

Universitätsklinikum Essen
Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Nieren- und Hochdruckkranke

**CHARAKTERISIERUNG VON
 α_1 -ADRENOZEPTOR-SUBTYPEN IN DER MAUS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Essen

Vorgelegt von
Jens Reese
aus Wuppertal
2001

Dekan : Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter : Prof. Dr. med. M. C. Michel
2. Gutachter : Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ch. J. van Koppen

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2002

INHALTSVERZEICHNIS

I. PUBLIKATIONEN	4
II. EINLEITUNG	5
III. METHODEN	7
1. Gewebepräparation	7
2. Radioligandenbindung	7
3. Chemikalien	8
4. Datenanalyse	9
IV. ERGEBNISSE	10
V. DISKUSSION	13
VI. ZUSAMMENFASSUNG	21
VII. LITERATUR	22
VIII. TABELLEN	29
IX. ABBILDUNGEN	35
X. LEBENS LAUF	44

I. PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits Gegenstand folgender Publikation gewesen:

Jens Reese, Ming Yang, Susanna Cotecchia and Martin C. Michel (1998):
Characterization of murine α_1 -adrenoceptor subtypes.
Naunyn-Schmiedeberg`s Archive of Pharmacology 357 (Suppl): R28

Ming Yang, Jens Reese, Susanna Cotecchia and Martin C. Michel (1998):
Murine α_1 -Adrenoceptor subtypes. I. Radioligand binding studies.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 286: 841-847

II. EINLEITUNG

α_1 -Adrenozeptoren vermitteln viele physiologische Wirkungen der sympatho-adrenalen Transmitter Adrenalin und Noradrenalin sowie ihrer Derivate [Ruffolo und Hieble, 1994]. Aus diesem Grund sind sie wichtige pharmakologische Angriffspunkte, zum Beispiel im Herz-Kreislauf- und im Urogenitalsystem [Ruffolo et al, 1995; Guimaraes et al., 2001]. Es existieren mindestens drei α_1 -Adrenozeptor-Subtypen, die α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} genannt werden [Hieble et al., 1995; Michel et al., 1995]. Die Gene und/oder cDNA's, die für diese drei Subtypen codieren, wurden bei Ratten und Menschen [Hieble et al., 1995; Michel et al., 1995] und kürzlich auch bei Hunden [Chang et al., 2000; Lagu et al., 2000] kloniert. Außerdem wurden artverwandte Homologe einiger Subtypen bei Hamstern, Rindern und Mäusen kloniert [Alonso-Llamazares et al., 1995; Cottecchia et al., 1988; Schwinn et al., 1990]. Die pharmakologische Darstellung von α_1 -Adrenozeptor-Subtypen in Geweben fand bis jetzt hauptsächlich bei der Ratte statt [Michel et al., 1995]. Einige Daten über die Charakterisierung von α_1 -Adrenozeptor-Subtypen in Geweben liegen außerdem für Menschen [Gross et al., 1989; Lepor et al., 1993; Michel et al., 1996], für Meerschweinchen [Büscher et al., 1996; Garcia-Sainz et al., 1992; Hayes und Pennefather, 1993] und für Rinder [Büscher et al., 1996] vor, jedoch existierten bei Beginn der Erstellung der vorliegenden Arbeit nur sehr wenige Daten für Mäuse [Garcia-Sainz et al., 1994].

Transgene Techniken sind zu einem wirksamen Werkzeug der molekularen Pharmakologie geworden, da sie es erlauben, Phänotypen zu untersuchen, die von genau definierten Genotypen hervorgebracht werden [Chien et al., 1994]. Die gebräuchlichste Spezies unter den transgenen Tieren ist die Maus. Im Bereich der α_1 -Adrenozeptoren-Forschung wurden transgene Mäuse gezüchtet, die an ihrem Myokard α_{1B} -Adrenozeptoren überexprimierten, oder Knock-Out-Mäuse, denen der α_{1B} -Adrenozeptoren fehlt [Brodde und Michel, 1999]. Die Interpretation der an solchen Mäusen erhobenen Befunde

war aber nur begrenzt möglich ist, da ein fundiertes Wissen in Bezug auf die physiologischen Eigenschaften der α_1 -Adrenozeptoren der Maus im Vergleich mit denen anderer Spezies fehlte. Aus diesem Grund habe ich bei einer Auswahl von Mausgeweben die α_1 -Adrenozeptoren charakterisiert. Hierzu wurden Sättigungsbindingsexperimente und Kompetitionsbindungsversuche mit verschiedenen subtypenselektiven Pharmaka, sowie Rezeptorinaktivierungsstudien mit Chloroäthylclonidin durchgeführt.

III. METHODEN

1. Gewebepräparation

Die für die Versuche benötigten weiblichen und männlichen Mäuse vom Stamm HLG, Gewicht 25-35 g, wurden aus dem Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. In einigen Versuchen wurden α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäuse (C57 x 129-Hybride) verwendet, die bereits in vorherigen Studien beschrieben wurden [Cavalli et al., 1997]. Die Mäuse wurden dekapitiert und die benötigten Organe sofort entnommen. Herz, Leber, Milz, Nieren und Lungen wurden makroskopisch von umliegendem Bindegewebe befreit, zerebraler Kortex und Kleinhirn wurden sorgfältig vom Stammhirn freipräpariert. Nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff wurden die Gewebe bei -80°C bis zu drei Monaten gelagert.

Zur Membranpräparation wurden die Gewebe in eiskaltem Präparationspuffer (5 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen und mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) für 10 s bei voller Geschwindigkeit und danach zweimal für je 20 s bei 2/3 Geschwindigkeit homogenisiert. Die Homogenate wurden zweimal für 20 min bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert; die Sedimente wurden danach in eiskaltem Bindungspuffer (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert.

2. Radioligandenbindung

Die Anzahl und Affinität der α_1 -Adrenozeptoren wurden in Sättigungsbindungsversuchen und Kompetitionsbindungsversuchen mit [^3H]Prazosin als Radioligand nach einer publizierten Methode bestimmt [Michel et al., 1993a]. Dazu wurden bei Sättigungsbindungsversuchen aliquote Anteile der Membransuspension (100 μl) mit sechs Konzentrationen von [^3H]Prazosin (10 - 300 pM) in einem Gesamtvolumen von 1000 μl Bindungspuffer (50 mM

Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,5) für 45 min bei 25° C inkubiert. Bei Kompetitionsbindungsversuchen wurden ebenfalls aliquote Anteile von 100 µl Membransuspension mit je 200 µl des entsprechenden Kompetitors und einer möglichst konstanten Konzentration von [³H]Prazosin in 1000 µl Bindungspuffer für 45 min bei 25° C inkubiert. Bei Versuchsansätzen mit α₁-Adrenozeptor-Agonisten wurde außerdem noch jeweils 100 µM GTP zugesetzt, um die Entwicklung von hochaffinen, GDP-abhängigen Bindungszuständen zu minimieren. Die Inkubationen wurden durch rasche Vakuumfiltration über Whatman GF/C-Filter beendet, und jeder Filter wurde zweimal mit jeweils 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Danach wurden die Filter für eine Stunde bei 60° C getrocknet, mit jeweils 4 ml Szintillatorflüssigkeit (Quickszint 1, Zinsser, Frankfurt) bedeckt und kräftig geschüttelt. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers mit 42 % Ausbeute bestimmt. Unspezifische Bindungen wurden als Bindung in Gegenwart von 10 µM Phentolamin definiert. In einigen Versuchen wurden die Membranpräparate mit verschiedenen Konzentrationen von Chloroäthylclonidin (0,1 - 10 µM) für 30 min bei 37° C inkubiert, zweimal gewaschen und zentrifugiert und erst danach mit dem Radioliganden inkubiert.

3. Chemikalien

Farbreagenz für die Proteinbestimmung wurde von BioRad (München) bezogen, Methoxamin-HCl und (-)-Noradrenalin-Bitartrat von Sigma (München). Chloroäthylclonidin-HCl, 5-Methylurapidil, (+)-Niguldipin-HCl und BMY 7378 (8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4,5]decan-7,9-dion Dihydrochlorid) waren von Research Biochemicals Inc. (Natick, MA, USA) und [³H]Prazosin (spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol) von New England Nuclear (Dreieich).

Die folgenden Substanzen wurden freundlicherweise von den jeweiligen Firmen zur Verfügung gestellt: (-)-Tamsulosin-HCl (früher bekannt unter der Bezeichnung YM 617, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), SB

216469 (N-(3-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-propyl)-3-methyl)-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-8-carboxamid Monoethan-sulfonat Monohydrat (früher bekannt unter der Bezeichnung Rec 15/2739, Recordati, Mailand, Italien) und Phentolamin-HCl (Novartis, Basel, Schweiz).

4. Datenanalyse

Die Daten werden dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler von n Experimenten. Sättigungsbindungsexperimente wurden analysiert durch Anpassung von rechtwinklig hyperbolischen Funktionen an die experimentellen Daten. Kompetitionsbindungsexperimente wurden analysiert durch die Anpassung von mono- und biphasischen sigmoiden Funktionen an die experimentellen Daten; eine zweiseitige Anpassung wurde nur dann akzeptiert, wenn sich daraus eine signifikante Verbesserung im Gegensatz zur einseitigen Anpassung ergab, was mit einem F-Test bestimmt wurde. Die K_i -Werte wurden aus den experimentell bestimmten IC_{50} -Werten mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_d)),$$

wobei L für die Konzentration des Liganden und K_d für seine Affinität steht. Alle Kurvenberechnungen wurden mit Hilfe des InPlot-Programmes (GraphPAD Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden wurde mit zweiseitigen, gepaarten t-Tests bestimmt, die mit Hilfe des InStat-Programmes (GraphPAD Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt wurden; ein $P < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

IV. ERGEBNISSE

Mit [³H]Prazosin wurden bei der Maus spezifische, sättigungsfähige und hochaffine Bindungsstellen in zerebralem Kortex, Kleinhirn, Leber, Lunge, Niere und Herz identifiziert (Tab. 1), in der Milz wurden jedoch keine quantifizierbaren spezifischen Bindungen entdeckt (Daten nicht dargestellt). Die K_d -Werte für [³H]Prazosin waren in allen Geweben ähnlich und beliefen sich im einzelnen auf 54 ± 14 pM beim zerebralen Kortex, 87 ± 15 pM beim Kleinhirn, 78 ± 11 pM bei der Leber, 67 ± 10 pM bei der Lunge, 73 ± 11 pM bei der Niere und 66 ± 12 pM beim Herzen (die Zahlen gelten jeweils für $n = 4-5$ Versuche).

Die α_1 -Adrenozeptoren der Maus wurden pharmakologisch mit Hilfe von Kompetitionsbindungsexperimenten charakterisiert. Hierzu wurden die subtypenselektiven Agonisten Noradrenalin und Methoxamin sowie die Antagonisten 5-Methylurapidil, BMY 7378, (+)-Niguldipin, SB 216469 und Tamsulosin verwendet. Bei der Leber ergaben sich für alle Agonisten und Antagonisten steile, monophasische Kurven von niedriger Affinität (Tab. 2, Abb. 1-7), was auf eine homogene α_{1B} -Adrenozeptorenpopulation hinweist.

Beim zerebralen Kortex waren alle Kompetitionskurven für die α_{1D} -selektive Substanz BMY 7378 steil, monophasisch und niederaffin (Tab. 3, Abb. 2). Die Kurven für 5-Methylurapidil, Methoxamin, (+)-Niguldipin und Tamsulosin ließen sich dagegen meist besser mit zweiphasigen als mit einphasigen Modellen darstellen; der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen lag für diese Substanzen zwischen 14 und 43 % (Tab. 3, Abb. 1, 3, 4 und 7). Obwohl die Kompetitionskurven für Noradrenalin und SB 216469 eher flach waren, ließen sie sich bei der Hälfte aller Versuche nicht signifikant besser durch zweiphasige als durch einphasige Modelle darstellen; die berechneten Affinitäten für beide Substanzen waren niedrig (Tab. 3, Abb. 5-6).

Im zerebralen Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen waren die Kompetitionskurven für (+)-Niguldipin und Tamsulosin bedeutend steiler als

bei den Mäusen der Kontrollversuche. Sie ließen sich in den meisten Fällen nicht mehr besser durch ein zweiphasiges Modell darstellen. Die berechneten Affinitäten beider Komponenten waren hoch; die $-\log K_i$ -Werte beliefen sich für (+)-Niguldipin auf $9,40 \pm 0,18$ und für Tamsulosin auf $10,29 \pm 0,27$ bei einer Versuchsanzahl von $n = 4$ (Abb. 8).

Beim Kleinhirn der Maus wurden die Kompetitionskurven für Methoxamin, (+)-Niguldipin, Noradrenalin und SB 216469 in wenigstens der Hälfte aller Versuche ebenfalls besser mit einem einphasigen Modell dargestellt und die berechneten Affinitäten waren ebenfalls niedrig (Tab. 4, Abb. 3-6). Im Gegensatz dazu waren die Kurven für Tamsulosin flacher und in allen Fällen wesentlich besser mit zweiphasigen Modellen darzustellen (Tab. 4, Abb. 7).

In der Mäuseniere zeigten BMY 7378 und Noradrenalin in fast allen Fällen steile und monophasische Kurven, die berechneten Affinitäten waren hier ebenfalls niedrig (Tab. 5, Abb. 2 und 5). Im Gegensatz hierzu zeigten 5-Methylurapidil, Methoxamin, (+)-Niguldipin und SB 216469 flache und biphasische Kurven. Der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen war für alle Substanzen ähnlich und schwankte zwischen 48 und 55 % (Tab. 5, Abb. 1, 3, 4 und 6). Obwohl die Kurven für Tamsulosin ebenfalls flach waren, wurden sie nur in zwei von vier Experimenten signifikant besser durch ein zweiphasiges als durch ein einphasiges Modell dargestellt (Tab. 5, Abb. 7).

In der Mäuselunge ergaben sich in der Mehrzahl der Fälle für BMY 7378, Methoxamin, (+)-Niguldipin, Noradrenalin und SB 216469 steile und monophasische Kurven, die errechneten Affinitäten waren für alle Substanzen niedrig (Tab. 6, Abb. 2-6). Im Gegensatz dazu hatten 5-Methylurapidil und Tamsulosin flache und biphasische Kurven, die Versuche ergaben 54 bis 59 % hochaffine Bindungsstellen (Tab. 6, Abb. 1 und 7).

Die Behandlung mit Chloroäthylclonidin ($10 \mu\text{M}$, 30 min, 37°C) reduzierte die Dichte der darstellbaren α_1 -Adrenozeptoren signifikant in allen Geweben (Tab. 1). In Leber und Niere wurde eine fast völlige Inaktivierung beobachtet, in zerebralem Kortex und Herz nahezu 90 % und in Kleinhirn und

Lunge ungefähr 75 bis 80 %. Obwohl bei Experimenten mit einer massiven Inaktivierung und/oder kleiner Kontrollrezeptordichte eine K_d -Berechnung nicht genau möglich ist, wurden in den restlichen Versuchen keine wesentlichen Veränderungen der K_d -Werte für [3 H]Prazosin beobachtet (die Daten werden hier nicht gezeigt).

Um die Unstimmigkeiten in der Bewertung von α_{1B} -Adrenozeptoren in den Kompetitionsbindungs- und Chloroäthylclonidinexperimenten zu klären, wurde die konzentrationsabhängige Inaktivierung von α_1 -Adrenozeptorsubtypen in Mausgeweben mit Chloroäthylclonidin untersucht. Bei diesen Experimenten diente Leber von Kontrollmäusen als Quelle von α_{1B} -Adrenozeptoren, wohingegen zerebraler Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen als Quelle für α_{1A} -Adrenozeptoren verwendet wurde. Chloroäthylclonidin (0,1 – 10 μ M) inaktivierte in beiden Versuchsanordnungen konzentrationsabhängig die α_1 -Adrenozeptoren (Abb. 9). Obwohl der Anteil der Inaktivierung, bezogen auf die jeweils getestete Chloroäthylclonidinkonzentration, für α_{1A} -Adrenozeptoren signifikant kleiner war als der für α_{1B} -Adrenozeptoren, waren die Unterschiede in der Gesamtschau nur gering weil bei 10 μ M Chloroäthylclonidin auch ca. 90 % der α_{1A} -Adrenozeptoren inaktiviert wurden.

V. DISKUSSION

Die gewebe- und zelltypenspezifische Verteilung von α_1 -Adrenozeptorsubtypen kann auf der Ebene der mRNA, der Proteine und der biochemischen Funktion untersucht werden. Bei der Maus wurden Studien auf der Ebene der mRNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach reverser Transkription [Alonso-Llamazares et al., 1995; Cavalli et al., 1997] und des Northern-Blottings [Garcia-Sainz et al., 1994] durchgeführt. Diese Studien ergaben, dass α_{1A} -Adrenozeptor-mRNA in Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Aorta, Fettgewebe und mehreren Hirnregionen, einschließlich zerebralem Kortex und Kleinhirn zu finden ist. α_{1B} -Adrenozeptor-mRNA wurde ebenfalls in all diesen Geweben gefunden, wenngleich auch in etwas geringerer Menge in Milz und Fettgewebe. α_{1D} -Adrenozeptor-mRNA wurde auch in allen oben genannten Geweben entdeckt, in der Leber ist sie jedoch nur in einer der Studien [Alonso-Llamazares et al., 1995] gefunden worden, in einer anderen [Cavalli et al., 1997] aber nicht. Meine Daten zeigen, dass mit Hilfe von [3 H]Prazosin-Bindungsstudien α_1 -Adrenozeptoren auf der Proteinebene in Mausgeweben zu finden sind, und zwar in folgender quantitativer Rangfolge: zerebraler Kortex > Kleinhirn > Leber > Lunge > Niere > Herz >> Milz, wobei sich in letzterer keine Rezeptoren entdecken ließen.

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um eventuelle qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies zu erforschen, das heißt, um die Subtypen der α_1 -Adrenozeptoren in verschiedenen Mausgeweben zu bestimmen. Hierzu wurden Kompetitionsbindungsversuche mit verschiedenen subtypenselektiven Agonisten und Antagonisten sowie Inaktivierungsstudien mit Chloroäthylclonidin angewandt. Meine Ergebnisse zeigen, dass Mäuseleber eine homogene Population von α_{1B} -Adrenozeptoren exprimiert. Ähnliche Resultate erhielten auch andere Forschungsgruppen [Garcia-Sainz et al., 1994]. Obgleich die Situation in anderen Geweben ein wenig komplizierter erscheint, zeigen die Daten aus den Kompetitionsbindungsversuchen mit

subtypenselektiven Pharmaka, dass Mäusekleinhirn und -lunge ebenfalls vornehmlich α_{1B} -Adrenozeptoren exprimieren, während zerebraler Kortex und Niere der Maus eine gemischte α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptorenpopulation im Verhältnis 30:70 % bzw. 50:50 % aufweisen.

Die Darstellung von α_{1D} -Adrenozeptoren auf der Proteinebene wurde lange Zeit erschwert durch das Fehlen von selektiven Antagonisten. Inzwischen wurde aber BMY 7378 als Antagonist mit nahezu 100-facher Selektivität für α_{1D} - gegenüber α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren vorgestellt [Goetz et al., 1995]. In der vorliegenden Studie waren die Konkurrenzkurven für BMY 7378 in Mäuseleber, -niere, -lunge und zerebralem Kortex steil und monophasisch. Sie wiesen ca. 100-fach niedrigere Affinität auf als bei klonierten Ratten- α_{1D} -Adrenozeptoren [Goetz et al., 1995; Yang et al., 1997a]. Obwohl eine niedrige Affinität von BMY 7378 zum α_{1D} -Adrenozeptor der Maus nicht ausgeschlossen werden kann, zeigen diese Daten, dass α_{1D} -Adrenozeptorprotein in den entsprechenden Geweben nicht vorhanden ist, obwohl korrespondierende mRNA existiert [Alonso-Llamazares et al., 1995; Cavalli et al., 1997]. Während α_{1D} -Adrenozeptoren auf der Proteinebene in der Rattenaorta entdeckt wurden, ähneln die vorliegenden Daten denen in einigen Rattengeweben [Deng et al., 1996; Yang et al., 1997a] und in menschlicher Prostata [Michel et al., 1996] und im menschlichen Penis [Goepel et al., 1999], wo in Radioligandenbindungsstudien kein α_{1D} -Adrenozeptorprotein gefunden werden konnte, obwohl korrespondierende mRNA nachgewiesen wurde. Dass man diese mRNA bei allen drei Spezies gefunden hat, zeigt, dass α_{1D} -Adrenozeptor-mRNA entweder nur schlecht in ein funktionierendes Protein translatiert wird, oder dass ein funktionierendes Protein sehr schnell wieder abgebaut wird. Studien mit klonierten menschlichen α_{1D} -Adrenozeptoren haben gezeigt, dass Agonistenexposition bei α_{1D} -Adrenozeptoren eine geringere Downregulation erzeugt, als bei α_{1A} - oder α_{1B} -Adrenozeptoren [Yang et al., 1997b]. Diese Tatsache spricht eher für eine ineffiziente Translation der α_{1D} -mRNA als für einen schnellen Abbau des Rezeptorproteins. Weitere Nachforschungen zu dieser Frage waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Nach

Abschluß der vorliegenden Studie ist aber gezeigt worden, dass α_{1D} -Adrenozeptoren sich primär nicht auf der zellulären Plasmamembran sondern vielmehr in einem intrazellulären Kompartiment aufhalten, wo sie der Detektion durch Standardmethoden nur bedingt zugänglich sind [McCune et al., 2000]. Desweiteren konnten Studien in jüngster Zeit zeigen, dass α_{1D} -Adrenozeptoren funktionell auch in mehreren anderen Blutgefäßen sowohl der Ratte [Filippi et al., 2001] als auch des Hundes [Willems et al., 2001; Yang und Chiba, 2001] nachgewiesen werden können. Der verbleibende Teil meiner Diskussion wird sich jedoch auf die Verteilung von α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren in Mausgeweben auf der Proteinebene beschränken.

Die vorliegende Studie erbrachte schlüssige Affinitätswerte für alle eingesetzten Substanzen in allen untersuchten Geweben. Diese Werte weisen eine gute Übereinstimmung mit denjenigen auf, über die unter Verwendung der gleichen Methoden zuvor berichtet wurde. Hierbei wurden menschliche Prostata [Michel et al., 1996], zerebraler Kortex vom Rind [Büscher et al., 1996], verschiedene Ratten- [Büscher et al., 1996; Michel et al., 1993a], und Meerschweinchengewebe [Büscher et al., 1996] sowie klonierte Ratten- und Rinder- α_1 -Adrenozeptoren [Chess-Williams et al., 1996; Michel et al., 1996; Michel und Insel, 1994] untersucht. Sie stimmen ebenfalls gut mit den veröffentlichten Werten anderer Forschergruppen für hepatische Maus- α_{1B} -Adrenozeptoren überein [Garcia-Sainz et al., 1994]. Berücksichtigt man die großen Schwankungen in Bezug auf die von verschiedenen Forschergruppen veröffentlichten Affinitätswerte, liegen die vorliegenden Werte auch im Bereich derer für klonierte Subtypen aus anderen Spezies, die von anderen Forschungsgruppen veröffentlicht worden sind [Michel et al., 1995]. Folglich scheinen Maus- α_1 -Adrenozeptoren, zumindest, was die hier untersuchten Pharmaka anbelangt, ein qualitativ ähnliches pharmakologisches Profil wie die von Ratten, Meerschweinchen, Rindern und Menschen aufzuweisen.

Die Möglichkeit, Mäuse als Modellsystem einzusetzen, hängt nicht nur von der Ähnlichkeit der pharmakologischen Rezeptorprofile ab, sondern auch von der qualitativen und quantitativen Expression der Rezeptorsubtypen im

Vergleich zu der anderer Spezies. Die vorliegenden Daten belegen, dass die Unterschiede zwischen einzelnen Spezies in Bezug auf die Expression von gewebespezifischen α_1 -Adrenozeptoren bedeutend größer zu sein scheinen, als die der pharmakologischen Affinitäten eines vorgegebenen (klonierten) Subtypen. Zum Beispiel war es mir nicht möglich, α_1 -Adrenozeptorbindungen in der Mäusemilz darzustellen, jedoch ist dies bei Ratten [Michel et al., 1993a] und Meerschweinchen [Büscher et al., 1996] mit derselben Methode sehr gut gelungen; hierbei handelt es sich mehrheitlich um den α_{1B} -Rezeptorsubtypen. Qualitativ zeigte die Mäuseleber sowohl in der vorliegenden, als auch in einer früheren Studie [Garcia-Sainz et al., 1994] eine homogene Population von α_{1B} -Adrenozeptoren. Während dies auch für Ratten- [Büscher et al., 1996; Garcia-Sainz et al., 1994] und Hamsterleber zutrifft, wurden in menschlicher [Garcia-Sainz et al., 1995] und in Meerschweinchenleber [Garcia-Sainz und Romero-Avila, 1993] homogene α_{1A} -Adrenozeptorpopulationen und in Kaninchenleber gemischte α_{1A} - und α_{1B} - Rezeptorpopulationen gefunden [Garcia-Sainz et al., 1992; Taddei et al., 1993; Torres-Marquez et al., 1991]. Im zerebralen Kortex ähnelt die Verteilung der α_{1A} -Adrenozeptoren bei Mäusen (vorliegende Studie) der von Meerschweinchen [Büscher et al., 1996]. Ihre Dichte ist jedoch niedriger als bei Ratten [Han und Minnemann, 1991; Michel et al., 1993a] und bei Menschen [Gross et al., 1989], und deutlich niedriger als bei Rindern [Büscher et al., 1996]. In der Niere weist die Maus (vorliegende Studie) ähnliche Rezeptordichten für α_{1A} - und α_{1B} -Rezeptoren auf wie die Ratte [Han et al., 1990; Michel et al., 1993a], beim Meerschweinchen überwiegen jedoch α_{1B} -Rezeptoren [Büscher et al., 1996]. Folglich ergeben sich bei der Betrachtung der qualitativen und quantitativen Expression von α_1 -Adrenozeptorsubtypen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. Es lässt sich daher auch nicht genau sagen, ob ein gegebener α_1 -Adrenozeptor, den man bei der Maus als Mediator einer bestimmten Funktion identifiziert hat, bei einer anderen Spezies auf die selbe Art und Weise reagiert. Dieser Vorbehalt setzt auch dem Einsatz von Knock-Out-Mäusen als Modellsystem Grenzen.

In einigen Mausgeweben verhielt sich Tamsulosin anders als andere α_{1A} -selektive Pharmaka. Eigentümlicherweise differenzierte Tamsulosin zwei Arten von Bindungsstellen in Mäuselunge und -kleinhirn, die von verschiedenen anderen Pharmaka, z.B. (+)-Niguldipin, trotz ihrer größeren Subtypenselektivität nicht unterschieden wurden. Das könnte bedeuten, dass die hoch- und niederaffinen Bindungsstellen für Tamsulosin nicht mit den α_{1A} - beziehungsweise α_{1B} -Adrenozeptoren übereinstimmen. Über ein ähnlich abweichendes Verhalten für Tamsulosin wurde bereits in Meerschweinchengewebe berichtet [Büscher et al., 1996]. Hierbei wurde mit einer Palette von sieben subtypenselektiven Pharmaka in der Meerschweinchenniere eine homogene α_{1B} -Adrenozeptorenpopulation aufgezeigt, während mit Tamsulosin 39 % hochaffine Bindungsstellen entdeckt wurden. Im zerebralen Kortex des Meerschweinchens zeigten diese sieben subtypenselektiven Pharmaka ein Verhältnis von 25:75 % für α_{1A} - beziehungsweise α_{1B} -Adrenozeptoren an, Tamsulosin jedoch eines von 51:49 %. Diese Tatsache wirft die Möglichkeit auf, dass die hoch- und niederaffinen Bindungsstellen für Tamsulosin in manchen Maus- und Meerschweinchengewebe nicht unbedingt mit α_{1A} - beziehungsweise α_{1B} -Adrenozeptoren übereinstimmen müssen. Auf jeden Fall sollte beachtet werden, dass sich Noradrenalin in den Meerschweinchengewebe [Büscher et al., 1996] ähnlich wie Tamsulosin verhält; gleiches gilt für 5-Methylurapidil in der Mäuselunge (vorliegende Studie). Um die Eigenschaften der niederaffinen Bindungsstellen für Tamsulosin in einigen Mausgeweben zu untersuchen, wurden Kompetitionsbindungsexperimente mit Tamsulosin in zerebralem Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen durchgeführt; parallel hierzu wurde (+)-Niguldipin als Referenzsubstanz eingesetzt. Laut vorausgegangenen Studien ist der zerebrale Kortex dieser Knock-Out-Mäuse eine Quelle für homogene α_{1A} -Adrenozeptoren [Cavalli et al., 1997]. Da mit Tamsulosin und (+)-Niguldipin hier nur hochaffine Bindungsstellen gefunden werden konnten, deuten diese Daten tatsächlich darauf hin, dass die hoch- und niederaffinen Bindungsstellen für Tamsulosin α_{1A} - beziehungsweise α_{1B} -Adrenozeptoren darstellen. Warum jedoch mit Tamsulosin im Gegensatz zu anderen α_{1A} -

selektiven Pharmaka quantitativ unterschiedliche Verhältnisse der beiden Subtypen entdeckt wurden, konnte nicht geklärt werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass [³H]Tamsulosin in manchen Geweben und sogar bei klonierten Rezeptorsubtypen andere Mengen an α_1 -Adrenozeptoren markiert als [³H]Prazosin [Hein et al., 2000; Michel und Goepel, 1998; Yazawa et al., 1992]. Folglich ist es möglich, dass α_1 -Adrenozeptor-Liganden aus unterschiedlichen chemischen Klassen α_1 -Adrenozeptorsubtypen in quantitativ unterschiedlicher Art und Weise markieren. Die Gründe hierfür aufzuklären, liegt jedoch außerhalb des Rahmens dieser Studie. Die Daten zeigen jedoch, dass man aus Verhältnissen für hoch- und niederaffinen Bindungsstellen, die man mit nur einer einzigen α_{1A} -selektiven Substanz erarbeitet hat, nur mit Vorsicht Rückschlüsse auf die wirkliche quantitative Verteilung dieser Subtypen ziehen sollte.

Die alkylierende Substanz Chloroäthylclonidin war, historisch gesehen, beim Nachweis der α_1 -Adrenozeptoren-Heterogenität sehr nützlich [Han et al., 1987]. Bei manchen Studien an Rattengeweben stimmte das Verhältnis von Chloroäthylclonidin-sensitiven und -nichtsensitiven Bindungsstellen sehr gut mit dem Verhältnis von α_{1B} - beziehungsweise α_{1A} -Adrenozeptoren überein, das man in Kompetitionsbindungsversuchen mit subtypenselektiven Antagonisten entdeckt hatte [Feng et al., 1991; Minneman et al., 1988; Wilson und Minneman, 1989]. Im Gegensatz dazu alkylierte Chloroäthylclonidin problemlos klonierte α_{1A} -Adrenozeptoren [Büscher et al., 1996; Han et al., 1995; Schwinn et al., 1995]; dies führte zu dem anfänglichen Mißerfolg, den klonierten α_{1A} -Adrenozeptor des Rindes richtig zu klassifizieren [Schwinn et al., 1995]. Mittlerweile hatte sich herausgestellt, dass die Fähigkeit von Chloroäthylclonidin, α_1 -Adrenozeptorsubtypen zu alkylieren, von der Inkubationstemperatur, der -dauer und der Osmolarität des Puffersystems abhängt. Hält man all diese Bedingungen konstant, kann man in der Tat eine gewisse Subtypenselektivität der alkylierenden Effekte von Chloroäthylclonidin beobachten [Schwinn et al., 1990]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass eine Inkubation mit 10 μ M Chloroäthylclonidin für 30 min bei 37 ° C in einem

niederosmolaren Puffer nötig und zugleich ausreichend ist, um α_{1B} -Adrenozeptoren in Rattengeweben vollständig zu inaktivieren. Diese Versuchsanordnung hat jedoch nur geringe Auswirkungen auf die α_{1A} -Adrenozeptoren der Ratte [Michel et al., 1993b]. In der vorliegenden Studie inaktivierte Chloroäthylclonidin unter diesen Bedingungen in hohem Ausmaße die α_1 -Adrenozeptoren in allen Mausgeweben. Im Bezug darauf wurden keine großen Unterschiede zwischen Geweben mit (zerebraler Kortex, Niere) oder ohne (Leber) bedeutender α_{1A} -Adrenozeptorenfraktion erkennbar. Dies stimmt mit einigen Studien an klonierten α_1 -Adrenozeptorsubtypen überein [Hirasawa et al., 1997], steht aber in deutlichem Gegensatz zu den oben genannten Studien an α_1 -Adrenozeptorsubtypen in Rattengeweben. Aus diesem Grund wurde die konzentrationsabhängige Inaktivierung von α_{1B} -Adrenozeptoren (Leber) und α_{1A} -Adrenozeptoren (Zerebraler Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen [Cavalli et al., 1997]) in Mausgeweben erforscht. Obwohl diese Versuche zeigten, dass Chloroäthylclonidin in statistisch signifikantem Maße die beiden Subtypen zu unterscheiden vermag, waren die gefundenen Unterschiede letztlich gering, da die α_1 -Adrenozeptoren durch 10 μ M Chloroäthylclonidin bereits vollständig inaktiviert wurden. Diese Beobachtungen sind denen ähnlich, die unter identischen Bedingungen bei Meerschweinchen gemacht wurden [Büscher et al., 1996]. Folglich hebt die vorliegende Studie mögliche Fehlerquellen beim Gebrauch von Chloroäthylclonidin zur Identifikation von α_1 -Adrenozeptorsubtypen hervor und liefert weitere Hinweise darauf, dass Daten, die mit Chloroäthylclonidin erhoben wurden, mit äußerster Vorsicht zu interpretieren sind.

Zusammengefaßt wurden in der vorliegende Studie in einer Vielzahl von Mausgeweben α_1 -Adrenozeptorsubtypen auf der Proteinebene entdeckt und charakterisiert. Insgesamt scheint das pharmakologische Profil der α_1 -Adrenozeptorsubtypen der Maus denen anderer Spezies ähnlich zu sein. Gleichwohl scheint es aber in der quantitativen und qualitativen α_1 -Adrenozeptorsubtypen-Expression eines gegebenen Gewebes erhebliche Unterschiede zu geben. Deshalb dürfte der Nutzen von Mäusen bei der

Identifizierung von α_1 -Adrenozeptorsubtypen, die bestimmte physiologische Antworten vermitteln, begrenzt sein.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In Mausgeweben wurden α_1 -Adrenozeptoren mit Hilfe von [^3H]Prazosin-Sättigungsbindungsversuchen identifiziert. Die Rezeptordichten stellten sich in folgender Reihenfolge dar: Zerebraler Kortex > Kleinhirn > Leber > Lunge > Niere > Herz > Milz, wobei in der Milz keine Rezeptorexpression nachgewiesen werden konnte. Kompetitionsbindungsversuche wurden mit 5-Methylurapidil, BMY 7378, Methoxamin, (+)-Niguldipin, Noradrenalin, SB 216469 und Tamsulosin durchgeführt. Basierend auf den monophasischen niederaffinen Kompetitionskurven von BMY 7378 wurden keine α_{1D} -Adrenozeptoren auf der Proteinebene gefunden. Die Kompetitionsstudien mit den α_{1A}/α_{1B} -diskriminierenden Pharmaka zeigten, dass der α_{1B} -Adrenozeptor der vorherrschende, wenn nicht sogar einzige Subtyp in Mäuseleber, -lunge und -kleinhirn zu sein scheint; zerebraler Kortex und Niere der Maus enthielten hingegen ca. 30 bzw. 50 % α_{1A} -Adrenozeptoren. Die Affinitäten der verschiedenen Kompetitoren in den Mausgeweben waren denen anderer Spezies sehr ähnlich. Die Substanz Tamsulosin verhielt sich jedoch anders als die übrigen Kompetitoren: das Verhältnis von hoch- bzw. niederaffinen Bindungsstellen für diese Substanz wich in einigen Fällen von denen der anderen Pharmaka ab. Die Behandlung mit Chloroäthylclonidin (10 μM , 30 min, 37° C) inaktivierte die α_1 -Adrenozeptoren in allen Geweben um mehr als 75 %. Beim Vergleich der konzentrationsabhängigen Inaktivierung von α_{1B} - (aus der Mäuseleber) und α_{1A} -Adrenozeptoren (aus zerebralem Kortex von α_{1B} -Knock-Out-Mäusen) ergab sich, dass α_{1B} -Adrenozeptoren nur geringfügig sensibler gegenüber Chloroäthylclonidin waren als α_{1A} -Adrenozeptoren. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass Mausgewebe α_{1A} - und α_{1B} - Adrenozeptoren exprimieren, die denen anderer Spezies ähnlich sind; die gewebespezifische Verteilung der Subtypen unterscheidet sich jedoch von der anderer Arten.

VII. LITERATUR

Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Casanova E, Ovalle S, Calvo P and Chincchtru MA (1995): Molecular cloning of α_{1D} -adrenergic receptor and tissue distribution of three α_1 -adrenergic receptor subtypes in mouse. *J Neurochem* 65: 2387-2392

Brodde O-E and Michel MC (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* 51: 651-689

Büscher R, Heeks C, Taguchi K and Michel MC (1996): Comparison of guinea-pig, bovine and rat α_1 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 117: 703-711

Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenninger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Schmidt A, Beermann F and Cotecchia S (1997): Decreased blood pressure response in mice deficient of the α_{1B} -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11589-11594

Chang RSL, Chen, T-B, O'Malley SSO, Pettibone DJ, DiSalvo J, Francis B, Bock MG, Freidinger R, Nagarathnam D, Miao SW, Shen Q, Lagu B, Dhar TGM, Tyagarajan S, Marzabadi MR, Wong WC, Gluchowski C and Forray C (2000): In vitro studies on L-771-688 (SNAP 6383), a new potent and selective α_{1A} -adrenoceptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 409: 301-312

Chess-Williams R, Chapple CR, Verfürth F, Noble AJ, Couldwell CJ, and Michel MC (1996): The effect of SB 216469, an antagonist which discriminates between the α_{1A} -adrenoceptor and the human prostatic α_1 -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 119: 1093- 1100

Chien KR (1996): Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals. *J Clin Invest* 97: 901-909

Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG and Kobilka BK (1988): Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7159-7163

Deng XF, Chemtob S and Varma DR (1996): Characterization of α_{1D} -adrenoceptor subtype in rat myocardium, aorta and other tissues. *Br J Pharmacol* 119: 269-276

Feng F, Pettinger WA, Abel PW and Jeffries WB (1991): Regional distribution of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 263-268

Filippi S, Parenti A, Donnini S, Granger HJ, Fazzini A and Ledda F (2001): α_{1D} -Adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 869-875

Garcia-Sainz JA, Romero-Avila MT (1993): Characterization of the α_{1A} -adrenoceptors of guinea-pig liver membranes: studies using [³H]5-methylurapidil. *Mol Pharmacol* 44: 589-594

Garcia-Sainz JA, Romero-Avila MT, Hernandez RA, Macias-Silva M, Olivares-Reyes A and Gonzales-Espinosa C (1992): Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptors: α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1C} -subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 760-767

Garcia-Sainz JA, Casas-Gonzales P, Romero-Avila MT and Gonzales-Espinosa C (1994): Characterisation of the hepatic α_{1B} -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci* 54: 1995-2003

Garcia-Sainz JA, Romero-Avila MT and Torres-Marquez ME (1995): Characterization of the human liver α_1 -adrenoceptors: predominance of the α_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol* 289: 81-86

Goepel M, Krege S, Price DT, Michelotti GA, Schwinn DA and Michel MC (1999): Characterization of α -adrenoceptors in the corpus cavernosum of patients undergoing sex change surgery. *J. Urol.* 162: 1793-1799

Goetz AS, King HK, Ward SDC, True TA, Rimele TJ and Saussy DLJ (1995): BMY 7378 is a selective antagonist of D subtype of α_1 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 272: R5-R6

Gross G, Hanft G and Mehdorn HM (1989): Demonstration of α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptor binding sites in human brain tissue. *Eur J Pharmacol* 169: 325-328

Guimaraes S and Moura D (2001): Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53:319-56

Han C, Abel PW and Minneman KP (1987): Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chloroethylclonidine. *Mol Pharmacol* 32: 505-510

Han C, Wilson KM and Minneman KP (1990): α_1 -Adrenergic receptor subtypes and formation of inositol phosphates in dispersed hepatocytes and renal cells. *Mol Pharmacol* 37: 903-910

Han C, and Minneman KP (1991): Interaction of subtype-selective antagonists with α_1 -adrenergic receptor binding sites in rat tissues. *Mol Pharmacol* 40: 531-538

Han C, Hollinger S, Theroux TL, Esbenshade TA and Minneman KP (1995): [3 H]Tamsulosin binding to cloned α_1 -adrenergic receptor subtypes expressed in human embryonic kidney 293 cells: antagonists potencies and sensitivity to alkylating agents. *Pharmacol Commun* 5: 117-126

Hayes JM and Pennefather JN (1993): Heterogeneity of α_1 -adrenoceptors in the guinea-pig uterus. *J Auton Pharmacol* 13: 305-314

Hein P, Goepel M, Cotecchia S and Michel MC (2000): Comparison of [3 H]tamsulosin and [3 H]prazosin binding to wild-type and constitutively active α_{1B} -adrenoceptors. *Life Sci.* 67: 503-508

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP and Ruffolo RRJ (1995): International Union of Pharmacology X. Recommendation for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47: 267-270

Hirasawa A, Sugawara T, Awaji T, Tsumaya K and Tsujimoto G (1997): Subtype-specific differences in subcellular localization of α_1 -adrenoceptors: chloroethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface α_1 -adrenoceptors irrespective of the subtype. *Mol Pharmacol* 52: 764-770

Lagu B, Tian D, Jeon Y, Li C, Wetzel JM, Nagarathnam D, Shen Q, Forray C, Chang RSL, Broten TP, Ransom RW, Chan T-B, O'Malley SS, Schorn TW, Rodrigues AD, Kassahun K, Pettibone DJ, Freidinger R and Gluchowski C (2000): De novo design of a novel oxazolidinone analogue as a potent and selective α_{1A} adrenergic receptor antagonist with high oral bioavailability. *J Med Chem* 43: 2775-2778

Lepor H, Tang R, Meretyk S and Shapiro E (1993): α_1 -adrenoceptor subtypes in the human prostate. *J Urol* 149: 640-642

McCune DF, Edelman SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJJ, Perez DM and Piascik MT (2000): Regulation of cellular localization and signaling properties of the α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* 57: 659-666

Michel MC, Büscher R, Kerker J, Kraneis H, Erdbrügger W and Brodde OE (1993a): α_1 -Adrenoceptor subtype affinities of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. Evidence for heterogeneity of chloroethylclonidine-resistant rat renal α_1 -adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348: 385-395

Michel MC, Kerker J, Branchek TA and Forray C (1993b): Selective irreversible binding of chloroethylclonidine at α_1 - and α_2 -adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* 44: 1165-1170

Michel MC and Insel PA (1994): Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350: 136-142

Michel MC, Kenny BA and Schwinn DA (1995): Classification of α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 1-10

Michel MC, Gröbbel B, Taguchi K, Verfürth F, Otto T and Kröpfl D (1996): Drugs for treatment of benign prostatic hyperplasia: affinity comparison at cloned α_1 -adrenoceptor subtypes and in human prostate. *J Auton Pharmacol* 16: 21-28

Michel MC and Goepel M (1998): Differential α_1 -adrenoceptor labeling by [3 H]prazosin and [3 H]tamsulosin. *Eur J Pharmacol* 342: 85-92

Minneman KP, Han C and Abel PW (1988) Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chloroethylclonidine and WB 4101. *Mol Pharmacol* 33: 509-514

Ruffolo RRJ and Hieble JP (1994): α -Adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 61: 1-64

Ruffolo RRJ, Bondinell WE and Hieble JP (1995): α - and β -adrenoceptors: from the gene to the clinic. 2. Structure-activity relationships and therapeutic applications. *J Med Chem* 38: 3681-3716

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ and Cotecchia S (1990): Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 265: 8183-8189

Schwinn DA, Johnston GL, Page SO, Mosley MJ, Wilson KH, Worman NP, Campbell S, Roock MO, Furness LM, Parry-Smith DJ, Peter B and Beiley DS (1995): Cloning and pharmacological characterization of human α_1 -adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparison with other species. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 134-142

Taddei C, Poggesi E, Leonardi A and Testa R (1993): Affinity of different α_1 -agonists and antagonists for the α_1 -adrenoceptors of rabbit and rat liver membranes. *Life Sci* 53: PL177-PL181

Torres-Marquez E, Villalobos-Molina R and Garcia-Sainz JA (1991): α_1 -Adrenoceptor subtypes in aorta (α_{1A}) and liver (α_{1B}). *Eur J Pharmacol* 206: 199-202

Willems EW, Valdivia LF, Saxena PR and Villalon CM (2001): The role of several α_1 - and α_2 -adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in the canine external carotid circulation. *Br J Pharmacol* 132: 1292-1298

Wilson KM and Minneman KP (1989): Regional variations in α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain. *J Neurochem* 53: 1782-1786

Yang M, Verfürth F, Büscher R and Michel MC (1997a): Is α_{1D} -adrenoceptor protein detectable in rat tissues ? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 438-446

Yang M, Ruan J, Taguchi K and Michel MC (1997b): Differential regulation of human α_1 -adrenoceptor subtypes by phenylephrine treatment. *Br J Pharmacol* 120 (Suppl.): 285P

Yang XP and Chiba S (2001): Effect of different α_1 -adrenoceptor subtypes in junctional and extrajunctional neurovascular regions in canine splenic arteries *Br J Pharmacol* 132: 1852-1858

Yazawa H, Takanashi M, Sudoh K, Inagaki O and Honda K (1992): Characterization of [3 H]YM617, R-(-)-5-[2-[[2[ethoxyring(n)- 3 H](o-ethoxyphenoxy)ethyl]amino]-propyl]-2-methoxybenzenesulfonamide HCl, a potent and selective α_1 -adrenoceptor radioligand. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 201-206

VIII. TABELLEN

Tabelle 1: α_1 -Adrenozeptordichte in Mäusegeweben: Wirkungen einer Behandlung mit Chloroäthylclonidin

Gewebe	Kontrolle	Chloroäthylclonidin- behandlung	
	fmol/mg Protein	fmol/mg Protein	% der Kontrolle
zerebraler Kortex	109,5 ± 12,3	11,1 ± 2,3**	11 ± 2
Kleinhirn	70,0 ± 5,4	14,5 ± 7,8*	21 ± 12
Leber	50,1 ± 4,0	0,8 ± 0,8***	1 ± 1
Lunge	39,2 ± 3,2	10,6 ± 5,3**	26 ± 12
Niere	30,0 ± 2,2	0,4 ± 0,2**	1 ± 1
Herz	4,9 ± 0,3	0,5 ± 0,2**	11 ± 4
Milz	nicht meßbar		

Die Daten sind Mittelwerte ± SEM aus 4-5 Experimenten und angegeben als fmol/mg Protein oder als % der gepaarten Kontrollen. Die Chloroäthylclonidinbehandlung erfolgte mit 30 min Inkubation mit 10 µM bei 37° C gefolgt von 2 Auswaschzentrifugationen. *, ** und ***: P < 0,05, 0,01 und 0,001 vs. Kontrolle in einem gepaarten, zweiseitigen t-Test.

Tabelle 2: Kompetitionsbindung in der Mäuseleber

	n	Hill-Steigungsfaktor	-log K _i
5-Methylurapidil	3	1,05 ± 0,02	6,36 ± 0,05
BMY 7378	3	1,08 ± 0,03	6,61 ± 0,06
Methoxamin	5	1,40 ± 0,08	3,95 ± 0,08
(+)-Niguldipin	4	1,19 ± 0,06	7,41 ± 0,07
Noradrenalin	4	0,89 ± 0,04	5,57 ± 0,12
SB 216469	3	0,95 ± 0,05	7,80 ± 0,06
Tamsulosin	5	0,88 ± 0,06	9,24 ± 0,05

Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von n Experimenten. Keine der Kompetitionskurven wurde signifikant besser durch ein biphasisches Modell erklärt.

Tabelle 3: Kompetitionsbindung im zerebralen Kortex der Maus

	n	Hill-Steigungsfaktor	$-\log K_{i \text{ high}}$	$-\log K_{i \text{ low}}$	% hochaffine Bindungsstellen
5-Methylurapidil	3/3	$0,49 \pm 0,03$	$9,62 \pm 0,45$	$6,80 \pm 0,03$	35 ± 3
BMY 7378	3/0	$1,00 \pm 0,01$	-	$7,02 \pm 0,02$	-
Methoxamin	7/5	$0,79 \pm 0,05$	$5,82 \pm 0,28$	$4,18 \pm 0,09$	30 ± 4
(+)-Niguldipin	6/4	$0,83 \pm 0,05$	$9,56 \pm 0,17$	$7,56 \pm 0,22$	14 ± 4
Noradrenalin	6/3	$0,82 \pm 0,05$	-	$5,67 \pm 0,06$	-
SB 216469	5/0	$0,82 \pm 0,03$	-	$8,15 \pm 0,13$	-
Tamsulosin	5/5	$0,61 \pm 0,05$	$10,76 \pm 0,26$	$9,04 \pm 0,26$	43 ± 8

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n Experimenten, wobei die erste Zahl die Anzahl der Versuche und die zweite die der biphasischen Kurven angibt.

Tabelle 4: Kompetitionsbindung im Kleinhirn der Maus

	n	Hill-Steigungsfaktor	-log K _i high	-log K _i low	% hochaffine Bindungsstellen
Methoxamin	6/3	0,73 ± 0,08	-	4,50 ± 0,18	-
(+)-Niguldipin	5/1	0,80 ± 0,05	-	7,81 ± 0,09	-
Noradrenalin	4/1	0,88 ± 0,09	-	5,34 ± 0,12	-
SB 216469	5/2	0,62 ± 0,04	-	7,85 ± 0,32	-
Tamsulosin	6/6	0,51 ± 0,07	11,05 ± 0,31	9,10 ± 0,21	56 ± 4

Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von n Experimenten, wobei die erste Zahl die Anzahl der Versuche und die zweite die der biphasischen Kurven angibt.

Tabelle 5: Kompetitionsbindung in der Mäuseniere

	n	Hill-Steigungsfaktor	$-\log K_{i \text{ high}}$	$-\log K_{i \text{ low}}$	% hochaffine Bindungsstellen
5-Methylurapidil	3/3	$0,48 \pm 0,03$	$8,78 \pm 0,12$	$6,74 \pm 0,05$	55 ± 4
BMY 7378	3/0	$1,07 \pm 0,10$	-	$6,86 \pm 0,03$	-
Methoxamin	7/5	$0,83 \pm 0,16$	$6,21 \pm 0,28$	$4,48 \pm 0,19$	48 ± 7
(+)-Niguldipin	6/5	$0,59 \pm 0,10$	$8,82 \pm 0,23$	$6,72 \pm 0,11$	49 ± 5
Noradrenalin	4/1	$0,93 \pm 0,04$	-	$6,00 \pm 0,13$	-
SB 216469	4/4	$0,47 \pm 0,08$	$9,13 \pm 0,15$	$6,87 \pm 0,24$	51 ± 5
Tamsulosin	4/2	$0,58 \pm 0,11$	-	$9,21 \pm 0,19$	-

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n Experimenten, wobei die erste Zahl die Anzahl der Versuche und die zweite die der biphasischen Kurven angibt.

Tabelle 6: Kompetitionsbindung in der Mäuselunge

	n	Hill-Steigungsfaktor	-log K _i high	-log K _i low	% hochaffine Bindungsstellen
5-Methylurapidil	3/3	0,42 ± 0,05	8,95 ± 0,22	6,71 ± 0,14	59 ± 3
BMY 7378	3/0	1,53 ± 0,37	-	6,94 ± 0,04	-
Methoxamin	6/2	1,56 ± 0,75	-	4,62 ± 0,26	-
(+)-Niguldipin	5/2	0,78 ± 0,20	-	7,35 ± 0,42	-
Noradrenalin	3/0	1,05 ± 0,10	-	5,61 ± 0,27	-
SB 216469	3/0	0,85 ± 0,04	-	8,12 ± 0,09	-
Tamsulosin	5/4	0,49 ± 0,10	10,49 ± 0,26	7,86 ± 0,52	54 ± 12

Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von n Experimenten, wobei die erste Zahl die Anzahl der Versuche und die zweite die der biphasischen Kurven angibt.

IX. ABBILDUNGEN

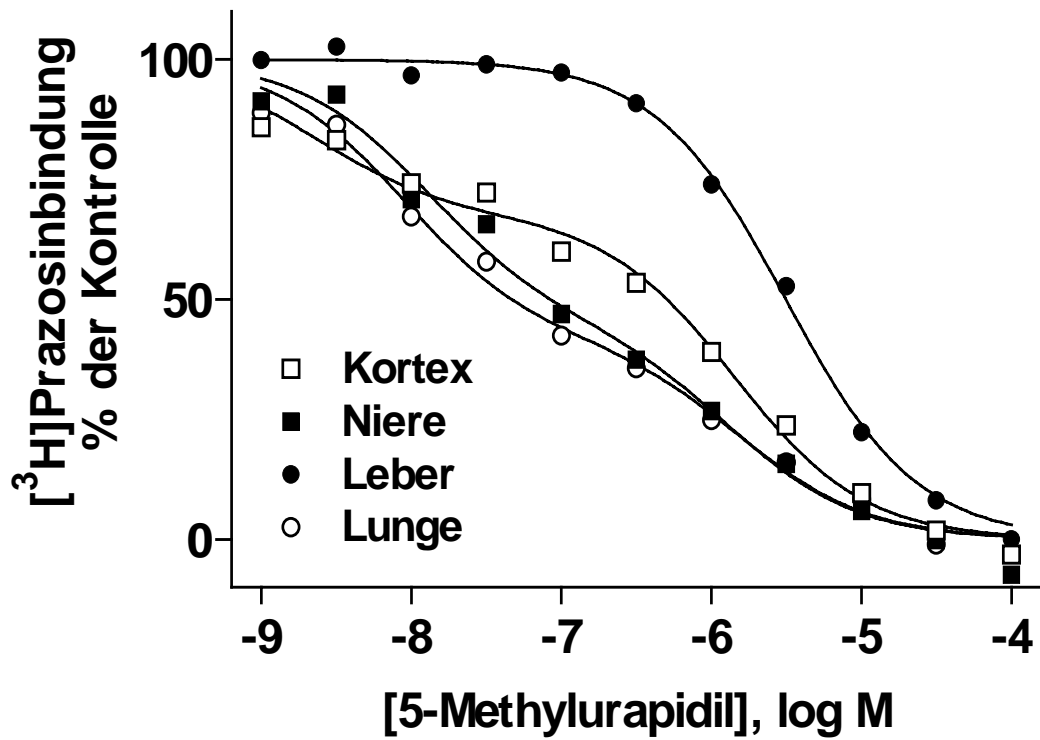


Abbildung 1: Ergebnisse der 5-Methylurapidil-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-3 und 5-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

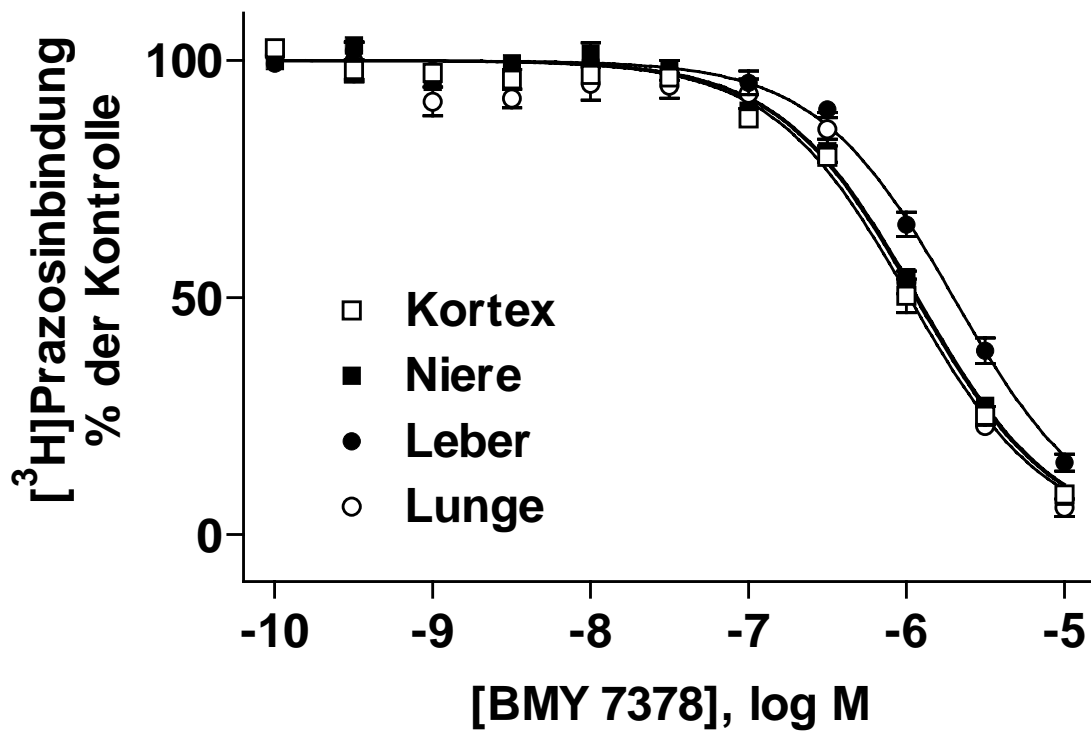


Abbildung 2: Ergebnisse der BMY 7378-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-3 und 5-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

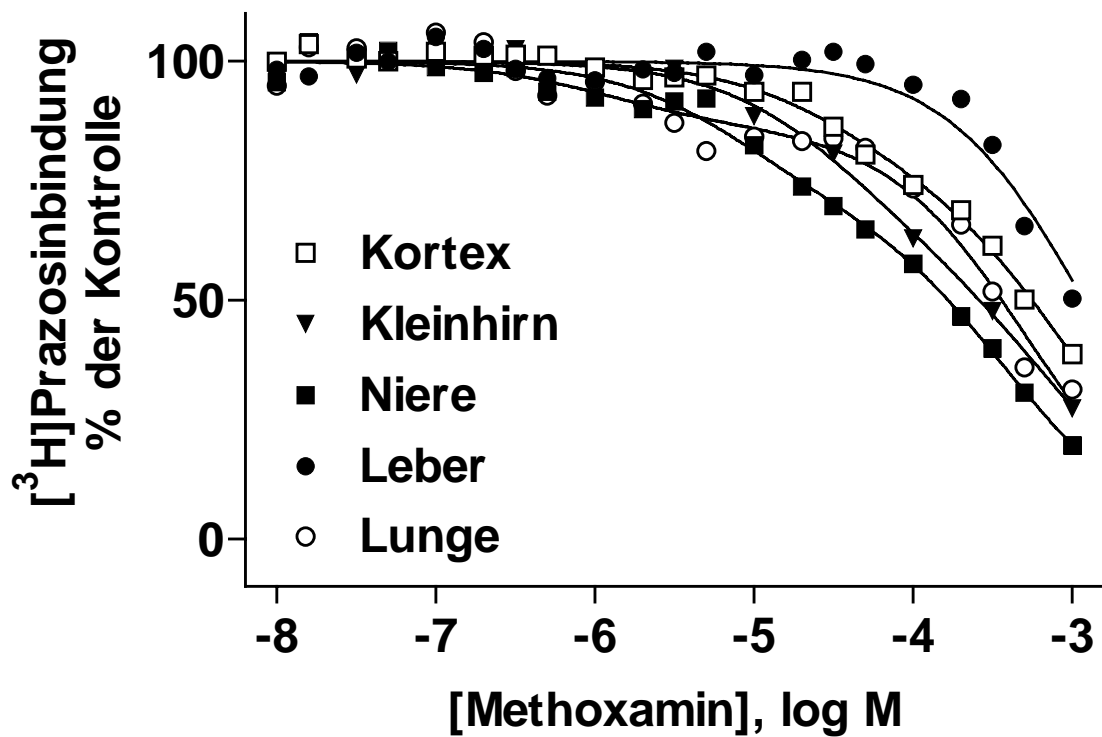


Abbildung 3: Ergebnisse der Methoxamin-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Kleinhirn (ausgefüllte Dreiecke), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

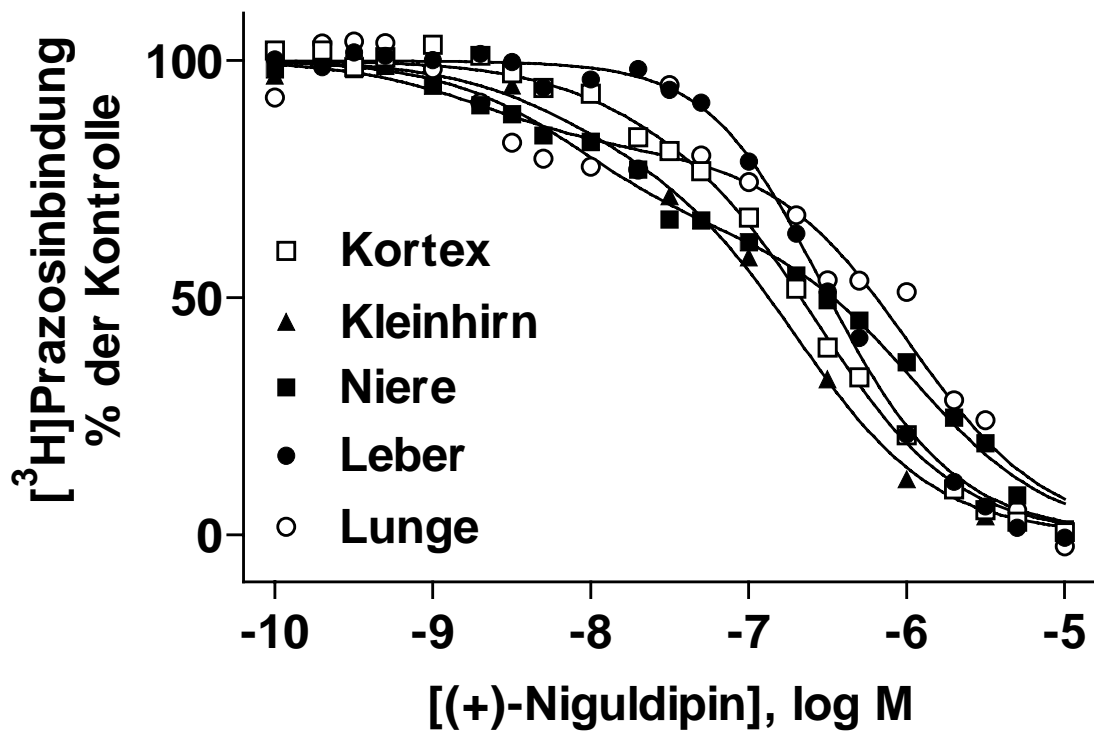


Abbildung 4: Ergebnisse der (+)-Niguldipin-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Kleinhirn (ausgefüllte Dreiecke), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

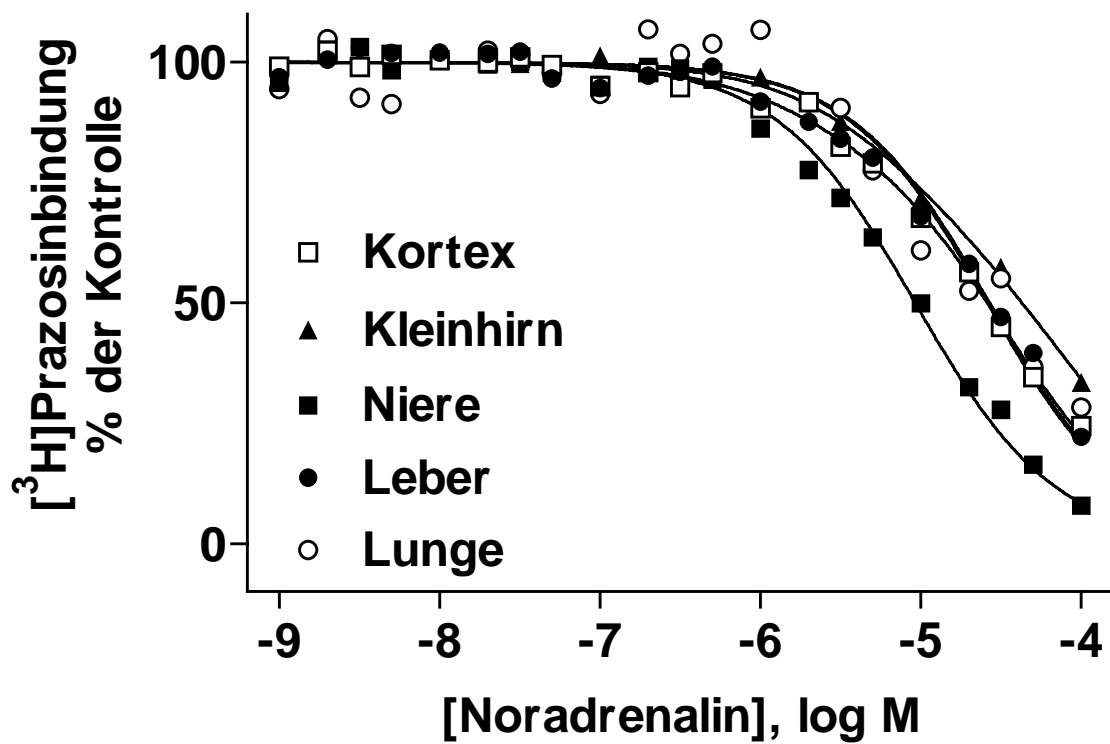


Abbildung 5: Ergebnisse der Noradrenalin-Kompetitionsbindung mit $[^3\text{H}]$ Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Kleinhirn (ausgefüllte Dreiecke), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

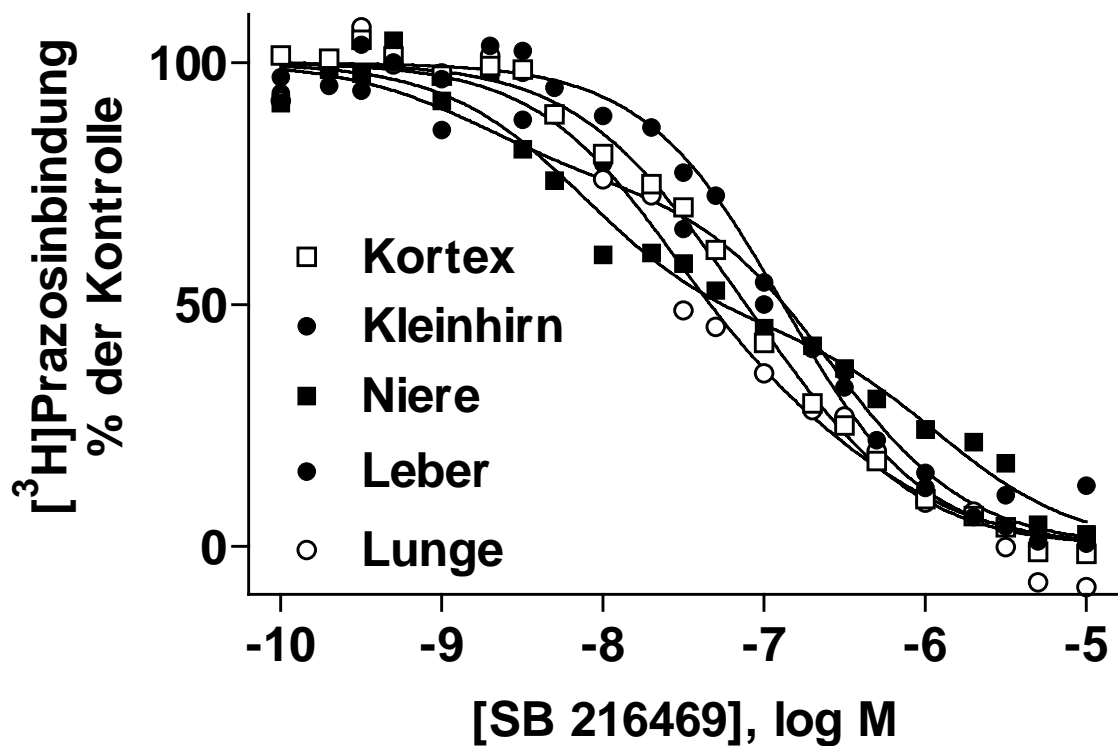


Abbildung 6: Ergebnisse der SB 216469-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Kleinhirn (ausgefüllte Dreiecke), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

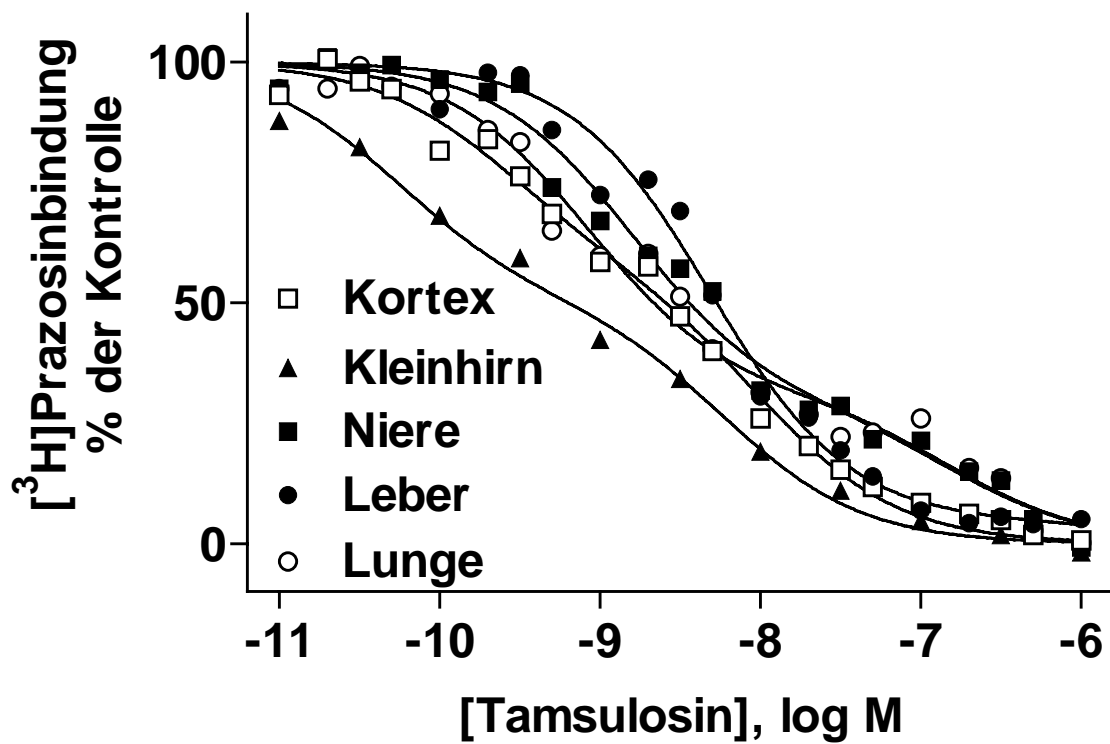


Abbildung 7: Ergebnisse der Tamsulosin-Kompetitionsbindung mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex der Maus (offene Quadrate), Kleinhirn (ausgefüllte Dreiecke), Niere (ausgefüllte Quadrate), Lunge (offene Kreise) und Leber (ausgefüllte Kreise). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der Gesamtanzahl der Experimente, die in den Tabellen 2-6 aufgeführt sind. Die Tabellen enthalten auch die quantitative Analyse der Daten.

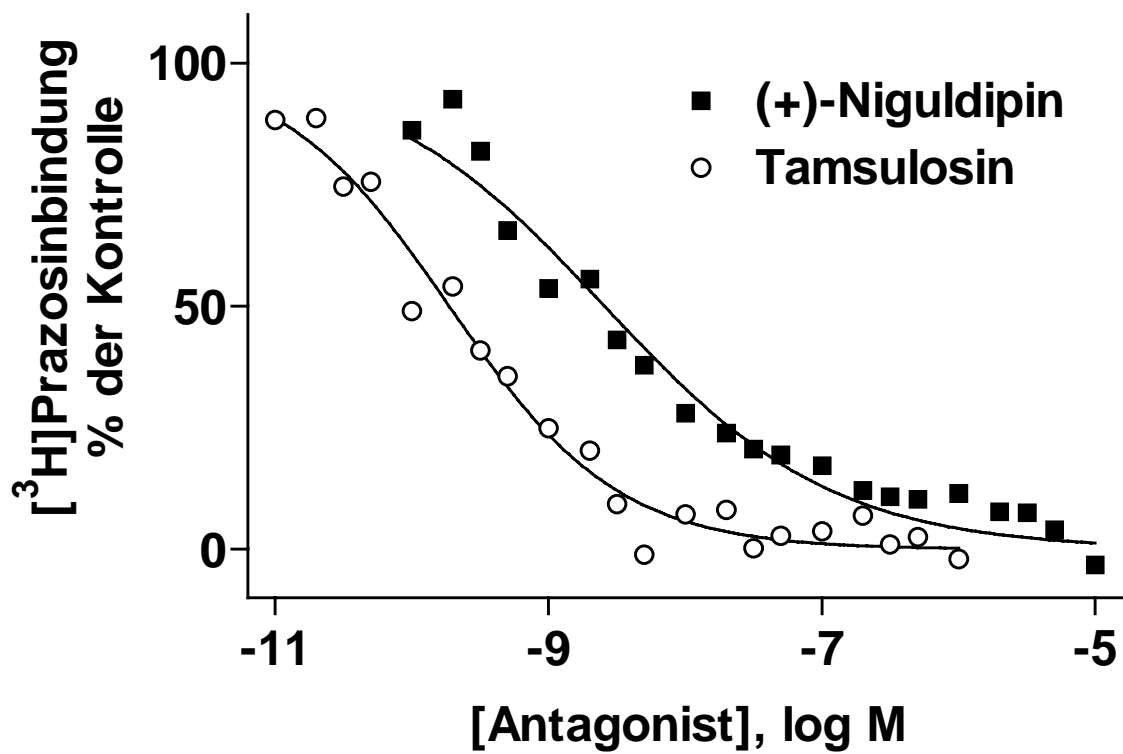


Abbildung 8: Ergebnisse der (+)-Niguldipin- (ausgefüllte Quadrate) und Tamsulosin- (offene Kreise) Kompetitionsbindungen mit [³H]Prazosin in zerebralem Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert von vier Experimenten.

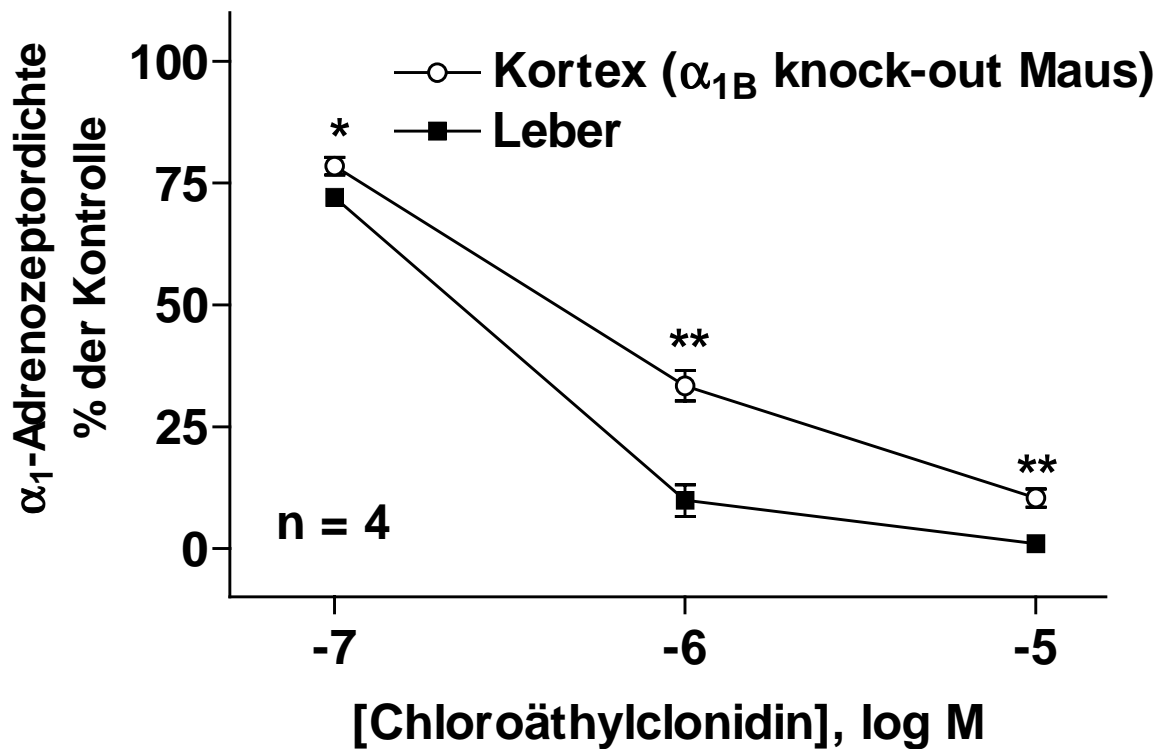


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von α_{1A} - und α_{1B} -Adrenozeptoren der Maus durch Chloroäthylclonidin. Membranpräparate normaler Mäuselebern wurden als Quelle reiner α_{1B} -Adrenozeptoren verwendet (ausgefüllte Quadrate), zerebraler Kortex von α_{1B} -Adrenozeptor-Knock-Out-Mäusen diente als Lieferant für α_{1A} -Adrenozeptoren (offene Kreise). Sie wurden in An- und Abwesenheit (Kontrolle) der aufgeführten Chloroäthylclonidinkonzentrationen für 30 min und 37° C inkubiert; es folgten je zweimaliges Waschen und Zentrifugieren. Danach wurde die α_1 -Adrenozeptorendichte durch Kompetitionsbindungsexperimente mit [3 H]Prazosin bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert aus vier Versuchen. Die α_1 -Adrenozeptorendichte belief sich unter Kontrollbedingungen in Leber und zerebralem Kortex auf 92 ± 17 beziehungsweise 59 ± 4 fmol/mg Protein. * und ** bedeuten ein $P < 0,05$ und $0,01$ in einem zweiseitigen t-Test im Vergleich zur Leber.

X. LEBENSLAUF

Jens Reese
Lehnsgrund 43
45149 Essen
Telefon: 0201 / 710 38 47

Geburtsdatum	08. November 1974
Geburtsort	Wuppertal
Schulbildung	1981 bis 1985 Städtische Grundschule Schützenstraße, Wuppertal 1985 bis 1994 Städtisches Gymnasium Sedanstraße, Wuppertal Abitur am 09.06.1994
Studium	Oktober 1994 bis September 1996 vorklinischer Studienabschnitt an der Universität-Gesamthochschule Essen Ärztliche Vorprüfung am 03.09.1996 Oktober 1996 bis März 1997 Freisemester für den praktischen Teil der Dissertation April 1997 bis März 1998 erster klinischer Studienabschnitt an der Universität-Gesamthochschule Essen Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 24.03.1998 April 1998 bis September 2000 zweiter klinischer Studienabschnitt an der Universität-Gesamthochschule Essen Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 12.09.2000 Oktober 2000 bis September 2001 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Essen Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 29.10.2001

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Ellen Beisenbusch, Frau Dr. rer. nat. Angela Bischoff, Frau Anette Kötting, Herrn Dipl.-Ing. Mathias Krüger, Frau Martina Michel und Frau Heike Sporkmann für die freundliche und geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Labormethoden sowie die große Hilfsbereitschaft und die freundliche und kollegiale Integration in das Laborteam bedanken. Sie haben mir ein effizientes Arbeiten und einen angenehmen Aufenthalt im nephrologischen Labor ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin C. Michel für seine exzellente Betreuung während dieser Arbeit. Seine geduldige Anleitung, seine Motivation und stetige Hilfsbereitschaft sowie das Einbringen seines großen Erfahrungsschatzes haben mir die Fertigstellung dieser Dissertation erst ermöglicht. Für die unkomplizierte, freundschaftliche Zusammenarbeit und die außerordentlich gute Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bedanken.