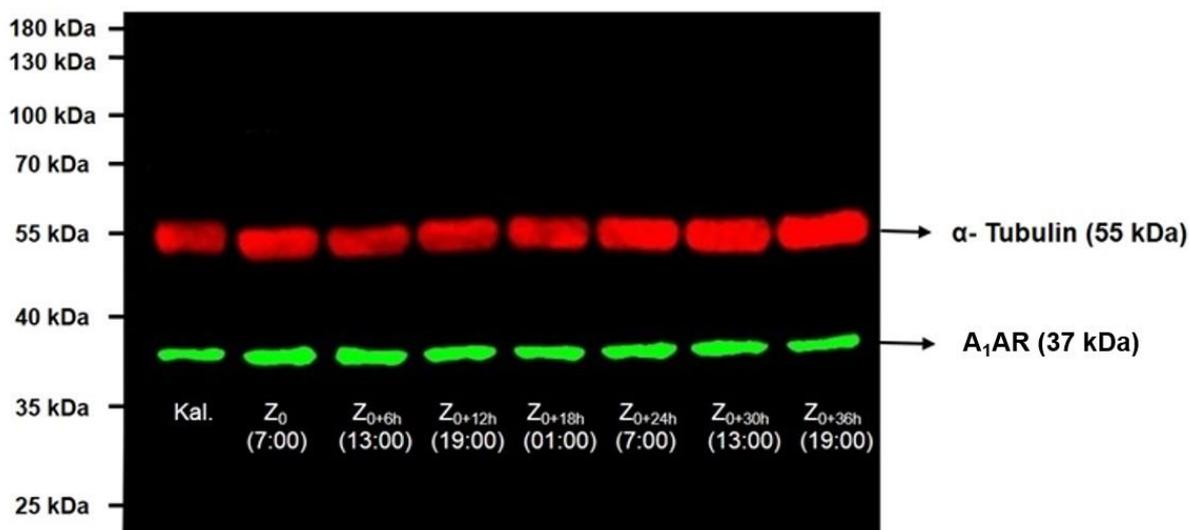


Abbildung 4.14: Western Blot der Expression von A₁AR unter chronischer Koffeinapplikation

Die Tiere der Koffeingruppe (n=49) wurden in Abständen von sechs Stunden getötet (n=7 pro Zeitpunkt). Der erste Tötungszeitpunkt war der Beginn der Schlafphase (Z₀, 07:00 Uhr). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt (n=1) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 µg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A₁AR und α-Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von λ=700 nm und λ=800 nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa (λ=700 nm) und eine bei ca. 37 kDa (λ=800 nm) detektiert. Die 37 kDa-Banden entsprechen dem A₁AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α-Tubulin sind.

Die Auswertung der einzelnen Western Blots wird in Tabelle 4.7 gezeigt.

Tabelle 4.7: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A₁AR der Koffein- und Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

		Neocortex		Thalamus		Hippocampus	
			p-Wert		p-Wert		p-Wert
07:00 Uhr (Z ₀)	Kontrolle	0,912 \pm 0,108	0,382	0,793 \pm 0,156	0,007*	0,727 \pm 0,135	0,004*
	Koffein	0,877 \pm 0,188		1,134 \pm 0,213		1,149 \pm 0,218	
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	Kontrolle	0,946 \pm 0,172	0,456	0,812 \pm 0,134	0,001*	0,786 \pm 0,162	0,001*
	Koffein	1,064 \pm 0,251		1,363 \pm 0,139		1,341 \pm 0,162	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	Kontrolle	0,920 \pm 0,171	0,53	0,972 \pm 0,128	0,097	0,725 \pm 0,114	0,001*
	Koffein	1,098 \pm 0,182		1,179 \pm 0,257		1,141 \pm 0,162	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	Kontrolle	1,019 \pm 0,120	0,902	0,870 \pm 0,103	0,035	0,678 \pm 0,109	0,001*
	Koffein	0,970 \pm 0,204		1,021 \pm 0,121		1,323 \pm 0,273	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	Kontrolle	0,952 \pm 0,160	0,71	0,766 \pm 0,100	0,001*	0,784 \pm 0,127	0,038
	Koffein	1,036 \pm 0,208		1,281 \pm 0,162		1,090 \pm 0,256	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	Kontrolle	1,093 \pm 0,175	0,71	0,766 \pm 0,141	0,007*	0,803 \pm 0,120	0,017
	Koffein	1,036 \pm 0,230		1,036 \pm 0,170		1,248 \pm 0,355	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	Kontrolle	1,018 \pm 0,249	0,383	0,845 \pm 0,217	0,209	0,931 \pm 0,115	0,128
	Koffein	0,854 \pm 0,111		0,974 \pm 0,214		1,115 \pm 0,212	

Anmerkung: p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet (n=7 Tiere pro Zeitpunkt). Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet (p < 0,05/3).

In Abbildung 4.15 ist das Tagesprofil der auf die Kontrollgruppe genormten, relativen A₁AR-Level in den verschiedenen Gehirnregionen dargestellt. Im Neocortex konnte keine signifikante Erhöhung des A₁AR festgestellt werden. Im Thalamus wurde nur während der Hellphase eine signifikante Erhöhung des A₁AR beobachtet. Im Hippocampus führte die chronische Koffeinapplikation zu einer Erhöhung des A₁AR, allerdings war diese Erhöhung nur für die ersten 24 h signifikant. Die Zeitpunkte Z_{0+24h}

und Z_{0+30h} waren ebenfalls signifikant, hielten jedoch der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht stand.

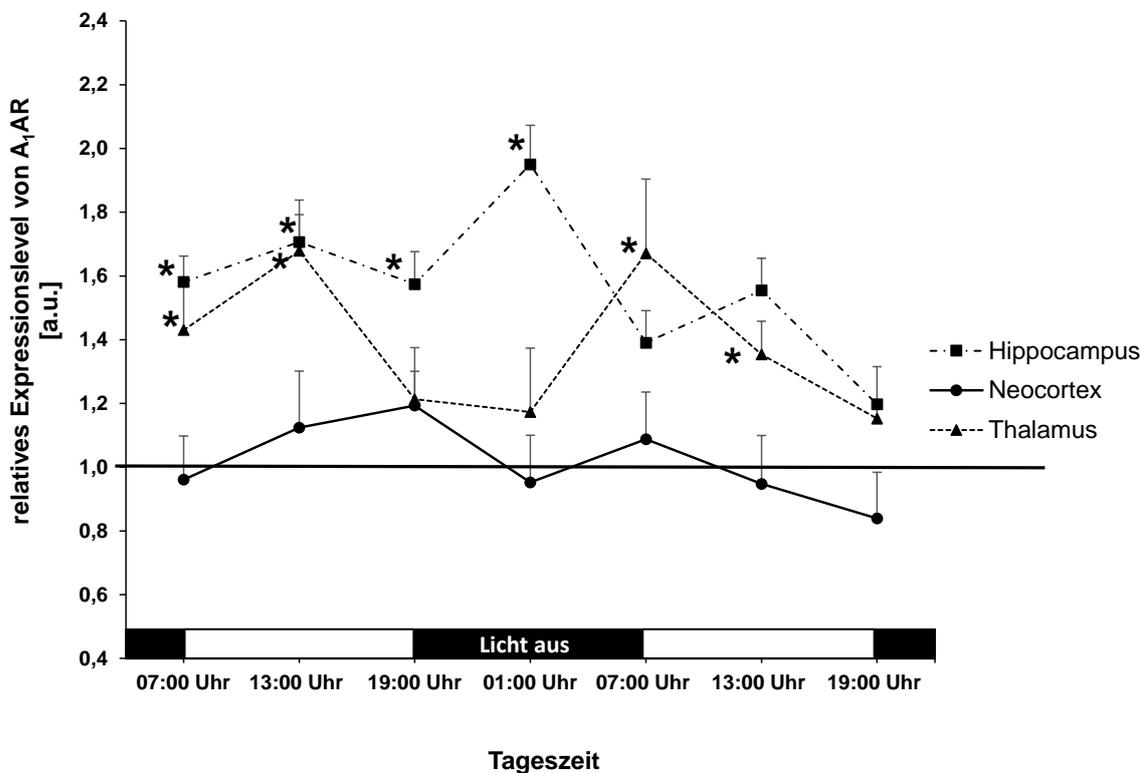


Abbildung 4.15: Tagesprofil der relativen Expressionslevel von A_1AR unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relativen Expressionslevel des A_1AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Hippocampus und Thalamus zu unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere pro Gruppe verwendet ($n=7$). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Koffein- und Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Für eine vereinfachte Betrachtung in Bezug auf die Wach- und Schlafphase der Tiere wurden die gemittelten Expressionslevel des A_1AR beider Gruppen erneut den gleichen zirkadianen Zeiten entsprechend zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Das Ergebnis ist in Tabelle 4.8 und in Abbildung 4.16 dargestellt. Intraindividuell konnten in keiner Region signifikante Unterschiede zwischen der Wach- und Schlafphase festgestellt werden. Für den Hippocampus waren die A_1AR -Level in der Koffeingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in der Wach- als auch in der Schlafphase signifikant erhöht ($> 35\%$). In der Mitte der Wachphase (1 Uhr) ist das A_1AR Level nach chronischer

Koffeinapplikation fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. Im Thalamus führte die chronische Koffeinbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des A₁AR in der Schlafphase (> 50 %). Auch in der Wachphase wurden Unterschiede detektiert (> 15 %), die sich jedoch als nicht signifikant erwiesen. Im Neocortex hatte die chronische Koffeinbehandlung keine Auswirkung auf die Expression des A₁AR.

Tabelle 4.8: Gepoolte mittlere A₁AR-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase

			Kontrolle	Koffein	Relative Differenz in %	p-Wert der inter-individuellen Analyse	p-Wert der <u>intra</u> -individuellen Analyse	
			$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$			Koffein	Kontrolle
Neocortex	Schlafphase	07:00 Uhr	0,932 ± 0,138	0,956 ± 0,214	2,58	0,982	0,639	0,864
		13:00 Uhr	1,020 ± 0,188	1,050 ± 0,241	2,94	0,804		
	Wachphase	19:00 Uhr	0,969 ± 0,219	0,976 ± 0,194	0,72	0,667		
		01:00 Uhr	1,019 ± 0,129	0,970 ± 0,204	-4,77	0,802		
Thalamus	Schlafphase	07:00 Uhr	0,780 ± 0,131	1,207 ± 0,203	54,85	0,000009*	0,142	0,142
		13:00 Uhr	0,789 ± 0,140	1,199 ± 0,225	52,08	0,000009*		
	Wachphase	19:00 Uhr	0,909 ± 0,189	1,077 ± 0,258	18,48	0,069		
		01:00 Uhr	0,870 ± 0,103	1,021 ± 0,121	17,29	0,038		
Hippocampus	Schlafphase	07:00 Uhr	0,756 ± 0,134	1,120 ± 0,239	48,22	0,0001*	0,037	0,204
		13:00 Uhr	0,794 ± 0,143	1,294 ± 0,280	62,98	0,000014*		
	Wachphase	19:00 Uhr	0,828 ± 0,154	1,128 ± 0,281	36,24	0,002*		
		01:00 Uhr	0,678 ± 0,109	1,323 ± 0,273	95	0,001*		

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Koffein- und Kontrollgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die p-Werte für den intraindividuellen Vergleich wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet (p intra- und interindividuell < 0,05/3).

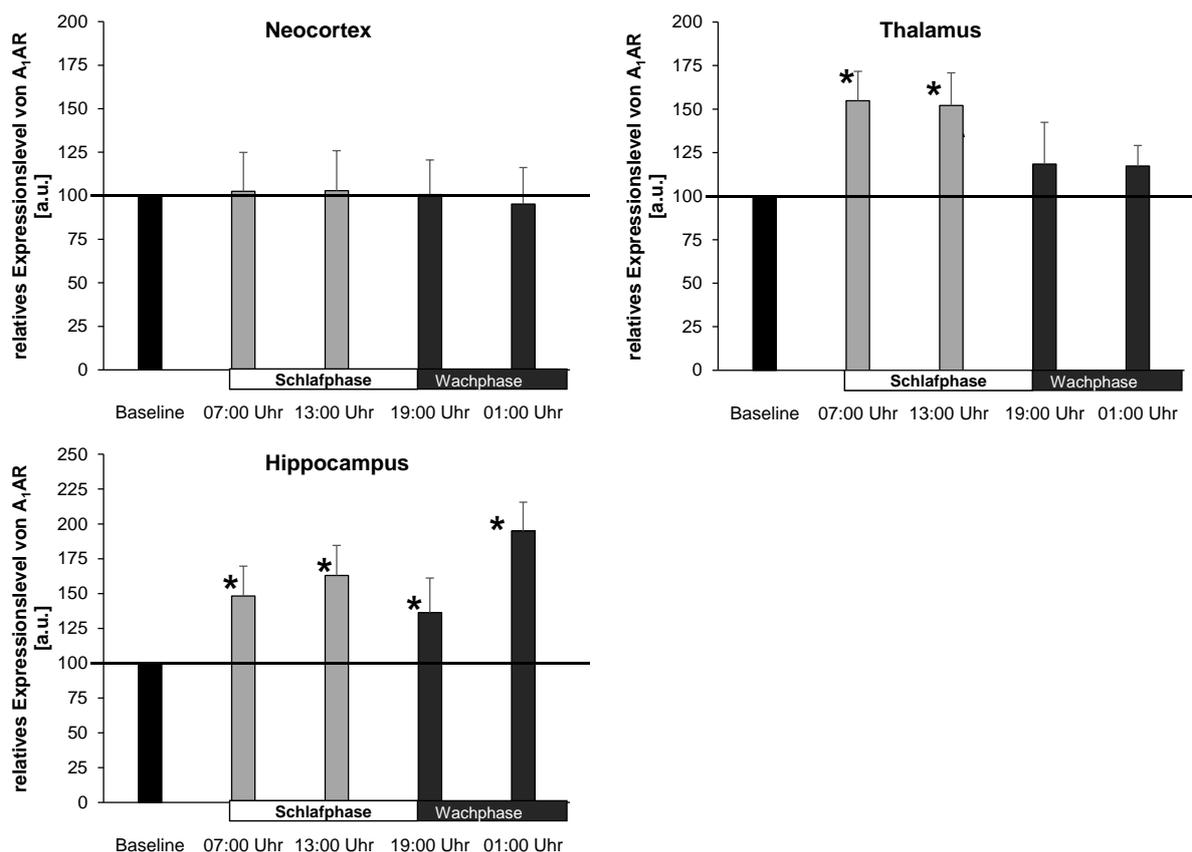


Abbildung 4.16: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die Proteinexpression des A₁AR in Neocortex, Hippocampus und Thalamus der Ratte differenziert nach Wach- und Schlafphase

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Thalamus und Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für die Zeitpunkte 7 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr wurden pro Gruppe 14 Tiere (n=14) und für den Zeitpunkt 1 Uhr wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Koffeingruppe sind mit * gekennzeichnet (p < 0,001; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

4.3.2.3 Auswirkung von Schlafentzug auf den A₁AR

Zur Untersuchung des Einflusses von Schlafentzug auf den A₁AR wurde zunächst ein 12-stündiger Scheinschlafentzug (vgl. Abbildung 3.3 und Kapitel 3.3.5) während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet (n=7). Danach wurden die übrigen Tiere der Gruppe dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug, sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden (vgl. Abb. 3.3). Die Analyse der

Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot, eine repräsentative Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.17 gezeigt.

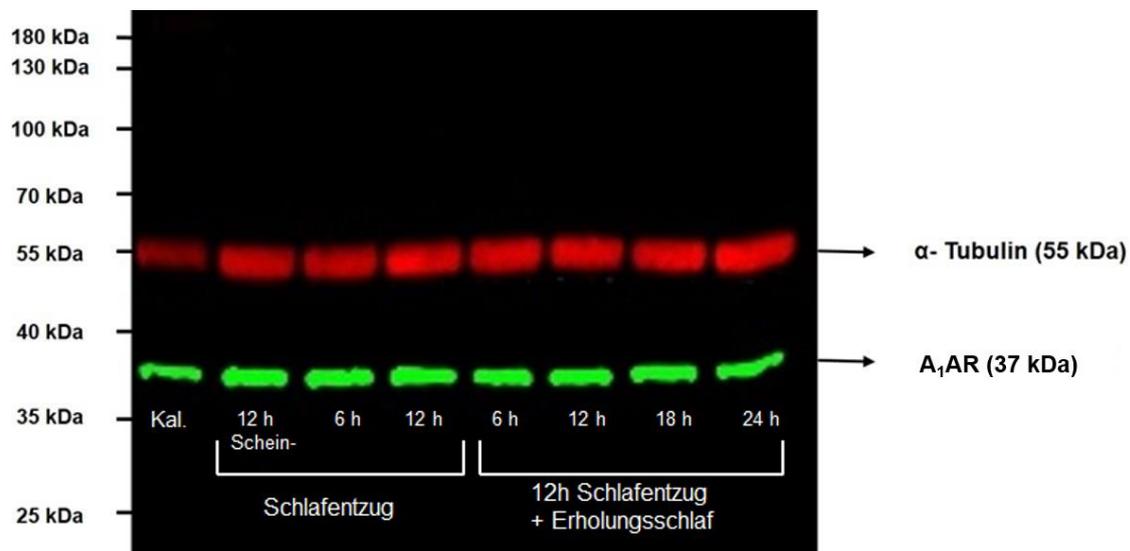


Abbildung 4.17: Western Blot der Expression von A₁AR nach Schlafentzug und Schlafentzug mit anschließender Erholungsschlafphase

Zunächst wurde ein 12-stündiger Scheinschlafentzug während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet ($n=7$). Die übrigen Tiere der Gruppe wurden dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden ($n=7$ pro Zeitpunkt). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt ($n=1$) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 μg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A₁AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm) und eine bei ca. 37 kDa ($\lambda=800$ nm) detektiert. Die 37 kDa-Banden entsprechen dem A₁AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α -Tubulin sind.

Schon der 12-stündige Scheinschlafentzug führte in allen untersuchten Gehirnregionen zu einer Erhöhung des A₁AR-Levels (Tabelle 4.9, Abbildung 4.18, 4.19 und 4.20), allerdings war der beobachtete Unterschied im Neocortex nicht signifikant.

Tabelle 4.9: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A₁AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,912 \pm 0,108	31,86	0,053
			Schlafentzug	1,203 \pm 0,257		
		6 h	Kontrolle	0,946 \pm 0,172	46,59	0,002*
			Schlafentzug	1,387 \pm 0,181		
		12 h	Kontrolle	0,920 \pm 0,171	62,51	0,001*
			Schlafentzug	1,496 \pm 0,265		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,019 \pm 0,120	48,87	0,001*
			Schlafentzug	1,517 \pm 0,231		
		12 h	Kontrolle	0,952 \pm 0,160	54,27	0,017
			Schlafentzug	1,469 \pm 0,353		
		18 h	Kontrolle	1,093 \pm 0,175	36,08	0,011*
			Schlafentzug	1,487 \pm 0,237		
24 h	Kontrolle	1,018 \pm 0,249	41,08	0,007*		
	Schlafentzug	1,443 \pm 0,169				
Thalamus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,793 \pm 0,156	92,94	0,001*
			Schlafentzug	1,530 \pm 0,324		
		6 h	Kontrolle	0,812 \pm 0,134	66,15	0,001*
			Schlafentzug	1,349 \pm 0,261		
	12 h	Kontrolle	0,972 \pm 0,128	30,16	0,007*	
		Schlafentzug	1,265 \pm 0,190			
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,870 \pm 0,103	55,35	0,001*
			Schlafentzug	1,352 \pm 0,285		

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Thalamus	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	12 h	Kontrolle	0,766 ± 0,100	115,27	0,001*
			Schlafentzug	1,650 ± 0,412		
		18 h	Kontrolle	0,766 ± 0,141	104,88	0,001*
			Schlafentzug	1,569 ± 0,314		
		24 h	Kontrolle	0,845 ± 0,217	51,85	0,017
			Schlafentzug	1,284 ± 0,318		
Hippocampus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,727 ± 0,135	114,33	0,001*
			Schlafentzug	1,558 ± 0,332		
		6 h	Kontrolle	0,786 ± 0,162	124,65	0,001*
			Schlafentzug	1,765 ± 0,269		
		12 h	Kontrolle	0,725 ± 0,114	106,11	0,001*
			Schlafentzug	1,493 ± 0,306		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,678 ± 0,109	90,46	0,001*
			Schlafentzug	1,292 ± 0,285		
		12 h	Kontrolle	0,784 ± 0,127	108,04	0,001*
			Schlafentzug	1,632 ± 0,296		
		18 h	Kontrolle	0,803 ± 0,120	103,21	0,001*
			Schlafentzug	1,631 ± 0,286		
24 h	Kontrolle	0,931 ± 0,115	40,99	0,073		
	Schlafentzug	1,313 ± 0,384				

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet, signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$).

Im Neocortex (Abbildung 4.18) führte der 6-stündige Schlafentzug zu einer signifikanten Erhöhung des A₁AR-Levels von ca. 46 %. Nach 12 Stunden Schlafentzug konnte eine signifikante Erhöhung des Rezeptorlevels von über 60 % beobachtet werden. Die Erhöhung blieb über den gesamten Zeitraum des Erholungsschlafes bestehen. Der signifikante Unterschied nach 12 Stunden Erholungsschlaf hielt allerdings der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht stand.

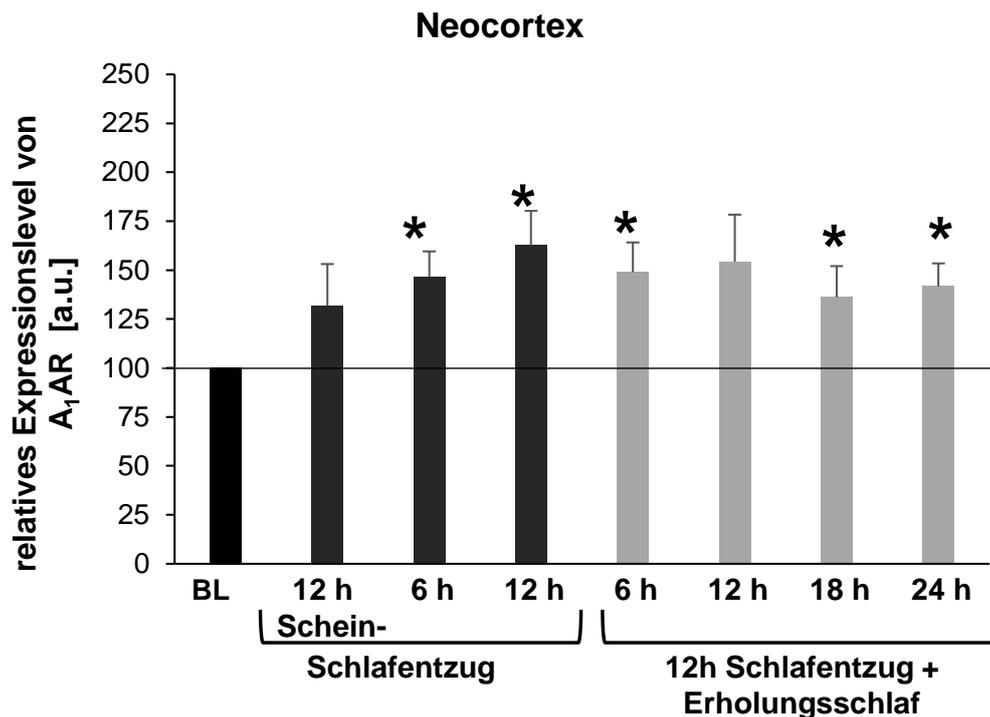


Abbildung 4.18: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A₁AR im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100%). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Im Thalamus (Abbildung 4.19) war das A₁AR-Level nach 12-stündigem Scheinschlafentzug fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. Während des eigentlichen Schlafentzuges sank das Rezeptorlevel allerdings wieder ab. Nach 12-stündigem Schlafentzug konnte nur noch ein signifikanter Unterschied von ca. 30 % zwischen Schlafentzugs- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Interessanterweise

fürte der anschließende Erholungsschlaf erneut zu einem signifikanten Anstieg des A₁AR-Levels. Ein Maximum wurde nach 12 Stunden Erholungsschlaf erreicht (+ 115 %). Der weitere Erholungsschlaf führte zu einem Absinken des A₁AR-Levels, nach 24 Stunden Erholungsschlaf konnte noch ein signifikanter Unterschied von ca. 50 % festgestellt werden, der allerdings der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht standhielt.

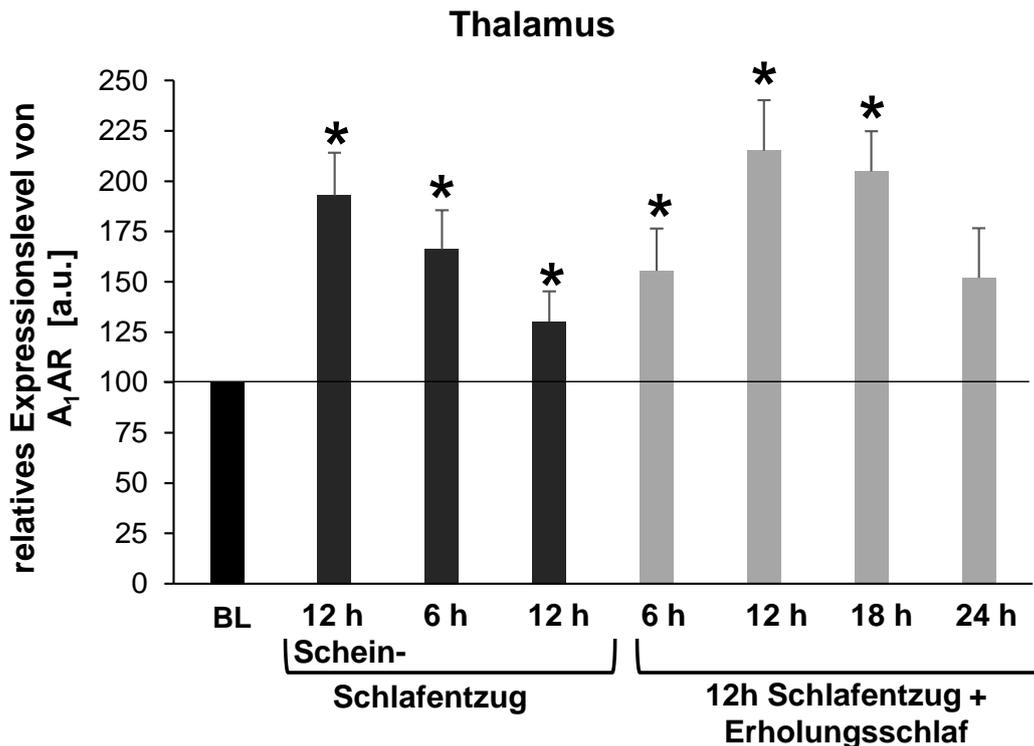


Abbildung 4.19: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A₁AR im Thalamus

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Thalamus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100%). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Im Hippocampus (Abbildung 4.20) führten sowohl der 6-stündige, als auch der 12-stündige Schlafentzug zu einer signifikanten Erhöhung des A₁AR-Levels um über 100 %. Die Erhöhung blieb während der ersten 18 Stunden des Erholungsschlafes bestehen und nahm danach wieder ab. Nach 24 Stunden Erholungsschlaf konnte noch eine nicht-signifikante Erhöhung des Rezeptorlevels von ca. 40 % festgestellt werden.

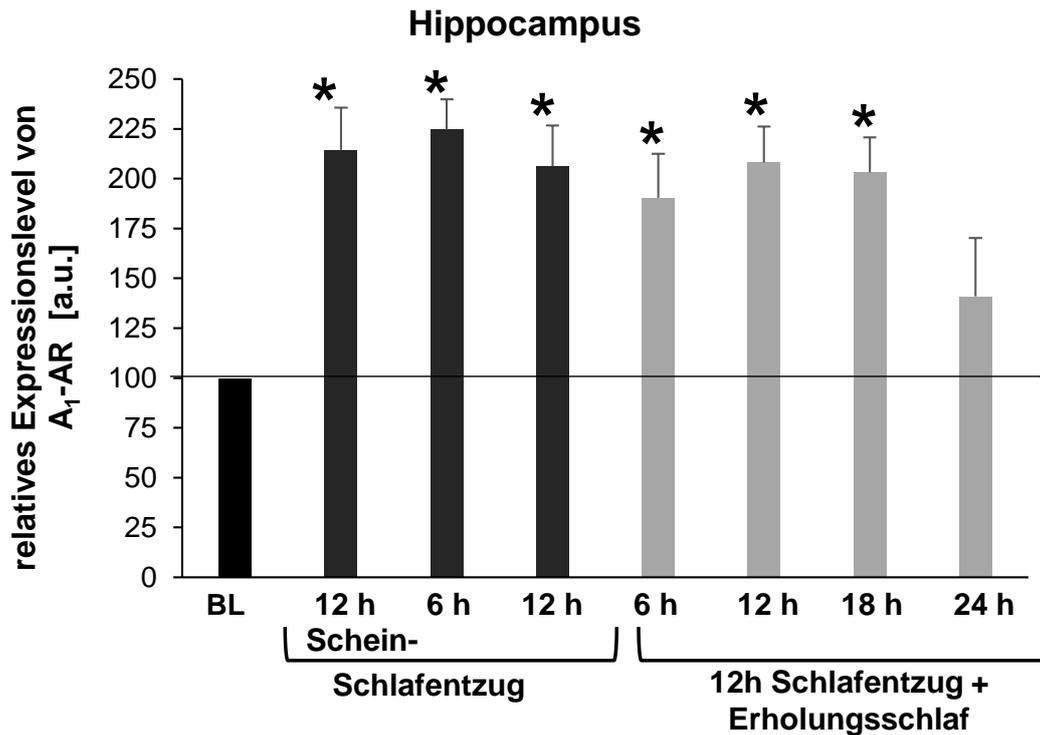


Abbildung 4.20: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die Proteinexpression des A₁AR im Hippocampus

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100%). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

4.3.2.4 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A₁AR

Zur Untersuchung des Einflusses von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A₁AR wurde zunächst über einen Zeitraum von 12 Wochen Koffein verabreicht. Im Anschluss wurden die gleichen Schlafentzugsexperimente durchgeführt wie in Kapitel 4.3.2.3. Die Koffeinapplikation wurde während der Schlafentzugsexperimente fortgeführt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot, eine repräsentative Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.21 gezeigt.

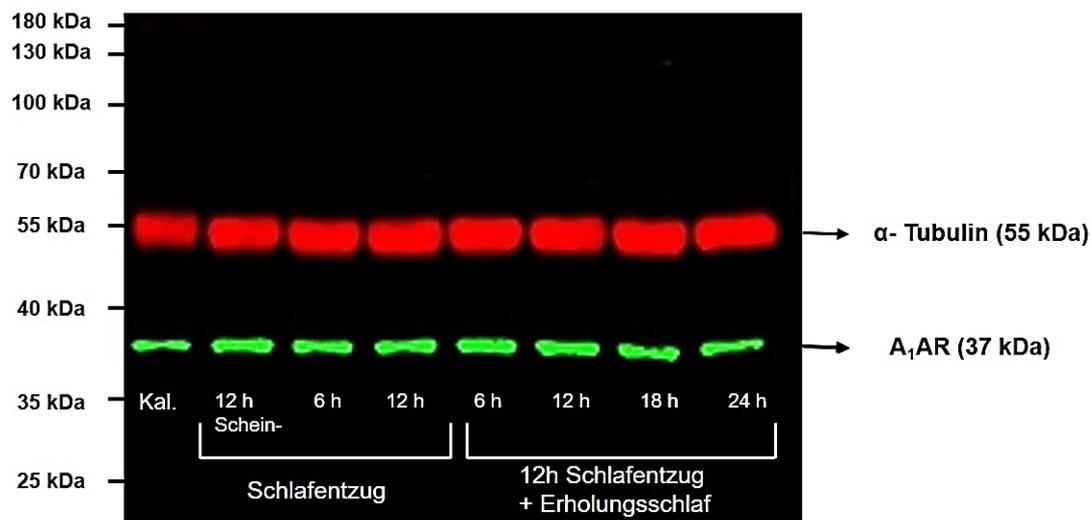


Abbildung 4.21: Western Blot der Expression von A₁AR nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug

Nach 12-wöchiger Koffeinapplikation wurde zunächst ein 12-stündiger Scheinschlafentzug während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet (n=7). Die übrigen Tiere der Gruppe wurden dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden (n=7 pro Zeitpunkt). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurden jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt (n=1) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 µg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A₁AR und α-Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von λ=700 nm und λ=800 nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa (λ=700 nm) und eine bei ca. 37 kDa (λ=800 nm) detektiert werden. Die 37 kDa-Banden entsprechen dem A₁AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α-Tubulin sind.

Während Schlafentzug bzw. eine chronische Koffeinapplikation tendenziell zu einer Erhöhung des A₁AR-Levels führten (vgl. Kapitel 4.3.2.2 und Kapitel 4.3.2.3), trat dieser Effekt bei der gleichzeitigen Anwendung beider Behandlungen nur noch begrenzt auf. Eine signifikante Erhöhung des A₁AR konnte nur im Thalamus nach chronischer Koffeinbehandlung und Schlafentzug mit anschließendem 12-stündigem Erholungsschlaf festgestellt werden (Abbildung 4.22, Tabelle 4.10). Die signifikante Erhöhung nach chronischer Koffeinbehandlung und 12-stündigem Scheinschlafentzug im Neocortex und Thalamus hielten der Bonferroni-Korrektur nicht stand.

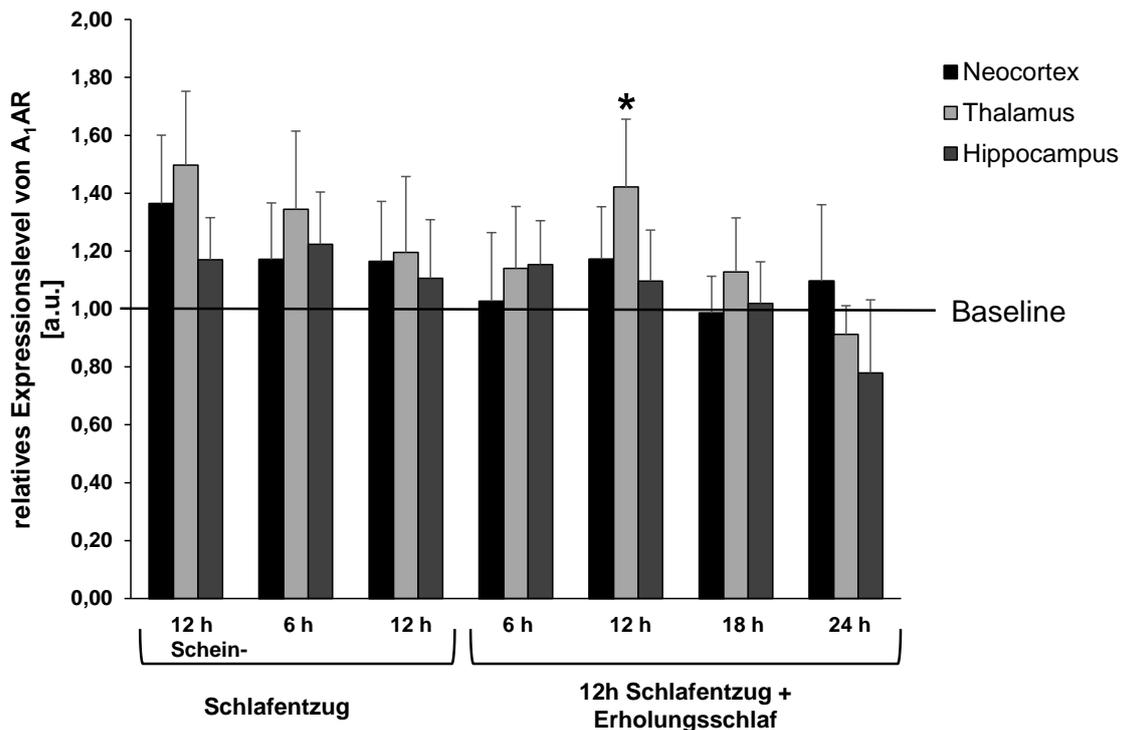


Abbildung 4.22: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die Proteinexpression des A₁AR in Neocortex, Thalamus und Hippocampus

Dargestellt wird der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Thalamus und Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Koffein-Schlafentzugs- und Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Tabelle 4.10: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A₁AR der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,912 \pm 0,108	36,35	0,019
			Koffein-Schlafentzug	1,244 \pm 0,237		
		6 h	Kontrolle	0,946 \pm 0,172	17,12	0,259
			Koffein-Schlafentzug	1,108 \pm 0,195		
		12 h	Kontrolle	0,920 \pm 0,171	16,37	0,209
			Koffein-Schlafentzug	1,071 \pm 0,208		

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,019± 0,120	2,61	1		
			Koffein-Schlafentzug	1,046± 0,238				
		12 h	Kontrolle	0,952 ± 0,160	17,20	0,209		
			Koffein-Schlafentzug	1,116 ± 0,181				
		18 h	Kontrolle	1,093 ± 0,175	-2,39	0,805		
			Koffein-Schlafentzug	1,078 ± 0,127				
		24 h	Kontrolle	1,018 ± 0,249	9,63	0,62		
			Koffein-Schlafentzug	1,116 ± 0,264				
		Thalamus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,793 ± 0,156	49,72	0,017
					Koffein-Schlafentzug	1,187 ± 0,255		
				6 h	Kontrolle	0,812 ± 0,134	34,43	0,053
					Koffein-Schlafentzug	1,091 ± 0,270		
12 h	Kontrolle			0,972 ± 0,128	19,51	0,209		
	Koffein-Schlafentzug			1,162 ± 0,262				
12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h		Kontrolle	0,870± 0,103	14,04	0,301		
			Koffein-Schlafentzug	0,992 ± 0,214				
	12 h		Kontrolle	0,766 ± 0,100	42,16	0,007*		
			Koffein-Schlafentzug	1,090 ± 0,234				
	18 h		Kontrolle	0,766 ± 0,141	12,84	0,318		
			Koffein-Schlafentzug	0,864 ± 0,187				
24 h	Kontrolle	0,845 ± 0,217	-8,73	1				
	Koffein-Schlafentzug	0,772 ± 0,099						

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Hippo-campus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,727 ± 0,135	16,98	0,165
			Koffein-Schlafentzug	0,850 ± 0,146		
		6 h	Kontrolle	0,786 ± 0,162	22,37	0,165
			Koffein-Schlafentzug	0,961 ± 0,181		
		12 h	Kontrolle	0,725 ± 0,114	10,62	0,535
			Koffein-Schlafentzug	0,802 ± 0,202		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,678 ± 0,109	15,34	0,259
			Koffein-Schlafentzug	0,783 ± 0,152		
		12 h	Kontrolle	0,784 ± 0,127	9,61	0,318
			Koffein-Schlafentzug	0,860 ± 0,177		
		18 h	Kontrolle	0,803 ± 0,120	1,94	0,535
			Koffein-Schlafentzug	0,818 ± 0,143		
	24 h	Kontrolle	0,931 ± 0,115	-22,09	0,165	
		Koffein-Schlafentzug	0,725 ± 0,253			

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen den beiden Gruppen wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängigen Stichproben berechnet, signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$).

Im Neocortex (Abbildung 4.23) führte der Schlafentzug mit anschließendem Erholungsschlaf zu einer signifikanten Erhöhung des A₁AR-Levels. Dieser Effekt wurde durch die chronische Koffeinbehandlung verhindert. Eine Ausnahme bildete der 12-stündige Scheinschlafentzug. Dieser führte in beiden Fällen zu einer nichtsignifikanten Erhöhung des A₁AR. Die chronische Koffeinbehandlung hingegen hatte keine Änderung der Expression des A₁AR zur Folge.

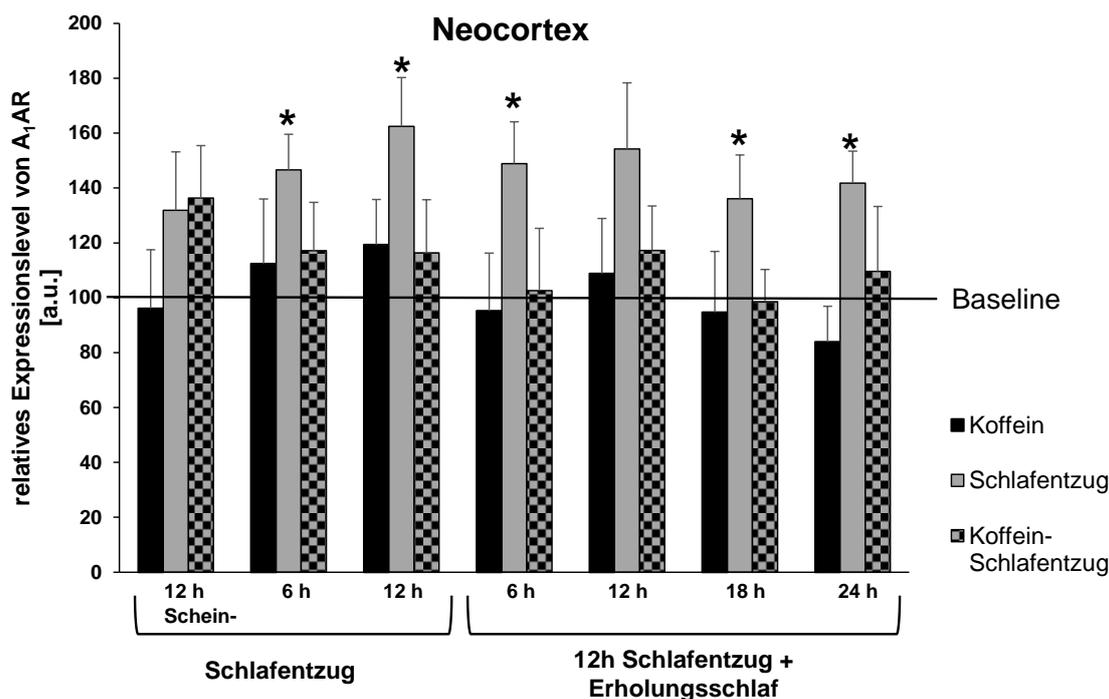


Abbildung 4.23: Der Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A₁AR im Neocortex

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Neocortex nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (n= 7 Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (p < 0,05/3, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Im Thalamus (Abbildung 4.24) führte der Schlafentzug mit anschließendem Erholungsschlaf ebenfalls zu einer (signifikanten) Erhöhung des A₁AR-Levels. Die chronische Koffeinbehandlung hatte nur während der Schlafphase der Tiere (Hellphase) signifikante Veränderungen zur Folge. Diese Effekte werden durch die gleichzeitige Anwendung beider Behandlungen deutlich abgemildert. Zwar wurde nach chronischer Koffeinbehandlung mit Schlafentzug und 12-stündigem Erholungsschlaf

ebenfalls eine signifikante Erhöhung des A₁AR festgestellt. Diese fiel jedoch im Vergleich zu den jeweiligen Einzelanwendungen deutlich niedriger aus.

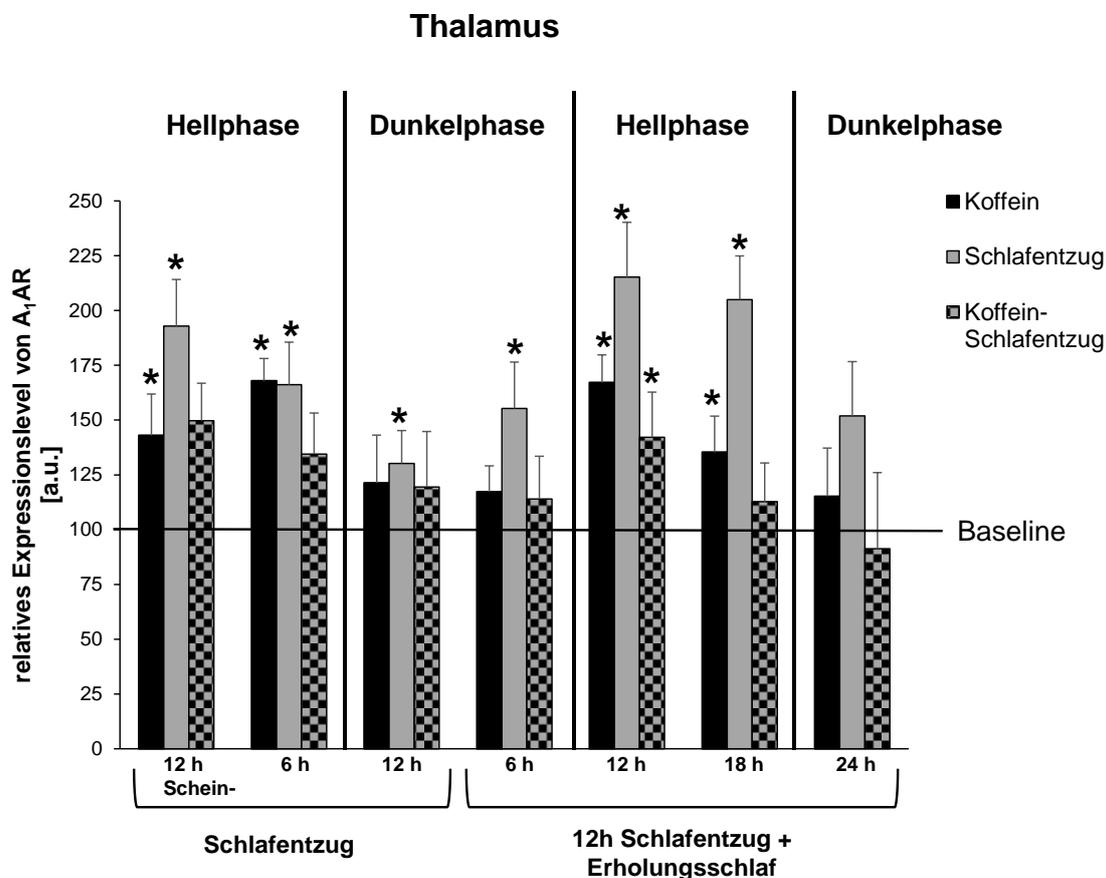


Abbildung 4.24: Der Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A₁AR im Thalamus

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Thalamus nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (n= 7 Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (p< 0,05/3, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Im Hippocampus (Abbildung 4.25) konnte sowohl nach Schlafentzug als auch nach einer chronischen Koffeinbehandlung eine Erhöhung des A₁AR festgestellt werden, wohingegen die Kombination von chronischer Koffeinbehandlung mit Schlafentzug zu einer Aufhebung der alleinigen Effekte führte.

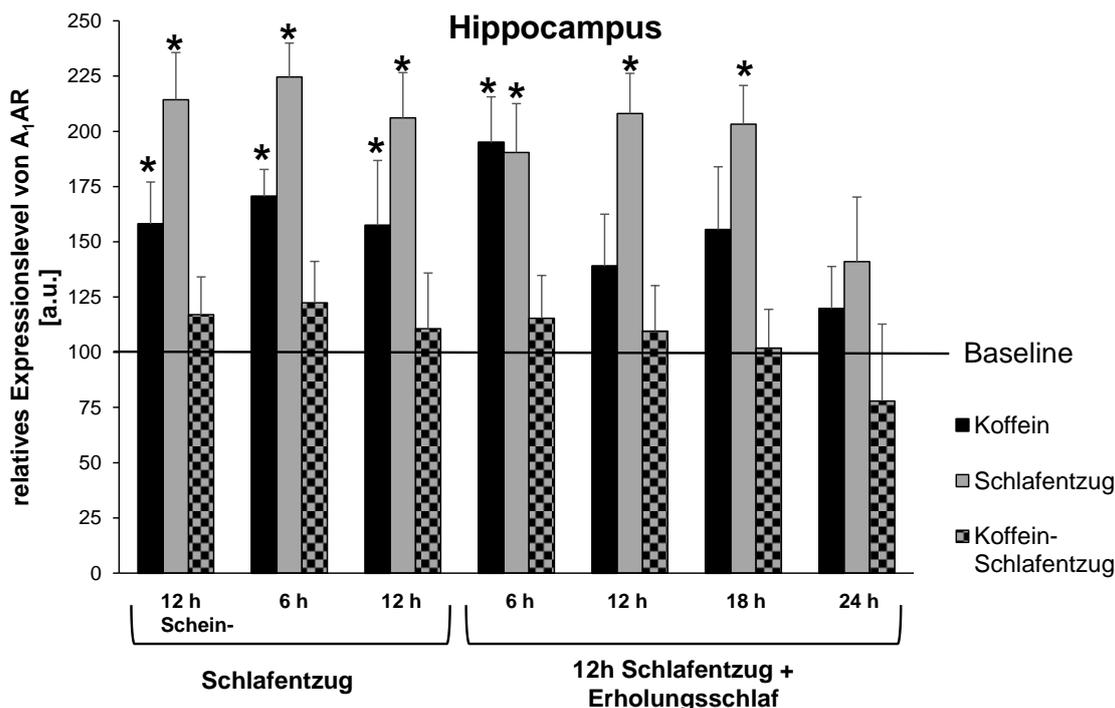


Abbildung 4.25: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A₁AR im Hippocampus

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A₁AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Hippocampus nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (n= 7 Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (p< 0,05/3, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

4.4 Untersuchung des A_{2A}-Adenosinrezeptors

4.4.1 Untersuchung der A_{2A}AR-mRNA

4.4.1.1 Untersuchung der A_{2A}AR-mRNA in der zirkadianen Rhythmik

Um mögliche Veränderungen der A_{2A}AR-mRNA innerhalb der zirkadianen Rhythmik im Necortex zu untersuchen, wurde ein Tagesprofil der mRNA erstellt. Der Versuchsablauf erfolgte analog zur Untersuchung der A₁AR-mRNA (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Untersuchung (Tabelle 4.11 und Abbildung 4.26) zeigt, dass die relative Expression der A_{2A}AR-mRNA im Necortex in der Mitte der Schlafphase (13:00 Uhr, Hellphase) niedriger war als zu den anderen Zeitpunkten. Das höchste mRNA-Level wurde in der Mitte der Wachphase (01:00 Uhr, Dunkelphase) detektiert. Insgesamt konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der A_{2A}AR-mRNA über einen Zeitraum von 36 h festgestellt werden.

Tabelle 4.11: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A_{2A} AR-mRNA zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

	Neocortex	
	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Werte
07:00 Uhr (Z_0)	1,129 \pm 0,268	0,076
13:00 Uhr (Z_{0+6h})	0,926 \pm 0,138	
19:00 Uhr (Z_{0+12h})	1,295 \pm 0,401	
01:00 Uhr (Z_{0+18h})	1,550 \pm 0,409	
07:00 Uhr (Z_{0+24h})	1,147 \pm 0,374	
13:00 Uhr (Z_{0+30h})	0,950 \pm 0,263	
19:00 Uhr (Z_{0+36h})	1,241 \pm 0,280	

Anmerkung: Der p-Wert wurde über einen Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ermittelt ($p < 0,05$), $n=6-7$ Tiere pro Zeitpunkt.

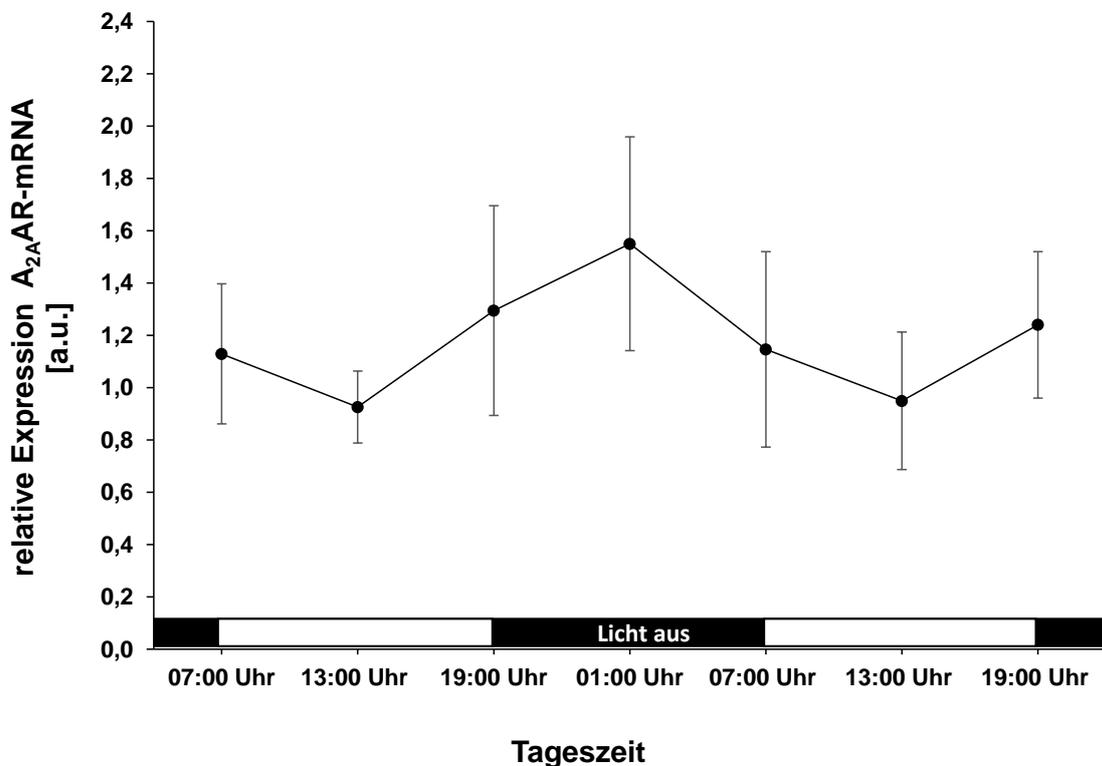


Abbildung 4.26: Zirkadianer Verlauf der relativen Expression der A_{2A} AR-mRNA

Dargestellt wird die relative Expression der A_{2A} AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) zu den unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurden 6-7 Tiere verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

Für eine vereinfachte Betrachtung in Bezug auf die Wach- und Schlafphase der Tiere wurden die gemittelten Expressionslevel der A_{2A} AR-mRNA den gleichen zirkadianen Zeiten entsprechend zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Die A_{2A} AR-mRNA zeigte innerhalb einer 24-stündigen Periode einen Anstieg während der Wachphase und ein Absinken während der Schlafphase. Zwischen dem mRNA-Level in der Mitte der aktiven Phase und dem mRNA-Level in der Mitte der Schlafphase konnte ein signifikanter Unterschied von ca. 65 % festgestellt werden.

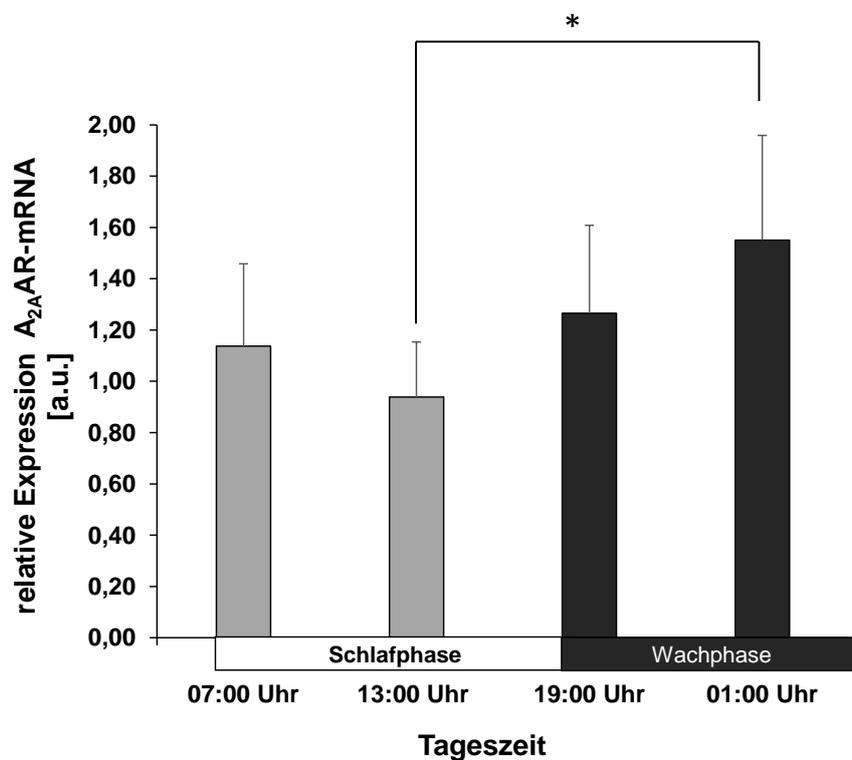


Abbildung 4.27: Zirkadiane Expression der A_{2A} AR-mRNA differenziert nach Schlaf- und Wachphase

Dargestellt wird der Einfluss der zirkadianen Rhythmik (Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase) auf die relative Expression der A_{2A} AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex. Für die Zeitpunkte 7 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr wurden pro Gruppe 13 Tiere ($n=13$) und für den Zeitpunkt 1 Uhr wurden pro Gruppe 6 Tiere ($n=6$) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten sind mit Verbindungslinien und * gekennzeichnet. ($p < 0,05$, Einfache Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

4.4.1.2 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf die A_{2A}AR-mRNA

Neben möglichen zirkadianen Effekten sollte auch der Einfluss einer 12-wöchigen chronischen Koffeinapplikation auf die Expression der A_{2A}AR-mRNA im Neocortex untersucht werden. Wie bei der Kontrollgruppe wurde ein Tagesprofil der mRNA unter chronischer Koffeinapplikation erstellt. Der Versuchsablauf erfolgte analog zur Untersuchung der A₁AR-mRNA (vgl. Kapitel 4.3.1.2). Die Untersuchung der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Analyse wird in Tabelle 4.12 gezeigt.

Tabelle 4.12: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A_{2A}AR-mRNA der Koffein- und der Kontrollgruppe zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

		Neocortex	
		$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
07:00 Uhr (Z ₀)	Kontrolle	1,129 \pm 0,268	0,945
	Koffein	1,124 \pm 0,392	
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	Kontrolle	0,926 \pm 0,138	0,002*
	Koffein	1,400 \pm 0,267	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	Kontrolle	1,295 \pm 0,401	0,073
	Koffein	1,611 \pm 0,266	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	Kontrolle	1,550 \pm 0,409	0,836
	Koffein	1,490 \pm 0,357	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	Kontrolle	1,147 \pm 0,374	0,731
	Koffein	1,197 \pm 0,379	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	Kontrolle	0,950 \pm 0,263	0,181
	Koffein	1,285 \pm 0,321	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	Kontrolle	1,241 \pm 0,280	0,668
	Koffein	1,290 \pm 0,243	

Anmerkung: Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet (n=6-7 Tiere pro Zeitpunkt).

In Abbildung 4.28 ist das Tagesprofil der auf die Kontrollgruppe normten, relativen A_{2A}AR-mRNA-Level im Neocortex dargestellt. Die chronische Koffeinapplikation führte zu einer Erhöhung der A_{2A}AR-mRNA in der Mitte der Schlafphase (13:00Uhr, Hellphase). Allerdings konnte nur für den Zeitpunkt Z_{0+6h} ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

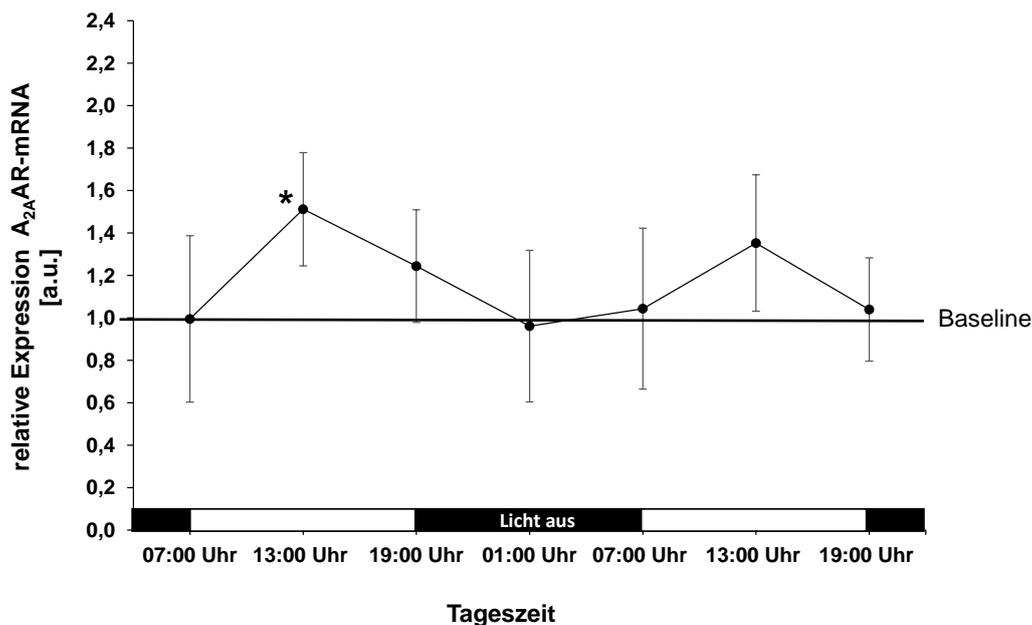


Abbildung 4.28: Tagesprofil der relativen Expression der A_{2A}AR-mRNA unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relative Expression der A_{2A}AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex zu unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden 6-7 Tiere pro Gruppe verwendet. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt.

Für eine vereinfachte Betrachtung in Bezug auf die Wach- und Schlafphase der Tiere wurden die gemittelten Expressionslevel der A_{2A}AR-mRNA beider Gruppen den gleichen zirkadianen Zeiten entsprechend zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Das Ergebnis ist in Tabelle 4.13 und Abbildung 4.29 dargestellt.

Intraindividuell konnten signifikante Unterschiede zwischen der Wach- und Schlafphase innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden, die bereits im vorherigen Kapitel beschrieben wurden. Innerhalb der Koffeingruppe wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression der A_{2A}AR-mRNA zwischen Wach- und Schlafphase detektiert. Das A_{2A}AR-mRNA-Level in der Koffeingruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Mitte der Schlafphase signifikant erhöht (>40 %). Zu Beginn der Wachphase war die A_{2A}AR-mRNA in der Koffeingruppe ebenfalls leicht erhöht (15 %). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Tabelle 4.13: Gepoolte mittlere A_{2A}AR-mRNA-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase

			Kontrolle	Koffein	Relative Differenz in %	p-Wert der <u>inter-individuellen</u> Analyse	p-Wert der <u>intra-individuellen</u> Analyse	
			$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$			Koffein	Kontrolle
Neocortex	Schlafphase	07:00 Uhr	1,138 ± 0,321	1,164 ± 0,387	2,29	0,964	0,081	0,004*
		13:00 Uhr	0,939 ± 0,215	1,347 ± 0,299	43,48	0,001*		
	Wachphase	19:00 Uhr	1,266 ± 0,342	1,463 ± 0,302	15,58	0,118		
		01:00 Uhr	1,550 ± 0,409	1,490 ± 0,357	-3,87	0,81		

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Koffein- und Kontrollgruppe wurden mit einem ungepaarten t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die p-Werte für den intraindividuellen Vergleich wurden mit einer einfachen Varianzanalyse berechnet. Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet (p intra- und interindividuell < 0,05/3).

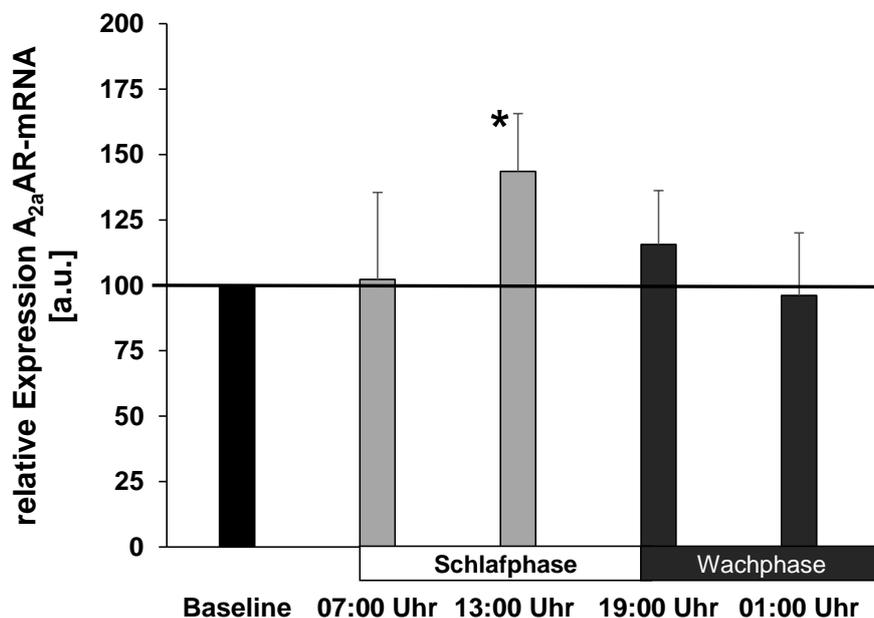


Abbildung 4.29: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die mRNA-Expression des A_{2A}AR im Neocortex differenziert nach Wach- und Schlafphase

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relative Expression der A_{2A}AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für die Zeitpunkte 7 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr wurden pro Gruppe 13 Tiere (n=13) und für den Zeitpunkt 1 Uhr wurden pro Gruppe 6 Tiere (n=6) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Koffeingruppe sind mit * gekennzeichnet (p < 0,001; ungepaarter t-Test).

4.4.1.3 Auswirkung von Schlafentzug auf die A_{2A}AR-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von Schlafentzug auf die A_{2A}AR-mRNA wurden Versuche analog zur Untersuchung der A₁AR-mRNA (vgl. Kapitel 4.3.1.3) durchgeführt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR (Abbildung 4.30 und Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A_{2A}AR-mRNA der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe im Neocortex

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	1,129 \pm 0,268	-5,90	0,731
			Schlafentzug	1,063 \pm 0,282		
		6 h	Kontrolle	0,926 \pm 0,138	43,21	0,008*
			Schlafentzug	1,326 \pm 0,336		
		12 h	Kontrolle	1,295 \pm 0,401	-3,53	0,873
			Schlafentzug	1,249 \pm 0,368		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,550 \pm 0,409	23,40	0,295
			Schlafentzug	1,913 \pm 0,613		
		12 h	Kontrolle	1,147 \pm 0,374	-13,30	0,534
			Schlafentzug	0,994 \pm 0,324		
		18 h	Kontrolle	0,950 \pm 0,263	20,75	0,456
			Schlafentzug	1,147 \pm 0,394		
	24 h	Kontrolle	1,241 \pm 0,280	7,23	0,945	
		Schlafentzug	1,330 \pm 0,382			

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängigen Stichproben berechnet.

Der 12-stündige Scheinschlafentzug führte zu keiner signifikanten Änderung in der Expression der $A_{2A}AR$ -mRNA. Nach sechsstündigem Schlafentzug konnte eine signifikante Erhöhung der $A_{2A}AR$ -mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Nach 12 h Schlafentzug sank das mRNA-Level wieder auf den Baselinewert zurück. Während des gesamten Erholungsschlafes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe festgestellt werden.

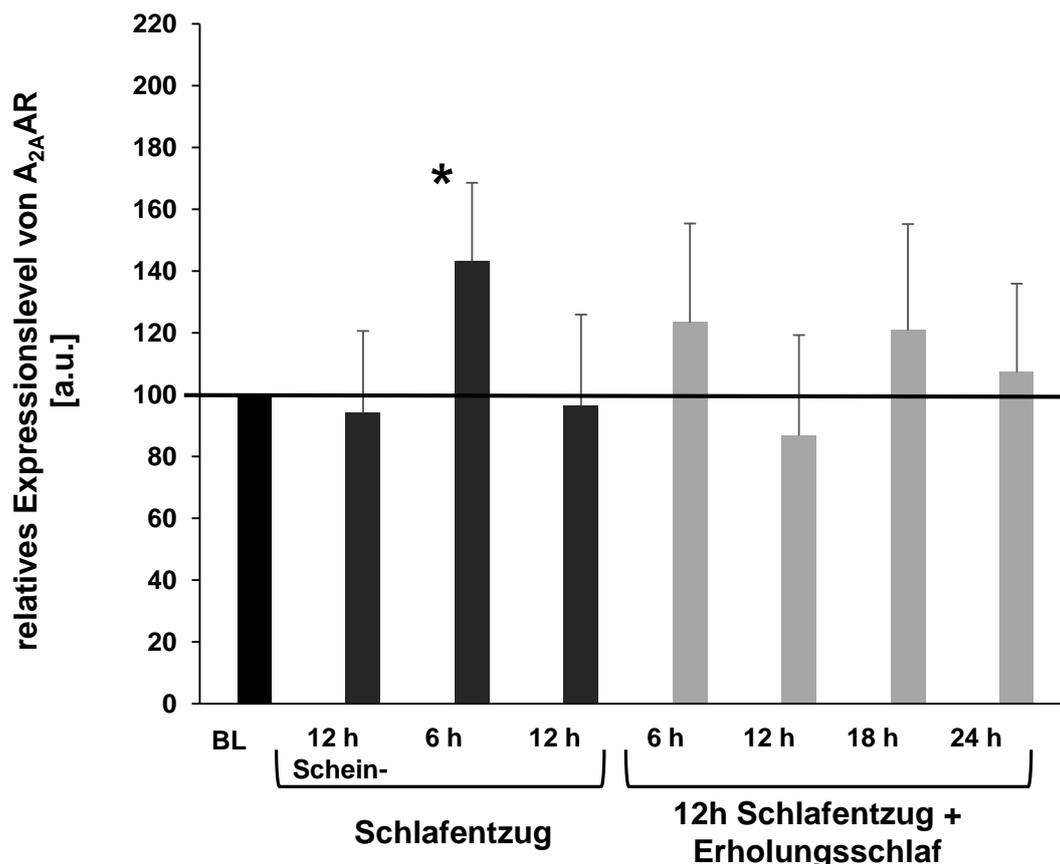


Abbildung 4.30: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die $A_{2A}AR$ -mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug und anschließendem Erholungsschlaf auf die relative Expression der $A_{2A}AR$ -mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 6-7 Tiere verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

4.4.1.4 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A_{2A}AR-mRNA

Zur Untersuchung des Einflusses von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A_{2A}AR-mRNA wurde zunächst über einen Zeitraum von 12 Wochen Koffein verabreicht. Im Anschluss wurden die gleichen Schlafentzugsexperimente durchgeführt wie in Kapitel 4.3.1.3. Die Koffeinapplikation wurde während der Schlafentzugsexperimente fortgeführt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels real-time PCR. Die Auswertung der PCR-Analyse wird in Tabelle 4.15 gezeigt.

Tabelle 4.15: Mittlere relative Expression (\pm Standardabweichung) der A_{2A}AR-mRNA der Kontroll- bzw. Koffein-Schlafentzugsgruppe im Neocortex

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	1,129 \pm 0,268	-14,36	0,259
			Koffein-Schlafentzug	0,967 \pm 0,185		
		6 h	Kontrolle	0,926 \pm 0,138	3,15	0,288
			Koffein-Schlafentzug	0,955 \pm 0,277		
		12 h	Kontrolle	1,295 \pm 0,401	15,69	0,534
			Koffein-Schlafentzug	1,498 \pm 0,406		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	1,550 \pm 0,409	-8,19	0,535
			Koffein-Schlafentzug	1,423 \pm 0,351		
		12 h	Kontrolle	1,147 \pm 0,374	12,24	0,445
			Koffein-Schlafentzug	1,287 \pm 0,399		
		18 h	Kontrolle	0,950 \pm 0,263	-19,58	0,209
			Koffein-Schlafentzug	0,764 \pm 0,216		
		24 h	Kontrolle	1,241 \pm 0,280	0,59	1,000
			Koffein-Schlafentzug	1,248 \pm 0,244		

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse der beiden Gruppen wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet.

Im Neocortex (Abbildung 4.31) konnte keine signifikante Veränderung der $A_{2A}AR$ -mRNA nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug festgestellt werden.

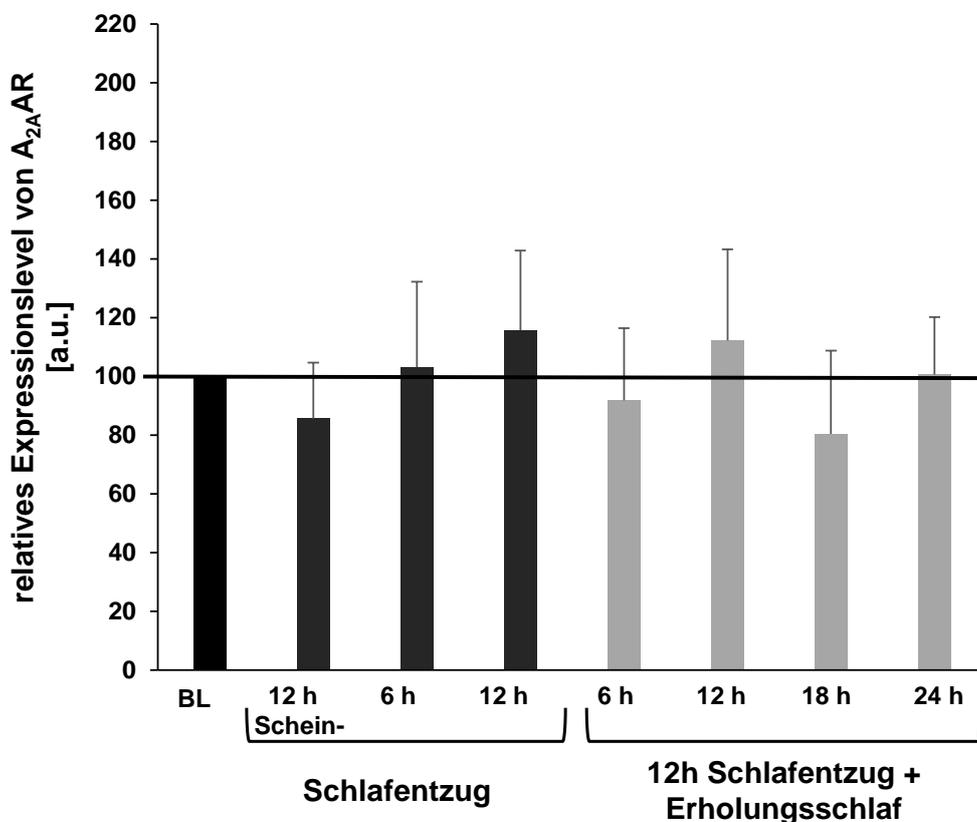


Abbildung 4.31: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die $A_{2A}AR$ -mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die relative Expression der $A_{2A}AR$ -mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 6-7 Tiere verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

Ein Vergleich aller Versuchsgruppen ist in Abbildung 4.32 gezeigt. Die beobachteten signifikanten Effekte auf die $A_{2A}AR$ -mRNA nach Schlafentzug und nach chronischer Koffeinbehandlung, konnten bei gleichzeitiger Anwendung beider Behandlungen nicht mehr festgestellt werden.

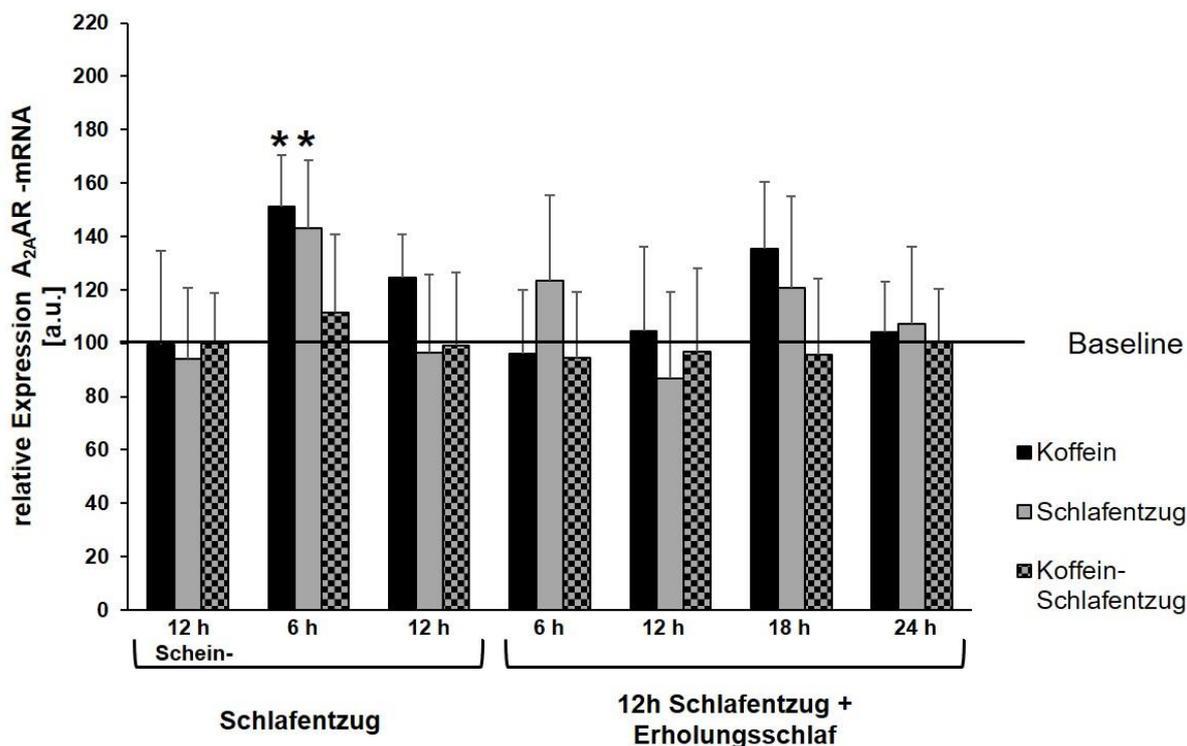


Abbildung 4.32: Einfluss von chronischem Kaffeekonsum und/oder Schlafentzug auf die A_{2A}AR-mRNA-Expression im Neocortex

Dargestellt wird die relative Expression der A_{2A}AR-mRNA (normalisiert auf die Expression von Cyclophilin A) im Neocortex nach chronischem Kaffeekonsum und/oder Schlafentzug normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert (BL) = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 6-7 Tiere verwendet. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

4.4.2 Untersuchung des A_{2A}AR-Proteins

4.4.2.1 Untersuchung des A_{2A}AR in der zirkadianen Rhythmik

Um den A_{2A}AR innerhalb der zirkadianen Rhythmik zu untersuchen, wurde ein Tagesprofil des Rezeptors erstellt. Der Versuchsablauf erfolgte analog zur Untersuchung der A₁AR (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Abbildung 4.33 zeigt repräsentativ einen Western Blot-Analyse der zirkadianen Expression von A_{2A}AR.

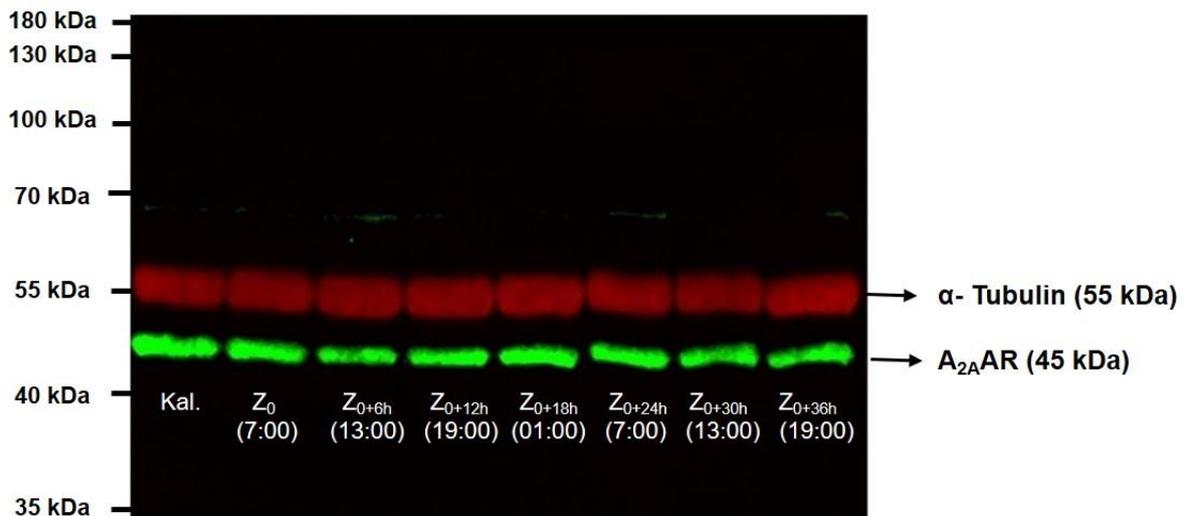


Abbildung 4.33: Western Blot der zirkadianen Expression von A_{2A}AR

Die Tiere der Kontrollgruppe ($n=49$) wurden in Abständen von sechs Stunden getötet ($n=7$ pro Zeitpunkt). Der erste Tötungszeitpunkt war der Beginn der Schlafphase (Z_0 , 07:00 Uhr). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt ($n=1$) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 μg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A_{2A}AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm) und eine bei ca. 45 kDa ($\lambda=800$ nm) detektiert. Die 45 kDa-Banden entsprechen dem A_{2A}AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α -Tubulin sind.

Die Auswertung der einzelnen Western Blots (Tabelle 4.16 und Abbildung 4.34) zeigt, dass in keiner der zu untersuchenden Gehirnregionen signifikante Unterschiede in den relativen Expressionsleveln des A_{2A}AR zwischen den verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten festgestellt werden konnte.

Tabelle 4.16: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A_{2A}AR zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

	Neocortex		Thalamus		Hippocampus	
	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
07:00 Uhr (Z ₀)	0,599 \pm 0,082	0,627	0,891 \pm 0,196	0,652	0,492 \pm 0,065	0,038
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	0,600 \pm 0,134		0,988 \pm 0,216		0,582 \pm 0,030	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	0,629 \pm 0,148		1,022 \pm 0,143		0,613 \pm 0,078	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	0,643 \pm 0,124		0,988 \pm 0,116		0,610 \pm 0,108	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	0,605 \pm 0,094		0,976 \pm 0,158		0,637 \pm 0,100	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	0,720 \pm 0,126		0,935 \pm 0,142		0,578 \pm 0,075	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	0,648 \pm 0,126		1,032 \pm 0,156		0,537 \pm 0,069	

Anmerkung: Die p-Werte wurden über einen Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ermittelt ($p < 0,05$), $n=7$ Tiere pro Zeitpunkt. Signifikante p-Werte wurden *post-hoc* einer Bonferroni-Korrektur unterzogen ($p < 0,5/3$)

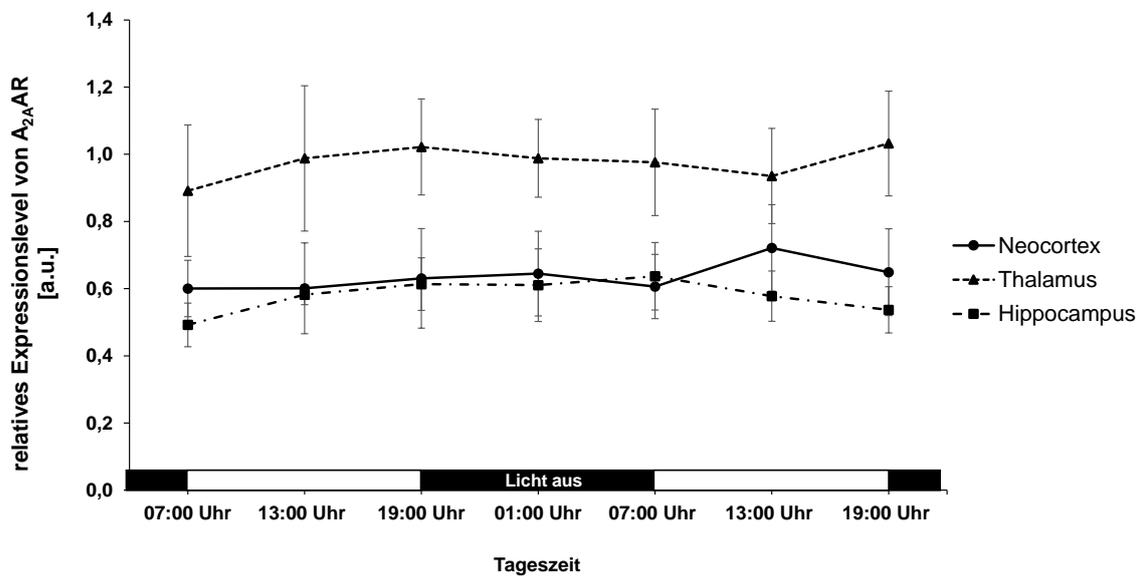


Abbildung 4.34: Zirkadianer Verlauf der relativen Expressionslevel von A_{2A}AR

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) zu den unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere verwendet ($n=7$). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

4.4.2.2 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation auf den A_{2A}AR

Neben möglichen zirkadianen Effekten sollte auch der Einfluss einer 12-wöchigen chronischen Koffeinapplikation auf die Expression des A_{2A}AR untersucht werden. Wie bei der Kontrollgruppe wurde ein Tagesprofil des Rezeptors unter chronischer Koffeinapplikation erstellt. Der Versuchsablauf erfolgte analog zur Untersuchung der A₁AR (vgl. Kapitel 4.3.2.2). Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Abbildung 4.35 zeigt repräsentativ eine Western Blot-Analyse der Expression von A_{2A}AR unter chronischer Koffeinapplikation.

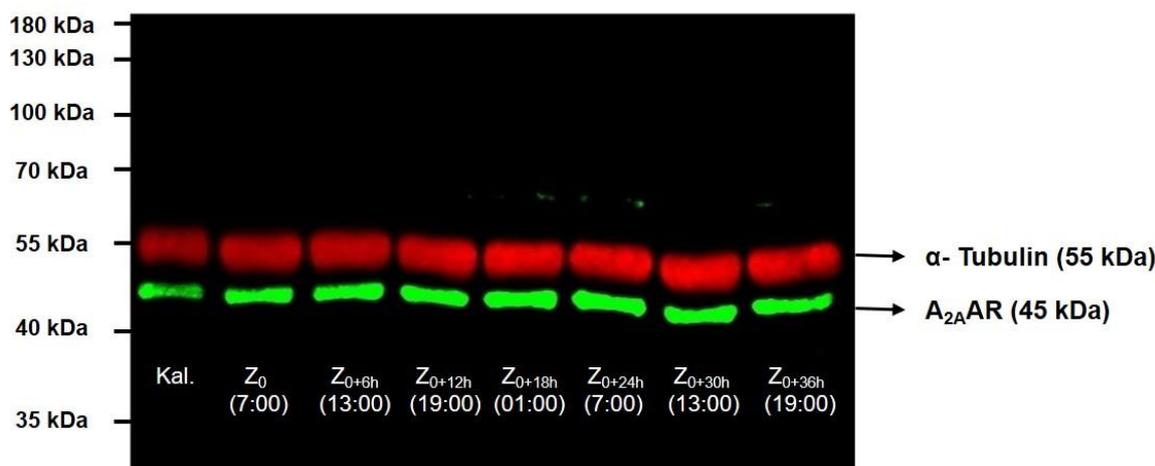


Abbildung 4.35: Western Blot der Expression von A_{2A}AR unter chronischer Koffeinapplikation

Die Tiere der Koffeingruppe (n=49) wurden in Abständen von sechs Stunden getötet (n=7 pro Zeitpunkt). Der erste Tötungszeitpunkt war der Beginn der Schlafphase (Z₀, 07:00 Uhr). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt (n=1) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 µg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A_{2A}AR und α-Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von λ=700 nm und λ=800 nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa (λ=700 nm) und eine bei ca. 45 kDa (λ=800 nm) detektiert werden. Die 45 kDa-Banden entsprechen dem A_{2A}AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α-Tubulin sind.

Die Auswertung der einzelnen Western Blots wird in Tabelle 4.17 gezeigt. In Abbildung 4.36 ist das Tagesprofil der auf die Kontrollgruppe genormten, relativen A_{2A}AR-Level in den verschiedenen Gehirnregionen dargestellt.

Tabelle 4.17: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) des A_{2A}AR nach chronischer Koffeinapplikation zu verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten

		Neocortex		Thalamus		Hippocampus	
		$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
07:00 Uhr (Z ₀)	Kontrolle	0,599 \pm 0,082	0,026	0,891 \pm 0,196	0,209	0,492 \pm 0,065	0,001*
	Koffein	0,803 \pm 0,137		1,029 \pm 0,165		0,730 \pm 0,081	
13:00 Uhr (Z _{0+6h})	Kontrolle	0,600 \pm 0,134	0,041	0,988 \pm 0,216	0,209	0,582 \pm 0,030	0,001*
	Koffein	0,849 \pm 0,177		1,176 \pm 0,159		0,768 \pm 0,086	
19:00 Uhr (Z _{0+12h})	Kontrolle	0,629 \pm 0,148	0,006*	1,022 \pm 0,143	0,067	0,613 \pm 0,078	0,011*
	Koffein	0,850 \pm 0,108		1,224 \pm 0,162		0,789 \pm 0,102	
01:00 Uhr (Z _{0+18h})	Kontrolle	0,643 \pm 0,124	0,0017*	0,988 \pm 0,116	0,011*	0,610 \pm 0,108	0,011*
	Koffein	0,857 \pm 0,148		1,262 \pm 0,201		0,819 \pm 0,123	
07:00 Uhr (Z _{0+24h})	Kontrolle	0,605 \pm 0,094	0,001*	0,976 \pm 0,158	0,013*	0,637 \pm 0,100	0,006*
	Koffein	0,957 \pm 0,148		1,294 \pm 0,233		0,835 \pm 0,101	
13:00 Uhr (Z _{0+30h})	Kontrolle	0,720 \pm 0,126	0,097	0,935 \pm 0,142	0,009*	0,578 \pm 0,075	0,001*
	Koffein	0,879 \pm 0,152		1,188 \pm 0,105		0,839 \pm 0,101	
19:00 Uhr (Z _{0+36h})	Kontrolle	0,648 \pm 0,126	0,038	1,032 \pm 0,156	0,535	0,537 \pm 0,069	0,001*
	Koffein	0,823 \pm 0,145		1,078 \pm 0,045		0,784 \pm 0,118	

Anmerkung: Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet (n=7 Tiere pro Zeitpunkt). Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet (p < 0,05/3).

Im Hippocampus führte die chronische Koffeinapplikation zu einer signifikanten Erhöhung des A_{2A}AR. Im Neocortex konnte um 1 Uhr (Mitte der Wachphase) eine signifikante Erhöhung des A_{2A}AR festgestellt werden, während die Erhöhung des Rezeptors um 13:00 Uhr (Mitte der Schlafphase) nicht signifikant war. Zu Beginn der Wach- (19 Uhr) und Schlafphase (7 Uhr) war das A_{2A}AR-Level ebenfalls erhöht. Eine Signifikanz konnte für den Beginn der Wachphase allerdings nur zum Zeitpunkt Z_{0+12h} und für den Beginn der Schlafphase nur zum Zeitpunkt Z_{0+24h} festgestellt werden, die jeweils entsprechenden zirkadianen Zeitpunkte (Z₀, Z_{0+36h}) hielten der Bonferroni-

Korrektur nicht stand. Im Thalamus wurde eine Erhöhung des A_{2A}AR beobachtet, allerdings war die Erhöhung nur zu den Zeitpunkten Z_{0+18h} (01:00 Uhr), Z_{0+24h} (07:00 Uhr) und Z_{0+30h} (13:00 Uhr) signifikant.

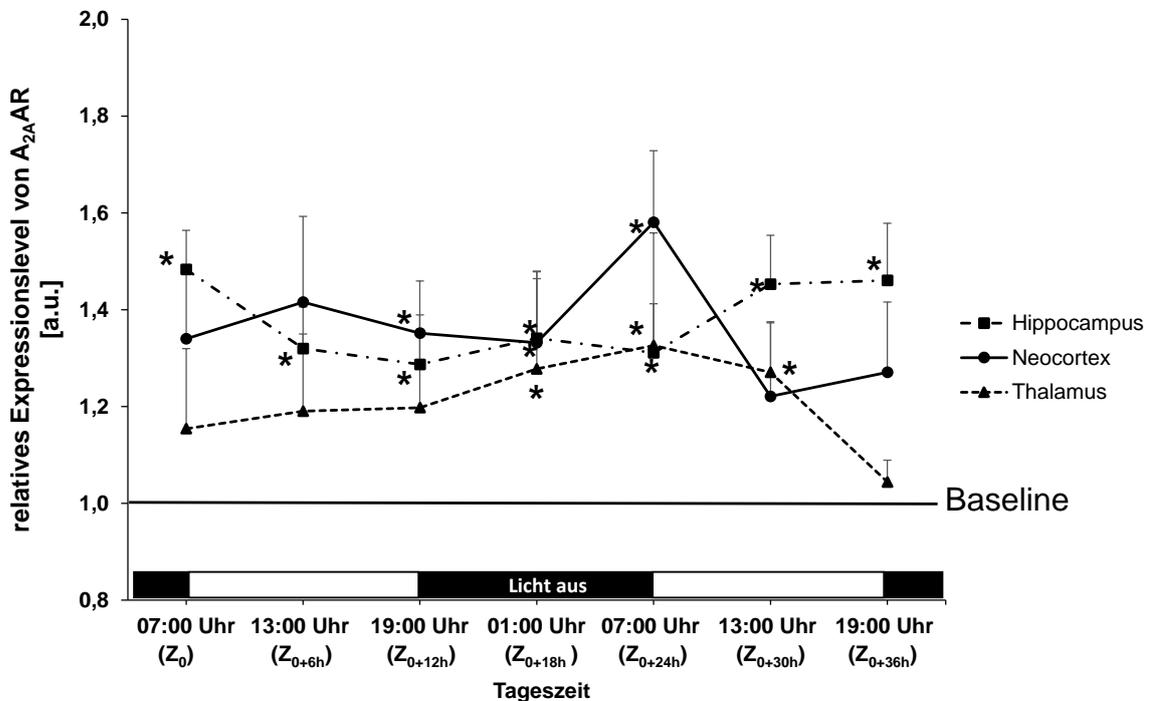


Abbildung 4.36: Tagesprofil der relativen Expressionslevel von A_{2A}AR unter chronischer Koffeinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Hippocampus und Thalamus zu unterschiedlichen zirkadianen Zeitpunkten normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden 7 Tiere pro Gruppe verwendet (n=7). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Koffein- und Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Für eine vereinfachte Betrachtung in Bezug auf die Wach- und Schlafphase der Tiere wurden die gemittelten Expressionslevel des A_{2A}AR beider Gruppen den gleichen zirkadianen Zeiten entsprechend zusammengefasst (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.37 und Tabelle 4.18 dargestellt.

Tabelle 4.18: Gepoolte mittlere A_{2A}AR-Level zu Beginn und in der Mitte der Schlaf- bzw. Wachphase

			Kontrolle	Koffein	Relative Differenz in %	p-Wert der inter-individuellen Analyse	p-Wert der <u>intra</u> -individuellen Analyse	
			$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$			Koffein	Kontrolle
Neocortex	Schlafphase	07:00 Uhr	0,603 ± 0,090	0,880 ± 0,162	45,79	0,0001*	0,955	0,782
		13:00 Uhr	0,661 ± 0,145	0,864 ± 0,166	30,65	0,004*		
	Wachphase	19:00 Uhr	0,640 ± 0,139	0,837 ± 0,129	30,76	0,010*		
		01:00 Uhr	0,645 ± 0,126	0,857 ± 0,148	32,88	0,017*		
Thalamus	Schlafphase	07:00 Uhr	0,934 ± 0,183	1,161 ± 0,242	24,37	0,024	0,472	0,353
		13:00 Uhr	0,962 ± 0,185	1,182 ± 0,135	22,93	0,006*		
	Wachphase	19:00 Uhr	1,027 ± 0,150	1,151 ± 0,140	12,03	0,039		
		01:00 Uhr	0,988 ± 0,116	1,262 ± 0,201	27,76	0,011*		
Hippocampus	Schlafphase	07:00 Uhr	0,564 ± 0,111	0,782 ± 0,106	38,59	0,0001*	0,946	0,874
		13:00 Uhr	0,580 ± 0,057	0,804 ± 0,100	38,58	0,0001*		
	Wachphase	19:00 Uhr	0,575 ± 0,083	0,787 ± 0,111	36,78	0,0001*		
		01:00 Uhr	0,610 ± 0,108	0,819 ± 0,123	34,09	0,011*		

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Koffein- und Kontrollgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die p-Werte für den intraindividuellen Vergleich wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet (p intra- und interindividuell < 0,05/3).

Intraindividuell konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wach- und Schlafphase festgestellt werden. Für den Hippocampus und den Neocortex waren die A_{2A}AR-Level in der Koffeingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in der Wach- als auch in der Schlafphase signifikant erhöht (> 30 %). Im Thalamus führte die chronische Koffeinbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des A_{2A}AR in der Mitte der Wach- und Schlafphase (> 20 %). Auch zu Beginn der Wach-

und Schlafphase wurden signifikante Unterschiede detektiert, die jedoch der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht standhielten.

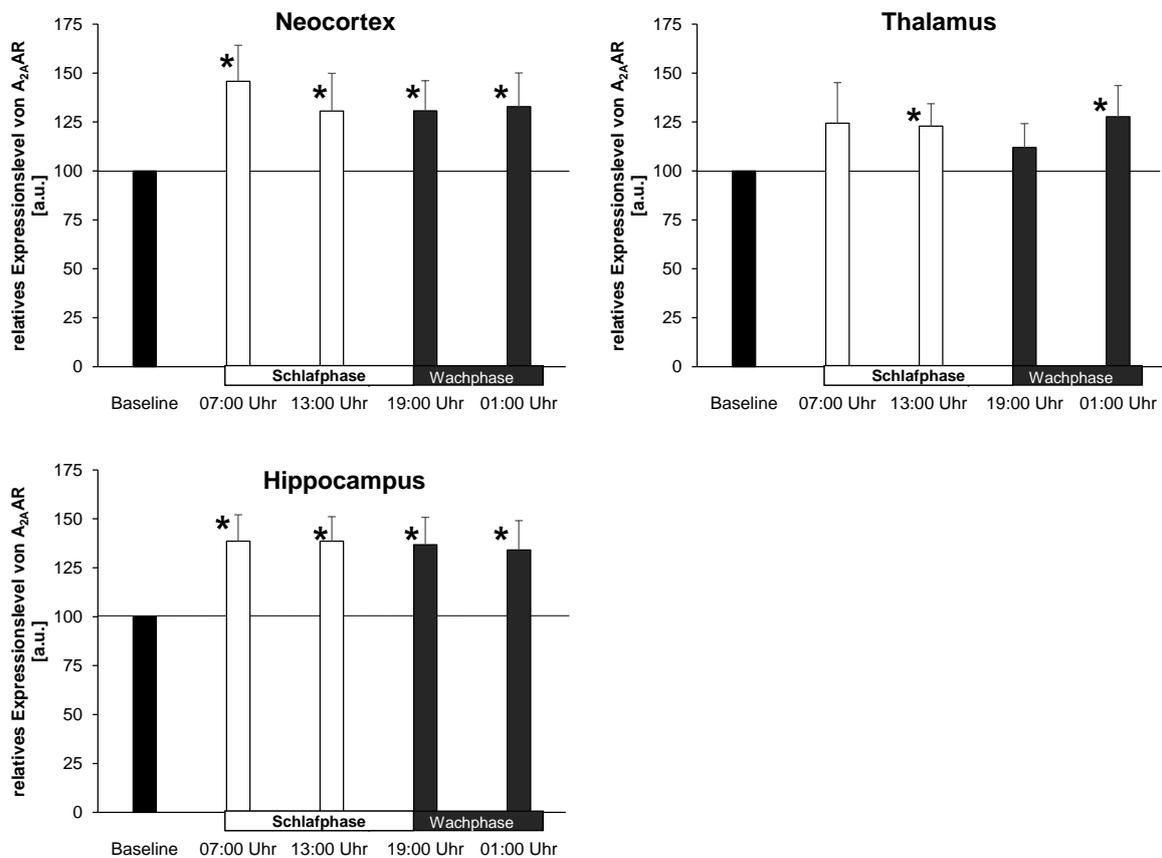


Abbildung 4.37: Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf die Proteinexpression des A_{2A}AR in Neocortex, Hippocampus und Thalamus der Ratte differenziert nach Wach- und Schlafphase

Dargestellt wird der Einfluss einer 12-wöchigen Koffeinapplikation auf die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Thalamus und Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für die Zeitpunkte 7 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr wurden pro Gruppe 14 Tiere (n=14) und für den Zeitpunkt 1 Uhr wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Koffeingruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,017$; Mann-Whitney-U-Test).

4.4.2.3 Auswirkung von Schlafentzug auf den A_{2A}AR

Zur Untersuchung des Einflusses von Schlafentzug auf den A_{2A}AR wurden Versuche analog zur Untersuchung des A₁AR (vgl. Kapitel 4.3.2.3) durchgeführt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot, eine repräsentative Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.38 gezeigt.

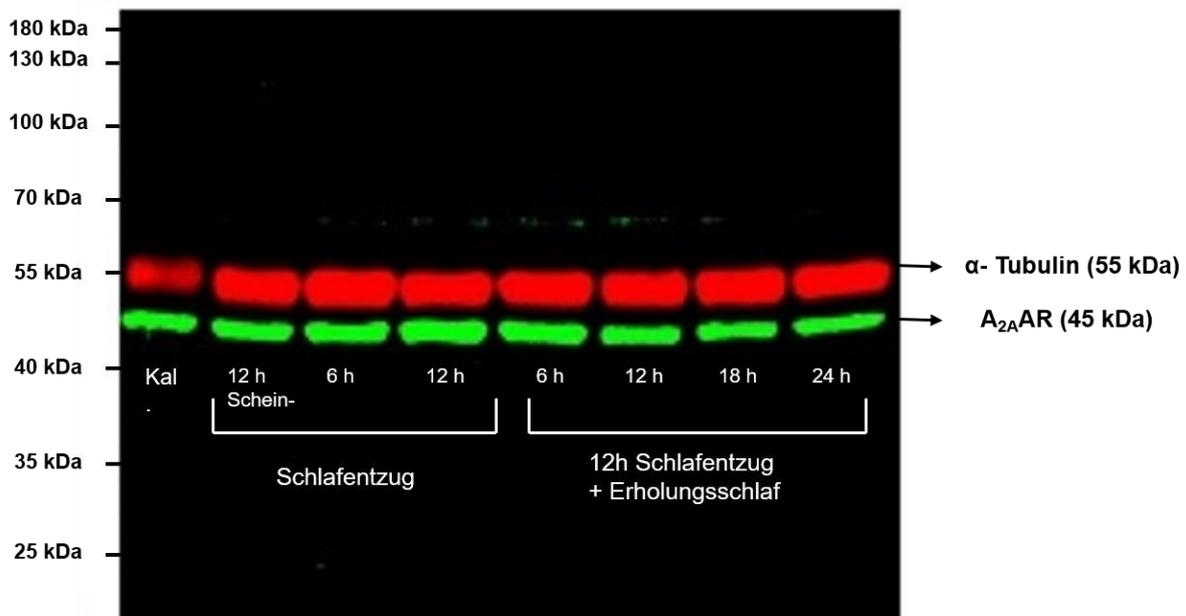


Abbildung 4.38: Western Blot der Expression von A_{2A}AR nach Schlafentzug und Schlafentzug mit anschließender Erholungsschlafphase

Zunächst wurde ein 12-stündiger Scheinschlafentzug während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet ($n=7$). Die übrigen Tiere der Gruppe wurden dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden ($n=7$ pro Zeitpunkt). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeprobe wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt ($n=1$) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 μ g Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A_{2A}AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm) und eine bei ca. 45 kDa ($\lambda=800$ nm) detektiert. Die 45 kDa-Banden entsprechen dem A_{2A}AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α -Tubulin sind.

Schon der 12-stündige Scheinschlafentzug führte in allen untersuchten Gehirnregionen zu einer Erhöhung des A_{2A}AR-Levels (Tabelle 4.19, Abbildung 4.39, 4.40 und 4.41), allerdings war der beobachtete Unterschied im Thalamus nicht signifikant.

Tabelle 4.19: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A_{2A}AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,599 \pm 0,082	67,09	0,001*
			Schlafentzug	1,001 \pm 0,148		
		6 h	Kontrolle	0,600 \pm 0,134	56,58	0,001*
			Schlafentzug	0,939 \pm 0,090		
		12 h	Kontrolle	0,629 \pm 0,148	44,90	0,002*
			Schlafentzug	0,912 \pm 0,079		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,643 \pm 0,124	56,33	0,001*
			Schlafentzug	1,006 \pm 0,104		
		12 h	Kontrolle	0,605 \pm 0,094	72,96	0,001*
			Schlafentzug	1,047 \pm 0,144		
		18 h	Kontrolle	0,720 \pm 0,126	38,33	0,004*
			Schlafentzug	0,996 \pm 0,120		
24 h	Kontrolle	0,648 \pm 0,126	54,51	0,001*		
	Schlafentzug	1,000 \pm 0,116				
Thalamus	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,891 \pm 0,196	24,13	0,053	
		Schlafentzug	1,107 \pm 0,155			
	Schlafentzug	6 h	Kontrolle	0,988 \pm 0,216	14,47	0,165
			Schlafentzug	1,131 \pm 0,180		
	12h	Kontrolle	1,022 \pm 0,143	23,73	0,053	
		Schlafentzug	1,264 \pm 0,258			
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,988 \pm 0,116	17,64	0,073
			Schlafentzug	1,162 \pm 0,209		

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Thalamus	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	12 h	Kontrolle	0,976 ± 0,158	19,66	0,097
			Schlafentzug	1,168 ± 0,228		
		18 h	Kontrolle	0,935 ± 0,142	17,89	0,128
			Schlafentzug	1,103 ± 0,144		
		24 h	Kontrolle	1,032 ± 0,156	-1,76	0,805
			Schlafentzug	1,014 ± 0,075		
Hippocampus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,492 ± 0,065	55,37	0,001*
			Schlafentzug	0,765 ± 0,131		
		6 h	Kontrolle	0,582 ± 0,030	38,86	0,001*
			Schlafentzug	0,808 ± 0,117		
		12 h	Kontrolle	0,613 ± 0,078	25,68	0,004*
			Schlafentzug	0,771 ± 0,077		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,610 ± 0,108	40,83	0,011*
			Schlafentzug	0,860 ± 0,184		
		12 h	Kontrolle	0,637 ± 0,100	36,30	0,004*
			Schlafentzug	0,868 ± 0,115		
		18 h	Kontrolle	0,578 ± 0,075	56,71	0,004*
			Schlafentzug	0,905 ± 0,164		
24 h	Kontrolle	0,537 ± 0,069	57,00	0,001*		
	Schlafentzug	0,843 ± 0,121				

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Koffein- und Schlafentzugsgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet, signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit dem Bonferroni-Verfahren korrigiert und mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$).

Im Neocortex und Hippocampus führte sowohl der 6-stündige als auch der 12-stündige Schlafentzug zu einer signifikanten Erhöhung des A_{2A}AR-Levels. Die Erhöhung blieb über den gesamten Zeitraum des Erholungsschlafes bestehen. Im Thalamus konnte nach Schlafentzug ebenfalls eine Erhöhung des A_{2A}AR-Levels beobachtet werden, die über den Erholungsschlaf von bis zu 18 Stunden andauerte. Die Erhöhung war jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Nach einem Erholungsschlaf von 24 h fiel das A_{2A}AR-Level wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe zurück.

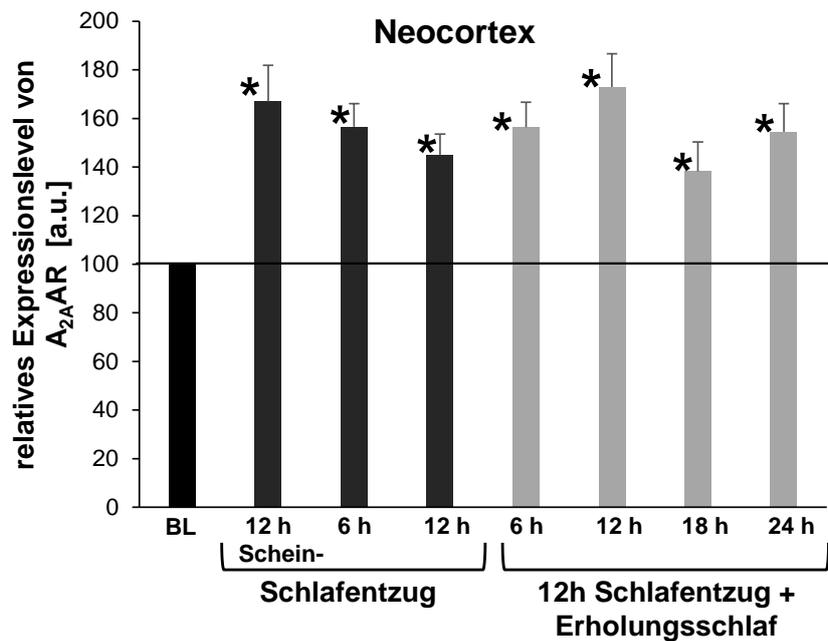


Abbildung 4.39: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A_{2A}AR im Neocortex

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Neocortex normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

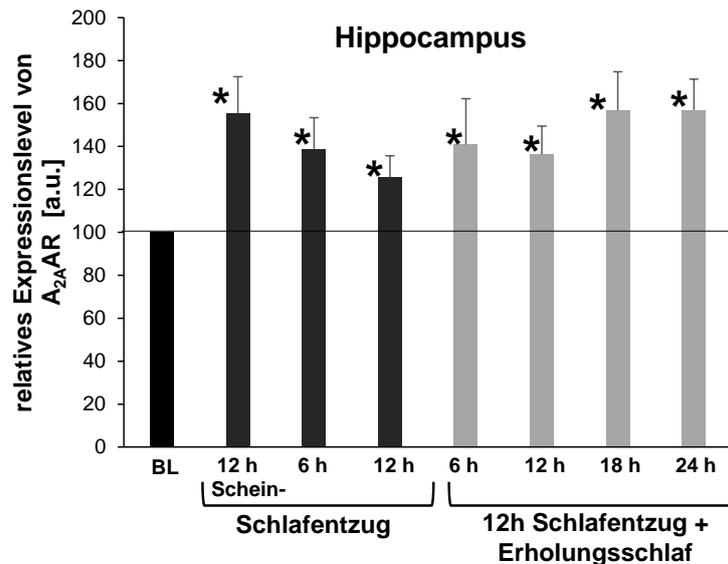


Abbildung 4.40: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A_{2A}AR im Hippocampus

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Schlafentzugsgruppe sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$; Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

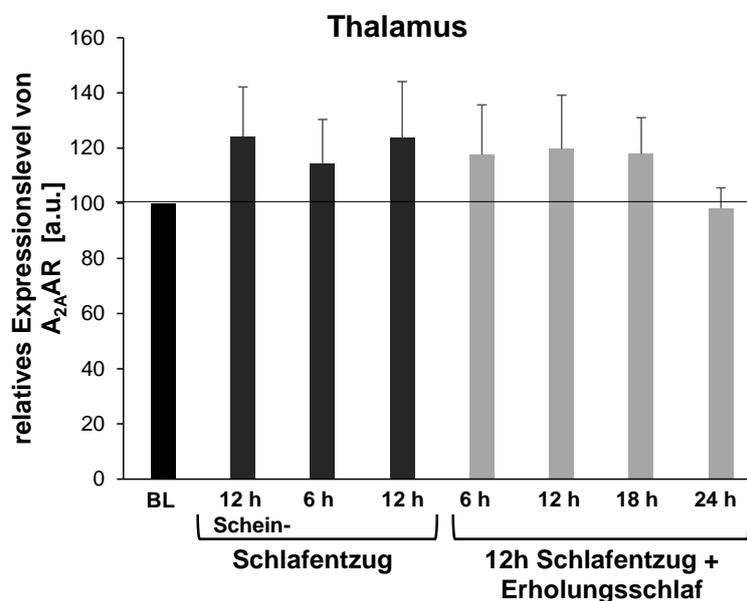


Abbildung 4.41: Der zeitliche Verlauf des Einflusses von Schlafentzug auf die Proteinexpression des A_{2A}AR im Thalamus

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Thalamus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 100 %). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere (n=7) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt.

4.4.2.4 Auswirkung einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A_{2A}AR

Zur Untersuchung des Einflusses von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf den A_{2A}AR wurde zunächst über einen Zeitraum von 12 Wochen Koffein verabreicht. Im Anschluss wurden die gleichen Schlafentzugsexperimente durchgeführt wie in Kapitel 4.3.2.3. Die Koffeinapplikation wurde während der Schlafentzugsexperimente fortgeführt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot, eine repräsentative Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.42 gezeigt.

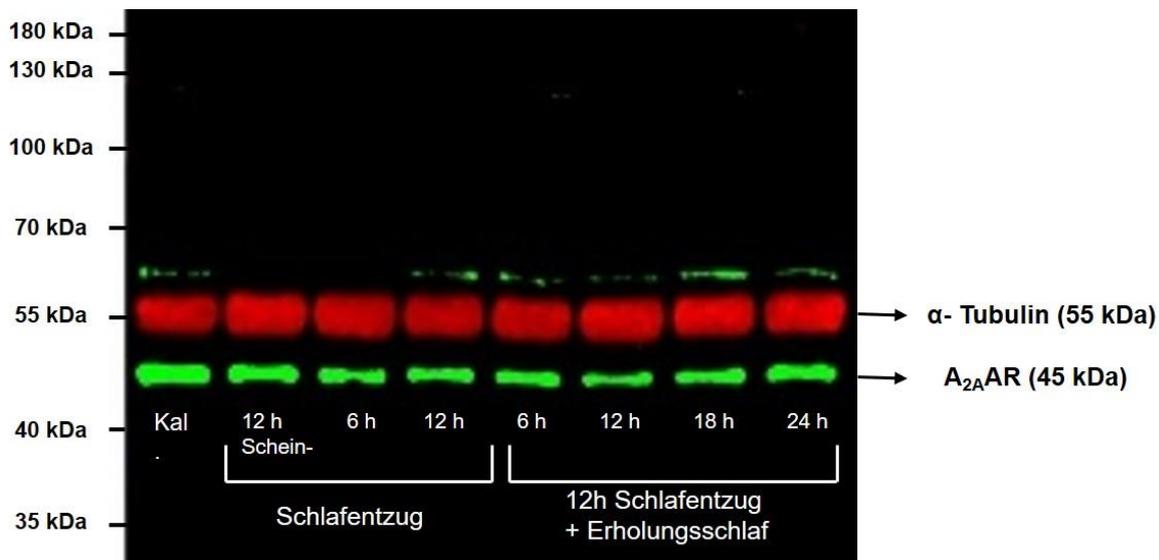


Abbildung 4.42: Western Blot der Expression von A_{2A}AR nach chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug

Nach 12-wöchiger Koffeinapplikation wurde zunächst ein 12-stündiger Scheinschlafentzug während der Wachphase der Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die ersten Tiere der Schlafentzugsgruppe getötet ($n=7$). Die übrigen Tiere der Gruppe wurden dem eigentlichen Schlafentzug unterzogen. Die weiteren Tötungen erfolgten nach sechs bzw. zwölf Stunden Schlafentzug sowie nach einer dem Schlafentzug folgenden Erholungsschlafphase von 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden ($n=7$ pro Zeitpunkt). Nach der Gehirnentnahme erfolgte die Dissektion der zu untersuchenden Gehirnregionen. Die Gewebeproben wurden einzeln homogenisiert und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Im Anschluss wurde jeweils eine Probe für jeden Zeitpunkt ($n=1$) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrag betrug 50 μg Gesamtprotein. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blot-Durchgänge wurden zusätzlich ein Kalibrator (Kal.) und für die spätere Identifikation der Banden Prestained Protein Marker als Molekulargewichtsstandard auf jedes Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen A_{2A}AR und α -Tubulin und im Anschluss mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte bei Wellenlängen von $\lambda=700$ nm und $\lambda=800$ nm mittels Fluoreszenzscanner. In jeder Probe wurde jeweils eine Fluoreszenzbande bei 55 kDa ($\lambda=700$ nm) und eine bei ca. 45 kDa ($\lambda=800$ nm) detektiert. Die 45 kDa-Banden entsprechen dem A_{2A}AR, während die 55 kDa-Banden charakteristisch für α -Tubulin sind.

Während Schlafentzug bzw. eine chronische Koffeinapplikation tendenziell zu einer Erhöhung des $A_{2A}AR$ -Levels führten (vgl. Kapitel 4.4.2.2 und Kapitel 4.4.2.3), war dieser Effekt bei der gleichzeitigen Anwendung beider Behandlungen nicht mehr zu beobachten. Im Thalamus führte die Behandlung mit Koffein und Schlafentzug vielmehr zu einem gegenteiligen Effekt. Es konnte eine Verringerung des $A_{2A}AR$ -Levels im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden, die über den gesamten Zeitraum des Erholungsschlafes bestehen blieb (Abbildung 4.43, Tabelle 4.20). Allerdings hielt der signifikante Unterschied nach 18 h Erholungsschlaf der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht stand. Lediglich im Neocortex konnte nach Schlafentzug und 12-stündigem Erholungsschlaf ein signifikanter Anstieg des Rezeptorlevels festgestellt werden.

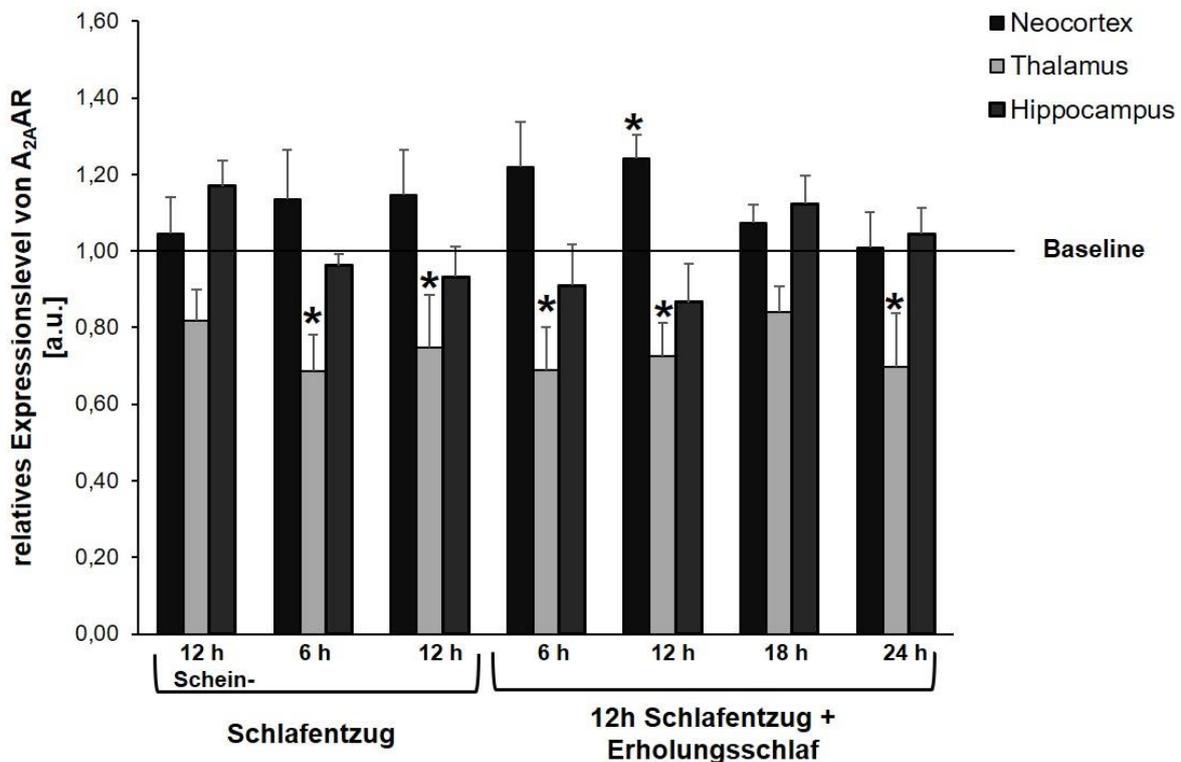


Abbildung 4.43: Der Einfluss von chronischer Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die Proteinexpression des $A_{2A}AR$ in Neocortex, Thalamus und Hippocampus

Dargestellt wird der Einfluss von Schlafentzug auf die relativen Expressionslevel des $A_{2A}AR$ (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Thalamus und Hippocampus normiert auf die jeweiligen Kontrolltiere (Baselinewert = 1). Für jeden Zeitpunkt wurden pro Gruppe 7 Tiere ($n=7$) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Koffein- und Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Tabelle 4.20: Mittlere relative Expressionslevel (\pm Standardabweichung) von A_{2A}AR der Kontroll- bzw. Schlafentzugsgruppe in Neocortex, Hippocampus und Thalamus

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Neocortex	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,599 \pm 0,082	4,64	0,902
			Koffein-Schlafentzug	0,627 \pm 0,095		
		6 h	Kontrolle	0,600 \pm 0,134	13,42	0,259
			Koffein-Schlafentzug	0,680 \pm 0,129		
		12 h	Kontrolle	0,629 \pm 0,148	14,71	0,259
			Koffein-Schlafentzug	0,722 \pm 0,118		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,643 \pm 0,124	21,95	0,073
			Koffein-Schlafentzug	0,785 \pm 0,117		
		12 h	Kontrolle	0,605 \pm 0,094	24,13	0,011*
			Koffein-Schlafentzug	0,751 \pm 0,063		
		18 h	Kontrolle	0,720 \pm 0,126	7,39	0,069
			Koffein-Schlafentzug	0,733 \pm 0,047		
24 h	Kontrolle	0,648 \pm 0,126	1,00	0,62		
	Koffein-Schlafentzug	0,654 \pm 0,092				
Thalamus	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,891 \pm 0,196	-18,18	0,073	
		Koffein-Schlafentzug	0,729 \pm 0,082			
	6 h	Kontrolle	0,988 \pm 0,216	-31,41	0,004*	
		Koffein-Schlafentzug	0,677 \pm 0,095			
	12 h	Kontrolle	1,022 \pm 0,143	-25,11	0,011*	
		Koffein-Schlafentzug	0,765 \pm 0,137			
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,988 \pm 0,116	-31,15	0,001*
			Koffein-Schlafentzug	0,680 \pm 0,114		

		Dauer	Gruppe	$\bar{x} \pm \sigma$	Differenz in %	p-Wert
Thalamus	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	12 h	Kontrolle	0,976 ± 0,158	-27,40	0,002*
			Koffein-Schlafentzug	0,708 ± 0,088		
		18 h	Kontrolle	0,935 ± 0,142	-15,87	0,027
			Koffein-Schlafentzug	0,787 ± 0,067		
		24 h	Kontrolle	1,032 ± 0,156	-30,30	0,004*
			Koffein-Schlafentzug	0,719 ± 0,141		
Hippocampus	Schlafentzug	12 h Schein-Schlafentzug	Kontrolle	0,492 ± 0,065	16,98	0,026
			Koffein-Schlafentzug	0,576 ± 0,052		
		6 h	Kontrolle	0,582 ± 0,030	-3,82	0,596
			Koffein-Schlafentzug	0,560 ± 0,093		
		12 h	Kontrolle	0,613 ± 0,078	-6,71	0,301
			Koffein-Schlafentzug	0,572 ± 0,087		
	12 h Schlafentzug + Erholungsschlaf	6 h	Kontrolle	0,610 ± 0,108	-9,07	0,136
			Koffein-Schlafentzug	0,555 ± 0,083		
		12 h	Kontrolle	0,637 ± 0,100	13,38	0,259
			Koffein-Schlafentzug	0,552 ± 0,099		
		18 h	Kontrolle	0,578 ± 0,075	12,31	0,064
			Koffein-Schlafentzug	0,649 ± 0,100		
24 h	Kontrolle	0,537 ± 0,069	4,42	0,535		
	Koffein-Schlafentzug	0,561 ± 0,093				

Anmerkung: Die p-Werte für die interindividuelle Analyse zwischen Koffein- und Schlafentzugsgruppe wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben berechnet, signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit dem Bonferroni-Verfahren korrigiert und mit * gekennzeichnet ($p < 0,05/3$).

Im Neocortex (Abbildung 4.44) und Hippocampus (Abbildung 4.45) konnte sowohl nach Schlafentzug, als auch nach einer chronischen Koffeinbehandlung eine Erhöhung des A_{2A}AR festgestellt werden, wohingegen die Kombination von chronischer Koffeinbehandlung mit Schlafentzug zu einer Aufhebung der alleinigen Effekte führte. Im Neocortex wurde nach chronischer Koffeinbehandlung mit Schlafentzug und 12-stündigem Erholungsschlaf eine signifikante Erhöhung des A_{2A}AR festgestellt. Diese fiel jedoch im Vergleich zu den jeweiligen Einzelanwendungen deutlich niedriger aus.

Im Thalamus (Abbildung 4.46) führten sowohl der chronische Koffeinkonsum als auch der Schlafentzug zu einer Erhöhung des A_{2A}AR-Levels, die allerdings nur bedingt signifikant waren. Im Gegensatz dazu konnte nach der Kombination von beiden Behandlungen eine Verringerung des Rezeptorlevels im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Verringerung nach 12-stündigem Scheinschlafentzug war allerdings nicht signifikant. Nach Schlafentzug und 18-stündigem Erholungsschlaf konnte eine signifikante Abnahme der A_{2A}AR-Gesamtexpression beobachtet werden, die aber der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht standhielt.

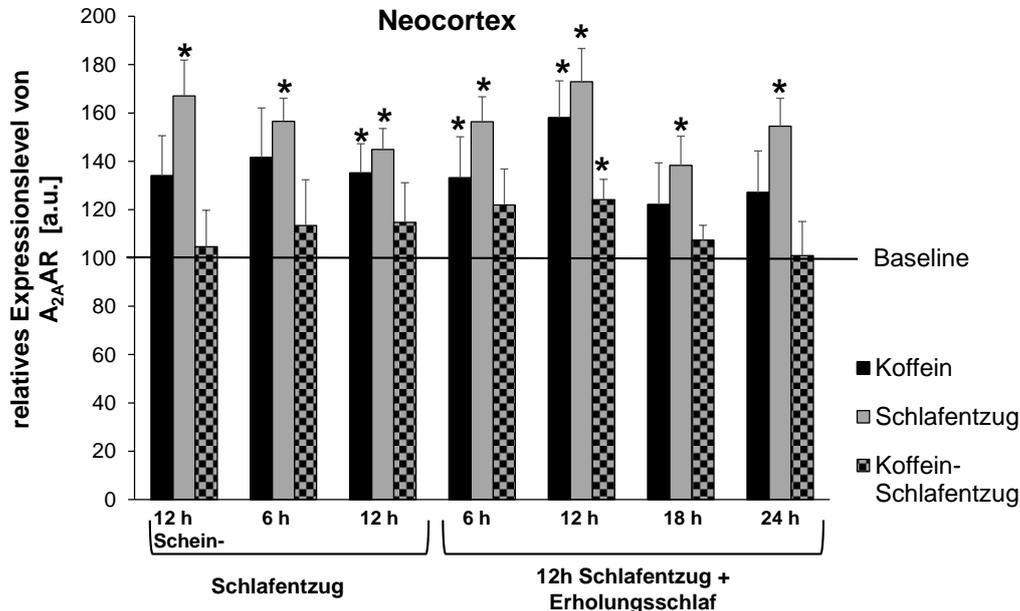


Abbildung 4.44: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A_{2A}AR im Neocortex

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Neocortex nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (n= 7 Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (p< 0,05/3, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

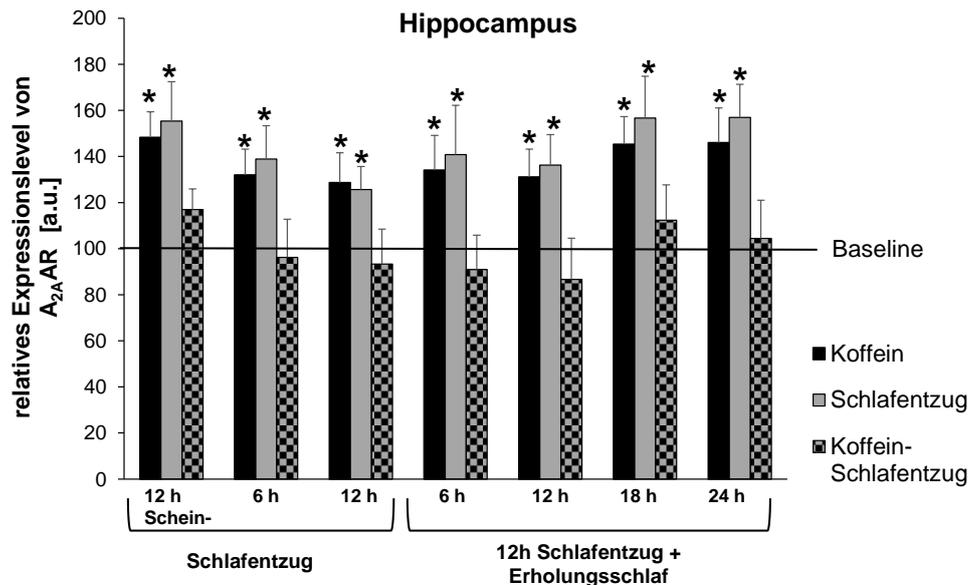


Abbildung 4.45: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A_{2A} -AR im Hippocampus

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A_{2A} AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Hippocampus nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt ($n=7$ Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

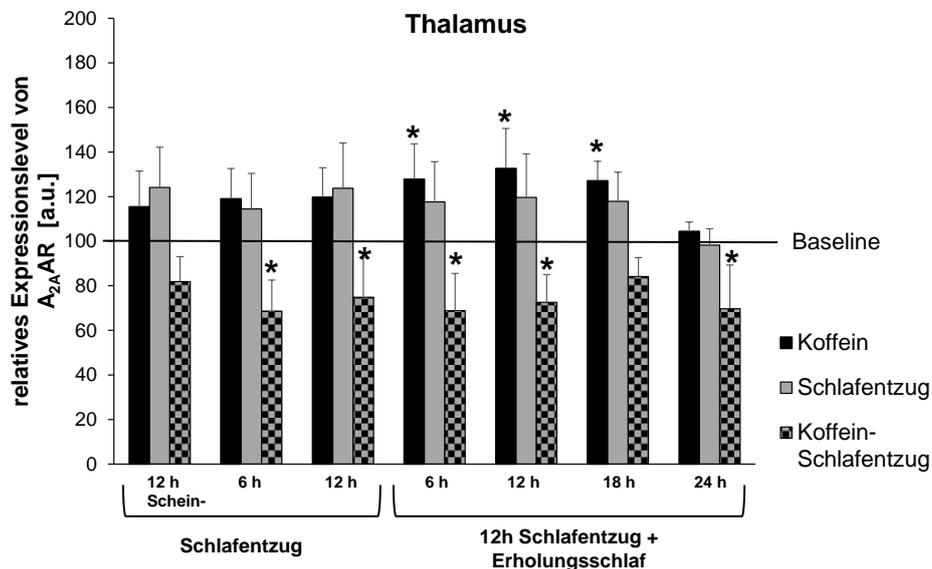


Abbildung 4.46: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A_{2A} -AR im Thalamus

Dargestellt werden die relativen Expressionslevel des A_{2A} AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) im Thalamus nach chronischem Koffeinkonsum und/oder Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt ($n=7$ Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. ($p < 0,05/3$, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Zusammenfassend ist in Abbildung 4.47 ein Vergleich aller untersuchten Regionen und Versuchsgruppen repräsentativ für den 12-stündigen Schlafentzug dargestellt.

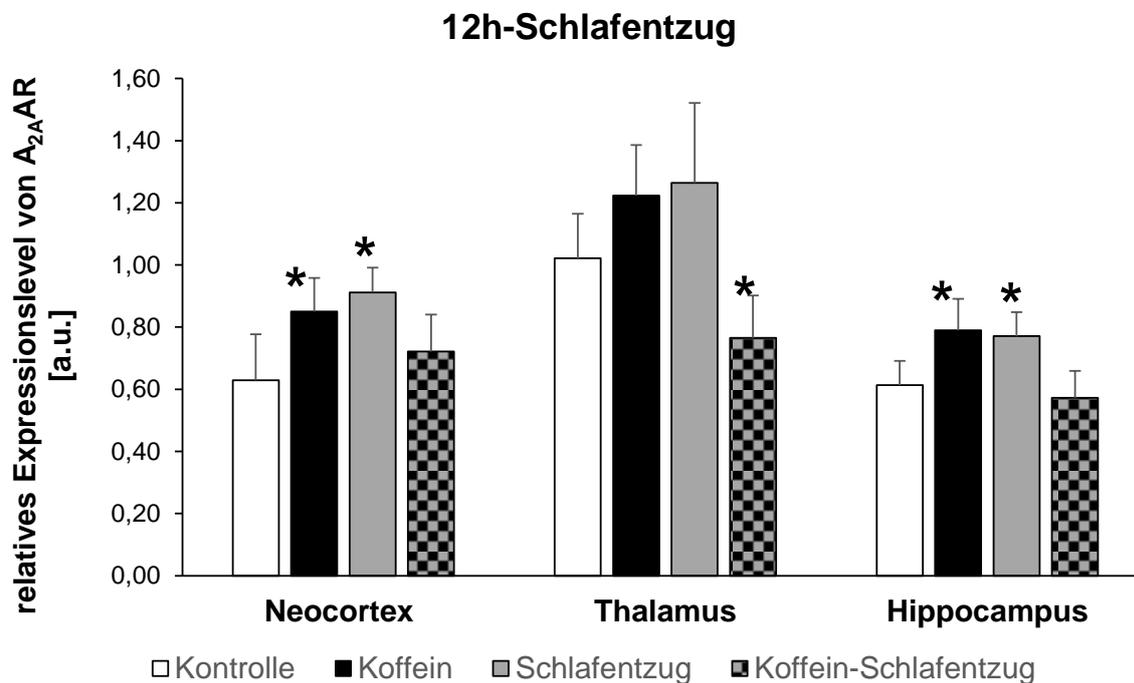


Abbildung 4.47: Einfluss von chronischem Koffeinkonsum und/oder 12 h Schlafentzug auf das relative Expressionslevel von A_{2A}AR

Dargestellt wird das relative Expressionslevel des A_{2A}AR (normalisiert auf das Expressionslevel von α -Tubulin) in Neocortex, Hippocampus und Thalamus nach chronischem Koffeinkonsum und/oder 12 h Schlafentzug. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt (n= 7 Tiere pro Gruppe). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet. (p< 0,05/3, Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

5 Diskussion

5.1 Zirkadiane Veränderung der A₁AR- und A_{2A}AR-mRNA sowie der Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine

Der Neuromodulator Adenosin stellt eine der bedeutendsten schlafregulierenden Substanzen dar (Borbély und Tobler, 1989; Porkka-Heiskanen et al., 2002) und seine Konzentration weist einen zirkadianen Verlauf auf (Chagoya de Sanchez et al., 1993; Huston et al., 1996). Folglich stellt sich die Frage, ob auch die Gesamtexpression der dazugehörigen Rezeptoren, über die Adenosin seine neuromodulatorischen Eigenschaften im ZNS ausübt (Fredholm et al., 2001a), einer zirkadianen Regulation unterliegt. Daher wurde in diesem Studienteil die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR zu definierten Zeiten im Verlauf von Tag und Nacht untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten *in vitro* mittels Western Blot in Neocortex, Thalamus und Hippocampus der Ratte. Da es in der Literatur bisher auch keine Untersuchungen der Rezeptor-mRNA gibt, wurde diese ergänzend mittels real-time PCR im Neocortex analysiert. Für die A₁AR-mRNA konnten im Verlauf von 36 h keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Das Expressionslevel war über den gesamten Zeitraum stabil. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die A₁AR-mRNA keinen zirkadianen Einflüssen unterliegt bzw. in einem engen Rahmen reguliert wird. Für die Gesamtexpression des A₁AR-Proteins zeigten sich weder im Neocortex noch im Hippocampus oder Thalamus signifikante tageszyklische Veränderungen. Im Gegensatz dazu zeigten sich, abhängig von der Hell- und Dunkelphase, Unterschiede in der Expression der A_{2A}AR-mRNA. Innerhalb der Hellphase (07:00 Uhr) sank die A_{2A}AR-mRNA bis zu einem Minimum in der Mitte der Phase (13:00 Uhr, Z_{0+6h}) ab. Danach stieg das A_{2A}AR-mRNA-Level über den Lichtwechsel (19:00 Uhr) bis zu einem Maximum in der Mitte der Dunkelphase (01:00 Uhr, Z_{0+18h}) hinein an, während danach ein erneutes Absinken beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 4.26). Da die untersuchten zirkadianen Zeitpunkte an das Versuchsdesign der Schlafentzugsstudie angepasst wurden, gab es eine Dopplung von Zeitpunkten. Unter anderem wurde auch die Mitte der Hellphase zweimal untersucht (Z_{0+6h}, Z_{0+30h}). Zu beiden Zeitpunkten konnte ein Minimum der A_{2A}AR-mRNA festgestellt werden. Die Differenz zwischen dem Minimum (13:00 Uhr, Z_{0+6h}, Z_{0+30h}) und dem Maximum (01:00 Uhr, Z_{0+18h}) der A_{2A}AR-mRNA betrug über 60 %. Die anschließende statistische Analyse zeigte allerdings, dass dieser Unterschied nicht signifikant war. Wie bereits erwähnt, sind Ratten nachtaktive Tiere

und gehören zu den polyphasischen Schläfern (Fleshner et al., 2011), d. h. die Tiere haben unterschiedlich lange über den Tag (Lichtphase) verteilte Schlafphasen, die interindividuell ebenfalls unterschiedlich sein können. Die fehlende Signifikanz ist möglicherweise genau auf diese interindividuellen Schwankungen der untersuchten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt zurückzuführen und könnte durch eine Erhöhung der Stichprobengröße behoben werden. Für die Gesamtexpression der A_{2A}AR konnte analog zum A₁AR ebenfalls in keiner der untersuchten Gehirnregionen eine signifikante tageszyklische Veränderung festgestellt werden.

Die bisherigen Studien, die den A₁AR und den A_{2A}AR im zirkadianen Verlauf untersuchen, beziehen sich ausschließlich auf die membrangebundenen Rezeptoren und weisen inkonsistente Befunde auf. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde sowohl für den A₁AR (kortikale Regionen, Striatum) als auch für den A_{2A}AR (Striatum) über eine 24-stündige Periode eine konstante Verfügbarkeit der membrangebundenen Rezeptoren gezeigt. Die Analyse erfolgte mit selektiven Antagonisten mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie (Oskamp et al., 2017) an Gehirnschnitten der Ratte. Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien eine zirkadiane Veränderung der membrangebundenen A₁AR und A_{2A}AR im Gehirn der Ratte und Maus beschrieben (Florio et al., 1991; Rosati et al., 1993; Virus et al., 1984). Für die Untersuchung wurden selektive Agonisten verwendet und Sättigungsstudien an Membran-Homogenaten durchgeführt. Sowohl Rosati *et al.* (1993) als auch Florio *et al.* (1991) beschrieben einen Anstieg der Rezeptordichte während der Dunkelphase (19:00 Uhr - 07:00 Uhr) und eine Abnahme während der Hellphase. Das Maximum der Rezeptordichte wurde in der zweiten Hälfte der Dunkelphase um 03:00 Uhr und das Minimum in der zweiten Hälfte der Schlafphase (Striatum: A₁AR und A_{2A}AR) um 15:00 Uhr bzw. gegen Ende der Schlafphase um 18:00 Uhr (Kortex: A₁AR) beobachtet. Der Verlauf ähnelt stark dem in der vorliegenden Arbeit festgestellten zirkadianen Verlauf der A_{2A}AR-mRNA. In allen bisherigen Studien wurde, wie bereits erwähnt, ausschließlich die zirkadiane Veränderung der membrangebundenen Rezeptoren untersucht, während im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung der Gesamtexpression der Rezeptoren unabhängig von ihrer Lokalisation in der Zelle erfolgte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR keiner zirkadianen Veränderung unterliegt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es zirkadiane Unterschiede zwischen intrazellulären und membrangebundenen Rezeptoren gibt. Dafür spricht auch der beobachtete zirkadiane, wenngleich auch nicht signifikante, Verlauf der A_{2A}AR-

mRNA. Zusammengefasst lässt die momentane Datenlage aufgrund der Anwendung verschiedener Techniken und der Untersuchung von teilweise verschiedenen Gehirnregionen keine eindeutige Aussage über die tageszyklische Veränderung und Regulation der Adenosinrezeptoren zu. Für zukünftige Untersuchungen könnte eine subzelluläre Fraktionierung der Gewebeproben nützlich sein, um eine Unterscheidung zwischen membrangebundenem und intrazellulärem Rezeptor mit der gleichen experimentellen Methodik zu ermöglichen.

5.2 Die Auswirkungen von Schlafentzug auf die A₁AR- und A_{2A}AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine

Wie bereits einleitend beschrieben (Kap. 1.3.3), induziert endogenes Adenosin nach Phasen verlängerten Wachseins den Einschlafprozess (Basheer et al., 2004; McCarley, 2007). Die schlafinduzierende Wirkung des Adenosins wird in erster Linie über den A₁AR (Landolt et al., 2012) vermittelt, wobei jüngste Befunde ebenfalls auf eine Beteiligung des A_{2A}AR hindeuten (Scammell et al., 2001). Die bisherigen Befunde zu schlafentzugsbedingten Veränderungen der Adenosinrezeptoren beziehen sich ausschließlich auf den A₁AR (Basheer et al., 2007; Elmenhorst et al., 2009; Elmenhorst et al., 2007) und deuten auf einen autarken Mechanismus zur Schlafregulation in neo- und subkortikalen Regionen hin (Elmenhorst et al., 2009). Um diesen Mechanismus weiter aufzuklären und einen direkten Vergleich zwischen dem A₁AR und dem A_{2A}AR zu ermöglichen, wurden in diesem Studienteil die Auswirkungen von Schlafentzug auf die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten *in vitro* mittels Western Blot in Neocortex, Thalamus und Hippocampus der Ratte. Darüber hinaus wurde im Neocortex zusätzlich die mRNA des A₁AR und des A_{2A}AR mittels real-time PCR analysiert.

Der Schlafentzug führte zu keiner signifikanten Veränderung der A₁AR-mRNA (vgl. Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu konnte nach einem 6-stündigen Schlafentzug eine signifikante Erhöhung der A_{2A}AR-mRNA festgestellt werden. Nach 12-stündigem Schlafentzug sank das A_{2A}AR-mRNA-Level wieder auf den Basiswert zurück und blieb über auch über den gesamten Erholungsschlaf unverändert (vgl. Abb. 4.30).

Die ersten 12 Stunden des Schlafentzuges wurden während der Dunkelphase der Tiere durchgeführt. Da Ratten nachtaktive Tiere sind und während dieser Phase nur ca. 35 % der Zeit schlafend verbringen (Basheer et al., 2007) stellt ein Schlafentzug während der Dunkelphase tatsächlich einen Scheinschlafentzug dar. Interessanterweise zeigte aber schon dieser 12-stündige Scheinschlafentzug während der aktiven Phase der Tiere in allen untersuchten Gehirnregionen einen Trend zur Hochregulierung des A₁AR- und des A_{2A}AR-Proteins, wobei dieser für den A₁AR in Thalamus und Hippocampus und für den A_{2A}AR in Neocortex und Hippocampus signifikant waren. Für beide Rezeptoren führte sowohl der 6- stündige als auch der 12-stündige Schlafentzug in Neocortex und Hippocampus zu einer Erhöhung des Proteinlevels, die weitestgehend über den gesamten Zeitraum des Erholungsschlafes aufrechterhalten blieb (vgl. Abb. 4.18 - 4.20 und Abb. 4.39 - 4.41). Der Trend zur Hochregulierung des A_{2A}AR im Thalamus war nicht signifikant.

Wie bereits erwähnt, beziehen sich die meisten Studien über den Einfluss von Schlafentzug auf das adenosinerge System in erster Linie auf den Neuromodulator Adenosin selbst und den A₁AR. Schlafentzug führt zu einem Anstieg in der Konzentration von endogenem Adenosin, welches vermittelt über den A₁AR u.a. durch Inhibierung wachaktiver Neurone im basalen Vorderhirn den Einschlafprozess induziert (Basheer et al., 2007; Basheer et al., 2004; Porkka-Heiskanen et al., 1997). Daneben konnte gezeigt werden, dass durch längeren Schlafentzug (> 6 h) ein zweiter Mechanismus ausgelöst wird, bei dem durch eine Hochregulation des A₁AR der inhibitorische Effekt von Adenosin auf wachaktive Neurone verstärkt und damit die Wiederherstellung der homöostatischen Bedingungen unterstützt wird (Basheer et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Hochregulierung des A₁AR nicht nur im basalen Vorderhirn, sondern auch in weiteren Gehirnregionen wie dem Kortex, Thalamus und Striatum auftritt (Elmenhorst et al., 2009) und somit auch andere Gehirnregionen an der Schlafregulation beteiligt sind. Der intrazelluläre Signalweg, durch die der schlafentzugsbedingte Anstieg des A₁AR ausgelöst wird, ist bisher nur für das basale Vorderhirn beschrieben. Unter Schlafentzug wird durch Adenosin eine Signalkaskade ausgelöst, die über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf-κB zuerst zu einem Anstieg der A₁AR-mRNA, gefolgt von einem Anstieg des A₁AR, führt. Diese Signalkaskade scheint auf die Neurone des basalen Vorderhirns begrenzt zu sein (Basheer et al., 2007; McCarley, 2007). Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorheriger Studien (Basheer et al., 2001), konnte in dieser Doktorarbeit im Neocortex

kein Anstieg der A₁AR-mRNA unter Schlafentzug beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass außerhalb des basalen Vorderhirns die Hochregulierung des A₁AR einer anderen Signalkaskade unterliegt. Die Ergebnisse für das A₁AR-Protein zeigen, dass Schlafentzug, wie bereits von Elmenhorst *et al.* (2009) beschrieben, nicht nur zu einer Hochregulierung der membrangebundenen A₁AR führt, sondern auch die Gesamtexpression des A₁AR ansteigt. Während mittels PET im Thalamus ein signifikanter Anstieg der A₁AR-Rezeptordichte von 11 % und in kortikalen Regionen von 9 % zu beobachten war (Elmenhorst *et al.*, 2009), konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg der A₁AR Gesamtexpression von ca. 50 % im Neocortex und von ca. 30 % im Thalamus gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass unter Schlafentzug sowohl die Anzahl membrangebundener Rezeptoren als auch die Zahl der Rezeptoren im Zellinneren zunimmt. Der signifikante Anstieg der Gesamtexpression des A₁AR trat in dieser Arbeit bereits nach einem sechsständigen Schlafentzug auf, während ein Anstieg der membrangebundenen Rezeptoren im basalen Vorderhirn erst nach einem 24-stündigem Schlafentzug beobachtet werden konnte (Basheer *et al.*, 2007; Elmenhorst *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass unter Schlafentzug zunächst die Zahl der intrazellulären A₁AR zunimmt und erst ein länger andauernder Schlafentzug zur Translokation der Rezeptoren und zum Einbau in die Zellmembran führt.

Interessanterweise führte ein 24-stündiger Schlafentzug im Hippocampus nur zu einer nicht-signifikanten Hochregulierung der membrangebundenen Rezeptoren, während in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg der Gesamtproteinexpression von ca. 100 % beobachtet werden konnte. Wie bereits einleitend erwähnt, beeinträchtigen Schlafmangel und Schlafentzug kognitive Fähigkeiten wie Lernen (Drummond *et al.*, 2000) und die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses (Stickgold, 2005) und dabei besonders die hippocampusabhängige Gedächtnisbildung (Guan *et al.*, 2004; Vecsey *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch eine Inhibierung der glialen Freisetzung von ATP und dessen Umwandlung zu Adenosin als auch durch eine Inhibierung des A₁AR die schlafentzugsbedingten Effekte auf die Gedächtnisbildung und die synaptische Plastizität im Hippocampus verhindert werden können (Florian *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse suggerieren, dass astrozytisches ATP und die Aktivierung von A₁AR an den durch Schlafmangel hervorgerufenen kognitiven Beeinträchtigungen im Hippocampus beteiligt sein könnten. Die Aktivierung von A₁AR führt zur Inhibierung der Adenylatcyclase und zu einer Verringerung der cAMP-Synthese (Landolt *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass kognitive Beeinträchtigungen im Hippocampus

teilweise durch eine Abschwächung des cAMP-Signalwegs hervorgerufen werden (Havekes et al., 2014; Vecsey et al., 2009), für die die Aktivierung der A₁AR mitverantwortlich sein könnte. Möglicherweise ist der in diese Arbeit beobachtete Anstieg der A₁AR Gesamtproteinexpression notwendig, um einer durch Adenosin hervorgerufenen Rezeptorinternalisierung entgegenzuwirken (Gainetdinov et al., 2004) und die Sensitivität der Zellen für Adenosin über die gesamte Dauer des Schlafentzuges aufrechtzuerhalten.

Die Erhöhung der A₁AR-Gesamtproteinexpression blieb in allen untersuchten Gehirnregionen für die Dauer des bis zu 18-stündigen Erholungsschlafes bestehen. Bisher wurden die Auswirkungen von Erholungsschlaf nach Phasen verlängerten Wachseins auf den A₁AR nur im Menschen untersucht. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass im Menschen die nach Schlafentzug auftretende erhöhte Verfügbarkeit membrangebundener A₁AR nach einer Nacht des Erholungsschlafes nicht mehr zu beobachten ist (Elmenhorst et al., 2017). Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass das erhöhte Rezeptorlevel nach dem Erholungsschlaf auf die intrazellulären A₁AR zurückzuführen ist. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Bisher gibt es nur eine weitere, uns bekannte Studie, die die Auswirkungen von Schlafentzug auf den A_{2A}AR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ein dreistündiger als auch ein 6-stündiger Schlafentzug zu einer signifikanten Abnahme der A_{2A}AR-mRNA und darüber hinaus ein 3-stündiger Schlafentzug auch zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptorbindung im Riechkolben der Ratte führten (Basheer et al., 2001). Wie bereits einleitend beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der Riechkolben der Ratte eine Rolle bei der Regulation des REM-Schlafes spielen könnte und A_{2A}ARs an dieser Regulation beteiligt sind (Wang et al., 2017; Wang et al., 2012). Eine Inhibierung des A_{2A}AR im Riechkolben der Ratte mit dem selektiven Antagonisten SCH58261 führte zu einer Erhöhung des REM-Schlafes, während durch Aktivierung des A_{2A}AR mit dem selektiven Agonisten CGS21680 der REM-Schlaf unterdrückt werden konnte (Wang et al., 2017). Eine Erhöhung des REM-Schlafes konnte darüber hinaus auch in A_{2A}AR-defizienten Mäusen beobachtet werden. Die während des Schlafentzuges beobachtete Abnahme der A_{2A}AR-mRNA und die damit einhergehende Abnahme der Rezeptorbindung könnten einer Aktivierung der A_{2A}AR entgegenwirken und somit eine Unterdrückung des REM-Schlafes während des

Erholungsschlafes vorbeugen. Im Striatum konnte keine Veränderung der $A_{2A}AR$ -mRNA oder der Rezeptorbindung festgestellt werden (Basheer et al., 2001).

Wie in Kapitel 1.3.3 dargestellt, ist der $A_{2A}AR$ nicht nur an der schlafinduzierenden Wirkung von Adenosin, sondern auch an der schlafinduzierenden Wirkung von PDG2 beteiligt. PDG2 akkumuliert, wie Adenosin, während des Wachseins und induziert Schlaf durch eine über Prostaglandin D_2 -Rezeptoren vermittelte Freisetzung von Adenosin (Huang et al., 2007; Urade und Hayaishi, 2011). Das freigesetzte Adenosin wirkt als Schlaffaktor, indem es $A_{2A}AR$ -exprimierende schlafaktive Neurone aktiviert und A_1AR -exprimierende wachaktive Neurone inhibiert (Urade und Hayaishi, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Schlafentzug nicht nur zu einer erhöhten Freisetzung von Adenosin, sondern auch zu einem Anstieg von PDG2 in der Zerebrospinalflüssigkeit von Ratten führt und mit einer erhöhten Schlafbereitschaft einhergeht (Ram et al., 1997). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Gesamtexpression des $A_{2A}AR$ im Neocortex und Hippocampus der Ratte eine Sensitivität für Schlafentzug aufweist. In beiden Regionen konnte nach Schlafentzug eine signifikant erhöhte Expression des $A_{2A}AR$ festgestellt werden, die auch nach einer 24-stündigen Erholungsphase noch aufrechterhalten wurde. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass neben dem A_1AR auch der $A_{2A}AR$ an der schlafinduzierenden Wirkung des Adenosins nach verlängertem Wachsein beteiligt ist (Urry und Landolt, 2015). Auch im Thalamus konnte ein Trend zu einer erhöhten Rezeptorexpression festgestellt werden, der allerdings nicht signifikant war. Eine Erklärung mag darin liegen, dass die schlafentzugsbedingte Ansprechrate der $A_{2A}AR$ -Expression in den unterschiedlichen Regionen variiert. Für den A_1AR konnte gezeigt werden, dass unter Schlafentzug die Zahl der membrangebundenen Rezeptoren im basalen Vorderhirn, im Thalamus, im Striatum und in kortikalen Regionen hochreguliert wird, während andere Regionen, wie beispielsweise das Zerebellum, der Hippocampus und das Zingulum, unverändert blieben (Basheer et al., 2007; Elmenhorst et al., 2009). Auch für die Adenosinkonzentration konnten im Zingulum von Ratten keine schlafentzugsbedingten Veränderungen festgestellt werden (Kalinchuk et al., 2011). Im Thalamus von Katzen zeigte sich nach 3-stündigem Schlafentzug ebenfalls keine Änderung der Adenosinwerte, während im frontalen Kortex ein Anstieg des Adenosins um ca. 30 % gegenüber dem physiologischen Pegel zu beobachten war (Porkka-Heiskanen et al., 2000). Mögliche schlafentzugsbedingte Veränderungen von Adenosin in Neocortex, Hippocampus und Thalamus von Ratten wurden bislang noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde die schlafentzugsbedingte Hochregulierung der Gesamtexpression des A_{2A}AR gezeigt. Für eine detailliertere Aufklärung wäre, wie für den A₁AR bereits durchgeführt, auch eine Untersuchung der membrangebundenen A_{2A}AR mittels PET oder Rezeptorautoradiographie interessant. Neben einer erhöhten Gesamtexpression des A_{2A}AR führte ein 6-stündiger Schlafentzug im Neocortex auch zu einem signifikanten Anstieg der A_{2A}AR-mRNA. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der den Effekten des Schlafentzuges bereits auf der Transkriptionsebene entgegengewirkt und bereits in ähnlicher Weise für den A₁AR im basalen Vorderhirn beschrieben wurde (Basheer et al., 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl der A₁AR als auch der A_{2A}AR sensitiv auf den Schlafentzug reagieren. Dabei konnten für die Gesamtexpression beider Rezeptoren regionenspezifische Unterschiede gezeigt werden. Tendenziell zeigt die Gesamtexpression des A₁AR in den untersuchten Regionen eine größere Ansprechbarkeit auf Schlafentzug als die Gesamtexpression des A_{2A}AR. Inwieweit dies auch auf die membrangebundenen Rezeptoren zutrifft, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3 Die Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation auf die A₁AR- und A_{2A}AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine

Das Neurostimulans Koffein übt seine anregende Wirkung auf das Zentralnervensystem primär über eine Antagonisierung der Adenosinrezeptoren aus. Dabei zeigen besonders der A₁AR und der A_{2A}AR eine hohe Affinität für Koffein (Fredholm et al., 1999; Ribeiro und Sebastiao, 2010). Für die Untersuchung der molekularen zerebralen Wirkungen einer chronischen Koffeinapplikation im Hinblick auf eine Interaktion mit der physiologischen Schlaf-Wach-Regulation stellen daher diese beiden Rezeptorsubtypen wichtige Zielstrukturen dar. Die bisher publizierten Studien zu koffeinbedingten Veränderungen des A₁AR bzw. des A_{2A}AR beziehen sich in erster Linie auf die membrangebundenen Rezeptoren und weisen inkonsistente Befunde auf (Boulenger et al., 1983; Chou et al., 1985; Georgiev et al., 1993; Johansson et al., 1993; Johansson et al., 1997; Shi et al., 1993). Darüber hinaus erfolgte bei diesen Studien keine differenzierte Betrachtung in Bezug auf die Schlaf- und Wachphase der Tiere. Aus diesem Grund wurden in diesem Studienteil die Auswirkungen einer chronischen

Koffeinapplikation auf das Tagesprofil der Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten *in vitro* mittels Western Blot in Neocortex, Thalamus und Hippocampus der Ratte. Darüber hinaus wurde im Neocortex zusätzlich die mRNA des A₁AR und des A_{2A}AR mittels real-time PCR analysiert.

Eine chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg Körpergewicht/d über einen Zeitraum von 12 Wochen führte zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Veränderung der A₁AR-mRNA im Neocortex (vgl. Abb. 4.7) Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den bisherigen Befunden in Bezug auf den Einfluss einer chronischen Koffeingabe auf den A₁AR, in denen ebenfalls keine Veränderung der A₁AR-mRNA festgestellt werden konnte (Espinosa et al., 2013; Johansson et al., 1993; Johansson et al., 1997) und unterstützen die Vermutung, dass Koffein keinen Einfluss auf die Transkription des A₁AR-Gens ausübt (Johansson et al., 1993). In Bezug auf die Gesamtexpression des A₁AR-Proteins zeigten sich regionenspezifische Unterschiede. Während durch die chronische Koffeinapplikation im Neocortex keine signifikante Veränderung der Gesamtexpression des A₁AR im Vergleich zur Kontrollgruppe hervorgerufen wurde, führte die Koffeinbehandlung im Hippocampus zu einer signifikanten Hochregulierung der Gesamtexpression (vgl. Abb. 4.15 und 4.16).

Interessanterweise wurde im Thalamus nur während der Hellphase, also der hauptsächlichlichen Schlafphase der Tiere, eine signifikante Erhöhung der Gesamtexpression festgestellt. Es konnte bei Katzen gezeigt werden, dass durch eine chronische Koffeinapplikation die Architektur des Schlafes verändert wird (Sinton und Petitjean, 1989). Obwohl die anfängliche durch Koffein hervorgerufene Erhöhung der Wachheit der behandelten Tiere während der Dauer der Behandlung wieder auf das Kontrolllevel zurückfiel, zeigten die behandelten Tiere bis zum Ende der dreiwöchigen Koffeinbehandlung eine verkürzte Tiefschlaf- und eine verlängerte Leichtschlafphase. Der gleiche Effekt wurde nach einer akuten Koffeingabe auch für Ratten beschrieben (Yanik et al., 1987). Der Thalamus spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Tiefschlafphase (Steriade, 2003; Steriade et al., 1991). Vor diesem Hintergrund deutet die festgestellte Hochregulierung des A₁AR im Thalamus während der eigentlichen Schlafphase der Tiere darauf hin, dass diese für Auswirkung des Koffeins auf die Architektur des Schlafes eine Rolle spielen könnte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Ansprechrate der A₁AR- Gesamtexpression auf die chronische Koffeinbehandlung abhängig von der Gehirnregion variiert. Diese Unterschiede wurden im vorangegangenen Kapitel auch in Bezug auf die Auswirkungen von Schlafentzug auf die Gesamtexpression der Adenosinrezeptoren festgestellt. In früheren Studien wurde bereits regionenspezifisch ein unterschiedliches Ansprechen der membrangebundenen A₁AR sowie der Adenosinkonzentration auf die chronische Koffeinapplikation beobachtet (Hawkins et al., 1988; Marangos et al., 1984; Nabbi, 2016; Wu und Coffin, 1984). Für die A_{2A}AR-mRNA führte die chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg Körpergewicht/d über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer Erhöhung in der Mitte der Hellphase (13:00 Uhr), während zu den anderen untersuchten Zeitpunkten keine Veränderung der A_{2A}AR-mRNA im Neocortex festgestellt werden konnte. (vgl. Abb. 4.28). Da die untersuchten zirkadianen Zeitpunkte an das Versuchsdesign der Schlafentzugsstudie angepasst wurden, gab es, wie bereits in Kapitel 5.1.1 erläutert, eine Dopplung von Zeitpunkten. Unter anderem wurde auch die Mitte der Hellphase zweimal untersucht (Z_{0+6h}, Z_{0+30h}). Zu beiden Zeitpunkten konnte eine Erhöhung der A_{2A}AR-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, die allerdings nur für den Zeitpunkt Z_{0+6h} signifikant war. Ein Zusammenfassen der jeweils gleichen zirkadianen Zeitpunkte zeigte eine signifikante Erhöhung der A_{2A}AR-mRNA in der Mitte der Hellphase (vgl. Abb. 4.29). Wie bereits für die zirkadianen Effekte auf die A_{2A}AR-mRNA beschrieben, könnte die fehlende Signifikanz beim zweiten Zeitpunkt auf interindividuelle Schwankungen der untersuchten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt zurückzuführen sein. Diese könnte möglicherweise, wie das Zusammenfassen der Zeitpunkte andeutet, durch eine Erhöhung der Stichprobengröße ausgeglichen werden.

Bisher wurden mögliche Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation auf die A_{2A}AR-mRNA noch in zwei weiteren Studien untersucht, dabei konnten im Striatum (1 g/L, 14 Tage) und im Hippocampus (1 g/L, 28 Tage) keine Veränderungen der A_{2A}AR-mRNA festgestellt werden (Espinosa et al., 2013; Johansson et al., 1993). Zur Erklärung dieser abweichenden Befunde können verschiedene Aspekte diskutiert werden: Zum einen erfolgte die Koffeinapplikation in den Studien von Johansson *et al.* (1993) und Espinosa *et al.* (2013) über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen, während in der vorliegenden Arbeit die Behandlung 85 Tage andauerte. Möglicherweise ist daher zur Beobachtung eines Effektes ein längerer Behandlungszeitraum mit Koffein nötig. Laut Sengupta (2013) würden 14 Tage etwa 1 1/2 Lebensjahren und 28 Tage ca. 3

Lebensjahren beim Menschen entsprechen, während der hier untersuchte Zeitraum beim Menschen ca. 9 Lebensjahren entsprechen würde (Sengupta, 2013). Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch das Alter der Tiere für die Untersuchung der Auswirkungen einer chronischen Koffeinaufnahme eine Rolle spielt. Die von Johansson *et al.* (1993) verwendeten Tiere waren zum Zeitpunkt der Tötung ca. 230 g schwer, während die hier verwendeten Tiere am Ende der Studie mehr als doppelt so schwer waren. Nach Sengupta macht dieser Gewichtsunterschied einen Altersunterschied von ca. 5 Monaten aus (Sengupta, 2013). Neben den Unterschieden bezüglich des Behandlungszeitraums und des Alters der Tiere könnte auch der Zeitpunkt der Untersuchung eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer chronischen Koffeinbehandlung auf die Adenosinrezeptoren zu vier verschiedenen zirkadianen Zeitpunkten untersucht. Ein Effekt auf die A_{2A}AR-mRNA konnte, wie bereits beschrieben, nur zu einem dieser Zeitpunkte festgestellt werden. In den anderen beiden Studien wurde die Untersuchung der A_{2A}AR mRNA lediglich zu einem Zeitpunkt durchgeführt. Ob die Tötung der Tiere dabei immer zur exakt gleichen Zeit stattgefunden hat, geht aus den publizierten Daten nicht hervor. Es ist denkbar, dass die chronische Koffeinbehandlung zu einer dauerhaften Veränderung der zirkadianen Regulation des A_{2A}AR führt. Diese Veränderung kann durch den direkten Vergleich von koffeinbehandelten und unbehandelten Tieren ohne Differenzierung nach exakten Zeitpunkten nicht abgebildet werden. Hinzu kommt, dass in den Studien jeweils andere Gehirnregionen untersucht wurden. Wie bereits erwähnt, wurde auch für den A₁AR und Adenosin ein unterschiedliches regionenspezifisches Ansprechen auf die Behandlung mit Koffein festgestellt (Hawkins *et al.*, 1988; Marangos *et al.*, 1984; Nabbi, 2016; Wu und Coffin, 1984).

Das Ergebnis dieser Arbeit ist ein erstes Anzeichen dafür, dass die koffeinbedingte Hochregulierung der A_{2A}AR-Gesamtexpression durch ein erhöhtes mRNA-Level hervorgerufen wird und dass eine chronische Koffeinbehandlung Auswirkungen auf die transkriptionelle Regulation des A_{2A}AR haben könnte. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Veränderung der A_{2A}AR-mRNA im Neocortex der Ratte untersucht. Die Untersuchung weiterer Regionen könnte ein Ziel zukünftiger Studien sein.

In Bezug auf die Gesamtexpression des A_{2A}AR-Proteins konnten wie für den A₁AR regionenspezifische Unterschiede festgestellt werden, wenngleich diese im Vergleich zum A₁AR geringer ausfielen. Im Neocortex führte die Koffeinbehandlung grundsätzlich

zu einer Erhöhung der Gesamtexpression des A_{2A}AR (vgl. Abb. 4.36), allerdings hielt die Überprüfung aller untersuchten Zeitpunkte nicht der anschließenden Bonferroni-Korrektur stand (Tab. 4.17). Die fehlende Signifikanz könnte, wie bereits für die mRNA erläutert, auf interindividuelle Unterschiede bei den untersuchten Tieren zum jeweiligen Zeitpunkt zurückzuführen sein, die durch das Zusammenfassen der jeweils gleichen zirkadianen Zeitpunkte kaschiert würde (Abb. 4.37). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung Gesamtexpression unabhängig vom untersuchten Zeitpunkt von mehr als 30 %. Im Hippocampus war die Gesamtexpression des A_{2A}AR ebenfalls signifikant um über 30 % hochreguliert. Im Thalamus konnte eine signifikante Erhöhung des A_{2A}AR nur in der Mitte der Hell- bzw. Dunkelphase festgestellt werden. Interessanterweise zeigten sich im Thalamus nach chronischer Koffeinapplikation, wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erläutert, auch in Bezug auf die Veränderung der Gesamtexpression des A₁AR tageszeitabhängige Unterschiede. Inwieweit diese Veränderungen eine Rolle für die koffeinbedingten Auswirkungen auf die Architektur des Schlafes spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Auswirkung einer chronischen Koffeinbehandlung auf die Gesamtexpression des A₁AR und A_{2A}AR wurde bislang nur in einer weiteren Studie im Hippocampus von Ratten untersucht. In dieser Studie konnten keine signifikanten Veränderungen des A₁AR bzw. des A_{2A}AR nach chronischer Koffeingabe festgestellt werden (Espinosa et al., 2013). Die verabreichte Koffeinmenge führte zu einer Koffeinplasmakonzentration von ca. 30 µM. Auch in der vorliegenden Studie wurde der Koffeinspiegel im Blutplasma einiger Tiere untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.1 dargestellt:

Tabelle 5.1: Koffeinplasmaspiegel zu Beginn der Hell- bzw. Dunkelphase

Zeitpunkt	Koffein-Plasmaspiegel	
	µg/µl	µmol
07:00 Uhr	6,29 ± 1,50	32,41
19:00 Uhr	0,29 ± 0,22	1,47

Der Koffeinspiegel betrug am Ende der Dunkelphase (Aktivphase) 6,29 ± 1,50 µg/mL, was einer Konzentration von ca. 32,41 µmol entspricht. Weiterhin zeigen die Daten, dass der Koffeinspiegel während des Tages, also während der primären Schlafphase der Tiere, abnimmt, was in Einklang mit den Daten der Koffeinstudie von Johansson *et al.* (1996) steht. Da die Koffeinkonzentration in der vorliegenden Arbeit denen der Studie

von Espinosa et al. (2013) sehr ähnlich ist, könnte die Ursache für die abweichenden Beobachtungen in der Behandlungsdauer begründet liegen. Wie bereits für die A_{2A}AR-mRNA erwähnt, verabreichten Espinosa *et al.* (2013) das Koffein über einen Zeitraum von 28 d, während der Behandlungszeitraum in dieser Arbeit 85 d betrug. Möglicherweise führt erst ein längerer Behandlungszeitraum zu einer dauerhaften Veränderung der Adenosinrezeptor-Gesamtexpression.

Die Ergebnisse der bisherigen Studien zu den Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation auf die membrangebundenen Adenosinrezeptoren weisen, wie bereits erwähnt, inkonsistente Befunde auf. Für die Ratte konnte nach 12 bis 28-tägiger Koffeinbehandlung mit hohen Dosen von ≥ 75 mg/kg Körpergewicht/d generell eine Hochregulierung der A₁AR-Rezeptordichte im Vorderhirn, Kortex, Zerebellum und Thalamus beobachtet werden (Green und Stiles, 1986; Hawkins et al., 1988; Ramkumar et al., 1988; Wu und Coffin, 1984). Im Hippocampus hingegen stellten Johansson *et al.* (1993) bei einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht/d eine Hochregulation der membrangebundenen A₁AR fest, während in der Studie von Hawkins *et al.* (1988) eine Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht/d zu keiner Veränderung führte. Die gleichen Studien führten für die membrangebundenen A_{2A}AR im Striatum zum umgekehrten Ergebnis. Johansson *et al.* (1993) konnten eine Hochregulierung des A_{2A}AR beobachten, während Hawkins *et al.* (1988) keine Veränderung feststellen konnten. In diesen Studien wurden Koffeindosen verwendet, die einem humanen Kaffeekonsum von mehr als 10 Tassen pro Tag entsprechen. Der Behandlungszeitraum dauerte in allen bisherigen Studien maximal 28 Tage. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl der A₁AR als auch der A_{2A}AR auf die dreimonatige chronische Koffeinbehandlung ansprechen. Dabei konnten für die Gesamtexpression beider Rezeptoren regionenspezifische Unterschiede gezeigt werden. Tendenziell zeigt die Gesamtexpression des A_{2A}AR eine größere Ansprechbarkeit auf Koffein als die Gesamtexpression des A₁AR. Inwieweit dies auch auf die membrangebundenen Rezeptoren zutrifft, bedarf weiterer Untersuchungen.

Weiterhin legen die Ergebnisse nahe, dass Koffein in Bezug auf die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR, zumindest teilweise, die Effekte anhaltender Wachheit imitiert. Insbesondere im Hippocampus konnte sowohl unter Schlafentzug als auch unter chronischer Koffeingabe eine Hochregulierung der Gesamtexpression beider Rezeptoren beobachtet werden. Für den A_{2A}AR war dies auch im Neocortex der Fall.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass auch in Bezug auf Adenosin selbst eine chronische Koffeingabe zu einer erhöhten Adenosinkonzentration führt, wie sie auch unter Schlafentzug beobachtet werden konnte (Kalinchuk et al., 2011; Nabbi, 2016). Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, wird unter Schlafentzug durch den Anstieg der Adenosinkonzentration der homöostatische Schlafdruck erhöht und der notwendige Erholungsschlaf ausgelöst. Durch die Hochregulierung des A₁AR und des A_{2A}AR wird die Wiederherstellung der homöostatischen Bedingungen unterstützt.

Wie bereits beschrieben, scheint der chronische Koffeinkonsum zu Gewöhnungseffekten zu führen. Beispielsweise konnte bei gewohnheitsmäßigen Kaffeetrinkern keine signifikante Veränderung der Schlafdauer und des Schlafrhythmus beobachtet werden (Colton et al., 1968; Curatolo und Robertson, 1983). Möglicherweise sind die nach chronischem Koffeinkonsum beobachtete erhöhte Adenosinkonzentration und die Hochregulierung der Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR für diese Gewöhnungseffekte mitverantwortlich und notwendig, um auch unter chronischem Koffeinkonsum die homöostatische Schlaf-Wach-Regulation aufrechtzuerhalten.

5.4 Die Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die A₁AR- und A_{2A}AR-mRNA sowie die Gesamtexpression der entsprechenden Rezeptorproteine

Schlafentzug führt zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit und beeinträchtigt das Lernen und die Gedächtnisbildung (Drummond et al., 2000; Ferrara et al., 2008; Kim et al., 2005; Lo et al., 2016; Vecsey et al., 2009; Yoo et al., 2007). Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass diesen, durch Schlafentzug hervorgerufenen, Beeinträchtigungen durch den chronischen Konsum von Koffein in moderaten Dosen teilweise entgegengewirkt werden kann (Alhaider et al., 2011; Alhaider et al., 2010b). Darüber hinaus mildert Koffeinkonsum während eines Schlafentzugs den Aufbau des Schlafdruckes ab und verändert die Architektur des Erholungsschlafes (Landolt et al., 2004; Schwierin et al., 1996; Wurts und Edgar, 2000). Die molekularen Mechanismen, die diesen Eigenschaften von Koffein zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig bekannt. Koffein übt seine Wirkung in Dosen, die einem normalen Koffeinkonsum von 3-5 Tassen im Menschen entsprechen, primär über eine Antagonisierung der Adenosinrezeptoren aus (Fredholm, 1995). Aus diesem Grund wurden in diesem

Studienteil die Auswirkungen einer chronischen Koffeinapplikation und Schlafentzug auf die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten *in vitro* mittels Western Blot in Neocortex, Thalamus und Hippocampus der Ratte. Darüber hinaus wurde im Neocortex zusätzlich die mRNA des A₁AR und des A_{2A}AR mittels real-time PCR analysiert.

Sowohl der A₁AR als auch der A_{2A}AR zeigten nach der kombinierten Anwendung von chronischer Koffeingabe und Schlafentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe weitestgehend keine Veränderung (vgl. Abb. 4.9; Abb. 4.22 - Abb. 4.25; Abb. 4.31 und Abb. 4.44 - Abb. 4.46). Die zuvor dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass beide Rezeptorsubtypen sensitiv auf die alleinige Anwendung von Schlafentzug bzw. chronischer Koffeingabe reagieren. Sowohl der Schlafentzug als auch die chronische Koffeingabe führten abhängig von der untersuchten Gehirnregion zu einer Hochregulierung der Gesamtexpression beider Rezeptoren. Dabei zeigte beispielsweise im Thalamus der A₁AR im Vergleich zum A_{2A}AR eine größere Ansprechbarkeit auf Schlafentzug, während im Neocortex nur der A_{2A}AR auf die chronische Koffeinbehandlung ansprach. Durch die Kombination von Schlafentzug mit vorhergehender und fortdauernder chronischer Koffeingabe werden die Effekte der Einzelinterventionen (Schlafentzug oder chronische Koffeingabe) aufgehoben. Lediglich zum Zeitpunkt Z_{0+24h} (12h Erholungsschlaf) konnte für den A₁AR (+ 40 %) im Thalamus und für den A_{2A}AR (+ 25 %) im Neocortex noch eine signifikante Hochregulierung der Gesamtexpression festgestellt werden. Diese fiel jedoch im Vergleich zu den Einzelinterventionen (A₁AR: + 125 % (Schlafentzug); + 60 % (chronische Koffeinapplikation) bzw. A_{2A}AR: + 70 % (Schlafentzug); + 60 % (chronische Koffeinapplikation)) deutlich geringer aus, so dass auch in diesem Fall die Effekte der alleinigen Anwendung von Schlafentzug bzw. chronischer Koffeingabe größtenteils, jedoch nicht vollständig, aufgehoben werden.

Wie bereits in Kapitel 5.1.2 und Kapitel 5.1.3 diskutiert, konnte im Thalamus nach Schlafentzug eine Erhöhung der Gesamtexpression des A_{2A}AR festgestellt werden, die jedoch nicht signifikant war. Nach chronischer Koffeingabe war die Gesamtexpression des A_{2A}AR nur in der Mitte der Hell- bzw. Dunkelphase erhöht. Interessanterweise führte die Kombination von chronischer Koffeingabe und Schlafentzug (6 h und 12 h) im Thalamus zu einer signifikanten Runterregulierung des A_{2A}AR (vgl. Abb. 4.46). Für die Gesamtexpression des A_{2A}AR im Thalamus führte die kombinierte Anwendung von

chronischer Koffeingabe und Schlafentzug somit nicht nur zu einer Aufhebung der durch die Einzelanwendung hervorgerufenen Effekte, sondern vielmehr sogar zu einem gegenteiligen Effekt. Die signifikante Herunterregulierung der Gesamtexpression des $A_{2A}AR$ blieb über die gesamte Dauer des Erholungsschlafes bestehen, allerdings hielt die Überprüfung der Verringerung des $A_{2A}AR$ zum Zeitpunkt Z_{0+30h} (18 h Erholungsschlaf) der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht stand. Die fehlende Signifikanz ist möglicherweise auf die interindividuellen Unterschiede in der Ansprechbarkeit der untersuchten Tiere auf die Behandlung zurückzuführen.

Dies ist die erste Studie, die die Auswirkungen von Schlafentzug bei gleichzeitiger chronischer Koffeingabe auf den A_1AR und den $A_{2A}AR$ untersucht. Eine Untersuchung von Adenosin in diesem Kontext erfolgte bisher nach unserem Wissen nicht. Weitere Befunde bezüglich der molekularen Mechanismen, die den Auswirkungen von Schlafentzug bei gleichzeitigem chronischem Koffeinkonsum zugrunde liegen, sind eher spärlich. In bisherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Schlafentzug im Gyrus dentatus, einer Teilstruktur des Hippocampus, zu einer Herunterregulierung des Wachstumsfaktors BDNF (engl.: brain-derived neurotrophic factor) führt und diese durch eine chronische Koffeingabe verhindert werden kann (Alhaider et al., 2010a). BDNF spielt im Hippocampus eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität und das Langzeitgedächtnis (Bekinschtein et al., 2008; Figurov et al., 1996; Kang und Schuman, 1995). Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass für die Effekte von BDNF auf die synaptische Plastizität und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus eine Aktivierung des $A_{2A}AR$ notwendig ist (Diogenes et al., 2004; Fontinha et al., 2008; Jeronimo-Santos et al., 2014). Daneben konnte auch gezeigt werden, dass Schlafentzug zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses und zu einer Abnahme von BDNF führt und dass diesen Auswirkungen durch die Gabe des selektiven A_1AR -Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthin (8-CPT) während des Schlafentzuges entgegengewirkt werden kann (Chauhan et al., 2016). Die Kombination von Schlafentzug mit einer chronischen Koffeinapplikation führt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu einer Normalisierung der Gesamtexpression des A_1AR und des $A_{2A}AR$ im Hippocampus. Möglicherweise ist diese Normalisierung dafür mitverantwortlich, dass eine chronische Koffeinnahme kognitiven Beeinträchtigungen während des Schlafentzuges entgegenwirken kann. In Bezug auf die Schlafregulation könnten die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen in der Gesamtexpression des A_1AR und des $A_{2A}AR$ ebenfalls eine Erklärung für den

abgeschwächten Schlafdruck und die Veränderungen in der Architektur des Erholungsschlafes sein, die bei einer Koffeinbehandlung während des Schlafentzuges beobachtet wurden (Schwierin et al., 1996; Wurts und Edgar, 2000).

Insgesamt deuten die Ergebnisse stark darauf hin, dass das adenosinerge System das molekulare Bindeglied darstellen könnte, welches die unterschiedlichen Auswirkungen von Koffein und Schlafentzug auf Verhaltensebene miteinander verknüpft. Zur weiteren Aufklärung des molekularen Mechanismus sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, wie sich die Adenosinkonzentration selbst bei der Kombination von Schlafentzug mit einer chronischen Koffeingabe verhält

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR zu definierten Zeiten im Verlauf von Tag und Nacht sowie deren Veränderung durch Schlafentzug und eine chronische Koffeinapplikation untersucht.

Die Gesamtexpression der beiden Rezeptoren zeigte innerhalb des regulären Tag-/Nacht-Rhythmus keine signifikanten Veränderungen. Sowohl ein 6-stündiger als auch ein 12-stündiger Schlafentzug führten zu einer signifikanten Hochregulierung der Gesamtexpression des A₁AR in Neocortex, Thalamus und Hippocampus sowie zu einer signifikanten Hochregulierung des A_{2A}AR in Neocortex und Hippocampus. Auch im Thalamus konnte tendenziell nach Schlafentzug eine erhöhte Expression des A_{2A}AR festgestellt werden, die allerdings nicht signifikant war. In bisherigen Studien konnte nach 24-stündigem Schlafentzug eine erhöhte Dichte der membrangebundenen A₁AR gezeigt werden. Unter Schlafentzug scheint somit zunächst die Zahl der intrazellulären Rezeptoren anzusteigen, während für die Translokation der Rezeptoren und den Einbau der Rezeptoren in die Zellmembran ein länger andauernder Schlafentzug nötig ist. Der Anstieg in der Gesamtexpression der beiden Rezeptoren blieb weitestgehend über den gesamten Zeitraum des Erholungsschlafes bestehen. Eine chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg Körpergewicht/Tag (dies entspricht einer humanen Koffeindosis von 4-5 Tassen Kaffee pro Tag) führte zu einer signifikanten Hochregulierung der Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR im Hippocampus und zu einer erhöhten Expression des A_{2A}AR im Neocortex. Interessanterweise konnten im Thalamus nur während der Hellphase signifikant erhöhte Expressionen beider Rezeptoren festgestellt werden. Die chronische Koffeinbehandlung scheint also im Thalamus einen zirkadianen Verlauf der Expression der Rezeptoren auszulösen. Während sowohl Schlafentzug als auch chronische Koffeinnahme zu einer regionenspezifischen Hochregulierung der Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR führten, zeigte die kombinierte Anwendung von Schlafentzug und chronischer Koffeinapplikation im Neocortex und Hippocampus im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen. Durch die Kombination von Schlafentzug und chronischer Koffeinnahme werden die Effekte der Einzelinterventionen auf die Expression der beiden Rezeptoren aufgehoben. Für die Gesamtexpression des A_{2A}AR im Thalamus führte die gemeinsame Anwendung von chronischer Koffeingabe und Schlafentzug nicht nur zu einer Aufhebung der durch die Einzelanwendung

hervorgerufenen Effekte, sondern vielmehr sogar zu einem gegenteiligen Effekt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte eine signifikante Herabregulation des A_{2A}AR festgestellt werden.

Schlafentzug führt zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit. Jüngste Befunde deuten darauf hin, dass diesen Beeinträchtigungen durch eine chronische Koffeinapplikation entgegengewirkt werden könnte. Darüber hinaus mildert eine chronische Koffeinapplikation während des Schlafentzuges den Aufbau eines Schlafdruckes ab und verändert die Architektur des Erholungsschlafes. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gesamtexpression des A₁AR und des A_{2A}AR schlafentzugs- und koffeinbedingten Veränderungen unterliegt. Somit könnte das adenosinerge System das molekulare Bindeglied für die Verknüpfung der Auswirkungen von chronischer Koffeinnahme und Schlafentzug auf Verhaltensebene darstellen.

7 Literatur

Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004; 45: 545-552.

Alam MN, Szymusiak R, Gong H, King J, McGinty D. Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J Physiol.* 1999; 521 Pt 3: 679-690.

Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martin M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008; 18: 211-219.

Aldridge A, Aranda JV, Neims AH. Caffeine metabolism in the newborn. *Clin Pharmacol Ther.* 1979; 25: 447-453.

Aldridge A, Bailey J, Neims AH. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin Perinatol.* 1981; 5: 310-314.

Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alkadhi KA. Caffeine prevents sleep loss-induced deficits in long-term potentiation and related signaling molecules in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2010a; 31: 1368-1376.

Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alkadhi KA. Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF: protection by caffeine. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46: 742-751.

Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity. *Sleep.* 2010b; 33: 437-444.

Aranda JV, Collinge JM, Zinman R, Watters G. Maturation of caffeine elimination in infancy. *Arch Dis Child.* 1979; 54: 946-949.

Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tane J, Citron BA, Lin X, Echeverria V, Potter H. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis.* 2009; 17: 661-680.

Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience.* 2006; 142: 941-952.

Arnaud M, Welsch C. Theophylline and caffeine metabolism in man. Hrsg. *Theophylline and other Methylxanthines/Theophyllin und andere Methylxanthine.* Springer, 1982: 135-148.

Arnaud MJ. Identification, kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1-Me-¹⁴C]caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochem Med.* 1976; 16: 67-76.

Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res.* 1987; 31: 273-313.

Arnaud MJ. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini S, Hrsg. Caffeine, Coffee and Health New York: Raven Press, 1993: 43-95.

Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of caffeine. In: Snel J, Lorist MM, Hrsg. Nicotine, Caffeine and Social Drinking: Behaviour and Brain Function. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998: 153-167.

Arnaud MJ, Welsch C. Comparison of caffeine metabolism by perfused rat liver and isolated microsomes A2 - Coon, Minor J. In: Conney AH, Estabrook RW, Gelboin HV, Gillette JR, O'Brien PJ, Hrsg. Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis. Academic Press, 1980: 813-816.

Attwell D, Gibb A. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 841-849.

Bailey DN, Weibert RT, Naylor AJ, Shaw RF. A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers. *J Anal Toxicol.* 1982; 6: 64-68.

Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience.* 2015; 309: 1-16.

Basheer R, Bauer A, Elmenhorst D, Ramesh V, McCarley RW. Sleep deprivation upregulates A1 adenosine receptors in the rat basal forebrain. *Neuroreport.* 2007; 18: 1895-1899.

Basheer R, Halldner L, Alanko L, McCarley RW, Fredholm BB, Porkka-Heiskanen T. Opposite changes in adenosine A1 and A2A receptor mRNA in the rat following sleep deprivation. *Neuroreport.* 2001; 12: 1577-1580.

Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol.* 2004; 73: 379-396.

Bauer A, Ishiwata K. Adenosine receptor ligands and PET imaging of the CNS. *Handb Exp Pharmacol.* 2009: 617-642.

Beach CA, Bianchine JR, Gerber N. The excretion of caffeine in the semen of men: pharmacokinetics and comparison of the concentrations in blood and semen. *J Clin Pharmacol.* 1984; 24: 120-126.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 2711-2716.

Benington JH, Heller HC. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol.* 1995; 45: 347-360.

Besedovsky L, Lange T, Born J. Sleep and immune function. *Pflugers Arch.* 2012; 463: 121-137.

Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Moller T, Matteoli M, Verderio C. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol.* 2005; 174: 7268-7277.

- Bjorness TE, Greene RW. Adenosine and Sleep. *Current Neuropharmacology*. 2009; 7: 238-245.
- Blanchard J, Sawers SJ. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983a; 24: 93-98.
- Blanchard J, Sawers SJ. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1983b; 11: 109-126.
- Bollinger T, Bollinger A, Oster H, Solbach W. Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model. *Gerontology*. 2010; 56: 574-580.
- Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther*. 1982; 32: 98-106.
- Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF, Garattini S. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab Rev*. 1984; 15: 1355-1383.
- Bonnet MH, Arand DL. Caffeine use as a model of acute and chronic insomnia. *Sleep*. 1992; 15: 526-536.
- Bonnet MH, Balkin TJ, Dinges DF, Roehrs T, Rogers NL, Wesensten NJ. The use of stimulants to modify performance during sleep loss: a review by the sleep deprivation and Stimulant Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *Sleep*. 2005; 28: 1163-1187.
- Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol*. 1982; 1: 195-204.
- Borbély AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J Biol Rhythms*. 1999; 14: 557-568.
- Borbély AA, Achermann P, Trachsel L, Tobler I. Sleep initiation and initial sleep intensity: interactions of homeostatic and circadian mechanisms. *J Biol Rhythms*. 1989; 4: 149-160.
- Borbély AA, Tobler I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev*. 1989; 69: 605-670.
- Bortolotti A, Traina GL, Guaitani A, Marzi E, Latini R, Young JF, Bonati M. In vivo and perfused liver caffeine kinetics in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1990; 69: 285-295.
- Boulenger JP, Patel J, Post RM, Parma AM, Marangos PJ. Chronic caffeine consumption increases the number of brain adenosine receptors. *Life Sci*. 1983; 32: 1135-1142.
- Brazier JL, Ritter J, Berland M, Khenfer D, Faucon G. Pharmacokinetics of caffeine during and after pregnancy. *Dev Pharmacol Ther*. 1983; 6: 315-322.
- Brooke RE, Deuchars J, Deuchars SA. Input-specific modulation of neurotransmitter release in the lateral horn of the spinal cord via adenosine receptors. *J Neurosci*. 2004; 24: 127-137.

Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 2012; 92: 1087-1187.

Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 1997; 36: 1201-1210.

Brunner DP, Dijk DJ, Borbély AA. Repeated partial sleep deprivation progressively changes in EEG during sleep and wakefulness. *Sleep.* 1993; 16: 100-113.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87: 659-797.

Buxton OM, Marcelli E. Short and long sleep are positively associated with obesity, diabetes, hypertension, and cardiovascular disease among adults in the United States. *Soc Sci Med.* 2010; 71: 1027-1036.

Callahan MM, Robertson RS, Arnaud MJ, Branfman AR, McComish MF, Yesair DW. Human metabolism of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine after oral administration. *Drug Metab Dispos.* 1982; 10: 417-423.

Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci.* 2009; 29: 14741-14751.

Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H. Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2009; 17: 681-697.

Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sleep.* 2010; 33: 585-592.

Chagoya de Sanchez V, Hernandez Munoz R, Suarez J, Vidrio S, Yanez L, Diaz Munoz M. Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat--possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. *Brain Res.* 1993; 612: 115-121.

Chauhan G, Ray K, Sahu S, Roy K, Jain V, Wadhwa M, Panjwani U, Kishore K, Singh SB. Adenosine A1 receptor antagonist mitigates deleterious effects of sleep deprivation on adult neurogenesis and spatial reference memory in rats. *Neuroscience.* 2016; 337: 107-116.

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N, Jr., Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2001; 21: Rc143.

Choi EJ, Bae SH, Park JB, Kwon MJ, Jang SM, Zheng YF, Lee YS, Lee SJ, Bae SK. Simultaneous quantification of caffeine and its three primary metabolites in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2013; 141: 2735-2742.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.

Chou DT, Khan S, Forde J, Hirsh KR. Caffeine tolerance: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Life Sci.* 1985; 36: 2347-2358.

Christie MA, McKenna JT, Connolly NP, McCarley RW, Strecker RE. 24 hours of sleep deprivation in the rat increases sleepiness and decreases vigilance: introduction of the rat-psychomotor vigilance task. *J Sleep Res.* 2008; 17: 376-384.

Clinton JM, Davis CJ, Zielinski MR, Jewett KA, Krueger JM. Biochemical Regulation of Sleep and Sleep Biomarkers. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine.* 2011; 7: S38-S42.

Cohen S, Doyle WJ, Alper CM, Janicki-Deverts D, Turner RB. Sleep habits and susceptibility to the common cold. *Arch Intern Med.* 2009; 169: 62-67.

Colton T, Gosselin RE, Smith RP. The tolerance of coffee drinkers to caffeine. *Clin Pharmacol Ther.* 1968; 9: 31-39.

Conlay LA, Conant JA, deBros F, Wurtman R. Caffeine alters plasma adenosine levels. *Nature.* 1997; 389: 136.

Cook C, Tallent C, Amerson E, Myers M, Kepler J, Taylor G, Christensen HD. Caffeine in plasma and saliva by a radioimmunoassay procedure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1976; 199: 679-686.

Correa M, Font L. Is there a major role for adenosine A2A receptors in anxiety? *Front Biosci.* 2008; 13: 4058-4070.

Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Muller CE, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol.* 2008; 210: 776-781.

Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 2001; 38: 107-125.

Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. *Purinergic Signalling.* 2005; 1: 111-134.

Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 1: S95-116.

Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastiao AM, Ribeiro JA, Fredholm BB. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1994; 649: 208-216.

Curatolo PW, Robertson D. The health consequences of caffeine. *Ann Intern Med.* 1983; 98: 641-653.

Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A_{2a} receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol*. 2007; 203: 241-245.

Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol*. 2003; 138: 1207-1209.

Daval JL, Deckert J, Weiss SR, Post RM, Marangos PJ. Upregulation of adenosine A₁ receptors and forskolin binding sites following chronic treatment with caffeine or carbamazepine: a quantitative autoradiographic study. *Epilepsia*. 1989; 30: 26-33.

de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev*. 2000; 33: 258-274.

Deckert J, Abel F, Kunig G, Hartmann J, Senitz D, Maier H, Ransmayr G, Riederer P. Loss of human hippocampal adenosine A₁ receptors in dementia: evidence for lack of specificity. *Neurosci Lett*. 1998; 244: 1-4.

Deutscher Kaffeeverband eV. Kaffeemarkt 2015 - Entwicklungen auf dem Kaffeemarkt. 2016.

Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11: 114-126.

Diogenes MJ, Fernandes CC, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Activation of adenosine A_{2A} receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J Neurosci*. 2004; 24: 2905-2913.

Dorfman LJ, Jarvik ME. Comparative stimulant and diuretic actions of caffeine and theobromine in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1970; 11: 869-872.

Drummond SP, Brown GG, Gillin JC, Stricker JL, Wong EC, Buxton RB. Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature*. 2000; 403: 655-657.

Dungo R, Deeks ED. Istradefylline: first global approval. *Drugs*. 2013; 73: 875-882.

Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 31-55.

Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci*. 2010; 30: 9007-9016.

EFSA NDA Panel. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*. 2015; 13: 4102- 4122.

Elmenhorst D, Basheer R, McCarley RW, Bauer A. Sleep deprivation increases A₁ adenosine receptor density in the rat brain. *Brain Res*. 2009; 1258: 53-58.

Elmenhorst D, Elmenhorst EM, Hennecke E, Kroll T, Matusch A, Aeschbach D, Bauer A. Recovery sleep after extended wakefulness restores elevated A₁ adenosine receptor availability in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114: 4243-4248.

Elmenhorst D, Meyer PT, Winz OH, Matusch A, Ermert J, Coenen HH, Basheer R, Haas HL, Zilles K, Bauer A. Sleep deprivation increases A1 adenosine receptor binding in the human brain: a positron emission tomography study. *J Neurosci*. 2007; 27: 2410-2415.

Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis*. 2009; 16: 85-91.

Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, Kalinine E, Souza DO, Cunha RA, Porciuncula LO. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34: 509-518.

Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long term development of ischaemic cell loss in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1987; 83: 287-292.

Fang J, Sanborn CK, Renegar KB, Majde JA, Krueger JM. Influenza viral infections enhance sleep in mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995; 210: 242-252.

Ferrara M, Iaria G, Tempesta D, Curcio G, Moroni F, Marzano C, De Gennaro L, Pacitti C. Sleep to find your way: the role of sleep in the consolidation of memory for navigation in humans. *Hippocampus*. 2008; 18: 844-851.

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996; 381: 706-709.

Fischer E. Untersuchungen in der Puringruppe 1ed. Berlin: Springer-Verlag, 1907.

Fleshner M, Booth V, Forger DB, Diniz Behn CG. Circadian regulation of sleep-wake behaviour in nocturnal rats requires multiple signals from suprachiasmatic nucleus. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2011; 369: 3855-3883.

Florian C, Vecsey CG, Halassa MM, Haydon PG, Abel T. Astrocyte-derived adenosine and A1 receptor activity contribute to sleep loss-induced deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory in mice. *J Neurosci*. 2011; 31: 6956-6962.

Florio C, Rosati AM, Traversa U, Vertua R. Circadian rhythm in adenosine A1 receptor of mouse cerebral cortex. *Life Sci*. 1991; 48: PL25-29.

Fontinha BM, Diogenes MJ, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Enhancement of long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor requires adenosine A2A receptor activation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology*. 2008; 54: 924-933.

Fredholm BB. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol*. 1995; 76: 228-239.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001a; 53: 527-552.

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000; 362: 364-374.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 83-133.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 2005; 63: 191-270.

Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol.* 2001b; 61: 443-448.

Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci.* 2004; 27: 107-144.

Gallopín T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, Lambolez B, Fort P. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience.* 2005; 134: 1377-1390.

Gass N, Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. The role of the basal forebrain adenosine receptors in sleep homeostasis. *Neuroreport.* 2009; 20: 1013-1018.

Georgiev V, Johansson B, Fredholm BB. Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res.* 1993; 612: 271-277.

Goel N, Rao H, Durmer JS, Dinges DF. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Semin Neurol.* 2009; 29: 320-339.

Goldstein A, Warren R, Kaizer S. Psychotropic effects of caffeine in man. i. individual differences in sensitivity to caffeine-induced wakefulness. *J Pharmacol Exp Ther.* 1965; 149: 156-159.

Gomes CV, Kaster MP, Tome AR, Agostinho PM, Cunha RA. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 1380-1399.

Green RM, Stiles GL. Chronic caffeine ingestion sensitizes the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J Clin Invest.* 1986; 77: 222-227.

Gu JG, Foga IO, Parkinson FE, Geiger JD. Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations. *J Neurochem.* 1995; 64: 2105-2110.

Guan Z, Peng X, Fang J. Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain Res.* 2004; 1018: 38-47.

Gubitz AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ. Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J Neurochem.* 1996; 67: 374-381.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 1999; 19: 520-528.

Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron.* 2009; 61: 213-219.

Hall MH, Smagula SF, Boudreau RM, Ayonayon HN, Goldman SE, Harris TB, Naydeck BL, Rubin SM, Samuelsson L, Satterfield S, Stone KL, Visser M, Newman AB. Association between sleep duration and mortality is mediated by markers of inflammation and health in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *Sleep.* 2015; 38: 189-195.

Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron.* 2012; 75: 762-777.

Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 759-770.

Hauser RA, Stocchi F, Rascol O, Huyck SB, Capece R, Ho TW, Sklar P, Lines C, Michelson D, Hewitt D. Preladenant as an Adjunctive Therapy With Levodopa in Parkinson Disease: Two Randomized Clinical Trials and Lessons Learned. *JAMA Neurol.* 2015; 72: 1491-1500.

Havekes R, Bruinenberg VM, Tudor JC, Ferri SL, Baumann A, Meerlo P, Abel T. Transiently Increasing cAMP Levels Selectively in Hippocampal Excitatory Neurons during Sleep Deprivation Prevents Memory Deficits Caused by Sleep Loss. *The Journal of Neuroscience.* 2014; 34: 15715.

Hawkins M, Dugich MM, Porter NM, Urbancic M, Radulovacki M. Effects of chronic administration of caffeine on adenosine A1 and A2 receptors in rat brain. *Brain Res Bull.* 1988; 21: 479-482.

Hayaishi O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2. *Faseb j.* 1991; 5: 2575-2581.

Hayaishi O, Urade Y, Eguchi N, Huang ZL. Genes for prostaglandin d synthase and receptor as well as adenosine A2A receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep. *Arch Ital Biol.* 2004; 142: 533-539.

Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010; 75: R77-87.

Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109 Suppl 1: 10661-10668.

Hu G, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007; 22: 2242-2248.

Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 858-859.

Huang ZL, Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7: 33-38.

Huang ZL, Urade Y, Hayaishi O. The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11: 1047-1057.

Huston JP, Haas HL, Boix F, Pfister M, Decking U, Schrader J, Schwarting RK. Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience.* 1996; 73: 99-107.

Ikeda GJ, Sapienza PP, McGinnis ML, Bragg LE, Walsh JJ, Collins TF. Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats. *J Appl Toxicol.* 1982; 2: 307-314.

Ikeda K, Kurokawa M, Aoyama S, Kuwana Y. Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002; 80: 262-270.

Illiff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, Benveniste H. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest.* 2013; 123: 1299-1309.

Illiff JJ, Nedergaard M. Is there a cerebral lymphatic system? *Stroke.* 2013; 44: S93-95.

Illiff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 147ra111.

Iwasaki N, Karashima A, Tamakawa Y, Katayama N, Nakao M. Sleep EEG dynamics in rat barrel cortex associated with sensory deprivation. *Neuroreport.* 2004; 15: 2681-2684.

Jacobson KA, von Lubitz DK, Daly JW, Fredholm BB. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17: 108-113.

Jain N, Kemp N, Adeyemo O, Buchanan P, Stone TW. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 2127-2133.

Jeronimo-Santos A, Batalha VL, Muller CE, Baqi Y, Sebastiao AM, Lopes LV, Diogenes MJ. Impact of in vivo chronic blockade of adenosine A2A receptors on the BDNF-mediated facilitation of LTP. *Neuropharmacology.* 2014; 83: 99-106.

Johansson B, Ahlberg S, van der Ploeg I, Brene S, Lindfors N, Persson H, Fredholm BB. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and

on mRNA levels in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1993; 347: 407-414.

Johansson B, Georgiev V, Lindstrom K, Fredholm BB. A1 and A2A adenosine receptors and A1 mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res.* 1997; 762: 153-164.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* 2007; 10: 331-339.

Kalaria RN, Sromek S, Wilcox BJ, Unnerstall JR. Hippocampal adenosine A1 receptors are decreased in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1990; 118: 257-260.

Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2006; 248: 9-15.

Kalinchuk AV, McCarley RW, Porkka-Heiskanen T, Basheer R. The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade. *J Neurochem.* 2011; 116: 260-272.

Kalinchuk AV, McCarley RW, Stenberg D, Porkka-Heiskanen T, Basheer R. The role of cholinergic basal forebrain neurons in adenosine-mediated homeostatic control of sleep: lessons from 192 IgG-saporin lesions. *Neuroscience.* 2008; 157: 238-253.

Kang H, Schuman EM. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science.* 1995; 267: 1658-1662.

Karacan I, Thornby JI, Anch M, Booth GH, Williams RL, Salis PJ. Dose-related sleep disturbances induced by coffee and caffeine. *Clin Pharmacol Ther.* 1976; 20: 682-689.

Kim EY, Mahmoud GS, Grover LM. REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2005; 388: 163-167.

Knutson KL. Does inadequate sleep play a role in vulnerability to obesity? *Am J Hum Biol.* 2012; 24: 361-371.

Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI, Geiger JD. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci.* 2002; 22: 5581-5587.

Kreutzmann JC, Havekes R, Abel T, Meerlo P. Sleep deprivation and hippocampal vulnerability: changes in neuronal plasticity, neurogenesis and cognitive function. *Neuroscience.* 2015; 309: 173-190.

Krueger JM, Rector DM, Churchill L. Sleep and Cytokines. *Sleep Med Clin.* 2007; 2: 161-169.

Krueger JM, Rector DM, Roy S, Van Dongen HP, Belenky G, Panksepp J. Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9: 910-919.

Krueger JM, Taishi P, De A, Davis CJ, Winters BD, Clinton J, Szentirmai E, Zielinski MR. ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep. *J Appl Physiol* (1985). 2010; 109: 1318-1327.

Kumar S, Rai S, Hsieh KC, McGinty D, Alam MN, Szymusiak R. Adenosine A(2A) receptors regulate the activity of sleep regulatory GABAergic neurons in the preoptic hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 305: R31-41.

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 1984; 10: 203-209.

Lachance MP, Marlowe C, Waddell WJ. Autoradiographic disposition of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983; 71: 237-241.

Lachenmeier DW, Wegert K, Kuballa T, Schneider R, Ruge W, Reusch H, Alexy U, Kersting M, Winkler G. Caffeine intake from beverages in German children, adolescents, and adults. *Journal of caffeine research*. 2013; 3: 47-53.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Landolt H-P, Retey JV, Tonz K, Gottselig JM, Khatami R, Buckelmuller I, Achermann P. Caffeine Attenuates Waking and Sleep Electroencephalographic Markers of Sleep Homeostasis in Humans. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 1933-1939.

Landolt HP, Dijk DJ, Gaus SE, Borbély AA. Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology*. 1995a; 12: 229-238.

Landolt HP, Retey JV, Adam M. Reduced neurobehavioral impairment from sleep deprivation in older adults: contribution of adenosinergic mechanisms. *Front Neurol*. 2012; 3: 62.

Landolt HP, Werth E, Borbély AA, Dijk DJ. Caffeine intake (200 mg) in the morning affects human sleep and EEG power spectra at night. *Brain Res*. 1995b; 675: 67-74.

Lange T, Dimitrov S, Bollinger T, Diekelmann S, Born J. Sleep after vaccination boosts immunological memory. *J Immunol*. 2011; 187: 283-290.

Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1193: 48-59.

Latini R, Bonati M, Castelli D, Garattini S. Dose-dependent kinetics of caffeine in rats. *Toxicology Letters*. 1978; 2: 267-270.

Latini R, Bonati M, Marzi E, Tacconi MT, Sadurska B, Bizzi A. Caffeine disposition and effects in young and one-year old rats. *J Pharm Pharmacol*. 1980; 32: 596-599.

Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem*. 2001; 79: 463-484.

Laurent C, Burnouf S, Ferry B, Batalha VL, Coelho JE, Baqi Y, Malik E, Mariciniak E, Parrot S, Van der Jeugd A, Faivre E, Flaten V, Ledent C, D'Hooge R, Sergeant N,

Hamdane M, Humez S, Muller CE, Lopes LV, Buee L, Blum D. A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol Psychiatry*. 2016; 21: 97-107.

Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, Schneider M, Hamdane M, Muller CE, Buee L, Blum D. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging*. 2014; 35: 2079-2090.

LeVine H, 3rd. Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Mol Neurobiol*. 1999; 19: 111-149.

Levy M, Zylber-Katz E. Caffeine metabolism and coffee-attributed sleep disturbances. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 33: 770-775.

Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, Cianfrogna J, Doran AC, Doran SD, Gibbs JP, Hosea N, Liu J, Nelson FR, Szewc MA, Van Deusen J. Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 313: 1254-1262.

Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, Cianfrogna J, Doran AC, Doran SD, Gibbs JP, Hosea N, Liu J, Nelson FR, Szewc MA, Van Deusen J. Evaluation of Cerebrospinal Fluid Concentration and Plasma Free Concentration As a Surrogate Measurement for Brain Free Concentration. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006; 34: 1443-1447.

Lo JC, Ong JL, Leong RL, Gooley JJ, Chee MW. Cognitive Performance, Sleepiness, and Mood in Partially Sleep Deprived Adolescents: The Need for Sleep Study. *Sleep*. 2016; 39: 687-698.

Madeira MH, Boia R, Ambrosio AF, Santiago AR. Having a Coffee Break: The Impact of Caffeine Consumption on Microglia-Mediated Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 4761081.

Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005; 45: 535-562.

Maia L, de Mendonca A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol*. 2002; 9: 377-382.

Marangos PJ, Boulenger JP, Patel J. Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies. *Life Sci*. 1984; 34: 899-907.

Marks V, Kelly JF. Absorption of caffeine from tea, coffee, and coca cola. *Lancet*. 1973; 1: 827.

McCall AL, Millington WR, Wurtman RJ. Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport. *Life Sci*. 1982; 31: 2709-2715.

McCarley RW. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med*. 2007; 8: 302-330.

Mednick S, Nakayama K, Stickgold R. Sleep-dependent learning: a nap is as good as a night. *Nat Neurosci*. 2003; 6: 697-698.

Methippara MM, Kumar S, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289: R1715-1723.

Mizoguchi A, Eguchi N, Kimura K, Kiyohara Y, Qu WM, Huang ZL, Mochizuki T, Lazarus M, Kobayashi T, Kaneko T, Narumiya S, Urade Y, Hayaishi O. Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 11674-11679.

Muller-Limmroth W. [Effect of caffeine containing and caffeine free coffee on human sleep]. *Z Ernahrungswiss Suppl.* 1972; 14: Suppl 14:46-53.

Nabbi D. Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf das adenosinerge System im Hinblick auf schlafregulierende und neuroprotektive Effekte im ZNS der Ratte. Universität Bonn, 2016.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 1992; 17: 139-170.

Nir Y, Staba RJ, Andrillon T, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Fried I, Tononi G. Regional slow waves and spindles in human sleep. *Neuron.* 2011; 70: 153-169.

Opp MR. Cytokines and sleep. *Sleep Med Rev.* 2005; 9: 355-364.

Oskamp A, Wedekind F, Kroll T, Elmenhorst D, Bauer A. Neurotransmitter receptor availability in the rat brain is constant in a 24 hour-period. *Chronobiol Int.* 2017: 1-10.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 1994; 369: 744-747.

Parsons WD, Neims AH. Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther.* 1978; 24: 40-45.

Patwardhan RV, Desmond PV, Johnson RF, Dunn GD, Robertson DH, Hoyumpa AM, Jr., Schenker S. Effects of caffeine on plasma free fatty acids, urinary catecholamines, and drug binding. *Clin Pharmacol Ther.* 1980; 28: 398-403.

Peigneux P, Laureys S, Delbeuck X, Maquet P. Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. *Neuroreport.* 2001; 12: A111-124.

Perez-Buira S, Barrachina M, Rodriguez A, Albasanz JL, Martin M, Ferrer I. Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett.* 2007; 423: 194-199.

Phillis JW. The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. *Brain Res.* 1995; 705: 79-84.

Phillis JW, Wu PH. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 1981; 16: 187-239.

Piirainen H, Ashok Y, Nanekar RT, Jaakola VP. Structural features of adenosine receptors: from crystal to function. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1808: 1233-1244.

Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA. When Too Much ATP Is Bad for Protein Synthesis. *J Mol Biol*. 2015; 427: 2586-2594.

Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D. Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev*. 2002; 6: 321-332.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*. 2000; 99: 507-517.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. 1997; 276: 1265-1268.

Porkka-Heiskanen T, Zitting KM, Wigren HK. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013; 208: 311-328.

Portas CM, Thakkar M, Rainnie DG, Greene RW, McCarley RW. Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience*. 1997; 79: 225-235.

Prediger RD. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20 Suppl 1: S205-220.

Qi H, Li S. Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2014; 14: 430-439.

Ram A, Pandey HP, Matsumura H, Kasahara-Orita K, Nakajima T, Takahata R, Satoh S, Terao A, Hayaishi O. CSF levels of prostaglandins, especially the level of prostaglandin D2, are correlated with increasing propensity towards sleep in rats. *Brain Res*. 1997; 751: 81-89.

Ramkumar V, Bumgarner JR, Jacobson KA, Stiles GL. Multiple components of the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system are regulated in rat cerebral cortex by chronic caffeine ingestion. *J Clin Invest*. 1988; 82: 242-247.

Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA, Stiles GL. Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol Pharmacol*. 1991; 40: 639-647.

Rector DM, Topchiy IA, Carter KM, Rojas MJ. Local functional state differences between rat cortical columns. *Brain Res*. 2005; 1047: 45-55.

Retey JV, Adam M, Khatami R, Luhmann UF, Jung HH, Berger W, Landolt HP. A genetic variation in the adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 81: 692-698.

Reyner LA, Horne JA, Reyner A. Gender- and age-related differences in sleep determined by home-recorded sleep logs and actimetry from 400 adults. *Sleep*. 1995; 18: 127-134.

Ribeiro JA, Sebastiao AM. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20 Suppl 1: S3-15.

Rivera-Oliver M, Diaz-Rios M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. *Life Sci*. 2014; 101: 1-9.

Roberts RE, Duong HT. The Prospective Association between Sleep Deprivation and Depression among Adolescents. *Sleep*. 2014; 37: 239-244.

Roehrs T, Roth T. Caffeine: sleep and daytime sleepiness. *Sleep Med Rev*. 2008; 12: 153-162.

Rosati AM, Traversa U, Florio C, Vertua R. Circadian rhythm of cortical and striatal adenosine receptors. *Life Sci*. 1993; 52: 1677-1684.

Rosenberg PA, Li Y. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. *Brain Res*. 1995; 692: 227-232.

Ryu JE. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther*. 1985; 8: 329-337.

Satoh S, Matsumura H, Suzuki F, Hayaishi O. Promotion of sleep mediated by the A_{2a}-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D₂ in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 5980-5984.

Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*. 2003; 69: 313-340.

Scales SJ, Chen YA, Yoo BY, Patel SM, Doung YC, Scheller RH. SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron*. 2000; 26: 457-464.

Scammell TE, Gerashchenko DY, Mochizuki T, McCarthy MT, Estabrooke IV, Sears CA, Saper CB, Urade Y, Hayaishi O. An adenosine A_{2a} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*. 2001; 107: 653-663.

Scharf MT, Naidoo N, Zimmerman JE, Pack AI. The energy hypothesis of sleep revisited. *Prog Neurobiol*. 2008; 86: 264-280.

Schweitzer PK, Randazzo AC, Stone K, Erman M, Walsh JK. Laboratory and field studies of naps and caffeine as practical countermeasures for sleep-wake problems associated with night work. *Sleep*. 2006; 29: 39-50.

Schwierin B, Borbély AA, Tobler I. Effects of N⁶-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1996; 300: 163-171.

Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; 471-534.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001; 81: 741-766.

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013; 4: 624-630.

Sengupta P, Roy S, Krueger JM. The ATP–cytokine–adenosine hypothesis: How the brain translates past activity into sleep. *Sleep and Biological Rhythms*. 2011; 9: 29-33.

Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol*. 1993; 13: 247-261.

Shukitt-Hale B, Miller MG, Chu Y-F, Lyle BJ, Joseph JA. Coffee, but not caffeine, has positive effects on cognition and psychomotor behavior in aging. *Age*. 2013; 35: 2183-2192.

Sinton CM, Petitjean F. The influence of chronic caffeine administration on sleep parameters in the cat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989; 32: 459-462.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985; 150: 76-85.

Somani SM, Khanna NN, Bada HS. Caffeine and theophylline: Serum/CSF correlation in premature infants. *The Journal of Pediatrics*. 1980; 96: 1091-1093.

Sonsalla PK, Wong LY, Harris SL, Richardson JR, Khobahy I, Li W, Gadad BS, German DC. Delayed caffeine treatment prevents nigral dopamine neuron loss in a progressive rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2012; 234: 482-487.

Soto J, Sacristan JA, Alsar MJ. Cerebrospinal fluid concentrations of caffeine following oral drug administration: correlation with salivary and plasma concentrations. *Ther Drug Monit*. 1994; 16: 108-110.

Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med*. 2004; 141: 846-850.

Steriade M. The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci*. 2003; 8: d878-899.

Steriade M, Dossi RC, Nunez A. Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J Neurosci*. 1991; 11: 3200-3217.

Stickgold R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*. 2005; 437: 1272-1278.

Stickgold R, James L, Hobson JA. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nat Neurosci*. 2000; 3: 1237-1238.

Stickgold R, Walker MP. Sleep-dependent memory triage: evolving generalization through selective processing. *Nat Neurosci.* 2013; 16: 139-145.

Stockwell J, Jakova E, Cayabyab FS. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules.* 2017; 22.

Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, Rainnie DG, Portas CM, Greene RW, McCarley RW. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res.* 2000; 115: 183-204.

Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci.* 2004; 24: 1-7.

Takeuchi M, Furuta H, Sumiyoshi T, Suzuki M, Ochiai Y, Hosokawa M, Matsui M, Kurachi M. Does sleep improve memory organization? *Front Behav Neurosci.* 2014; 8: 65.

Tetzlaff C, Kolodziejcki C, Markelic I, Worgotter F. Time scales of memory, learning, and plasticity. *Biol Cybern.* 2012; 106: 715-726.

Thakkar MM, Delgiacco RA, Strecker RE, McCarley RW. Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats. *Neuroscience.* 2003a; 122: 1107-1113.

Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. A1 receptor and adenosinergic homeostatic regulation of sleep-wakefulness: effects of antisense to the A1 receptor in the cholinergic basal forebrain. *J Neurosci.* 2003b; 23: 4278-4287.

Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev.* 2006; 10: 49-62.

Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron.* 2014; 81: 12-34.

Traversa U, Rosati AM, Florio C, Vertua R. Effects of chronic administration of adenosine antagonists on adenosine A1 and A2a receptors in mouse brain. *In Vivo.* 1994; 8: 1073-1078.

Ulas J, Brunner LC, Nguyen L, Cotman CW. Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.* 1993; 52: 843-854.

Urade Y, Eguchi N, Qu WM, Sakata M, Huang ZL, Chen JF, Schwarzschild MA, Fink JS, Hayaishi O. Sleep regulation in adenosine A2A receptor-deficient mice. *Neurology.* 2003; 61: S94-96.

Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep Med Rev.* 2011; 15: 411-418.

Urry E, Landolt HP. Adenosine, caffeine, and performance: from cognitive neuroscience of sleep to sleep pharmacogenetics. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015; 25: 331-366.

- Utge S, Kronholm E, Partonen T, Soronen P, Ollila HM, Loukola A, Perola M, Salomaa V, Porkka-Heiskanen T, Paunio T. Shared genetic background for regulation of mood and sleep: association of GRIA3 with sleep duration in healthy Finnish women. *Sleep*. 2011; 34: 1309-1316.
- Van Dongen HP, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep*. 2003; 26: 117-126.
- Vecsey CG, Baillie GS, Jaganath D, Havekes R, Daniels A, Wimmer M, Huang T, Brown KM, Li XY, Descalzi G, Kim SS, Chen T, Shang YZ, Zhuo M, Houslay MD, Abel T. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. *Nature*. 2009; 461: 1122-1125.
- Verkhatsky A, Kettenmann H. Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci*. 1996; 19: 346-352.
- Virus RM, Baglajewski T, Radulovacki M. Circadian variation of [³H]N6-(L-phenylisopropyl)adenosine binding in rat brain. *Neurosci Lett*. 1984; 46: 219-222.
- von Lubitz DK, Dambrosia JM, Kempinski O, Redmond DJ. Cyclohexyl adenosine protects against neuronal death following ischemia in the CA1 region of gerbil hippocampus. *Stroke*. 1988; 19: 1133-1139.
- Von Lubitz DK, Lin RC, Melman N, Ji XD, Carter MF, Jacobson KA. Chronic administration of selective adenosine A1 receptor agonist or antagonist in cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 1994; 256: 161-167.
- Vyazovskiy V, Borbély AA, Tobler I. Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat. *J Sleep Res*. 2000; 9: 367-371.
- Wang YQ, Li R, Wang DR, Cherasse Y, Zhang Z, Zhang MQ, Lavielle O, McEown K, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A, Qu WM, Lazarus M, Huang ZL. Adenosine A2A receptors in the olfactory bulb suppress rapid eye movement sleep in rodents. *Brain Struct Funct*. 2017; 222: 1351-1366.
- Wang YQ, Tu ZC, Xu XY, Li R, Qu WM, Urade Y, Huang ZL. Acute administration of fluoxetine normalizes rapid eye movement sleep abnormality, but not depressive behaviors in olfactory bulbectomized rats. *J Neurochem*. 2012; 120: 314-324.
- Wei CJ, Li W, Chen JF. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1808: 1358-1379.
- Weiss SM, Benwell K, Cliffe IA, Gillespie RJ, Knight AR, Lerpiniere J, Misra A, Pratt RM, Revell D, Upton R, Dourish CT. Discovery of nonxanthine adenosine A2A receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 2003; 61: S101-106.
- Williams JA, Zimmerman FJ, Bell JF. Norms and trends of sleep time among US children and adolescents. *JAMA Pediatr*. 2013; 167: 55-60.
- Wu PH, Coffin VL. Up-regulation of brain [³H]diazepam binding sites in chronic caffeine-treated rats. *Brain Res*. 1984; 294: 186-189.

Wurts SW, Edgar DM. Caffeine during sleep deprivation: sleep tendency and dynamics of recovery sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 65: 155-162.

Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 2013; 342: 373-377.

Yanik G, Glaum S, Radulovacki M. The dose-response effects of caffeine on sleep in rats. *Brain Res.* 1987; 403: 177-180.

Yoo SS, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP. A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nat Neurosci.* 2007; 10: 385-392.

Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 945-953.

Zhou Y, Chu X, Deng F, Tong L, Tong G, Yi Y, Liu J, Tang J, Tang Y, Xia Y, Dai Y. The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. *Oncotarget.* 2017.

Zielinski MR, Krueger JM. Sleep and innate immunity. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 3: 632-642.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362: 299-309.

