

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

**Einfluss von MK-801 und Ethanol
auf die relative mRNA Expression von Spleißvarianten und Untereinheiten
des NMDA Rezeptors in Hirngewebe von Ratten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hanna Räder

aus
Gross-Gerau

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Möller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Konnerth

Prof. Dr. H. Künzle

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dan Rujescu

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2003

**Meinem Vater und
meiner Schwester Eva**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das glutamaterge System	2
1.1.1	Metabotrope Glutamatrezeptoren	2
1.1.2	Ionotrope Glutamatrezeptoren	2
1.2	Der NMDA Rezeptor	3
1.2.1	Haupteigenschaften des NMDA Rezeptors	3
1.2.2	Aufbau des Rezeptorkomplexes.....	5
1.2.3	NR1 Untereinheit und NR1 Spleißvarianten.....	8
1.2.3.1	Regionale Expression der NR1 Untereinheit und N-terminaler Spleißvarianten ...	8
1.2.3.2	Funktionelle Eigenschaften der N-terminalen Spleißvarianten	9
1.2.4	NR2 Untereinheiten.....	10
1.2.4.1	Regionale Expression der NR2 Untereinheiten	10
1.2.4.2	Funktionelle Eigenschaften der NMDA Rezeptoruntereinheiten NR2A – NR2D	11
1.2.4.2.1	Bindungsaffinität von Agonisten.....	11
1.2.4.2.2	Bindungsaffinität von Antagonisten	11
1.2.4.2.3	Elektrophysiologische Eigenschaften.....	11
1.2.4.2.4	Versuche mit <i>knock-out</i> Mäusen	12
1.3	Der NMDA Rezeptorantagonist Dizolcipin (MK-801)	13
1.3.1	Geschichte und Entwicklung.....	13
1.3.2	Ein pharmakologisches Psychosemodell unter Verwendung von NMDA Rezeptorantagonisten	15
1.4	Der NMDA Rezeptorantagonist Alkohol	16
1.4.1	Wirkung von Ethanol auf das glutamaterge System bzw. den NMDA Rezeptor	16
1.4.1.1	Ethanolbindungsstelle	16
1.4.2	Akuter Einfluss von Ethanol auf die glutamaterge Erregungsweiterleitung	17
1.4.2.1	Ethanolinteraktionen mit den NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten.....	17
1.4.3	Chronischer Einfluss von Ethanol auf die glutamaterge Erregungsweiterleitung.....	18
1.4.3.1	Neurochemische Veränderungen	19
1.4.3.2	Neuropathologische Veränderungen	19
1.4.4	Modell der forcierten Ethanolintoxikation.....	20
1.4.5	Das 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell.....	20

2	Eigene Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit	22
2.1	Auswirkungen von MK-801 und Ethanol auf die NMDA Rezeptorexpression	22
2.1.1	Wie beeinflusst MK-801 die NMDA Rezeptorexpression?	22
2.1.2	Wie beeinflusst Ethanol die NMDA Rezeptorexpression?	22
2.2	Zielsetzung	23
3	Materialien und Methoden	24
3.1	Materialien	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Software	24
3.1.3	Chemikalien	25
3.1.4	Tiermodelle	27
3.1.4.1	Pharmakologisches Psychosemodell unter Verwendung des NMDA Rezeptorantagonisten MK-801	27
3.1.4.2	Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation	28
3.1.4.3	Das 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell	29
3.2	Methoden	31
3.2.1	RNA Extraktion	31
3.2.1.1	Präparation der Gewebeproben	31
3.2.1.2	Homogenisierung des Gewebes	31
3.2.1.3	Auffangen und Binden der RNA	32
3.2.1.4	RNA Reinigung und DNA Verdau	32
3.2.1.5	Auswaschen der RNA	33
3.2.2	Reinheits- und Ausbeutebestimmung der RNA	34
3.2.3	Reverse Transkription (RT)	35
3.2.3.1	Hintergründe zur RT	35
3.2.3.2	Vorgehensweise	37
3.2.4	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	38
3.2.4.1	Das Reaktionsprinzip der PCR	38
3.2.4.2	Allgemeine PCR Bedingungen	39
3.2.4.3	PCR Optimierung	40
3.2.4.3.1	Primerpaar für NR1 +E5/-E5	40
3.2.4.3.2	Primerpaar für GAPDH/NR2B	40
3.2.4.3.3	Primerpaar für NR2C/NR2A	41
3.2.4.3.4	Primer Rehydratisierung	41

3.2.4.3.5	Puffer Optimierung	42
3.2.4.3.6	PCR-Zyklusoptimierung.....	42
3.2.4.3.6.1	Zyklusoptimierung für NR1 +E5/-E5	43
3.2.4.3.6.2	Zyklusoptimierung GAPDH/NR2B.....	44
3.2.4.3.6.3	Zyklusoptimierung NR2C/NR2A	45
3.2.4.3.7	PCR Bedingungen.....	46
3.2.4.3.8	Pipettierschema und Reaktionsansatz	47
3.2.5	Der Restriktionsverdau	48
3.2.6	Gelelektrophorese.....	49
3.2.6.1	Densitometrische Gelauswertung.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Auswertungsmethode und Messdaten.....	52
4.1.1	t-Test für unabhängige Stichproben	52
4.1.2	Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).....	52
4.2	Relative mRNA Expression des NMDA Rezeptors im pharmakologischen Psychosemodell.....	53
4.2.1	Ratio NR1 +E5/-E5.....	54
4.2.2	Ratio NR2C/NR2A	56
4.2.3	Ratio GAPDH/NR2B.....	58
4.3	Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Unter- einheiten im Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation	60
4.3.1	Ratio NR1 +E5/-E5.....	61
4.3.1.1	Post-hoc Test und Balkendiagramme	62
4.3.2	Ratio NR2C/NR2A	63
4.3.2.1	Post-hoc Tests und Balkendiagramme.....	64
4.3.3	Ratio GAPDH/NR2B.....	65
4.3.3.1	Post-hoc Tests und Balkendiagramme.....	66
4.4	Relative mRNA Expression der Spleißvarianten und Untereinheiten im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell	69
4.4.1	Ratio NR1 +E5/-E5.....	70
4.4.2	Ratio NR2C/NR2A	71
4.4.3	Ratio GAPDH/NR2B.....	72

5	Diskussion	73
5.1	Auswirkung chronisch niedrig dosierter MK-801 Applikation auf NMDA Rezeptoren	73
5.1.1	Relevanz des Tiermodells	73
5.1.2	mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im pharmakologischen Psychosemodell	74
5.1.2.1	Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten	74
5.1.2.2	Relative mRNA Expression der NR2 Untereinheiten	75
5.1.2.2.1	Ratio GAPDH/NR2B	75
5.1.2.2.2	Ratio NR2C/NR2A	75
5.1.3	Relevanz der Ergebnisse für das Psychosemodell	76
5.1.4	Befunde zur Bestätigung dieses Modells	76
5.2	NMDA Rezeptoren und Entstehung von Alkoholsuchtverhalten	78
5.2.1	Tiermodelle zum Beschreiben vom Suchtverhalten beim Menschen	78
5.2.2	mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation	79
5.2.2.1	Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten	79
5.2.2.2	Relative mRNA Expression der NR2 Untereinheiten	80
5.2.2.2.1	Ratio NR2C/NR2A	80
5.2.2.2.2	Ratio GAPDH/NR2B	80
5.2.2.3	Weitere Befunde	81
5.2.3	Relevanz des 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodells	82
5.2.4	mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell	83
6	Zusammenfassung	86
7	Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis	88
8	Literaturverzeichnis	91
9	Danksagung	106

10	Lebenslauf	107
10.1	Publikationen	108
10.2	Kongressbeiträge.....	108
10.3	Posterpräsentationen	108

1 Einleitung

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkungen zweier NMDA Rezeptorantagonisten (MK-801 und Ethanol) auf den glutamatergen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptor.

Dabei wird das Spleißverhalten der NR1 Untereinheit sowie die Expression der NR2A – NR2C Untereinheiten des NMDA Rezeptors genauer untersucht.

Im ersten Teil wird ein pharmakologisches Psychosemodell verwendet, um den Einfluss einer chronisch niedrig dosierten Gabe von MK-801 auf die relative mRNA Expression des NMDA Rezeptors zu untersuchen. Die Ergebnisse werden dabei vor dem Hintergrund des Pathomechanismus einer glutamatergen Dysfunktion interpretiert.

Im zweiten Teil werden mittels zweier verschiedener Tiermodelle der Einfluss von akutem und chronischem Alkoholkonsum auf die relative mRNA Expression des NMDA Rezeptors in unterschiedlichen Hirnregionen von Ratten untersucht. Veränderungen des Rezeptors werden dabei im Zusammenhang mit der Entwicklung von Alkoholsucht näher betrachtet.

1.1 Das glutamaterge System

Glutamat gilt als der wichtigste erregende Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS).

Er spielt eine wichtige Rolle bei dessen Entwicklung sowie bei zahlreichen wesentlichen Hirnfunktionen. Glutamat aktiviert glutamaterge Rezeptoren (GluR), wobei man zwischen ionotropen und metabotropen Rezeptoren unterscheidet.

1.1.1 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Metabotrope Glutamatrezeptoren unterteilen sich in acht verschiedene Subtypen, die mit mGluR 1 – 8 bezeichnet werden. Sie vermitteln die langsame glutamaterge Signaltransduktion, indem sie über G-Proteine (Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein) intrazelluläre Botenstoffe (*second messenger*) freisetzen. Diese modulieren wiederum andere Stoffwechsellkaskaden.

1.1.2 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren bilden kationspezifische Ionenkanäle und können aufgrund pharmakologischer und elektrophysiologischer Eigenschaften in zwei verschiedene Rezeptorsubtypen unterteilt werden: NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) und non-NMDA Rezeptoren.

Beide bestehen aus vier transmembranen Domänen: TM1, TM2, TM3 und TM4. Die TM2 Domäne scheint den Ionenkanal des Rezeptors zu formen, welcher für die Depolarisation wichtig ist. Der extrazelluläre N-Terminus wird als Polypeptidkette definiert, die am Ende eine freie Aminogruppe trägt. Am intrazellulären C-Terminus befindet sich am Ende der Polypeptidkette eine α -Carbonylgruppe [198].

Die non-NMDA Rezeptoren werden entsprechend ihren Agonisten, α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazol (AMPA) und Kainat (KA) eingeteilt [36, 40]. Vom AMPA Rezeptor kennt man bisher eine Genfamilie mit vier Untergruppen (GluR 1 – 4), vom KA Rezeptor zwei Genfamilien, unterteilt in GluR 5 – 7 und KA 1 – 2 [36]. Die Erregung von AMPA und KA Rezeptoren führt zu einem spannungsunabhängigen depolarisierenden Einstrom von Natriumionen. Aufgrund der raschen Kinetik der AMPA und KA Rezeptoren dienen sie hauptsächlich der schnellen glutamatergen Informationsübertragung. Da sie wenig calciumpermeabel sind, tragen sie nur geringfügig zu Prozessen bei, welche durch einen erhöhten intrazellulären Calciumspiegel ausgelöst werden [137].

1.2 Der NMDA Rezeptor

Der NMDA Rezeptor ist gegenwärtig der am besten untersuchte Subtyp der Glutamatrezeptoren. Man geht davon aus, dass er nicht nur in der schnellen Informationsübertragung eine zentrale Rolle spielt, sondern auch bei Prozessen wie Synaptogenese, Gedächtnisbildung, Lernen und Erinnerungsvermögen von wichtiger Bedeutung ist [1]. Eine Dysfunktion von NMDA Rezeptoren wird im Zusammenhang mit der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen wie z. B. der Alkoholerkrankung und der Schizophrenie diskutiert [37, 67, 176].

1.2.1 Haupteigenschaften des NMDA Rezeptors

Der spannungsabhängige und transmittergesteuerte NMDA Rezeptor trägt beim Ruhepotential (-70 mV bis -50 mV) nur geringfügig zu erregenden postsynaptischen Potentialen bei, da sein Ionenkanal durch Magnesiumionen blockiert wird. Erfolgt eine Depolarisation der postsynaptischen Membran durch gleichzeitige präsynaptische Glutamat- und Glycinbindung, verlassen die Magnesiumionen den Kanal, und Natrium- und Calciumionen strömen ein. Dieser Einstrom von Calciumionen löst eine Kaskade von Folgereaktionen, wie z. B. Aktivierung phosphorylierender Enzyme, aus [176].

Aufgrund seiner Besonderheit in der synaptischen Übertragung (langsames Öffnen und Schließen der Kanäle und hohe Permeabilität für Calciumionen) kann der Rezeptor nachgeschaltete Signalkaskaden induzieren, welche wichtig für die Plastizität in der Erregungsübertragung sind. Dabei kann eine zu hohe Calciumionenkonzentration neurotoxisch wirken und bei Übererregung des Rezeptors zum Zelltod führen [22, 176].

Die Bindung von Rezeptormodulatoren wie Polyamin, Zinkionen oder Protonen an verschiedene Bindungsstellen des Rezeptors verleihen dem NMDA Rezeptor unterschiedliche Eigenschaften, die je nach seiner Zusammensetzung variieren [146, 116, 199].

Substanzen die antagonistisch auf den NMDA Rezeptor wirken sind u. a. MK-801, Phencyclidin (PCP) und Ketamin, welche den Rezeptor im Ionenkanal blockieren und Ethanol, dessen Bindungsstelle noch nicht genau bekannt ist (Abb. 1).

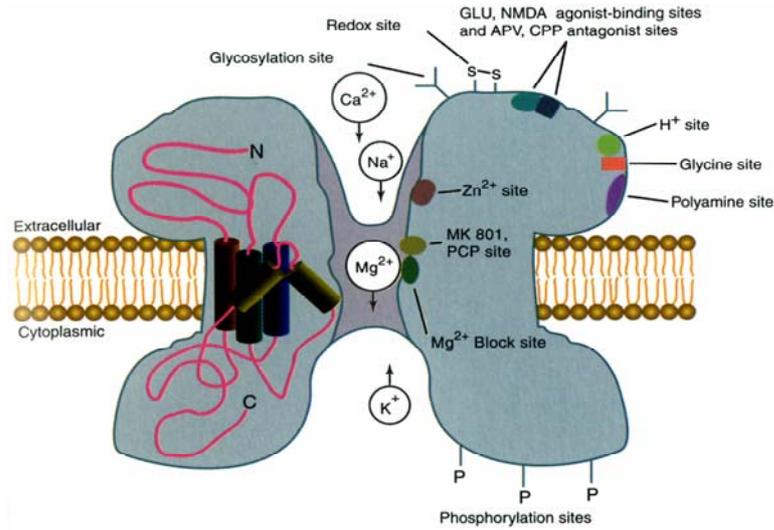


Abb. 1: aus Michael J. Zigmond (ed.): Fundamental Neuroscience [196]

Schematische Darstellung, die den NMDA Rezeptor mit Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und Regulatoren beschreibt. Sein komplex gebauter Ionenkanal durch spannungsabhängige Magnesiumionen Blockade, hohe Permeabilität für Calciumionen und langsame Öffnungskinetik charakterisiert.

1.2.2 Aufbau des Rezeptorkomplexes

Der NMDA Rezeptorkomplex besitzt eine heteromere Struktur, welche durch Agonisten- und Antagonisten- Bindungsstudien aufgedeckt wurde [40]. Hinweise auf die Gegenwart multipler Polypeptide im NMDA Rezeptorkomplex ergaben *in vitro*-Versuche von NMDA Rezeptoruntereinheiten, die in *Xenopus* Oocyten exprimiert wurden [78, 120, 130, 132].

Die existierenden Genfamilien bestehen aus der NR1 Untereinheit, welche 1991 zuerst von Moriyoshi et al. [132] kloniert wurde, und der Familie der NR2A – NR2D Untereinheiten. Diese sind zu ca. 20% homolog [78, 130].

Die mRNA-Transkripte der ionotropen Glutamaterezeptoren kodieren für Proteine mit einer Länge von ca. 900 (NR1) bis ca. 1500 Aminosäuren (NR2) und sind teilweise posttranskriptionellen Veränderungen wie alternativem Spleißen unterworfen. Dies hat die Expression funktionell sehr unterschiedlicher Proteine zur Folge [73].

Durch alternatives Spleißen entstehen aus der NR1 Untereinheit acht Isoformen (Abb. 2). Sie unterscheiden sich durch Vorhandensein oder Abwesenheit einer aus 21 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Kasette (Exon 5) und zweier C-terminalen Kassetten (Exon 21 und Exon 22). Dabei kodiert Exon 21 für 37 und Exon 22 für 38 Aminosäuren. Insgesamt besteht das NR1 Gen aus 22 Exons und 21 Introns [40, 73].

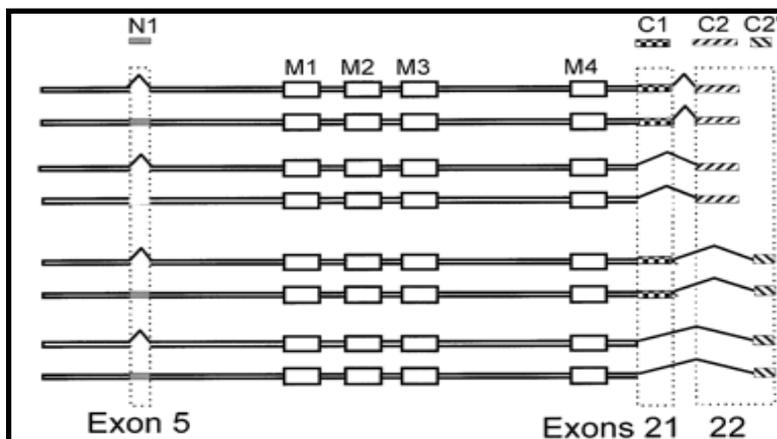


Abb. 2: aus Dingledine R. et al. [36]

Die Abbildung stellt die Untereinheit NR1 dar, welche durch ein Gen kodiert wird. Durch alternatives Spleißen entstehen acht mögliche Isoformen.

Die weißen Boxen M1-M4 repräsentieren die vier transmembranen Domänen. N1 dient zur Bezeichnung von Exon 5, C1 von Exon 21 und C2 von Exon 22. Innerhalb der gestrichelten Gebiete findet alternatives Spleißen statt.

50% des NR1 Proteins besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne, weiterhin befinden sich extrazellulär zwei Segmente (S1 und S2), welche wahrscheinlich die Bindungsstellen für Glycin und Glutamat darstellen [197]. Das intrazelluläre C-terminale Ende beinhaltet vier oder fünf Bereiche, die von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden [174]. Weiterhin existieren drei transmembrane Domänen (TM1, TM3, TM4) und ein viertes hydrophobes Segment, welches in Form einer Haarnadelschleife den Ionenkanal ausbildet [197] (Abb. 3).

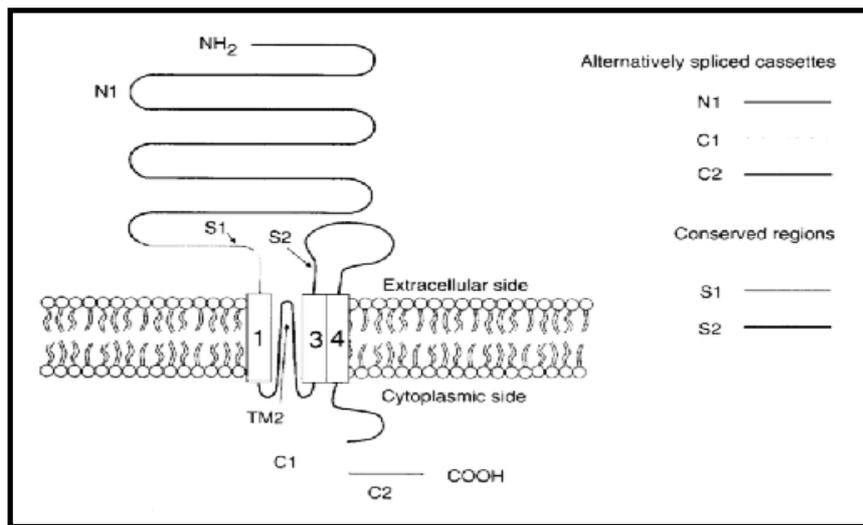


Abb. 3: aus Zukin R. und Bennett M. [197]

Schematische Darstellung der möglich anzunehmenden Struktur der NR1 Untereinheit, welche die alternativen Spleißstellen für Exon 5 (N1), Exon 21 (C1) und Exon 22 (C2) enthält.

Die Familie der NR2 Untereinheiten NR2A, NR2B, NR2C, NR2D wird durch vier Gene kodiert. Die Untereinheiten NR2A und NR2C sind zu 55%, die Untereinheiten NR2A und NR2B zu 70% in ihrer Aminosäuresequenz homolog. Sie werden altersabhängig unterschiedlich exprimiert, wobei die Verteilung der NR2A Untereinheit die größte Ähnlichkeit mit der der NR1 Untereinheit zeigt [130].

Neuerdings wurde von einer dritten NR3 Untereinheit berichtet, welche den NMDA Rezeptor in inhibitorischer Weise zu modulieren scheint, aber keinen funktionellen Ionenkanal bildet [24, 32, 172].

Die genaue Zusammensetzung des nativen NMDA Rezeptors ist nicht endgültig geklärt.

Die NR1 Untereinheit ist so aufgebaut, dass sie einen funktionellen Ionenkanal ausbilden kann [73]. NR2 Untereinheiten können im Gegensatz zur NR1 Untereinheit keine funktionellen Ionenkanäle ausbilden. Sie besitzen nur dann eine Funktion, wenn sie mit der NR1 Untereinheit koexprimiert werden.

Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass der native NMDA Rezeptor aus einer Kombination von NR1 und NR2 Untereinheiten besteht. Strommuster einzelner Kanäle weisen darauf hin, dass der NMDA Rezeptorkomplex aus einem Pentamer von drei NR1 Untereinheiten und zwei NR2 Untereinheiten gebildet wird [145].

Durch die Kombination der NR1 Untereinheit mit verschiedenen NR2 Untereinheiten entstehen funktionsfähige Rezeptorkomplexe, die sowohl elektrophysiologisch als auch pharmakologisch variieren, z. B. unterscheiden sie sich je nach Komposition in ihrer Sensitivität für Agonisten bzw. für Antagonisten oder in ihrer Reaktionskinetik [78, 131].

Aufgrund der funktionellen Unterschiede der NR2 Untereinheiten wird angenommen, dass sie (in Kombination mit den acht NR1 Isoformen) vorrangig die funktionelle Vielfalt der NMDA Rezeptoren mitbestimmen. Dabei scheinen sie die Aktivität des Rezeptorkomplexes insgesamt zu erhöhen [40, 78, 120, 131, 158].

1.2.3 NR1 Untereinheit und NR1 Spleißvarianten

1.2.3.1 Regionale Expression der NR1 Untereinheit und N-terminaler Spleißvarianten

Die NR1 Untereinheit wird in fast allen Hirnregionen exprimiert. Im Gehirn einer erwachsenen Ratte ist sie vorwiegend im cerebralen Cortex, Hippocampus, olfaktorischen Bulbus, Thalamus, Striatum, Hirnstamm und Cerebellum zu detektieren. Aufgrund der ubiquitären Verteilung geht man davon aus, dass die NR1 Untereinheit die grundlegende Komponente des Rezeptors darstellt [197] (Abb. 4a).

NR1 Untereinheiten ohne N-terminale Kasette (-Exon 5) wurden hauptsächlich im Hippocampus, Striatum und Cerebellum detektiert (Abb. 4b), während die Spleißvarianten mit N-terminaler Kasette (+Exon 5) hauptsächlich im Cerebellum zu finden sind (Abb. 4c).

Insgesamt wird die Spleißvariante ohne N-terminale Kasette im Vergleich zur Spleißvariante mit N-terminaler Kasette fünffach stärker exprimiert [96, 98, 197].

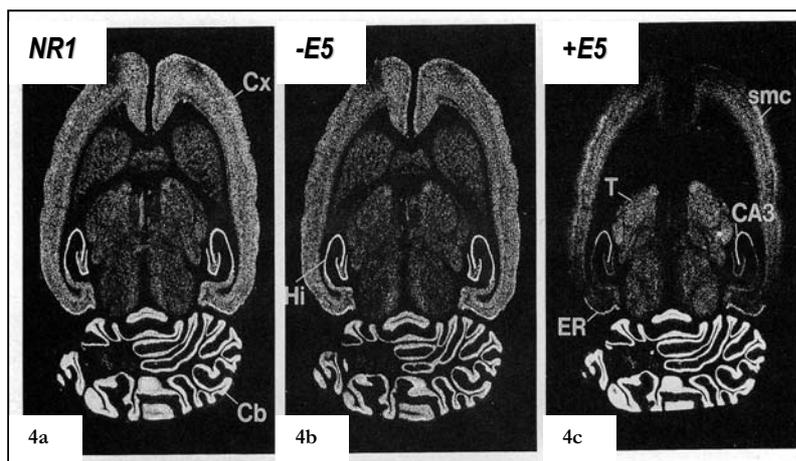


Abb. 4 a- c: aus Laurie und Seeburg [96]

Horizontalschnitte durch das Hirn einer erwachsenen Ratte, welche die Expression der NR1 Untereinheit und der NR1 Spleißvarianten mit (+E5) und ohne N-terminaler Kasette (-E5) darstellen.

Cb = Cerebellum, Cx = Cortex, CA3 = CA3 Region des Hippocampus, ER = entorhinaler Cortex, Hi = Hippocampus smc= supplementär-motorischer Cortex, T = Thalamus

1.2.3.2 Funktionelle Eigenschaften der N-terminalen Spleißvarianten

Der Rezeptorkomplex aus NR1/NR2B und die Anwesenheit der Spleißvariante NR1+E5 erzeugten nach Rezeptorstimulation in *Xenopus* Oocyten eine erhöhte Stromamplitude. *Xenopus* Oocyten, die diese Spleißvariante exprimierten, zeigten eine dreifach größere Strömungsamplitude [195, 197]. Diese Beobachtung lässt annehmen, dass die N-terminale Kasette zu Konformationsänderungen im NR1 Rezeptorprotein führt, welche die NMDA Rezeptorantworten durch Aktivierung eines Agonisten (z. B. Glutamat) erhöhen [195, 197]

Insbesondere die N-terminale Insertion beeinflusst die pharmakologischen Eigenschaften der Varianten so, dass die Bindungsaffinität für Agonisten bei Ausschluss von Exon 5 (NR1-E5), für Antagonisten bei Einschluss (NR1+E5) erhöht wird [41, 72, 135].

Ligandenbindungsstudien mit Glutamat zeigten in Regionen, die vorwiegend NR1-E5/NR2B exprimieren, eine hohe Affinität zu Agonisten, während Regionen die vorwiegend NR1+E5/NR2B exprimieren eine hohe Affinität zu Antagonisten aufwiesen [129]. Auch andere Arbeitsgruppen [41, 197] zeigten, dass die Rezeptoraffinität für Glutamat bei Abwesenheit von Exon 5 um das Fünffache erhöht wird.

Dagegen werden Rezeptoren, die die Spleißvariante mit Exon 5 enthalten, siebenfach stärker von PKC (Proteinkinase C) potenziert [41]. Möglicherweise löst die N-terminale Kasette Konformationsänderungen im Rezeptorprotein aus, welche für das veränderte Bindungsverhalten gegenüber Agonisten und Antagonisten verantwortlich gemacht werden könnte.

1.2.4 NR2 Untereinheiten

1.2.4.1 Regionale Expression der NR2 Untereinheiten

Die Komponenten der zweiten Genfamilie, die Untereinheiten NR2A – NR2D, werden hirnregionsspezifisch und altersabhängig unterschiedlich stark exprimiert [1, 3, 15, 40, 41, 131, 185].

Die folgenden Parasagittalschnitte (Abb. 5a - d) durch das Gehirn einer 56 Tage alten Ratte zeigen die unterschiedlichen Expressionen der NR2 Untereinheiten mittels *in situ*-Hybridisierung [3].

Abb. 5a: Expression von NR2A mRNA:

Die NR2A Untereinheit ist weitgehend im ganzen Hirn exprimiert, mit hoher Expressionsrate im cerebralen Cortex, Hippocampus und Cerebellum [1, 3, 15, 40, 41, 131, 185].



Abb. 5b: Expression von NR2B mRNA:

Die NR2B Untereinheit wird im Gegensatz zur NR2A Untereinheit selektiver exprimiert, mit hohen Expressionsraten im cerebralen Cortex, Hippocampus, Striatum, Thalamus und dem olfaktorischen Bulbus [1, 3, 15, 40, 41, 131, 185].

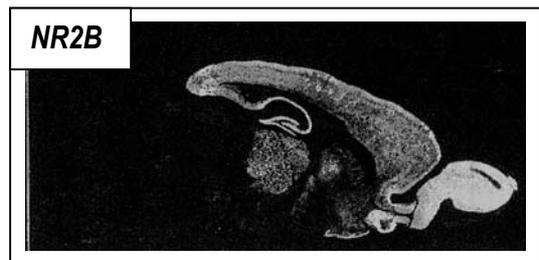


Abb. 5c: Expression von NR2C mRNA:

Die NR2C Untereinheit wird vorwiegend im Cerebellum exprimiert, mit schwachen Expressionsraten in anderen Hirnarealen [1, 3, 15, 40, 41, 131, 185].

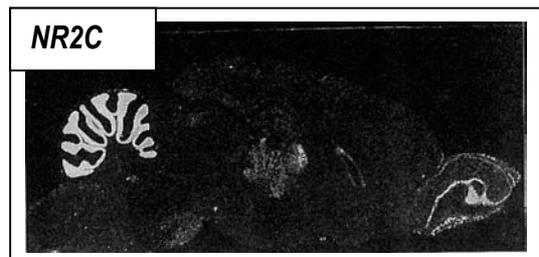


Abb. 5d: Expression von NR2D mRNA:

Die Expression der NR2D Untereinheit beschränkt sich weitgehend auf Regionen des Diencephalons (Thalamus), des Mittelhirns und des olfaktorischen Bulbus [1, 3, 15, 40, 41, 131, 185].



1.2.4.2 Funktionelle Eigenschaften der NMDA Rezeptoruntereinheiten NR2A – NR2D

1.2.4.2.1 Bindungsaffinität von Agonisten

Anhand elektrophysiologischer Studien im *Xenopus* Expressionssystem zeigte sich, dass die EC_{50} von Glutamat und NMDA bei der Kombination aus den Untereinheiten NR1/NR2B im Vergleich zur Kombination NR1/NR2C erhöht war [73, 131]. Ausserdem bindet Glutamat mit höherer Affinität an NR1/NR2B als an NR1/NR2A Untereinheiten [171]. Anhand dieser Ergebnisse wurde folgende Rangliste für die Bindungsaffinitäten von Glutamat bei verschiedenen Rezeptorkombinationen erstellt: NR1/NR2B > NR1/NR2A = NR1/NR2D > NR1/NR2C > NR1 [97].

1.2.4.2.2 Bindungsaffinität von Antagonisten

Rezeptorkombinationen aus NR1/NR2A und NR1/NR2B, welche beide in *Xenopus* Oocyten exprimiert wurden, scheinen effektiver von dem nicht-kompetitiven Rezeptorkanalblocker MK-801 gehemmt zu werden als die Kombinationen von NR1/NR2C und NR1/NR2D [18]. Es wurde folgende Rangliste für die Bindungsaffinität von MK-801 bei verschiedenen Rezeptorkombinationen erstellt: NR1/NR2A = NR1/NR2B >> NR1/NR2C = NR1/NR2D [97].

1.2.4.2.3 Elektrophysiologische Eigenschaften

Elektrophysiologische Unterschiede der Untereinheiten wurden teilweise bereits in Zusammenhang mit den NR1 Spleißvarianten am N-terminalen Ende (Kapitel 1.2.3.2) beschrieben. Hier sei noch erwähnt, dass aus der längeren Deaktivierungszeit der NR1/NR2B Rezeptorkombination im Vergleich zur NR1/NR2A Rezeptorkombination länger anhaltende exzitatorische postsynaptische Potentiale resultieren [181]. Weiterhin erhöht eine Rezeptorkombination aus den Untereinheiten NR1/NR2A/NR2B die NMDA Rezeptor vermittelte intrazelluläre Calciumionenkonzentration [55].

1.2.4.2.4 Versuche mit *knock-out* Mäusen

Die biologische Bedeutung der verschiedenen NMDA Rezeptoruntereinheiten konnte mit Versuchen an *knock-out* Mäusen weiter beschrieben werden.

Mausmutanten ohne NR1 oder NR2B Untereinheit waren nicht lebensfähig und starben perinatal. Dies deutet darauf hin, dass diese Untereinheiten in wichtige Funktionen der Hirnphysiologie involviert sind. Ausserdem ist anzunehmen, dass ihre Anwesenheit für Vitalfunktionen vorausgesetzt wird. Elektrophysiologische Untersuchungen an NR1 und NR2B *knock-out* Mäusen konnten zusätzlich veranschaulichen, dass diese beiden Untereinheiten zur Ausbildung synaptischer Plastizität unabdingbar waren [51, 94, 101, 169, 170].

Mäuse, die 5% der NR1 Untereinheit exprimierten waren, im Gegensatz zu NR1 *knock-out* Mäusen, bis ins Erwachsenenalter lebensfähig, wobei sie abnormales Verhalten wie erhöhte lokomotorische Aktivität, gehäufte Stereotypien sowie Defizite im sozialen und sexuellen Verhalten zeigten. Diese Verhaltensänderungen sind denen, die in pharmakologischen Tiermodellen für Schizophrenie beobachtet wurden ähnlich und konnten durch Applikation typischer und atypischer Neuroleptika wie Haloperidol und Clozapin verbessert werden [126].

Die gezielte „Ausschaltung“ von NR2A, NR2C oder NR2A/NR2C Untereinheiten war dagegen nicht letal und führte zu lebensfähigen Nachkommen [42, 79, 82]. Mausmutanten ohne NR2A Untereinheit wiesen einen diskreten Mangel an räumlichem Orientierungsvermögen auf, während man bei Mausmutanten mit fehlender NR2C Untereinheit eine normale motorische Koordination beobachtete. Granulazellen des Cerebellums von Mäusen, denen entweder die NR2C Untereinheit alleine oder die Kombination aus NR2C/NR2A Untereinheiten fehlte, zeigten keine durch NMDA Rezeptor vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale mehr [169, 170].

Die NR2A Untereinheit könnte somit möglicherweise zur Entwicklung des räumlichen Orientierungsvermögens beitragen [169, 170], während die NR2C Untereinheit eine aktive Rolle bei der Ausbildung motorischer Koordination zu spielen scheint.

1.3 Der NMDA Rezeptorantagonist Dizolcipin (MK-801)

1.3.1 Geschichte und Entwicklung

Ende der 50er Jahre bereits wurde die Substanz Phencyclidin (PCP) – mit damals noch unbekanntem Wirkmechanismus – als Anästhetikum entwickelt. Dabei stellte man fest, dass die Applikation von PCP zu einem Katatonie-ähnlichen Zustandsbild mit völlig ausdruckslosem Gesicht, offenem Mund, starren Blick und generalisierter Rigidität mit zeitweise wächsernem Widerstand führte. PCP induzierte einen Zustand der Dissoziation von der Umgebung ohne kompletten Bewußtseinsverlust. Daher wurde die Bezeichnung „dissoziative Anästhetika“ für PCP und seine Derivate, wie z.B. Ketamin, das analoge Veränderungen hervorrief, eingeführt [29].

Diese Substanzgruppe erlangte große Aufmerksamkeit, nachdem Luby berichtet hatte, dass die akute Gabe einer subanästhetischen PCP - Dosis bei gesunden Probanden zu psychopathologischen Veränderungen mit beeindruckender Ähnlichkeit mit bestimmten Primärsymptomen des schizophrenen Formenkreises führte [109].

Bei Anwendung von PCP in narkotisch wirksamer Dosierung zeigte sich, dass bis zu 50% der erwachsenen Patienten schwere intraoperative Komplikationen mit Agitiertheit und Halluzinationen erlitten [28, 149]. Diese Reaktion hielt auch nach Beendigung der Narkose bei einem hohen Prozentsatz der Fälle in Form eines psychotischen Syndroms mit Exzitation, Verhaltensauffälligkeiten und Halluzinationen für bis zu zehn Tage an [122].

Wird PCP einmalig remetierten Schizophrenie Patienten verabreicht, führt dies zum Wiederauftreten der spezifischen Akutsymptomatik, die z. T. mehrere Wochen anhält [39]. Dagegen beobachtet man bei chronischem PCP - Abusus, in Analogie zur Schizophrenie, neben der Negativsymptomatik vorwiegend religiösen und paranoiden Wahn, sowie auditorische Halluzinationen [5, 74]. Auch eine akute Gabe von Ketamin führt zu schizophrenen Positivsymptomen, wie Wahnwahrnehmungen und Halluzinationen.

PCP ist seit den frühen 60er Jahren auch unter dem Namen „angel dust“ bekannt und wurde in den USA zu einer populären Straßendroge mit psychotomimetischen Eigenschaften, die schnell und billig herzustellen ist [143]. Dieser Drogenabusus nahm in den Augen mancher Autoren den Charakter einer „landesweiten“ Epidemie an, so dass zu Beginn der 80er Jahre in den Ballungszentren z.T. über 40% der Patienten in psychiatrischen Notaufnahmen effektive PCP- Spiegel im Blut aufwiesen [193]. PCP übertraf zu dieser Zeit bei weitem Heroin in Bezug auf Gebrauch, Verbreitung, finanziellen Umsatz und Gefahr für Verbraucher und Unbeteiligte [143].

Ebenfalls zu Beginn der 80er Jahre gelang die Aufklärung des möglichen Wirkmechanismus der dissoziativen Anästhetika als NMDA Rezeptorantagonisten [104] und bald wurden andere Substanzen mit gleichem Angriffspunkt im NMDA Rezeptor Ionenkanal entwickelt, wie z. B. Dizolcipin (MK- 801).

MK-801, ((+)-5-Methyl-10, 11-Dihydro-5H-Dibenzo (a,d) Cyclohepten-5, 10-Imin), wurde initial als Antikonvulsivum mit anxiolytischen und zentral sympatomimetischen Eigenschaften beschrieben [25 – 27]. Der Wirkmechanismus dieser liquorgängigen Substanz besteht in einer selektiven, nicht-kompetitiven Blockade des NMDA Rezeptors durch hochaffine Bindung an die Phencyclidin- (PCP) Bindungsstelle, die im Ionenkanal des Rezeptors der Magnesiumionen Bindungsstelle benachbart ist. Dabei ist MK-801 um ein Vielfaches stärker antagonistisch wirksam als seine verwandten Substanzen PCP und Ketamin.

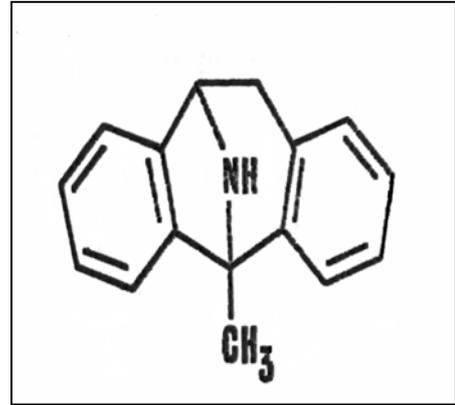


Abb. 6: Strukturformel von MK-801

In MK-801 wurden ursprünglich große Hoffnungen gesetzt, da die Blockade von NMDA Rezeptoren eine potentielle Neuroprotektion erwarten ließ. Dabei wollte man den erhöhten Glutamatspiegeln entgegenwirken, die durch übermäßige Aktivierung von NMDA Rezeptoren zustande kommen und zu exzitotoxischer Zellschädigung führen können. Dennoch kam MK-801 nicht zum klinischen Routineeinsatz, da sein neurochemisches Wirkprofil in Analogie zu den Beobachtungen bei PCP und Ketamin eine potentiell psychotomimetische Wirkung befürchten ließ, für die es im Tiermodell starke Hinweise gab [86, 142].

1.3.2 Ein pharmakologisches Psychosemodell unter Verwendung von NMDA Rezeptorantagonisten

Verständlicherweise sind Analogieschlüsse in Bezug auf die Symptomatik zwischen einem pharmakologischen Psychosemodell durch Gabe von NMDA Rezeptorantagonisten und schizophrener Psychose nur eingeschränkt möglich. Dennoch zeigen Nager im Tiermodell nach MK-801 Behandlung Verhaltensanomalien wie z. B. motorische Hyperreaktivität, gehäufte Stereotypien und sozialen Rückzug, die mit schizophrenietypischer Symptomatik assoziiert werden können [125]. Darüber hinaus können bei Ratten und Mäusen durch Gabe von MK-801 Defizite in Lern- und Gedächtnistests induziert werden [13, 14, 66, 133], die in Analogie zu den kognitiven Lebenseinschränkungen bei Schizophrenie Patienten hauptsächlich das Arbeitsgedächtnis betreffen [85].

In der hier vorgestellten Arbeit haben wir versucht die Hypothese einer veränderten Zusammensetzung des NMDA Rezeptors durch MK-801 Blockade zu belegen. Unter Anwendung eines pharmakologischen Psychosemodells haben wir dabei die Auswirkungen von chronisch niedrig dosiertem MK-801 auf den NMDA Rezeptor untersucht.

1.4 Der NMDA Rezeptorantagonist Alkohol

1.4.1 Wirkung von Ethanol auf das glutamaterge System bzw. den NMDA Rezeptor

Die Involvierung des glutamatergen Systems in die Entwicklung der Alkoholabhängigkeit wurde bislang hauptsächlich zur Erklärung der Entzugssymptomatik herangezogen [95]. Mittlerweile geht man davon aus, dass das glutamaterge System auch eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Alkoholverlangen und -abhängigkeit spielt [37, 177, 179, 186]. Der NMDA Rezeptor steht im Mittelpunkt dieser Überlegungen.

Es existieren Befunde, dass Ethanol direkt mit dem NMDA Rezeptor interagiert. Tsai et al. beobachteten, dass akuter Ethanoleinfluss die NMDA Rezeptorantworten inhibiert und längerfristige Ethanolinhibition zu einer Rezeptorsensibilisierung führt [177, 179].

Es wird angenommen, dass sich die unterschiedliche Ethanolsensitivität des Rezeptors zumindest teilweise aus verschiedenartigen Rezeptorkompositionen ergibt [96, 186]. Dabei scheint die Alkoholempfindlichkeit des Rezeptors je nach Hirnregion zu variieren [160, 195].

1.4.1.1 Ethanolbindungsstelle

Interaktionen von Ethanol mit NMDA Rezeptorbindungsstellen sind wiederholt untersucht worden. Ethanol interagiert weder mit der Glutamat- noch mit der PCP- Bindungsstelle [149]. Hinsichtlich einer Interaktion mit der Glycinbindungsstelle ergaben sich in zwei unabhängigen Studien widersprüchliche Ergebnisse. In neuronalen Kulturen zeigte sich, dass durch die Erhöhung der Glycinkonzentration der inhibitorische Ethanoleffekt auf die NMDA Rezeptorantwort vermindert wird [35, 147]. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Versuche mit NMDA Rezeptoren, die in *Xenopus* Oocyten exprimiert wurden [16]. Andere Studien, die ähnliche Rezeptorkombinationen in *Xenopus* Oocyten untersuchten, konnten dagegen keine Interaktion von Ethanol mit der Glycinbindungsstelle feststellen [113].

Eine andere Studie, die eine mögliche Interaktion von Ethanol mit Bindungsstellen von NMDA Rezeptormodulatoren untersuchte zeigte, dass weder die Anwesenheit von Zink- und Magnesiumionen noch die Anwesenheit anderer modulierender Redoxsubstanzen Einfluss auf die Ethanolsensitivität von heteromeren NMDA Rezeptorkomplexen hat [23].

Insgesamt suggerieren diese Studien, dass Ethanol an keiner der bisher bekannten Modulationsstellen des NMDA Rezeptors angreift. Dies führt zu der Annahme, dass Ethanol den NMDA Rezeptor über Membranlipide oder Proteine (z. B. PKC), die mit diesem interagieren, modulieren kann [18, 181]. Untersuchungen an isolierten Membranen, die NMDA Rezeptoren

enthalten, ergaben jedoch, dass Ethanol NMDA-vermittelte Ströme inhibieren kann [105, 106]. Da die inhibitorische Wirkung selbst nach Zerstörung der Membran bestehen blieb, können Membranlipide nicht der Hauptangriffsort von Ethanol sein [65]. Weiterhin wurden von Ethanol auch NMDA Rezeptoruntereinheiten inhibiert, welchen der intrazelluläre C-Terminus entfernt wurde [141]. Dies könnte weiterhin bedeuten, dass sich die Interaktionsstelle von Ethanol entweder an einer extrazellulären Domäne des NMDA Rezeptors oder zumindest an einer Region befindet, die nur extrazellulär zugänglich ist [141].

1.4.2 Akuter Einfluss von Ethanol auf die glutamaterge Erregungsweiterleitung

Unter physiologischen Bedingungen besteht im zentralen Nervensystem ein Gleichgewicht zwischen inhibitorischer und exzitatorischer Neurotransmission.

Lovinger et al. [105-108] beschrieben, dass unter akuter Ethanoleinwirkung zentral lokalisierte NMDA Rezeptoren gehemmt werden und somit die exzitatorische Reizweiterleitung inhibiert wird. Zusätzlich konnten Martin und Schwartzwelder [112] eine dosisabhängige Hemmung der Glutamatfreisetzung im Hippocampus durch Alkoholkonzentrationen, die man bei Alkoholikern gemessen hat, nachweisen.

Ausserdem wurde beobachtet, dass durch akuten Alkoholeinfluss und bei Alkoholkonzentrationen, wie sie beim Abusus erreicht werden, die GABAergen Hemmvorgänge im ZNS verstärkt werden [108]. Das Gleichgewicht zwischen GABAerger Neurotransmission und glutamaterger Neurotransmission ist somit auf die Seite der inhibitorischen Erregungsweiterleitung verschoben.

1.4.2.1 Ethanolinteraktionen mit den NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten

Homomere NR1 Untereinheiten sind normalerweise nicht in der Lage funktionelle NMDA Rezeptoren auszubilden. Werden sie jedoch in *Xenopus* Oocyten exprimiert, zeigen sie dort die gleichen Eigenschaften, z. B. gleiche Ethanolsensitivität, wie in intakten Neuronen [105].

Dabei wurde festgestellt, dass die Ethanolsensitivität von NR1 Spleißvarianten mit und ohne N-terminaler Kasette abhängig zu sein scheint. Kolchine et al. zeigten, dass die Exon 5 Einschlussvariante stärker von Ethanol inhibiert wird [87]. Neueste Studien suggerieren allerdings, dass dieser Effekt nur in *Xenopus* Oocyten zu beobachten ist [6, 7, 144].

Dagegen scheinen heteromere NMDA Rezeptoren, die in *Xenopus* Oocyten exprimiert werden, unterschiedlich stark von Ethanol beeinflusst zu werden. Studien, die an diesen Rezeptoren durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass Ethanol vorzugsweise heteromere Rezeptorkomplexe aus NR1/NR2A und NR1/NR2B beeinflusst. Dabei war der Effekt bei Vorhanden-

sein der NR2C Untereinheit am schwächsten ausgeprägt [7, 93,113,171]. In humanen Zelllinien exprimierte NR1/NR2A Rezeptoren zeigen nach Ethanolbehandlung im Gegensatz zu NR1/NR2B oder NR1/NR2C Rezeptorkombinationen erniedrigte NMDA Rezeptorströme [15]. Bei allen genannten Kombinationen wurden sowohl die Stromamplituden als auch die Strömungsdauer inhibiert. Die stärkste Hemmung war bei einer Kombination aus NR1/NR2A zu beobachten [192].

1.4.3 Chronischer Einfluss von Ethanol auf die glutamaterge Erregungsweiterleitung

Die unter akutem Ethanoleinfluss entstehende Gleichgewichtsverschiebung der glutamatergen und GABAergen Neurotransmittersysteme führt bei chronischem Alkoholkonsum zu einer kompensatorisch erhöhten glutamatergen Reizweiterleitung. Das glutamaterge System ist dabei in molekulare (Kapitel 1.4.3.1) und zelluläre (Kapitel 1.4.3.2) Veränderungen involviert [37].

Michaelis und seine Mitarbeiter konnten schon 1978 eine Erhöhung der Gesamtzahl von glutamatergen Bindungsstellen in Rattenhirnen nach chronischer Ethanolbehandlung nachweisen [123]. Daraus resultiert eine kompensatorisch erhöhte glutamaterge Neurotransmission, wobei sich ein neues Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Reizweiterleitung im ZNS einstellt. Entfällt bei Alkoholentzug die hemmende Wirkung von Ethanol auf das glutamaterge System, überwiegt durch die Gleichgewichtsverschiebung die glutamaterge Erregung, welche am Auftreten von Entzugssymptomen beteiligt ist. Die entstandene ZNS Hyperexzitabilität kann sich u. a. im Auftreten von Entzugstremor, erhöhter autonomer Aktivität sowie Entzugskrämpfen äussern [90].

Es wird angenommen, dass die Entstehung der ZNS Hyperexzitabilität aus einer Reduktion der GABA-vermittelten neuronalen Inhibition, einer erhöhten glutamatergen Rezeptoraktivität sowie aus einer erhöhten Dichte spannungsabhängiger Calciumkanäle resultiert [64, 65, 155]. Ligandenbindungsstudien geben klare Hinweise darauf, dass diese erhöhte Hyperexzitation ein spezifischer NMDA Rezeptoreffekt ist und nicht als Folge einer generell erhöhten glutamatergen Neurotransmission auftritt (Kapitel 1.4.3.1). Dies wird durch den Befund bekräftigt, dass bei Gabe des hochaffinen NMDA Rezeptorantagonisten MK-801 das Auftreten und die Schwere der Krämpfe bei Tieren im Ethanolentzug dosisabhängig abnehmen [56, 57].

1.4.3.1 Neurochemische Veränderungen

Samson und Harris postulierten bereits 1992 [155] eine verstärkte NMDA Rezeptorexpression und/oder eine veränderte Rezeptorzusammensetzung nach chronischer Alkoholaufnahme. In späteren Untersuchungen stellte man nach chronischer Alkoholeinnahme in verschiedenen Hirnregionen von Mäusen und Ratten eine erhöhte mRNA- [48, 63, 165] sowie Proteinexpression der NMDA Rezeptoruntereinheiten NR1, NR2A und NR2B fest [50, 83, 136, 175].

Sanna und Mitarbeiter [156] nahmen eine erhöhte Dichte von NMDA Rezeptoren während des Ethanolentzugs an, da sie im Hippocampus erwachsener Ratten eine erhöhte Anzahl von Bindungsstellen des nicht-kompetitiven NMDA Rezeptorantagonisten MK-801 nachweisen konnten. Dieser Nachweis konnte durch weitere Untersuchungen repliziert werden [56, 57, 62]. Zusätzlich wurde nach Alkoholbehandlung eine erhöhte Sensitivität von NMDA Rezeptoren beobachtet. Die Rezeptoren reagierten sehr viel empfindlicher auf die Gabe des prokonvulsiven Isoniazids [168]. Einen weiteren Hinweis zur gesteigerten Aktivität des NMDA Rezeptors erbrachte eine Studie von Darstein et al., in der gezeigt wurde, dass der Langzeit-Alkoholismus zu einem Anstieg der NMDA Rezeptorfunktion nach Alkoholkonsum im Striatum von Ratten führte. Gemessen wurde dies anhand der NMDA-induzierten Freisetzung von [³H]-Acetylcholin in Schnitten des Striatums [31]. Diese Befunde konnten durch die Forschungsgruppen Hu [75] und Snell [164] unterstützt werden.

1.4.3.2 Neuropathologische Veränderungen

In granulären Zellen des hippocampalen Gyrus dentatus wurde nach fünfmonatigem Alkoholkonsum und anschließendem zweimonatigen Entzug eine Abnahme von Pyramidenzellen bei Ratten beobachtet [182]. Auch die synaptische Dichte der hippocampalen CA1 Region zeigte sich nach monatelanger Ethanolexposition bei Mäusen erniedrigt [157]. Zusätzlich wurde nach chronischer Ethanolexposition eine Abnahme der Neuronendichte im Cerebellum von Ratten beobachtet [173].

1.4.4 Modell der forcierten Ethanolintoxikation

Zu den Methoden der forcierten Ethanolapplikation gehören z.B. die Verwendung von Inhalationsklammern. Durch Verdampfen von Alkohol wird dadurch eine Dauerintoxikation erreicht [53].

Eine weitere Methode stellt die Intoxikation nach Majchrowicz (1975) dar, bei der Tiere 4 Tage lang durch wiederholte orale Verabreichung von hohen Alkoholdosen per Schlundsonde unter Dauerintoxikation gehalten [110] werden. Die Tiere reagieren mit starker Sedation, Gewichtsabnahme und werden ausserdem in ihrem Schlaf-Wach-Rhythmus gestört. Die Methoden der forcierten Ethanolintoxikation sind zur Erzielung dauerhafter Intoxikationen, hoher Blutalkoholwerte sowie zu Untersuchungen von Toleranzentwicklung und Entzugserscheinungen geeignet. Bei dem von uns untersuchten Tiermodell wurden Tiere fünf Tage lang nach der Methode von Majchrowicz mit 20% igem Alkohol behandelt. Dieses Tiermodell wurde bereits 1998 von Follesa und Ticku zur Untersuchung möglicher Veränderungen der NMDA Rezeptorexpression im Rattenhirn herangezogen [55].

1.4.5 Das 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell

Am Max-Planck-Institut für Psychiatrie wurde ein Tiermodell etabliert [69, 70, 168, 167], welches auf freiwilliger Langzeit-Alkoholapplikation basiert. Dabei hatten Ratten die freie Wahl zwischen Wasser und unterschiedlich konzentrierten Alkohollösungen (5% ig, 10% ig, 20% ig), welche in etwa dem Ethanolgehalt von Bier, Wein und Spirituosen entsprechen (Abb. 7). Diese wurde ihnen in regelmässigen Abständen immer wieder entzogen.



Abb. 7: Photo eines 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodells

Nach einigen Monaten freiwilligen Alkoholkonsums begannen die Tiere ihren Alkoholkonsum zu steigern, was ein Indiz für Toleranzentwicklung ist [100, 180]. Nach Alkoholdeprivationsphasen zeigten die „alkoholerfahrenen“ Tiere einen vorübergehenden Anstieg des Alkoholkonsums und der Alkoholpräferenz. Dieses Phänomen wird als Alkoholdeprivationseffekt bezeichnet [99, 161]. Dabei waren die Tiere nach einer Deprivationsphase stärker motiviert an 20% ige Alkohollösungen zu gelangen als Tiere, die kontinuierlich Alkohol konsumierten [168]. Gesteigerte Moti-

vation und intensives Alkoholverlangen während eines Rückfalls wurde 1993 von Markou et al. als „Craving“ beschrieben [111].

Rückfalltrinken konnte auch in diesem Tiermodell nach einer Abstinenzzeit von bis zu einem Jahr beobachtet werden. Dies führt zu der Annahme, dass die Tiere während dieser Zeit ein spezielles Alkoholerinnerungsvermögen entwickelt haben [167, 168].

Insgesamt änderte sich das Trinkmuster der Tiere in den zwei Jahren insofern, dass sie größere Mengen höher konzentrierter Alkoholösungen (auch zu unüblichen Zeiten) zu sich nahmen und das Trinkverhalten nach Entzug unkontrolliert zu werden schien. Während des Abstinenzbeginns zeigten die Tiere milde körperliche Entzugssymptome. Im Verlauf der Alkoholabstinenz zeigten sie Entzugserscheinungen, die sich in erhöhtem Angstverhalten und in Hyperreaktivität auf Stressstimuli äusserten [69, 70].

Freiwilliges Trinken führte also bei diesen Tiere zu Alkoholabhängigkeit und Alkoholtoleranzentwicklung. Der sogenannte Alkoholdeprivationseffekt, der nach Alkoholentzug beobachtet werden konnte, stellt in diesem Tiermodell ein Maß für rückfallartiges Trinken und Alkoholverlangen dar. Damit kann dieses Tiermodell sowohl die Entzugssymptomatik als auch neuere Aspekte und Kriterien des Alkoholsuchtverhaltens wie „Craving“ und Rückfall verkörpern, welche eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Alkoholverlangen und Alkoholabhängigkeit zu spielen scheinen [68]. Das 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell scheint somit geeignet zu sein verschiedene Facetten der Alkoholabhängigkeit umfassend zu beschreiben.

2 Eigene Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit

2.1 Auswirkungen von MK-801 und Ethanol auf die NMDA Rezeptorexpression

2.1.1 Wie beeinflusst MK-801 die NMDA Rezeptorexpression?

Viele Befunde deuten darauf hin, dass eine chronisch niedrig dosierte Applikation von NMDA Rezeptorantagonisten, wie MK-801, klinische und pathologische Facetten von Psychosen abbilden kann. Wir vermuten, dass der inhibitorische Effekt durch niedrig dosierte chronische Behandlung von MK-801, zu einer Veränderung der NMDA Rezeptorexpression führt. Dabei stellten wir die Hypothese auf, dass dies nicht nur in einer erhöhten Dichte von NMDA Rezeptoren resultiert sondern, dass die MK-801 Inhibition zu Veränderungen im Rezeptorkomplex führen könnte. Diese könnten mit einer Rezeptor Funktionssteigerung einhergehen, um der Blockade von MK-801 entgegenzuwirken.

Für die Untersuchung dieser Hypothese ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Bewirkt die Gabe von MK-801 eine Änderung in der Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes?
- Beeinflusst chronisch niedrig dosierte MK-801 Applikation die NMDA Rezeptorexpression in verschiedenen Hirnregionen des Rattenhirns unterschiedlich?

2.1.2 Wie beeinflusst Ethanol die NMDA Rezeptorexpression?

Der heutige Forschungsstand geht davon aus, dass akute und chronische Ethanolapplikation die NMDA Rezeptorexpression unterschiedlich beeinflusst.

Während die akute Gabe von Ethanol die NMDA Rezeptorfunktion zu inhibieren scheint [107], führt chronische Ethanoleinnahme zu einer verstärkten NMDA Rezeptorfunktion [107]. Diese könnte eine Rolle bei Toleranzentwicklung, Abhängigkeit und Alkoholentzugssymptomen spielen [43, 92, 100, 180].

Mit dieser Rezeptorfunktionssteigerung könnte neben einer erhöhten Rezeptoranzahl eine veränderte Rezeptorkomposition einhergehen. Mehrere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Alkohol die Genexpression des NMDA Rezeptors modulieren kann. Es wurden Veränderungen sowohl bei posttranskriptionalen als auch bei posttranslationalen Vorgängen beobachtet [92].

Da die genaue Auswirkung von Ethanol auf die NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten kontrovers diskutiert werden, haben wir uns bezüglich der NMDA Rezeptorexpression folgende Fragen gestellt:

- Inwiefern beeinträchtigt kurzfristig forcierte Applikation von Ethanol die relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen der Ratte?
- Inwiefern beeinträchtigt langfristig freiwillige Applikation von Ethanol die relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen der Ratte?
- Unterscheiden sich die Effekte von Ethanol auf die NMDA Rezeptorexpression in Abhängigkeit von seiner Applikationsart, Einnahmedauer oder Konzentration und könnten daraus resultierende Veränderungen des NMDA Rezeptors für die Entstehung von Suchtverhalten wie Toleranz und Abhängigkeit bedeutend sein?

2.2 Zielsetzung

Wir untersuchten tierexperimentell den Einfluss der NMDA Rezeptorantagonisten MK-801 und Ethanol auf die mRNA Expression der Spleißvarianten und Untereinheiten des NMDA Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen der Ratte. Aus Hippocampus, Striatum, Cerebellum, occipitaler und frontaler Cortex wurde die gesamte RNA extrahiert. Nach Reverser Transkription, PCR und anschließender Gelelektrophorese wurden die relativen Intensitäten der NR1 Spleißvarianten NR1 +E5/-E5, die relativen Intensitäten der NR2C/NR2A Untereinheiten sowie GAPDH/NR2B gemessen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

- Photometer Genequant Amersham Biosciences, Freiburg
- Tiefkühlschrank Typ Economic (-20°C) Firma Bosch, München
- Gelkammer Typ Wide Mini Bio-Rad Laboratories, München
Sub Cell GT
- Spannungsquelle Typ Power Pac 300 Bio-Rad Laboratories, München
- Mikrozentrifuge Typ Centrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg
- PCR-Maschine Typ Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg
- Pipetten Eppendorf, Hamburg
- Inkubator Flow Laboratories, Virginia, USA
- Waagen Typ Explorer Ohaus Corporation, USA
Typ PRECISA 1620 C PRECISA Instruments AG,
Dietikon
- Skalpelle PFM, Köln
- Ultra-Tiefkühlschrank Typ ULT 1386 VOE REVCO Scientific Inc., Asheville,
(-80°C) USA
- Pipettenspitzen Sarstedt, Nümbrecht
- Sterile Unterlagen Sengewald, Rohrdorf
- Eagle Eye Stratagene, La Jolla, USA

3.1.2 Software

- Gelauswertung Eagle Eye Stratagene, La Jolla, USA
- Bildverarbeitung Photoshop 6.0 Adobe, USA
- Statistik SPSS 11.0 Borland, USA

3.1.3 Chemikalien

- dNTP 10 mM Amersham Biosciences, Freiburg
- β -Mercaptoethanol Bio-Rad Laboratories, München
- Ethidiumbromid 10 mg/ml Bio-Rad Laboratories, München

- dNTP Mix (10 mM) Invitrogen, Karlsruhe
- 5x PCR-Puffer A Invitrogen, Karlsruhe
 300 mM Tris-HCl (pH 8,5)
 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 7,5 mM MgCl_2
- 5x PCR-Puffer E Invitrogen, Karlsruhe
 300 mM Tris-HCl (pH 9,0)
 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 7,7 mM MgCl_2
- 5x PCR- Puffer F Invitrogen, Karlsruhe
 300 mM Tris-HCl (pH 10,0)
 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 10 mM MgCl_2
- PCR-Optimizer Kit Invitrogen, Karlsruhe

- 5x First Strand Buffer Life Technologies, Karlsruhe
 250 mM Tris-HCl (pH 8.3)
 375 mM KCl
 15 mM MgCl_2
- 0,1 M DTT Life Technologies, Karlsruhe
- SuperScriptTM II Life Technologies, Karlsruhe
- Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Life Technologies, Karlsruhe
- Taq-DNA-Polymerase (recombinant) 1u/ μl Life Technologies, Karlsruhe
- Primer NR1 +E5/-E5-a,s Life Technologies, Karlsruhe
- Primer NR2AC Life Technologies, Karlsruhe
- Primer GAPDH-a,s Life Technologies, Karlsruhe
- Primer NR2B-a,s Life Technologies, Karlsruhe

- BpmI (2000 u/ml) New England BioLabs, Frankfurt
- ScaI (10000 u/ml) New England BioLabs, Frankfurt

3.1.4 Tiermodelle

3.1.4.1 Pharmakologisches Psychosemodell unter Verwendung des NMDA Rezeptor-antagonisten MK-801

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zehn männliche Long Evans Ratten im Alter von 32 – 40 Tagen, die vom Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried bezogen wurden. Die Haltung und Behandlung der Tiere wurden von Frau Dr. Frauke Ohl und Herrn Dr. Martin Keck vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchgeführt.

Die Tiere wurden jeweils zu zweit in Käfigen gehalten, wo sie freien Zugang zu Wasser und Futter hatten. Bei konstanter Raumtemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$) wurden die Tiere täglich von 7 Uhr morgens bis 19 Uhr abends unter künstlichem Licht gehalten.

Entsprechend der Versuchsanordnung wurden die Tiere einer Kontrollgruppe (KON, $n = 5$) und einer experimentellen Gruppe (MK-801, $n = 5$) randomisiert zugeordnet.

Fünf Tiere (KON) wurden mit physiologischer Kochsalzlösung, die anderen fünf Tiere (MK-801) chronisch niedrigdosiert mit MK-801 behandelt. Die Applikation von MK-801 sowie die Applikation physiologischer Kochsalzlösung erfolgte täglich durch intraperitoneale (i. p.) Injektionen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Wirkstoffdosis betrug dabei in der chronischen Behandlungsgruppe 0,02 mg MK-801/kg/Körpergewicht.

24 Stunden nach der letzten MK-801 Applikation bzw. nach der letzten Applikation physiologischer Kochsalzlösung, wurden alle 10 Tiere nach kurzer Halothan Narkose dekapitiert. Die anschließend entnommenen Rattenhirne wurden zur weiteren Untersuchung an Herrn Dr. Dan Rujescu, Molekulare Neurobiologie, Psychiatrische Klinik der LMU München weitergeleitet. Dort wurden die Hirne weiter präpariert.

Jedes Gehirn wurde in PBS gewaschen und auf Eis präpariert. Die rechte Hemisphäre wurde in Hippocampus, Striatum, Cerebellum, sowie occipitalen und frontalen Cortex dissektiert und bei -80°C gelagert.

3.1.4.2 Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation

Als Versuchstiere dienten 20 männliche Wistar Ratten, mit einem Gewicht von 300 – 340 g zu Beginn des Experiments. Diese wurden aus dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried bezogen. Nach der Lieferung wurden die Tiere für fünf Tage akklimatisiert. Der Versuch wurde von Frau Dr. Sabine M. Hölter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchgeführt.

Die Tiere wurden in standardisierten Käfigen gehalten und hatten Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum*. Bei konstanter Raumtemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$) wurden die Tiere täglich von 7 Uhr morgens bis 19 Uhr abends unter künstlichem Licht gehalten.

Entsprechend der Versuchsanordnung wurden die Tiere folgenden Gruppen randomisiert zugeordnet; einer Kontrollgruppe (KON, $n = 7$), einer Gruppe der Tiere mit 9 h (ALK-9h, $n = 7$) bzw. mit 24 h (ALK-24h, $n = 6$) Alkoholentzug. Die Kontrollgruppe (KON $n = 7$) erhielt für fünf Tage alle acht Stunden Wasser per Schlundsonde. Die Tiere der Alkoholgruppen ($n = 13$) bekamen eine Initialdosis von 4g/kg/Körpergewicht Ethanol per Schlundsonde. Die fünftägige Dauerintoxikation der Tiere wurde dadurch erreicht, dass ihnen alle 8 Stunden Ethanol appliziert wurde. Dabei betrug die tägliche Alkoholdosis ca. 9 g/kg/Tag. Die Gesamtmenge an Ethanol, die während dieser Zeit verabreicht wurde lag je nach Tier zwischen 39 – 48 g/kg (MW $43 \pm 0,8$ SD).

Diese Tiere verloren fast 10% ihres Körpergewichts. Zusätzlich zeigten sie eine starke Sedation und Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus.

Nach fünf Tagen Dauerintoxikation endete das Experiment mit einer Alkoholdeprivationsphase, die 9 h (ALK-9h) bzw. 24 h (ALK-24h) andauerte. Nach kurzer Halothan Narkose wurden die alkoholbehandelten Tiere nach 9 h ($n = 7$) bzw. 24 h ($n = 6$) dekapitiert. Die alkoholnaiven Tiere wurden 9 h ($n = 3$) bzw. 24 h ($n = 4$) nach der letzten Wassergabe dekapitiert.

Jedes Gehirn wurde nach Dekapitation in PBS gewaschen und auf Eis präpariert. Die rechte Hemisphäre wurde in Hippocampus, Striatum, Cerebellum sowie occipitalen und frontalen Cortex dissektiert und bei -80°C gelagert. Die Hirnteile wurden zur weiteren Untersuchung an Herrn Dr. Dan Rujescu, Molekulare Neurobiologie, Psychiatrische Klinik der LMU München weitergeleitet. Dort wurden die Hirne bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.4.3 Das 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell

Als Versuchstiere dienten neun männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 220 – 250 g, die ebenfalls aus dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried bezogen wurden. Nach einwöchiger Akklimatisierung wurde mit der Behandlung begonnen, welche auch hier von Frau Dr. Sabine M. Hölter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchgeführt wurde.

Die Tiere wurden in standardisierten Käfigen gehalten und hatten Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum*. Bei konstanter Raumtemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$) wurden die Tiere täglich von 7 Uhr morgens bis 19 Uhr abends unter künstlichem Licht gehalten.

Entsprechend der Versuchsanordnung wurden die Tiere einer Kontrollgruppe (KON, $n = 4$) und einer Alkoholgruppe (ALK, $n = 5$) randomisiert zugeordnet.

Die alkoholnaiven Tiere (KON) wurden ausschließlich mit Leitungswasser getränkt.

Die Tiere der experimentellen Gruppe (ALK) hatten über einen Zeitraum von zwei Jahren Zugang zu Wasser und zu unterschiedlich konzentrierten Alkohollösungen. Dabei hatten sie die Wahl zwischen Leitungswasser und drei Alkohollösungen verschiedener Konzentration (5%, 10% und 20%). Diese wurden aus 96% Ethanol und Leitungswasser hergestellt. Die Alkohollösungen wurden wöchentlich erneuert und, um Platzpräferenzen auszuschließen, jeweils anders positioniert.

Nach einer ersten konstanten Alkoholgabe von acht Wochen wurden die Alkohollösungen alle vier Wochen jeweils für drei Tage entzogen. Nach zwei Jahren betrug der durchschnittliche Alkoholkonsum der alkoholtrinkenden Tiere $6,54 \text{ g/kg/Tag}$ ($\pm 0,77 \text{ SD}$).

Der jeweilige Alkoholkonsum der einzelnen Tiere betrug:

Tier 1 : $5,38 \text{ g/kg/Tag}$

Tier 2 : $7,20 \text{ g/kg/Tag}$

Tier 4 : $4,95 \text{ g/kg/Tag}$

Tier 6 : $9,21 \text{ g/kg/Tag}$

Tier 10 : $5,97 \text{ g/kg/Tag}$

Nach zweijährigem freiwilligen Trinken wurden die alkoholtrinkenden Tiere 24 Stunden nach Alkoholdeprivation dekapitiert. Die alkoholnaiven Tiere wurden entsprechend 24 Stunden nach letzter Wassergabe ebenfalls dekapitiert. Dies geschah bei beiden Tiergruppen nach kurzer Halothan Narkose. Jedes Gehirn wurde innerhalb von 10 Minuten auf Eis präpariert. Die rechte Hemisphäre wurde auch in diesem Experiment in Hippocampus, Striatum, Cerebellum, sowie occipitalen und frontalen Cortex dissektiert.

Die Hirnteile wurden auf Trockeneis tiefgefroren und zur weiteren Untersuchung an Herrn Dr. Dan Rujescu, Molekulare Neurobiologie, Psychiatrische Klinik der LMU München weitergeleitet. Dort wurden die Hirne bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2 Methoden

Aus dem Hirngewebe wurde die gesamte RNA extrahiert und die relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 sowie der NR2A – NR2C Untereinheiten des NMDA Rezeptors mittels RT-PCR untersucht. Nach Reverser Transkription wurden die relevanten Genabschnitte durch eine Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Nach Gelelektrophorese wurden die relativen Verhältnisse der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5, der Untereinheiten NR2C/NR2A sowie das relative Verhältnis von GAPDH/NR2B densitometrisch bestimmt.

3.2.1 RNA Extraktion

Die Extraktionen der RNA aus den unterschiedlichen Hirnregionen wurden unter Verwendung des RNeasy® -Mini-Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Extraktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (RNeasy® Mini Handbooks “RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“).

Die Technologie der RNA Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel Membran. Ein spezielles Puffersystem bewirkt die Bindung von bis zu 100 µg RNA (länger als 200 bp) an dieser Membran. Die Denaturierung aller Proteine, einschließlich der RNasen, erfolgte durch einen Guanidium-Isothiocyanat haltigen Puffer in Verbindung mit β-Mercaptoethanol. Durch die Inaktivierung der RNasen wird der Abbau der RNA verhindert. Ethanol schafft adäquate Bindungsverhältnisse, so dass die RNA vollständig an die Membran binden kann und so eine effiziente Reinigung möglich ist (Qiagen, Rneasy Mini Kit, Handbook). Die zur RNA Extraktion verwendeten Puffer RLT, RW1 und RPE der Firma Qiagen sind durch diese nicht näher spezifiziert.

3.2.1.1 Präparation der Gewebeproben

Während der Präparation der Gewebeproben wurde stets auf Trockeneis gearbeitet, wobei alle verwendeten Reagenzien steril und RNase-frei waren.

Sterile Handschuhe, Unterlagen und Skalpelle verhinderten RNase Kontaminationen. Es wurden 20 – 30 mg Hirngewebe abgewogen und in sterilen 1,5 ml Eppendorf- Gefäßen sofort wieder auf Trockeneis gestellt.

3.2.1.2 Homogenisierung des Gewebes

Zur groben Homogenisierung wurden die Gewebeproben in 600 µl RLT Puffer (RNA Lysis Tissue), welcher vorher mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt wurde, gegeben. Nach mehrmaligem Aufziehen mit einer 2 ml Spritze mit Kanüle (Ø= 3mm) entstand ein homogenes Lysat.

Dieses wurde auf die im RNeasy®-Mini-Kit enthaltene QIA-Shredder spin Säule (erste selektive Membran), die sich auf einem 2 ml Sammelröhrchen befand gegeben und 3 x 3 min bei höchster Drehzahl (≥ 14000 rpm) in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert.

In neu vorgelegten 1,5 ml Sammelröhrchen wurde das Lysat mit 600 μ l 70% Ethanol gemischt, um die im nachfolgenden Schritt notwendigen Bindungskonditionen schaffen zu können.

3.2.1.3 Auffangen und Binden der RNA

700 μ l des Gemischs aus Ethanol und Lysat wurden nun auf die auch im RNeasy® -Mini-Kit enthaltene RNeasy mini spin Säule (zweite selektive Membran), welche sich ebenfalls auf einem 2 ml Sammelröhrchen befand, überführt und 15 s bei ≥ 10000 rpm zentrifugiert. Dieselbe Prozedur wurde mit dem restlichen Lysat durchgeführt, wobei das Eluat jeweils verworfen wurde.

3.2.1.4 RNA Reinigung und DNA Verdau

Zur Reinigung der an die Membran gebundenen RNA wurden 350 μ l Puffer RW1 (RNA Wash) auf die RNesay spin Säule gegeben und nochmals 15 s bei ≥ 10000 rpm zentrifugiert.

DNA Verdau:

Der DNA Verdau wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt. Zuerst wurde die lyophilisierte DNaseI (1500 units) in 550 μ l RNase-freiem Wasser gelöst, vorsichtig gemischt, in 10 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Ein 10 μ l Aliquot wurde mit 70 μ l RDD Puffer vorsichtig gemischt, direkt auf die Membran pipettiert und dann 15 min bei Raumtemperatur ($20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) inkubiert. Der zum DNA Verdau verwendete Puffer RDD der Firma Qiagen ist durch diese nicht näher spezifiziert. Danach wurde der DNA Verdau nochmals mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen und 15 s bei ≥ 10000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde verworfen. Die RNeasy spin Säule wurde in neue 1,5 ml Sammelröhrchen überführt.

Waschen und Trocknen:

Die Membran wurde mit 500 μ l RPE Puffer, welcher zuvor mit 80 T 70% Ethanol versetzt wurde, gewaschen und nochmals bei ≥ 10000 rpm 15 s zentrifugiert. Nach Zugabe von weiteren 500 μ l RPE Puffer wurde ein letztes Mal 2 min bei höchster Drehzahl (≥ 14000 rpm) zentrifugiert, um die RNeasy spin Säule zu trocknen, die abschliessend nochmals in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen überführt wurde.

3.2.1.5 Auswaschen der RNA

Um die RNA vollständig von der Membran zu lösen wurden 40 µl RNase- freies Wasser auf diese gegeben und anschließend 1 min bei ≥ 10000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde sofort auf Eis gestellt. Für ein zweites Eluat wurde der Vorgang wiederholt. Beide wurden in 1,5 ml Sammelröhrchen gelagert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

3.2.2 Reinheits- und Ausbeutebestimmung der RNA

UV-Absorptionsspektren können zur qualitativen und quantitativen Bewertung von Nukleinsäurelösungen herangezogen werden. Nukleotide stellen substituierte Aromate dar, die UV-Licht im Bereich zwischen 220 – 230 nm absorbieren. Für Konzentrationsberechnungen dient das mittlere Absorptionsmaximum bei 260 nm, wobei folgende Gleichung herangezogen wurde:

$$c [\text{RNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

Viele Substanzen mit konjugierten Elektronensystemen (z. B. aromatische Aminosäuren) absorbieren ebenfalls im Bereich von 260 – 280 nm. Deshalb wird über den Quotienten A_{260}/A_{280} ein Reinheitsfaktor festgelegt, der zwischen 1,7 – 2,0 liegen sollte.

Zur Bestimmung der RNA Konzentration wurden 5 μl des unter 3.2.1.5 beschriebenen Eluats eingesetzt und mit RNase- freiem Wasser zu einer 5% igen Lösung verdünnt. Die Messungen wurden in einer Quarzglasküvette mit dem Photometer Genequant® der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Der Reinheitsgrad der untersuchten RNA Lösungen lag in der Regel bei 1,8 – 1,9. Die erhaltenen RNA Konzentrationen lagen durchschnittlich bei ca. 200 $\mu\text{g/ml}$. Zum Nullabgleich wurde RNase- freies Wasser als Referenzlösung verwendet.

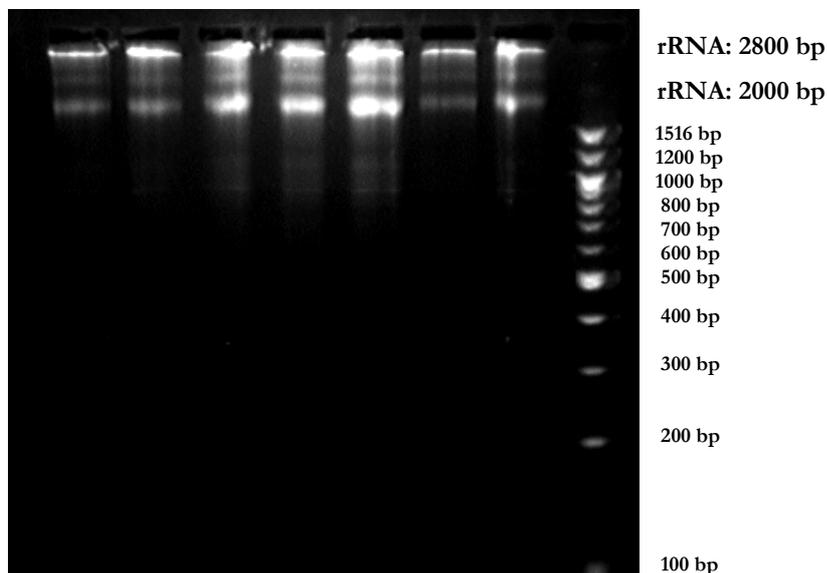


Abb. 8:

Gelelektrophorese zur visuellen Beurteilung der RNA Qualität. Es stellt sich intakte RNA dar. Degenerationsprodukte sind nicht detektierbar. Die rechte Bande stellt den Längenstandard dar; r-RNA (ribosomale RNA).

3.2.3 Reverse Transkription (RT)

3.2.3.1 Hintergründe zur RT

Zu den häufig angewandten Methoden zum Nachweis spezifischer mRNA gehören die *in situ*-Hybridisierung, Northern Blots, *dot* oder *slot blot* Analysen, S1 Nuklease *assays* und RNase *protection assays*. Dabei gilt die *in situ*-Hybridisierung zwar als sehr empfindliche Methode, ist aber aufgrund der komplizierten Technik eher schwer durchzuführen. Die anderen erwähnten Methoden sind weniger sensitiv. Ihnen fehlt die notwendige Empfindlichkeit um selten vorkommende Transkripte sowie um geringe Mengen an RNA nachweisen zu können.

Durch die Einführung der PCR wurde eine Untersuchungsmethode entwickelt, deren Eigenschaften durch Schnelligkeit, Effizienz, Spezifität und Sensitivität charakterisiert ist. Da RNA allerdings nicht als Vorlage einer PCR dienen kann, wurde die Reverse Transkription (RT) der PCR vorgeschaltet. Hier wird die RNA in cDNA umgeschrieben, um sie für die PCR zugänglich zu machen. Die Kombination der beiden Methoden wird RT-PCR genannt.

Im ersten Schritt der RT hybridisiert ein Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer an das polyadenylierte 3' Ende der einzelsträngigen mRNA. Dieses dient im zweiten Schritt der Reversen Transkriptase (SuperScript™II®) als Startpunkt, um die komplementäre cDNA zu synthetisieren, indem sie die RNA in ein RNA : DNA Hybrid umwandelt (Abb. 9).

Die kommerziell erhältliche Reverse Transkriptase ist ein genetisch manipuliertes Enzym, das ursprünglich aus bestimmten RNA Tumoviren stammt. Bei diesem Enzym ist das RNase H aktive Zentrum durch eine Deletion so verändert, dass die RNase H Aktivität um den Faktor $10^6 - 10^7$ reduziert ist, die Polymerase Aktivität jedoch voll erhalten bleibt.

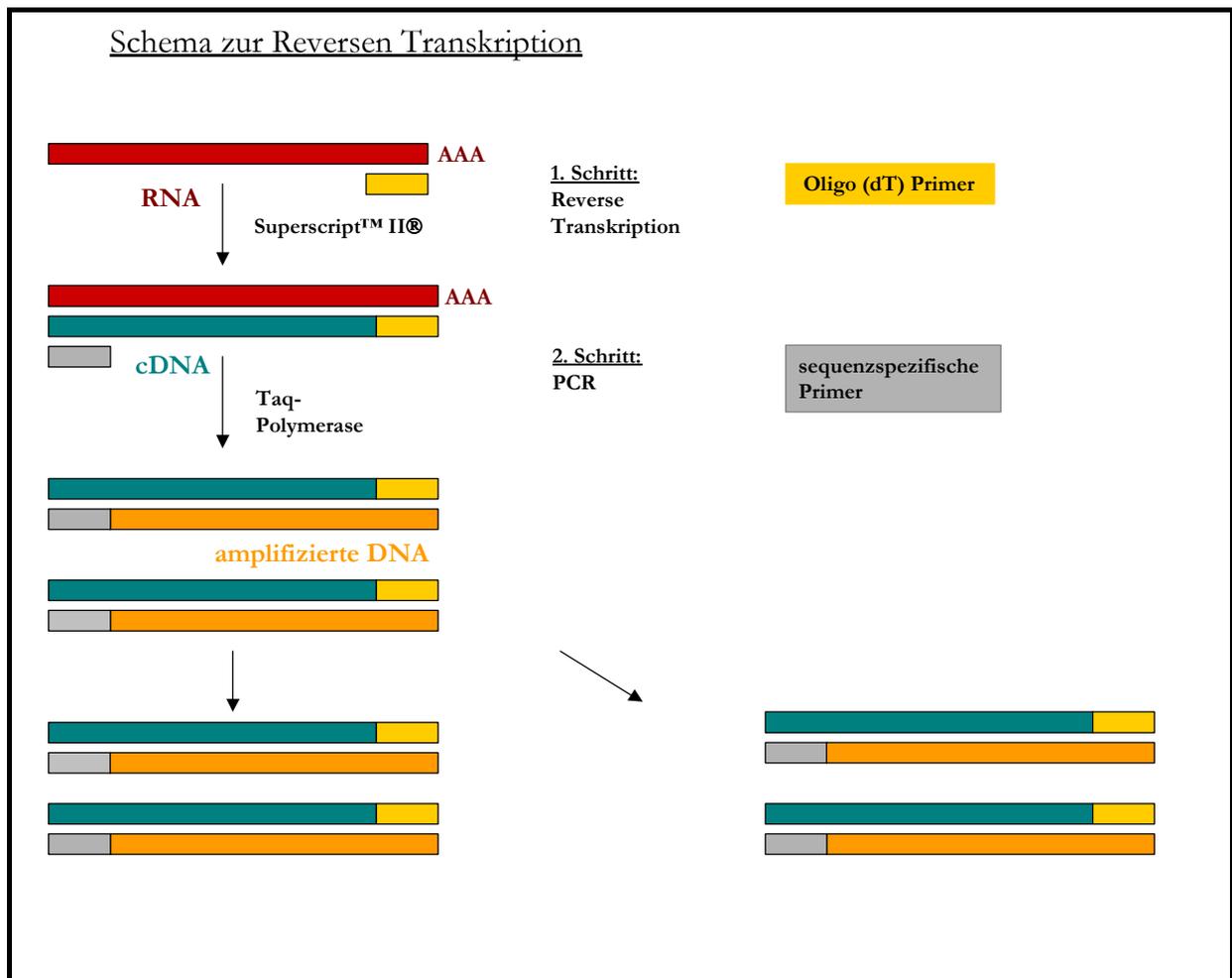


Abb. 9:

Schematische Darstellung der Reversen Transkription (RT) und der anschließenden DNA Amplifizierung mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR):

Die doppelsträngige cDNA wird aus der einzelsträngigen mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (SuperScript™II®) synthetisiert. Als Startpunkt für die Reverse Transkriptase dient der Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer. Anschließend wird mit der cDNA die PCR durchgeführt, wobei ein Primerpaar und die Taq-Polymerase das gewünschte DNA-Fragment amplifizieren.

3.2.3.2 Vorgehensweise

Alle verwendeten Reagenzien waren steril und alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt, wobei die Reverse Transkription gemäß den Angaben des Herstellers (Firma Life Technologies) erfolgte. Die Reagenzien wurden bis auf den RNase Inhibitor (Firma Boehringer Mannheim) und dem dNTP Mix (Invitrogen) von der Firma Life Technologies bezogen.

Von den 40 µl des unter 3.2.1.5 gewonnenen RNA Eluats wurden jeweils 7,5 µl (ca. 1,5 µg mRNA) in 0,5 ml RNase-freie Sammelröhrchen übergeführt und mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl) versetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei 70°C im Eppendorf Mastercycler präinkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und abgekühlt.

Währenddessen wurde eine Mischung aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

4 µl 5x First Strand Buffer
2 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol)
4 µl 10 mM dNTP Mix
0,5 µl RNase Inhibitor (40 units/µl)

Nach kurzem Zentrifugieren wurde jede Probe mit 10,5 µl dieser Mischung versetzt, vorsichtig gemischt und anschließend 2 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde den einzelnen Proben jeweils 1 µl Reverse Transkriptase (SuperscriptTMII®) zugefügt und für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Zum Abschluss wurde die Reaktion 15 min bei 70°C inaktiviert. Im direkten Anschluss an die Reverse Transkription wurde mit der erhaltenen cDNA die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

3.2.4 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

3.2.4.1 Das Reaktionsprinzip der PCR

Die Polymerasen-Kettenreaktion, kurz PCR (polymerase chain reaction) genannt, ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Ihrem Erfinder, dem U.S. Amerikaner Kary B. Mullis, ist für diese Leistung 1993 der Nobelpreis verliehen worden.

Das Reaktionsprinzip der PCR [134] ähnelt der Replikation der DNA in der Zelle. Anstatt der zellulären RNA Primer werden künstlich synthetisierte Oligonukleotidprimer verwendet. Ausgehend von einer DNA Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den sense- bzw. anti-sense-Strang hybridisiert, wird die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert (Abb. 9).

Dabei sind ein geeignetes Puffersystem, Desoxynucleotide und eine DNA-Polymerase von weiterer Bedeutung. Bei der DNA-Polymerase handelt es sich um eine thermostabile, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*E. coli*) stammende, Taq-Polymerase [154]. Diese hitzestabile DNA-Polymerase hat die PCR sehr vereinfacht und verbessert. Das Bakterium *Thermus aquaticus* lebt im Wasser bei einer Temperatur von 75°C. Seine DNA-Polymerase hat ein Temperaturoptimum von 72°C und ist selbst bei der Denaturierungstemperatur von ca. 90°C noch stabil. Bei den Nukleotiden Guanin (G), Thymin (T), Adenosin (A) und Cytosin (C) ist es wichtig, dass sie exakt in der gleichen Konzentration vorliegen, damit ein Fehleinbau in den neu synthetisierten DNA Strang vermieden wird.

Die gesamte Reaktion basiert auf 3 Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die in Zyklen wiederholt werden: Im ersten Schritt der Denaturierung (ca. 94°C) wird die DNA bzw. das RNA – cDNA Gemisch in Einzelstränge denaturiert. Beim zweiten Schritt, der Renaturierung oder dem „Annealing“ (ca. 53°C), hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt, der Polymerisation (ca. 72°C), als Startermoleküle für die Taq-Polymerase, welche die Matrizenstränge kopiert. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startermolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im darauffolgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Das bedeutet, dass im ersten Reaktionszyklus die Anzahl der neugewonnenen DNA Molekülen linear zunimmt, wogegen in den darauffolgenden Zyklen (indem auch die Produkte des ersten Zyklus als Matrize dienen) die Reaktionsprodukte exponentiell mit der Zykluszahl wachsen. Somit wird das ursprüngliche DNA Stück um ein milliardenfaches vervielfältigt.

3.2.4.2 Allgemeine PCR Bedingungen

Enzymkonzentration:

Die ideale Enzymkonzentration für einen 50 µl Ansatz sollte bei 0,5 – 1,5 units Taq-Polymerase liegen. Eine zu hohe Enzymkonzentration kann die Nebenproduktbildung verstärken, da die Substratspezifität des Enzyms sinkt.

Desoxynukleotide:

Die 10 mM Stammlösung sollte einen pH-Wert von 7 aufweisen. Die Nukleotide dGTP, dATP, dCTP und dTTP (energiereiche Triphosphate) müssen exakt in der gleichen Konzentration (je 2,5 mM) vorliegen, da ansonsten ein Fehleinbau in den neu synthetisierten DNA Strang gefördert wird. Günstig ist dabei ein gering konzentriertes Gemisch da dieses einen positiven Einfluss auf die Genauigkeit der Taq-Polymerase hat.

Primerkonzentration:

Die Primer Konzentration muss hoch genug sein, damit genügend Oligonukleotide für das in den aufeinanderfolgenden Zyklen zur Verfügung stehen. Zu hohe Primerkonzentrationen sind allerdings kritisch, da sie oft zu einer Selbsthybridisierung der Primer führen.

pH-Optimum:

Der ideale Reaktionsansatz sollte ein pH-Optimum von ca. pH 8,8 aufweisen. Ein zu saurer Puffer kann zu vorzeitigem Aktivitätsverlust des Enzyms führen.

Auswahl der Ionenkonzentration:

Die Magnesiumionenkonzentration bestimmt die Anlagerung der Primer an den Matrizenstrang, die Dissoziationstemperatur von Matritze und Extensionsprodukten, die Bildung von Primer/Dimer Artefakten und die Aktivität und Genauigkeit der Taq-Polymerase. Die ideale Magnesiumionenkonzentration sollte hierfür in einem Bereich von 1,2 und 2,5 mM liegen.

Auswahl der Annealing Temperatur:

Diese muss je nach Primersequenz empirisch ermittelt werden. Ist die Temperatur zu hoch können sich die Primer nicht anlagern, so dass die Produktausbeute am Ende der Reaktion zu gering ist. Wählt man eine zu niedrige Temperatur lagern sich die Primer auch an anderen Sequenzstellen an, wobei unspezifische Nebenprodukte entstehen.

Um eine optimale Ausbeute und eine stabile Reaktion zu etablieren, wurden folgende Parameter der PCR wie folgt optimiert.

3.2.4.3 PCR Optimierung

3.2.4.3.1 Primerpaar für NR1 +E5/-E5

Zur Amplifizierung der beiden Isoformen NR1+E5 und NR1-E5 wurde ein Primerpaar (Tab. 1) gewählt, welches das alternative Exon flankiert. Die Primer binden an die Positionen 495 bzw. 1162, bezogen auf das erste Nukleotid des Startcodons der ungespleißten Isoform [6].

Die Primerauswahl erfolgte nach Allgaier et al. [6], da diese Primerkombination alle von uns gewünschten Anforderungen erfüllte.

Tab. 1:

Primerpaar zur Amplifizierung der Spleißvarianten NR1+E5 und NR1-E5. Die amplifizierten Fragmente der beiden Isoformen liegen bei 647 bp (NR1+E5) und 604 bp (NR1-E5).

Name	Orientierung	Sequenz
NR1 +E5/-E5-s	Sense	5' TCA GCG ACG ACC ACG AGG GAC G 3'
NR1 +E5/-E5-a	Antisense	5' TTG TAG ATG CCC ACT TGC ACC A 3'

3.2.4.3.2 Primerpaar für GAPDH/NR2B

Das Primerdesign für die Amplifizierung der gewünschten Abschnitte der NR2B- und GAPDH mRNA wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Zuerst wurden in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die mRNA Sequenzen für NR2B (Nucleotide: M91562) und GAPDH (Nucleotide: AF106860) ermittelt.

Das Primerdesign erfolgte über das Computerprogramm „Primer3“ (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi>), welches optimale Primerkombinationen ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass intronüberspannende Primer zur Amplifizierung aller Produkte ausgewählt wurden, um eine chromosomale Verunreinigung eindeutig ausschliessen zu können. Im Anschluss daran wurden mit „BLAST“, einem weiteren Programm des „National Center for Biotechnology Information“, die Primer und die zu amplifizierenden Sequenzen auf ihre Spezifität überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>).

Da GAPDH als konstitutionelles Gen überall gleich stark exprimiert wird, schien es als Referenz zur Ermittlung der relativen mRNA Expression von NR2B geeignet.

Die Primer (Tab. 2) zur Amplifizierung von GAPDH und NR2B binden an die Positionen 967 und 1769 (Nucleotide: AF106860) bzw. 4384 und 4540 (Nucleotide: M91562).

Tab. 2:

Primerpaare zur Amplifizierung der entsprechenden Genprodukte. Die Länge für GAPDH entspricht 803 bp, für NR2B 157 bp.

Name	Orientierung	Sequenz
GAPDH-s	Sense	5' TTC ACA AAG TTG TCA TTG AG 3'
GAPDH-a	Antisense	5' TAC ATG GTC TAC ATG TTC CA 3'
NR2B-s	Sense	5' GTG AGA GCT CCT TTG CCA AC 3'
NR2B-a	Antisense	5' TGA AGC AAG CAC TGG TCA TC 3'

3.2.4.3.3 Primerpaar für NR2C/NR2A

Die Untereinheiten NR2A und NR2C konnten mittels eines Primerpaares gemeinsam amplifiziert werden. Die Primer (Tab. 3) binden an die Positionen 1370 und 1896 (NR2A) und 1364 und 1890 (NR2C), bezogen auf das erste Nukleotid des Startcodons [10]. Anschließend wurde das amplifizierte Fragment NR2AC, mit einer Länge von 547 bp, simultan mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Bpm, ScaI). Diese Enzyme erkennen jeweils spezifische Regionen der Untereinheiten NR2A und NR2C und werden unter 3.2.5 näher beschrieben. Die Auswahl des Primerpaares NR2AC und der Restriktionsenzyme erfolgte nach Audinat et al. [10].

Tab. 3:

Primerpaar, welches die Genprodukte NR2A und NR2C mit einer Länge von 547 bp gemeinsam amplifiziert.

Name	Orientierung	Sequenz
NR2AC-s	Sense	5' GGG GTT CTG CAT CGA CAT CC 3'
NR2AC-a	Antisense	5' GAC AGC AAA GAA GGC CCA CAC 3'

3.2.4.3.4 Primer Rehydratisierung

Die lyophilisierten Primer wurden von der Firma Life Technologies bezogen. Die Sammelröhrchen mit den lyophilisierten Primern wurden zunächst einige Sekunden zentrifugiert, danach vorsichtig geöffnet und in RNase-freiem Wasser so rehydratisiert, dass eine Endkonzentration von 50 nmol/ml erzielt wurde. Nach 2 min wurden die Primerlösungen 15 s lang gevortext, nochmals zentrifugiert und anschließend in Aliquots bei – 20°C aufbewahrt.

3.2.4.3.5 Puffer Optimierung

Die Ermittlung der besten Puffer erfolgte über eine Testreihe mit Puffern unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentration und pH-Werte. Die $MgCl_2$ -Konzentrationen variierten von 7,5 mM bis 17,5 mM, der pH-Wert von pH 8,5 bis pH 10, wobei alle Puffer 300 mM Tris-HCl und 75 mM Ammoniumsulfat enthielten. Die Nomenklatur der verwendeten Puffer A-K erfolgte in Anlehnung an das Pufferoptimierungsprotokoll der Firma Invitrogen („Optimized Buffer Kit“).

Bei der Amplifikation der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 stellte sich Puffer F als optimal heraus. Das Optimum für die NR2AC Sequenz war Puffer E, für die Sequenzen GAPDH und NR2B Puffer A. Mit den gewählten Puffern ergaben sich optimale Bandenintensitäten, unspezifische Fragmente wurden nicht amplifiziert. Tabelle 4 zeigt die für die Optimierung verwendeten Puffer.

Tab. 4: Verwendete Puffer zur Amplifizierung der jeweiligen Genprodukte.

Primerpaare	Puffer	$MgCl_2$ Konzentration	pH-Wert
NR1 +E5/-E5	F	10,0 mM	9,0
NR2AC	E	7,7 mM	9,0
GAPDH/NR2B	A	7,5 mM	8,5

3.2.4.3.6 PCR-Zyklusoptimierung

Die Anzahl der Amplifikate wächst exponentiell mit der Zyklenzahl. Werden zu wenig Zyklen durchgeführt, ist die Ausbeute zu gering. Bei zu hoher Zyklenzahl wird eine Sättigung erreicht und relative Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Banden können nicht mehr erkannt werden. Um zu gewährleisten, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Fragmente dem des Ausgangsmaterials entspricht, muss die Messung in der exponentiellen Phase liegen. Für diesen Optimierungsschritt werden einzelne Reaktionsansätze jeweils nach einer definierten Zyklenzahl aus dem Thermocycler entnommen. Anhand des Agarosegels lassen sich die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zyklenzahl in einer Kurve darstellen (Abb. 10 a/b – 12 a/b). Nach Optimierung erwiesen sich für die Amplifizierung der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 34 Zyklen, für die Untereinheiten NR2C/NR2A 33 Zyklen und für GAPDH/NR2B 34 Zyklen, als optimal.

3.2.4.3.6.1 Zyklusoptimierung für NR1 +E5/-E5

Anhand des Agarosegels (Abb. 10a) lassen sich die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zyklenzahl in einer Kurve darstellen (Abb. 10b). Nach Vergleich der Intensitätszunahme von NR1+E5 und NR1-E5 wurden für die PCR 34 Zyklen gewählt.

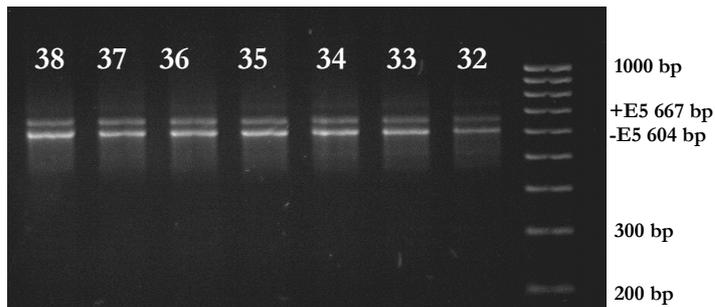


Abb. 10a:

Agarosegel zur Zyklusoptimierung für die Amplifikation der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5. Das Auftragsvolumen betrug 50 µl. Die Intensität der Banden steigt an und geht dann in eine Sättigung über.

Die Banden ganz rechts im Bild stellen den Längenstandard dar.

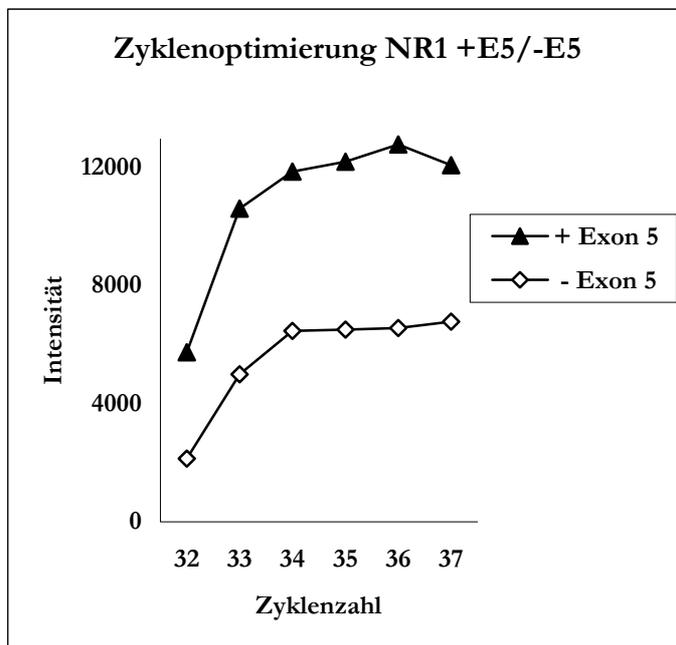


Abb. 10b:

Graphische Darstellung der gemessenen Intensitäten der Gelbanden von NR1+E5 und NR1-E5. Die Intensität der Banden war ab dem 32. Zyklus messbar.

3.2.4.3.6.2 Zyklusoptimierung GAPDH/NR2B

Anhand des Agarosegels (Abb. 11a) lassen sich die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zykluszahl in einer Kurve darstellen (Abb. 11b). Nach Vergleich der Intensitätszunahme von GAPDH und NR2B wurden für die PCR 34 Zyklen gewählt.

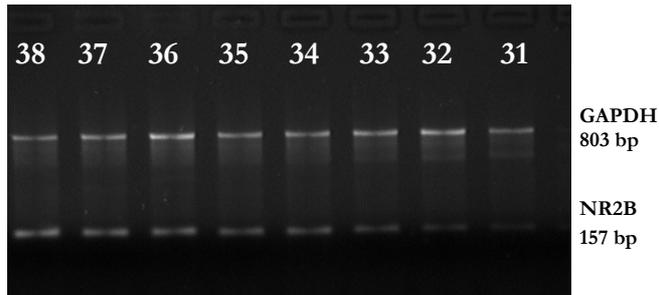


Abb. 11a:

Agarosegel zur Zyklusoptimierung für die Amplifikation von GAPDH und NR2B. Das Auftragsvolumen betrug 50 μ l. Die Intensität der Banden steigt an und geht dann in eine Sättigung über.

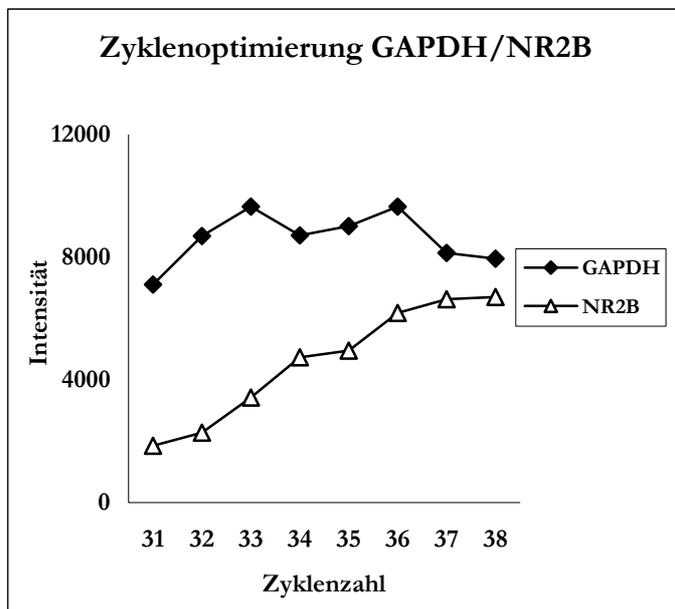


Abb. 11b:

Graphische Darstellung der gemessenen Intensitäten der Gelbanden von GAPDH und NR2B. Die Intensität der Banden war ab dem 31. Zyklus messbar.

3.2.4.3.6.3 Zyklusoptimierung NR2C/NR2A

Anhand des Agarosegels (Abb. 12a) lassen sich die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zyklenzahl in einer Kurve darstellen (Abb. 12b). Nach Vergleich der Intensitätszunahme von NR2C und NR2A wurden für die PCR 34 Zyklen gewählt.

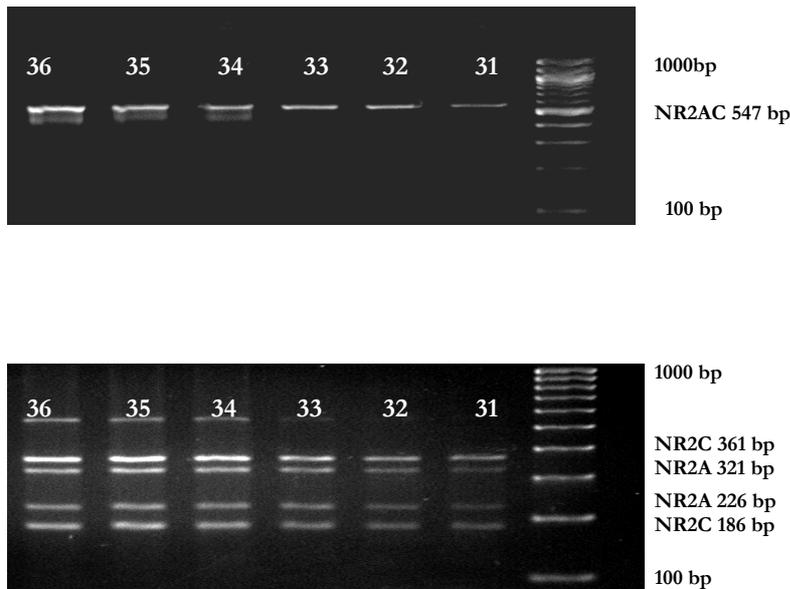


Abb. 12a:

Agarosegel zur Zyklusoptimierung für die Amplifikation von NR2AC vor (oberes Gel) und NR2A bzw. NR2C nach Restriktionsverdau (unteres Gel). Das Auftragsvolumen betrug 50 µl. Die Intensität der Banden steigt an und geht dann in eine Sättigung über.

Die Banden ganz rechts im Bild stellen den Längenstandard dar.

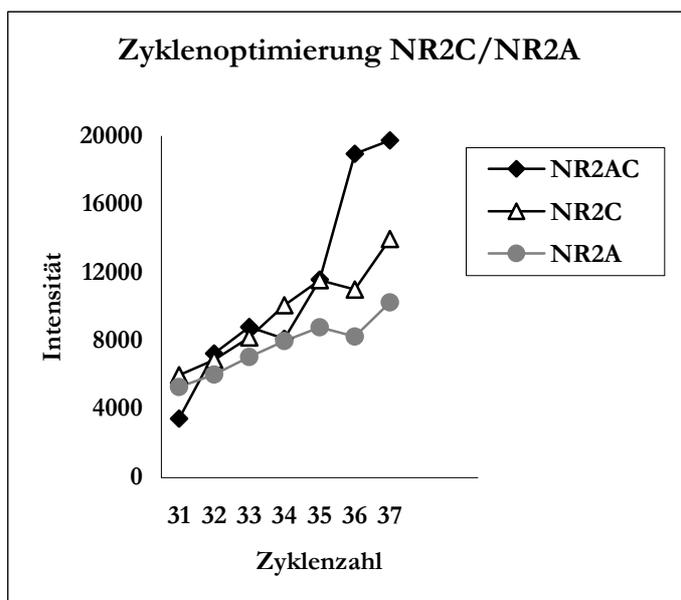


Abb. 12b:

Graphische Darstellung der gemessenen Intensitäten der Gelbanden von NR2C und NR2A vor und nach Restriktionsverdau. Die Intensität der Banden war ab dem 31. Zyklus messbar.

3.2.4.3.7 PCR Bedingungen

Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma Eppendorf, dem Mastercycler Gradient®, durchgeführt.

PCR Programm für NR1 +E5/-E5:

Initiale Denaturierung: 94°C 3: 00 min

34 Zyklen:

Denaturierung: 94°C 0: 30 min

Annealing: 64°C 0: 30 min

Elongation: 72°C 1: 00 min

Produktlängen:

NR1+E5: 667 bp

NR1 -E5: 604 bp

PCR Programm für GAPDH/NR2B:

Initiale Denaturierung: 94°C 2: 00 min

34 Zyklen:

Denaturierung: 94°C 0: 30 min

Annealing: 52,5°C 0: 30 min

Elongation: 72°C 0: 38 min

Produktlängen:

GAPDH: 803 bp

NR2B: 157 bp

PCR Programm für NR2C/NR2A:

Initiale Denaturierung: 94°C 2:00 min

33 Zyklen:

Denaturierung: 94°C 0: 30 min

Annealing: 53°C 0: 30 min

Elongation: 72°C 0: 36 min

Produktlängen:

NR2AC: 547bp

3.2.4.3.8 Pipettierschema und Reaktionsansatz

In nachfolgender Tabelle 5 sind für die PCR eingesetzten Reagenzien und deren Volumina aufgeführt.

Tab. 5:

Auflistung der verwendeten Reagenzien für einen 50 µl PCR- Reaktionsansatz.

Reagenzien	Volumen / Probe	Endkonzentration
Sense Primer (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Antisense Primer (5 µM)	3 µl	0,3 µM
Puffer A* (für NR2B, GAPDH)	10 µl	1,5 mM MgCl ₂
Puffer E* (für NR2A, NR2C)		1,54 mM MgCl ₂
Puffer F* (für NR1 +E5/-E5)		2,0 mM MgCl ₂
dNTP Mix (10 mM)	5 µl	1 mM
PCR Wasser	26,8 µl	
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,2 µl	1 unit
Volumen: Reagenziengemisch	48 µl	
cDNA	2 µl	
Endvolumen des Reaktions- Mix	50 µl	

* Die Endkonzentrationen von Tris-HCl und Ammoniumsulfat der Puffer A, E und F entsprechen bei diesem Reaktionsansatz jeweils 60 mM Tris-HCl und 15 mM (NH₄)₂SO₄.

Die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten des Gemischs ist nicht beliebig gewählt. Die dNTPs und die Taq-Polymerase wurden zuletzt pipettiert, da eine zu frühe Zugabe zu unspezifischen Amplifikationen führen kann.

Desweiteren wurden sowohl Negativproben als auch Positivproben amplifiziert; dabei gewährleisten die Negativkontrollen, dass das Gemisch nicht durch Fremd-DNA kontaminiert ist. Die Positivkontrolle bestätigt, dass die PCR Reaktion erfolgreich durchgeführt wurde.

3.2.5 Der Restriktionsverdau

Um die cDNA Fragmente NR2A und NR2C differenzieren zu können, wurde das amplifizierte Genprodukt NR2AC (547 bp) simultan mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (BpmI, ScaI) geschnitten. Diese Enzyme erkennen jeweils spezifische Regionen von NR2A und NR2C. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte nach Audinat et al. [10].

Tab. 6:

Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme mit deren spezifischen Erkennungsregionen für die cDNA Fragmente NR2A und NR2C und entsprechenden Produktlängen.

Restriktions-enzym	Konzentration	Erkennungssequenz	Produktlängen verdaut
BpmI	2000 u*/ml	5'...CTG GAG (N) 16 ▼...3' 3'...GAC CTC (N) 14 ▲...5'	NR2A: 226 bp und 321 bp
ScaI	10000 u*/ml	5'...AGT ▼ ACT... 3' 3'...TCA ▲ TGA...5'	NR2C: 186 bp und 361 bp

* unit wird als die Menge Enzym definiert die benötigt wird, um 1 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 50 µl bei 37°C in einer Stunde zu verdauen.

Restriktionsansatz:

Folgende Reagenzien der Firma New England Biolabs wurden dabei für einen 50 µl Ansatz verwendet:

2,5 µl BpmI

0,5 µl ScaI

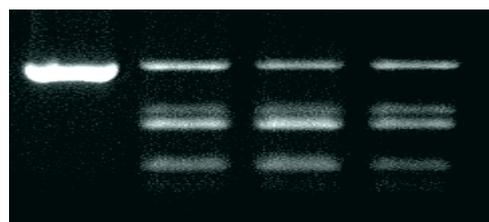
6,0 µl 1x NE Puffer 4

21 µl PCR Wasser

20 µl des PCR Produkts

Die Konzentration der Restriktionsenzyme wurde so gewählt, dass die gemeinsam amplifizierten Untereinheiten optimal verdaut wurden.

Nach Mischen der Reagenzien wurde der Restriktionsansatz 24 Stunden bei 37°C inkubiert.



Unverdautes Fragment NR2AC Verdaute Fragmente NR2A und NR2C

Abb.13:

Gemeinsam amplifiziertes Genprodukt der Fragmente NR2A und NR2C auf Agarosegel.

Unverdaut: NR2AC: 547 bp (linke Bande)

Verdaut: NR2A: 226 bp, 321 bp (rechte Banden)

NR2C: 186 bp, 361 bp (rechte Banden)

3.2.6 Gelelektrophorese

Gelelektrophorese ist eine einfache Methode, um die Größe und Form von DNA Molekülen zu bestimmen. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Migration geladener Partikel in einem elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA Molekülen durch die Agarosematrix wandern, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der DNA Fragmente. Desweiteren hängt die Migration von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration ab. Mit Agarosegelen lassen sich DNA Fragmente über einen weiten Größenbereich von etwa 100 bp bis zu 50 kb auftrennen.

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Es wird in Elektrophoresepuffer aufgenommen und durch Erhitzen in Lösung gebracht. Die Vielzahl an Hydroxy-Gruppen ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, durch die bei der Abkühlung eine großporige Gelmatrix entsteht.

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Reagenzien verwendet:

Agarose

0,5x TBE Puffer

Ethidiumbromid

Das Gel wurde, je nach PCR Ansatz, unterschiedlich stark konzentriert hergestellt:

NR1 +E5/-E5:	2%
NR2AC (unverdaut)	2%
NR2C/NR2A (verdaut)	3%
GAPDH/NR2B:	2%

Zur Herstellung des Gels wurde die benötigte Menge Agarose mit 0,5x TBE Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen der Lösung und nach Zugabe von 1 µl/100 ml Ethidiumbromid wurde die fertige Lösung in die Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid ist eine Substanz, die in die DNA Helix interkaliert und bei Beleuchtung mit UV-Licht fluoresziert. Nach Erkalten des Gels wurde die Gelkammer mit 0,5x TBE gefüllt, welches als Laufpuffer verwendet wurde. Die PCR-Proben (50 µl) wurden jeweils mit 5 µl Ladepuffer (Loading Dye) gemischt. Dieser Ladepuffer enthält Glycerin, das die Dichte der PCR-Produkte erhöht und dadurch die DNA in die Geltaschen sinken lässt. Ein zusätzlich aufgetragener Längenstandard, der DNA Fragmente verschiedener Größe enthält (DNA Marker), diente zur Identifizierung der einzelnen Produktlängen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer

Gleichspannung von 100 mV. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die einzelnen Fragmente zur Anode und trennen sich je nach Größe auf.

Nach abgeschlossener Auftrennung (Dauer: 30 min – 1 h) wird das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

Zusammensetzung der Reagenzien:

<u>5x TBE Puffer</u>	5,4%	Trisbase
	2,75%	Borsäure
	0,375%	Natrium- EDTA

Die 5x TBE Puffer Stammlösung wird vor Gebrauch 1: 10 mit Wasser verdünnt.

<u>6x Glycerol Loading Dye</u>	3 T	1% Bromphenolblaulösung
	3 T	30% Glycerollösung
	0,1 T	0,5 mM EDTA-Lösung
	3,9 T	destilliertes Wasser

DNA-Längenstandard: „100 bp DNA Ladder“ (500 µg/ml) mit 12 DNA Fragmenten von 100 bp – 1517 bp (Abb. 14).

3 µl (1,5 µg) des DNA-Längenstandards werden mit 1 µl Ladepuffer (Loading Dye) gemischt

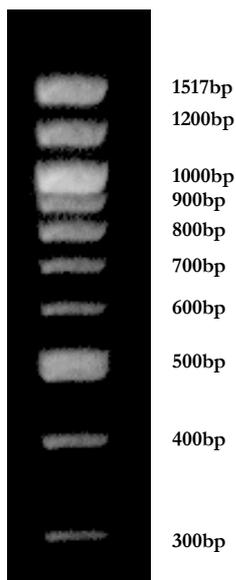


Abb. 14:
DNA-Längenstandard
zur Identifizierung der
Bandenlängen der
jeweilig amplifizierten
cDNA Fragmente.

3.2.6.1 Densitometrische Gelauswertung

Die Ablichtung der Gele wurde mit dem Gerät Eagle Eye® der Firma Stratagene durchgeführt. Mit diesem Gerät ist es möglich, das Gel mit UV-Licht zu bestrahlen und zu fotografieren. Die jeweiligen Banden wurden unter UV-Licht detektiert, deren Gesamtfläche markiert und die Bandenintensität mit Hilfe des zugehörigen Computerprogrammes ausgewertet. Nach Speicherung auf Datenträger wurden die gemessenen Intensitäten in das Statistikprogramm SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, 2001) eingegeben und das relative Verhältnis der Spleißvarianten bzw. Untereinheiten in den einzelnen Hirnregionen berechnet. Die Daten wurden aggregiert und mittels t-Test für unabhängige Stichproben bzw. mit einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertungsmethode und Messdaten

Aus Gewebe des Hippocampus, Striatums, Cerebellums sowie des occipitalen und frontalen Cortex aller Tiere wurde zwei- bis dreimal RNA extrahiert. Damit wurde im Anschluss Reverse Transkription und mit der synthetisierten cDNA PCR durchgeführt. Zu einem geringen Teil konnten nicht alle Banden auf den Elektrophoresegelelten ausgewertet werden.

Die Einzeldaten entsprechen dem Verhältnis der relativen mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten NR1 +E5 zu NR1 –E5, der Untereinheiten NR2C zu NR2A sowie GAPDH zu NR2B, wobei Verhältnis der Untereinheiten zu ihrer relativen mRNA Expression umgekehrt proportional sind.

Nach Aggregation der Einzeldaten aller Tiere wurde die Mittelwertunterschiede berechnet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der SPSS 11.0 Software (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, 2001).

4.1.1 t-Test für unabhängige Stichproben

Im pharmakologischen Psychosemodell (MK-801 Modell) und im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell und wurden jeweils zwei Gruppen, eine Verumgruppe (ALK bzw. MK-801) und eine Kontrollgruppe (KON) Gruppen miteinander verglichen. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben. Auch hier wurde $p < 0,05$ (zweiseitig) als Signifikanzniveau akzeptiert.

4.1.2 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Im Modell der forcierten Ethanolintoxikation wurden die Kontrollgruppe (KON, $n = 7$) und zwei Verumgruppen (ALK-9h, $n = 7$ und ALK-24h, $n = 6$) miteinander verglichen. (ALK-9h: 9 h Ethanoldeprivation, ALK-24: 24 h Ethanoldeprivation).

Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Bei signifikanten Gruppenunterschieden wurde ein post-hoc Bestätigungstest (Scheffé-Prozedur) angeschlossen, um die Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen. Somit konnte differenziert werden, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestanden. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ (zweiseitig) akzeptiert und im Folgenden mit „*“ gekennzeichnet.

4.2 Relative mRNA Expression des NMDA Rezeptors im pharmakologischen Psychosemodell

Tabelle 7 zeigt die Anzahl der im pharmakologischen Psychosemodell durchgeführten RNA Extraktionen, Reverser Transkriptionen (RT) und PCRs. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind für die Verumgruppe (MK-801, n = 5) sowie für die Kontrollgruppe (KON, n = 5) entsprechend der jeweiligen Hirnregionen einzeln aufgelistet.

Tab. 7:

Anzahl der durchgeführten Versuche [RNA Extraktion; Reverser Transkription (RT) und PCR] sowie Anzahl der erhaltenen und zur Auswertung herangezogenen Einzelmessungen pro Gruppe. MK-801 stellt die Verumgruppe KON die Kontrollgruppe dar.

	RNA Ex-trak-tion	RT	PCR	Anzahl der Einzelmessungen NR1 +E5/-E5		Anzahl der Einzelmessungen NR2C/NR2A		Anzahl der Einzelmessungen GAPDH/NR2B	
				MK-801 (n=5)	KON (n=5)	MK-801 (n=5)	KON (n=5)	MK-801 (n=5)	KON (n=5)
Hippo-campus	A	4	8	53	51	85	81	74	74
	B	4	12						
Striatum	A	4	8	32	32	34	40	49	49
	B	3	3						
Cerebellum	A	2	4	34	31	20	18	30	30
	B	2	3						
Occipitaler Cortex	A	4	10	81	88	63	60	47	49
	B	4	5						
	C	4	5						
Frontaler Cortex	A	2	5	33	34	45	38	40	38
	B	2	4						

4.2.1 Ratio NR1 +E5/-E5

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte relative mRNA Expression der Spleißvariante NR1+E5 im Hippocampus ($p = 0,027^*$) (Tab. 8, Abb. 15, 16) und Striatum ($p = 0,019^*$) (Tab. 8, Abb. 17, 18). Hingegen fanden wir im Cerebellum, occipitalen und frontalen Cortex keine signifikante Veränderungen (Tab. 8).

Tab. 8:

Statistische Auswertung der relativen mRNA Expression der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 7 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Hippocampus	MK- 801	5	1,23 (0,09)	2,697	8	0,027*
	KON	5	1,07 (0,09)			
Striatum	MK- 801	5	1,72 (0,45)	2,931	8	0,019*
	KON	5	1,11 (0,12)			
Cerebellum	MK- 801	5	1,50 (0,12)	-0,627	8	0,548
	KON	5	1,61 (0,38)			
Occipitaler Cortex	MK- 801	5	0,78 (0,18)	0,294	8	0,776
	KON	5	0,73 (0,32)			
Frontaler Cortex	MK- 801	5	0,85 (0,13)	-0,303	8	0,770
	KON	5	0,88 (0,19)			

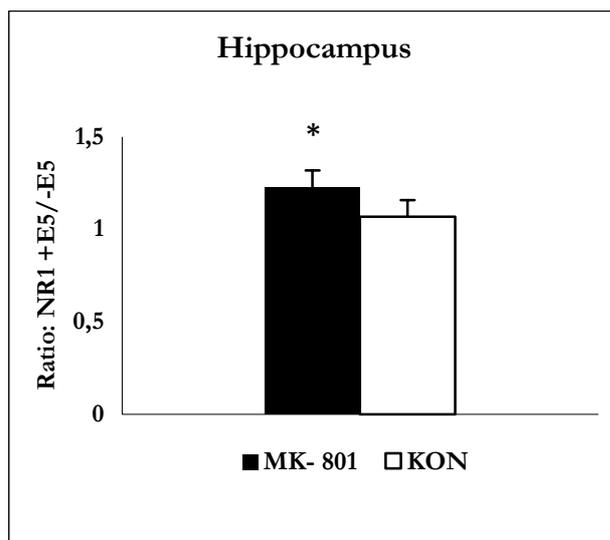


Abb. 16:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR1+E5 zu NR1-E5 im Hippocampus dar.

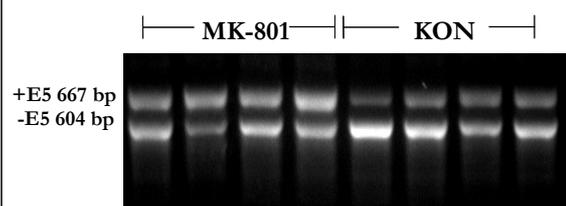


Abb. 15:

RT-PCR für NR1 +E5/-E5. Die Produkte von 604 bp (ohne Exon 5) und 667 bp (mit Exon 5) entsprechen den Spleißvarianten. Das Agarosegel zeigt die relative Expression im Hippocampus.

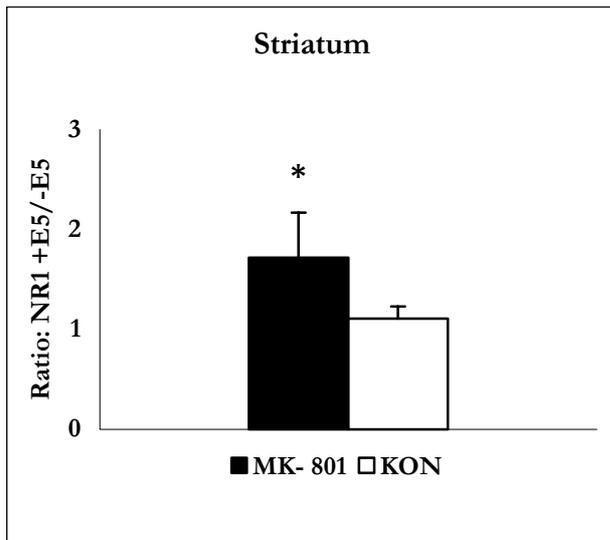


Abb. 18:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR1+E5 zu NR1-E5 im Striatum dar.

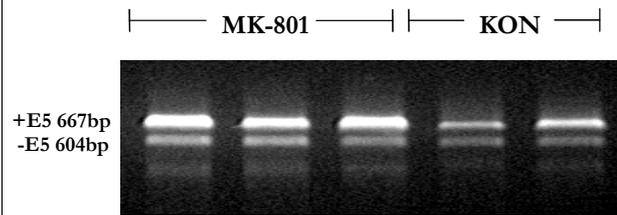


Abb. 17:

RT-PCR für NR1 +E5/-E5. Die Produkte von 604 bp (ohne Exon 5) und 667 bp (mit Exon 5) entsprechen den Spleißvarianten. Das Agarosegel zeigt die relative Expression im Striatum.

4.2.2 Ratio NR2C/NR2A

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante relativ erniedrigte NR2A mRNA Expression im Hippocampus ($p = 0,027^*$) (Tab. 9, Abb. 19, 20), occipitalen Cortex ($p = 0,031^*$) (Tab. 9, Abb. 21, 22) und frontalen Cortex ($p = 0,043^*$) (Tab. 9, Abb. 23, 24). Hingegen fanden wir in den übrigen untersuchten Hirnregionen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 9).

Tab. 9:

Statistische Auswertung für die Untereinheiten NR2C/NR2A in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 7 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Hippocampus	MK- 801	5	0,67 (0,11)	2,691	8	0,027*
	KON	5	0,54 (0,03)			
Striatum	MK- 801	5	1,21 (0,11)	-1,307	8	0,228
	KON	5	1,05 (0,24)			
Cerebellum	MK- 801	5	2,19 (0,43)	-0,864	8	0,413
	KON	5	2,00 (0,25)			
Occipitaler Cortex	MK- 801	5	1,13 (0,11)	2,617	8	0,031*
	KON	5	0,92 (0,14)			
Frontaler Cortex	MK- 801	5	0,63 (0,08)	2,398	8	0,043*
	KON	5	0,53 (0,04)			

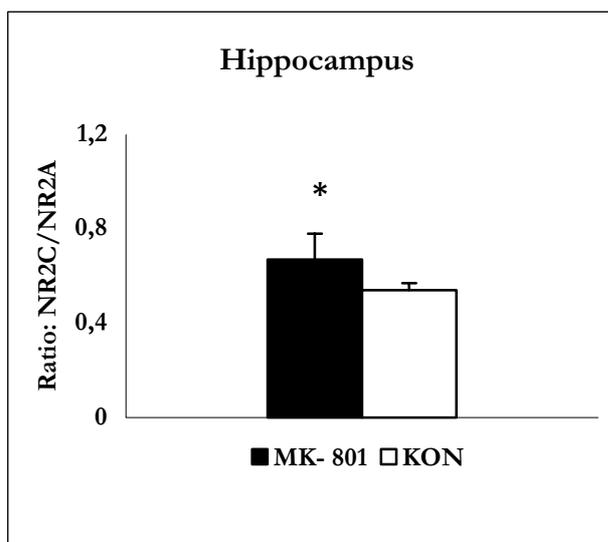


Abb. 20:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im Hippocampus dar.

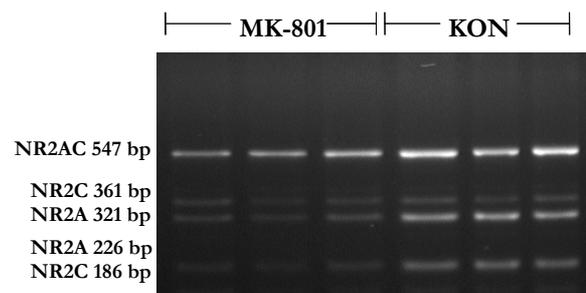


Abb. 19:

Agarosegel einer RT-PCR für NR2C/NR2A im Hippocampus. Nach Verdau werden folgende Banden detektiert: 226 bp und 321 bp (NR2A) sowie 186 bp und 361 bp (NR2C).

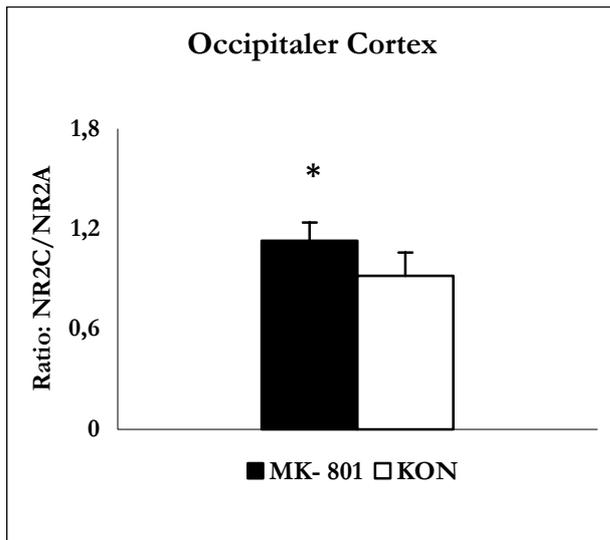


Abb. 22:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im occipitalen Cortex dar.

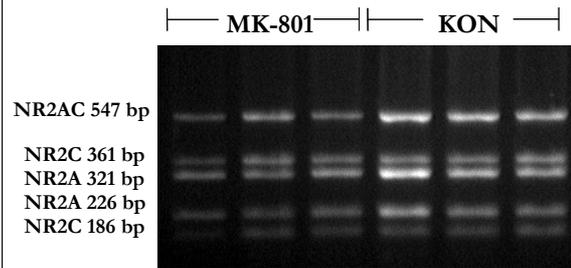


Abb. 21:

Agarosegel einer RT-PCR für NR2C/NR2A. im occipitalen Cortex. Nach Verdau werden folgende Banden detektiert: 226 bp und 321 bp (NR2A) sowie 186 bp und 361 bp (NR2C)

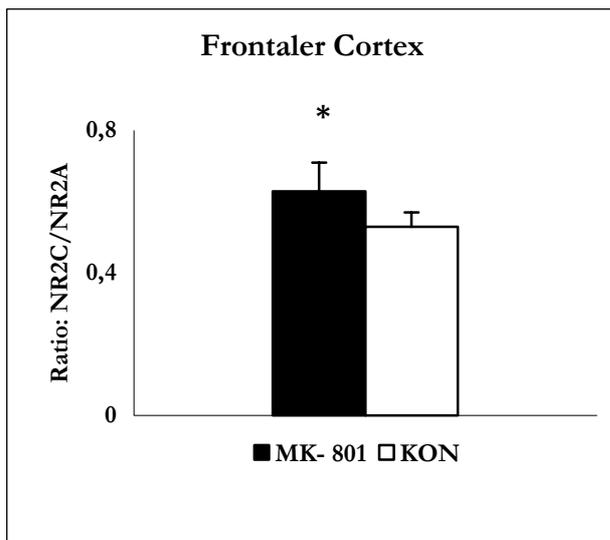


Abb. 24:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im frontalen Cortex dar.

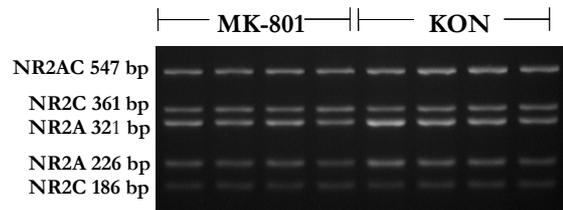


Abb. 23:

Agarosegel einer RT-PCR für NR2C/NR2A. im frontalen Cortex. Nach Verdau werden folgende Banden detektiert: 226 bp und 321 bp (NR2A) sowie 186 bp und 361 bp (NR2C)

4.2.3 Ratio GAPDH/NR2B

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante relativ erhöhte NR2B mRNA Expression im Hippocampus ($p = 0,014^*$) (Tab. 10, Abb. 25, 26) und im frontalen Cortex ($p = 0,033^*$) (Tab. 10, Abb. 27, 28). Hingegen fanden wir in den übrigen untersuchten Hirnregionen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 10).

Tab. 10:

Statistische Auswertung für GAPDH/NR2B in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich.

In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 7 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Hippocampus	MK- 801	5	2,58 (0,23)	-3,149	8	0,014*
	KON	5	3,04 (0,24)			
Striatum	MK- 801	5	3,62 (1,08)	1,322	8	0,223
	KON	5	2,97 (0,23)			
Cerebellum	MK- 801	5	4,99 (0,93)	-1,252	8	0,246
	KON	5	6,18 (1,91)			
Occipitaler Cortex	MK- 801	5	1,68 (0,29)	-1,269	8	0,240
	KON	5	2,71 (1,79)			
Frontaler Cortex	MK- 801	5	1,45 (0,12)	2,398	8	0,033*
	KON	5	1,67 (0,15)			

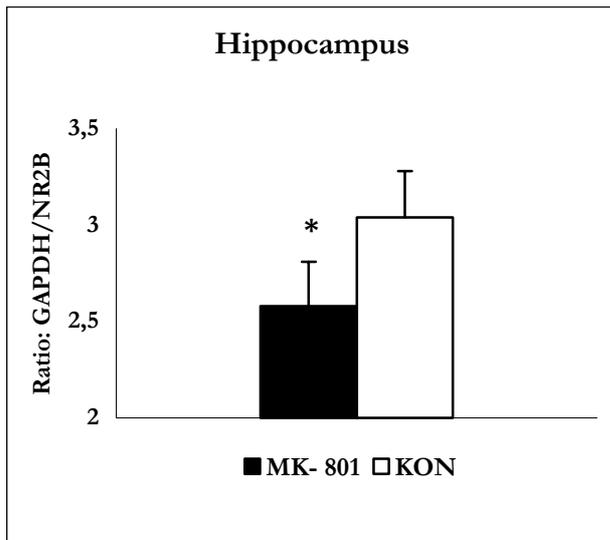


Abb. 26:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im Hippocampus dar.

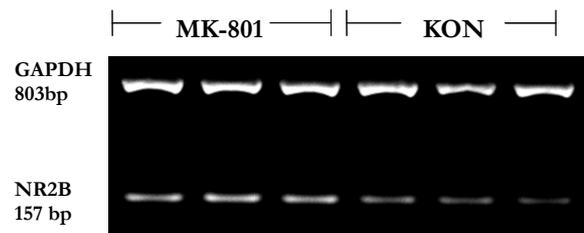


Abb. 25:

Agarosegel einer RT-PCR zur Bestimmung der relativen Expression von NR2B und GAPDH (Hippocampus). Die Produktlängen liegen bei 157 bp (NR2B) und 803 bp (GAPDH).

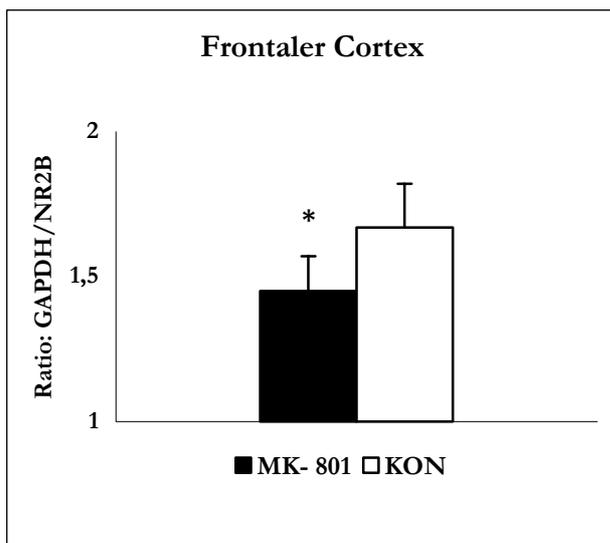


Abb. 28:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im frontalen Cortex dar.

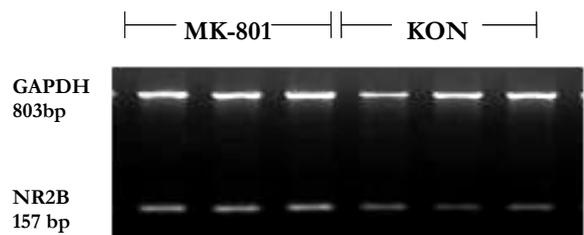


Abb. 27:

Agarosegel einer RT-PCR zur Bestimmung der relativen Expression von NR2B und GAPDH (frontaler Cortex). Die Produktlängen liegen bei 157 bp (NR2B) und 803 bp (GAPDH).

4.3 Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation

Tabelle 11 zeigt die Anzahl der im Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation durchgeführten RNA Extraktionen, Reversen Transkriptionen und PCRs. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind für die Kontrollgruppe KON (n = 7) und die Verumgruppen ALK-9h (n = 7) bzw. ALK-24h (n = 6) entsprechend der untersuchten Hirnregionen einzeln aufgelistet.

Tab. 11:

Anzahl der durchgeführten Versuche [RNA Extraktion, Reverser Transkription (RT) und PCR] sowie Anzahl der daraus erhaltenen und zur Auswertung herangezogenen Einzelmessungen pro Gruppe. KON stellt die Kontrollgruppe, ALK-9h und ALK-24h die Verumgruppen dar.

	RNA Ex-trak-tion	RT	PCR	Anzahl der Einzelmessungen NR1 +E5/-E5			Anzahl der Einzelmessungen NR2C/NR2A			Anzahl der Einzelmessungen GAPDH/NR2B		
				KON	ALK-9h	ALK-24h	KON	ALK-9h	ALK-24h	KON	ALK-9h	ALK-24h
				(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=6)
Hippocampus	A	4	4	23	30	23	50	52	45	32	33	12
	B	4	4									
Striatum	A	1	1	12	15	15	8	8	10	11	13	11
	B	1	1									
	C	1	1									
Cerebellum	A	1	2	7	7	6	10	13	6	16	18	12
	B	1	1									
Occipital Cortex	A	1	1	8	5	6	12	13	11	22	16	19
	B	1	1									
	C	1	1									
Frontaler Cortex	A	1	1	-	-	-	43	40	46	49	39	33
	B	1	2									
	C	1	2									

4.3.1 Ratio NR1 +E5/-E5

Nach Auswertung mittels ANOVA zeigte sich zwischen den drei Gruppen eine signifikant erhöhte relative mRNA Expression der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 im Hippocampus und occipitalen Cortex. Dabei war das Verhältnis zugunsten der Exon 5 Einschlussvariante verschoben. Im Cerebellum und im Striatum konnten wir keine signifikanten Veränderungen beobachten (Tabelle 12).

Tab. 12:

Statistische Auswertung der relativen mRNA Expression der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 11 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	F	df	p
Hippocampus	KON	7	45 (10)	6,329	2/17	0,009*
	ALK-9h	7	66 (15)			
	ALK-24h	6	58 (8)			
Striatum	KON	6	83 (34)	0,27	2/16	0,973
	ALK-9h	7	79 (30)			
	ALK-24h	6	79 (36)			
Cerebellum	KON	7	184 (55)	0,006	2/17	0,994
	ALK-9h	7	185 (69)			
	ALK-24h	6	182 (29)			
Occipitaler Cortex	KON	7	39 (17)	4,268	2/13	0,038*
	ALK-9h	5	92 (50)			
	ALK-24h	4	59 (14)			

4.3.1.1 Post-hoc Test und Balkendiagramme

Die relative mRNA Expression der Spleißvariante NR1+E5 im Hippocampus zeigte sich nach 9 h und 24 h Alkoholentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe numerisch erhöht und erreichte nach 9 h Alkoholentzug statistische Signifikanz ($p = 0,009^*$) (Tab. 13, Abb. 29).

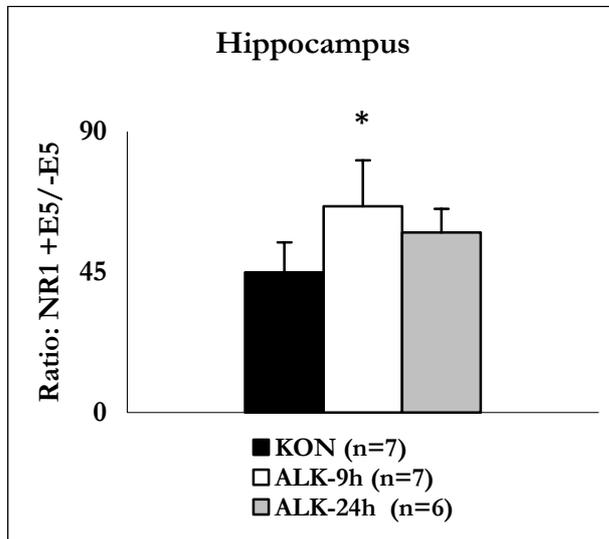


Abb. 29:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR1+E5 zu NR1-E5 im Hippocampus dar.

Die relative mRNA Expression der Spleißvariante NR1 +E5 im occipitalen Cortex zeigte sich nach 9 h und 24 h Alkoholentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe numerisch erhöht und erreichte nach 9 h Alkoholentzug statistische Signifikanz ($p = 0,038^*$) (Tab. 14, Abb. 30).

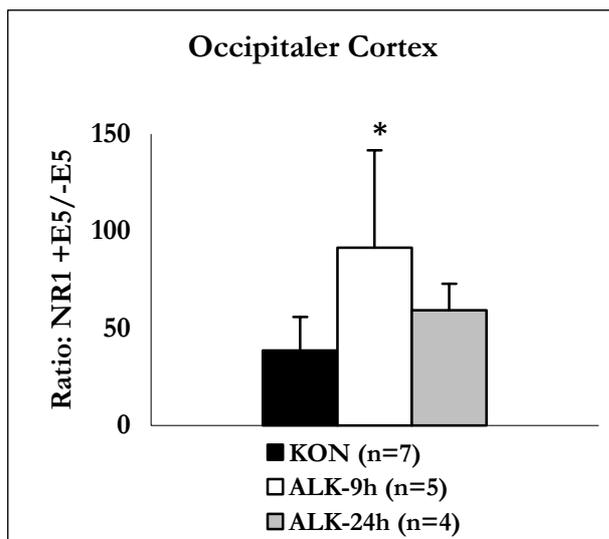


Abb. 30:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR1+E5 zu NR1-E5 im occipitalen Cortex dar.

Tab. 13:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von NR1 +E5/-E5 zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,009*
ALK-9h /ALK-24h	0,424
ALK-24h/KON	0,152

Tab. 14:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von NR1 +E5/-E5 zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,038*
ALK-9h /ALK-24h	0,328
ALK-24h/KON	0,584

4.3.2 Ratio NR2C/NR2A

Nach Auswertung mittels ANOVA zeigte sich zwischen den drei Gruppen eine signifikant erhöhte relative mRNA Expression der NR2A Untereinheit verglichen zu NR2C im Hippocampus und occipitalen Cortex. Hingegen fanden wir im Striatum, Cerebellum und frontalen Cortex keine signifikante Veränderungen (Tabelle 15).

Tab. 15:

Statistische Auswertung der relativen mRNA Expression der Untereinheiten NR2C/NR2A in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 11 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	F	df	p
Hippocampus	KON	7	93 (22)	5,217	2/16	0,018*
	ALK-9h	7	67 (8)			
	ALK-24h	5	88 (13)			
Striatum	KON	5	205 (147)	1,599	2/15	0,235
	ALK-9h	7	167 (17)			
	ALK-24h	6	264 (104)			
Cerebellum	KON	7	134 (23)	1,904	2/17	0,179
	ALK-9h	7	171 (70)			
	ALK-24h	6	128 (6)			
Occipitaler Cortex	KON	6	138 (47)	7,56	2/15	0,005*
	ALK-9h	6	64 (11)			
	ALK-24h	6	131 (39)			
Frontaler Cortex	KON	7	110 (17)	2,485	2/17	0,113
	ALK-9h	7	97 (7)			
	ALK-24h	6	94 (15)			

4.3.2.1 Post-hoc Tests und Balkendiagramme

Die relative mRNA Expression von NR2A im Hippocampus zeigte sich nach 9 h Alkoholentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,024^*$) (Tab. 16, Abb. 31).

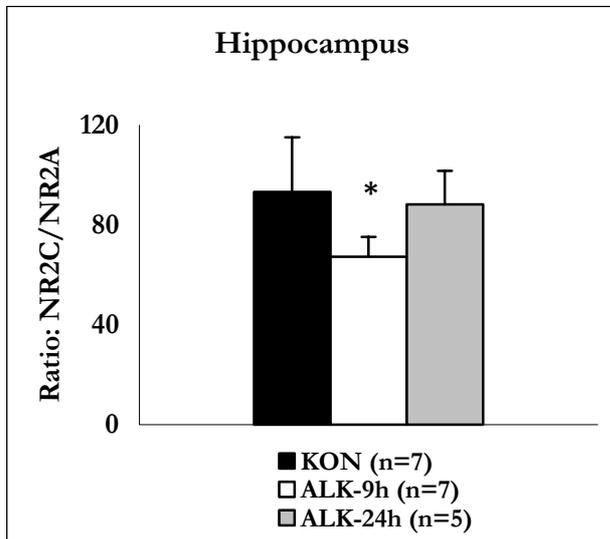


Abb. 31:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im Hippocampus dar.

Die relative NR2A mRNA Expression im occipitalen Cortex zeigte sich nach 9 h im Vergleich zu 24 h Alkoholentzug ($p = 0,021^*$) und zur Kontrollgruppe ($p = 0,011^*$) signifikant erhöht (Tab. 17, Abb. 32).

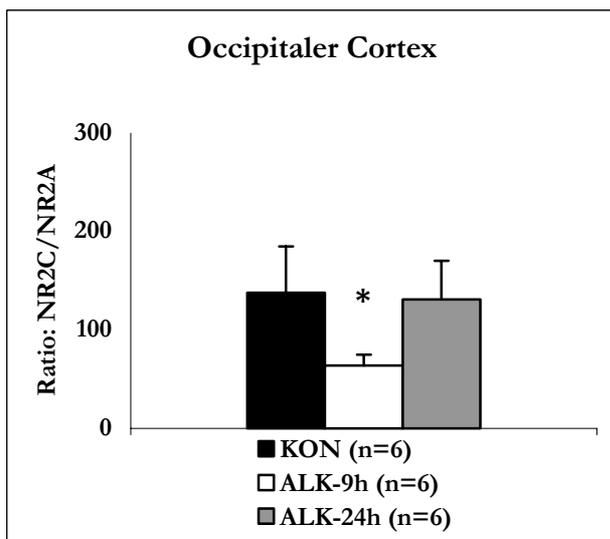


Abb. 32:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im occipitalen Cortex dar.

Tab. 16:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von NR2C/NR2A zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,024*
ALK-9h/ALK-24h	0,106
ALK-24h/KON	0,869

Tab. 17:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von NR2C/NR2A zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,011*
ALK-9h/ALK-24h	0,021*
ALK-24h/KON	0,943

4.3.3 Ratio GAPDH/NR2B

Nach Auswertung mittels ANOVA zeigte sich zwischen den drei Gruppen eine signifikant erhöhte relative NR2B mRNA Expression im Verhältnis zu GAPDH in allen untersuchten Hirnregionen (Tabelle 18).

Tab. 18:

Statistische Auswertung der relativen mRNA Expression GAPDH/NR2B in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 11 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	F	df	p
Hippocampus	KON	7	326 (44)	25,989	2/16	0,000009*
	ALK-9h	6	268 (30)			
	ALK-24h	6	132 (66)			
Striatum	KON	7	181 (23)	7,599	2/17	0,004*
	ALK-9h	7	157 (23)			
	ALK-24h	6	241 (64)			
Cerebellum	KON	7	373 (116)	14,733	2/17	0,0002*
	ALK-9h	7	245 (70)			
	ALK-24h	6	503 (54)			
Occipitaler Cortex	KON	7	208 (66)	5,505	2/16	0,015*
	ALK-9h	6	113 (20)			
	ALK-24h	6	148 (56)			
Frontaler Cortex	KON	7	196 (86)	5,734	2/17	0,012*
	ALK-9h	7	107 (32)			
	ALK-24h	6	198 (32)			

4.3.3.1 Post-hoc Tests und Balkendiagramme

Die relative NR2B mRNA Expression im Hippocampus zeigte sich nach 24 h Alkoholentzug im Vergleich zu 9 h Alkoholentzug ($p = 0,001^*$) und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,00001^*$) (Tab. 19, Abb. 33).

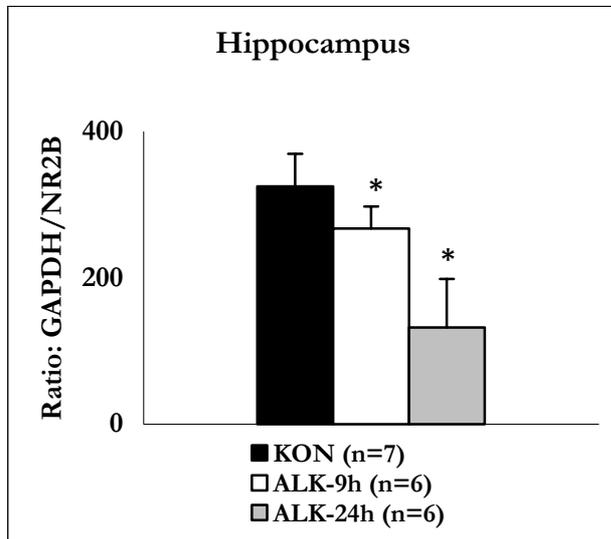


Abb. 33:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im Hippocampus dar.

Die relative NR2B mRNA Expression im Striatum zeigte sich nach 9 h Alkoholentzug im Vergleich zu 24 h Alkoholentzug signifikant erhöht ($p = 0,005^*$) und nach 24 h Alkoholentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($p = 0,044^*$) (Tab. 20, Abb. 34).

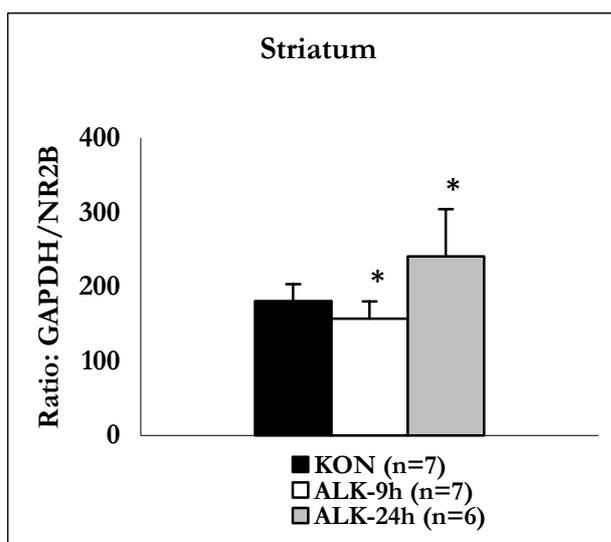


Abb. 34:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im Striatum dar.

Tab. 19:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von GAPDH/NR2B zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,136
ALK-9h /ALK-24h	0,001*
ALK-24h/KON	0,00001*

Tab. 20:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von GAPDH/NR2B zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,551
ALK-9h /ALK-24h	0,005*
ALK-24h/KON	0,044*

Die relative NR2B mRNA Expression im Cerebellum zeigte sich nach 9 h Alkoholentzug im Vergleich zu 24 h Alkoholentzug ($p = 0,0002^*$) und zur Kontrollgruppe ($p = 0,040^*$) signifikant erhöht. Nach 24 h Alkoholentzug zeigte sich die relative NR2B mRNA Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($p = 0,045^*$) (Tab. 21, Abb. 35).

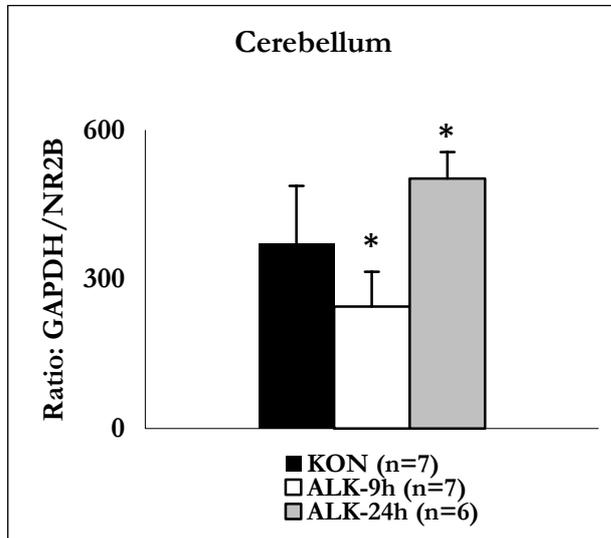


Abb. 35:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im Cerebellum dar.

Die relative NR2B mRNA Expression im occipitalen Cortex zeigte sich nach 9 h und 24 h Alkoholentzug im Vergleich zur Kontrollgruppe numerisch erhöht und erreichte nach 9 h Alkoholentzug statistische Signifikanz ($p = 0,017^*$) (Tab. 22, Abb. 36).

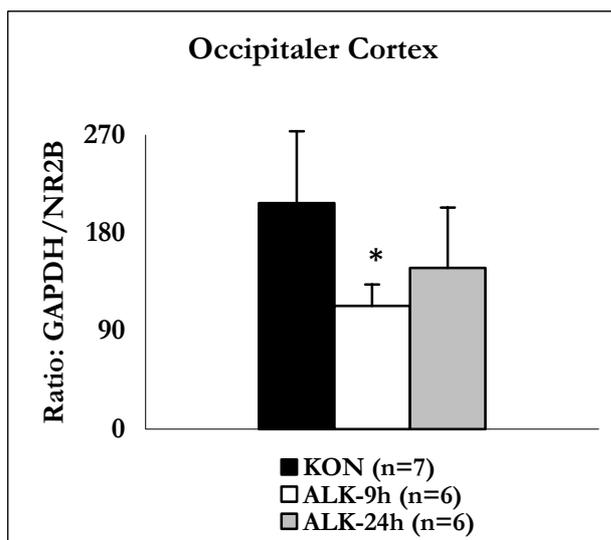


Abb. 36:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im occipitalen Cortex dar.

Tab. 21:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von GAPDH/NR2B zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,040*
ALK-9h /ALK-24h	0,0002*
ALK-24h/KON	0,045*

Tab. 22:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von GAPDH/NR2B zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,017*
ALK-9h /ALK-24h	0,529
ALK-24h/KON	0,152

Die relative NR2B mRNA Expression im frontalen Cortex zeigte sich nach 9 h im Vergleich zu 24 h Alkoholentzug ($p = 0,033^*$) und zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,031^*$) (Tab. 23, Abb. 37).

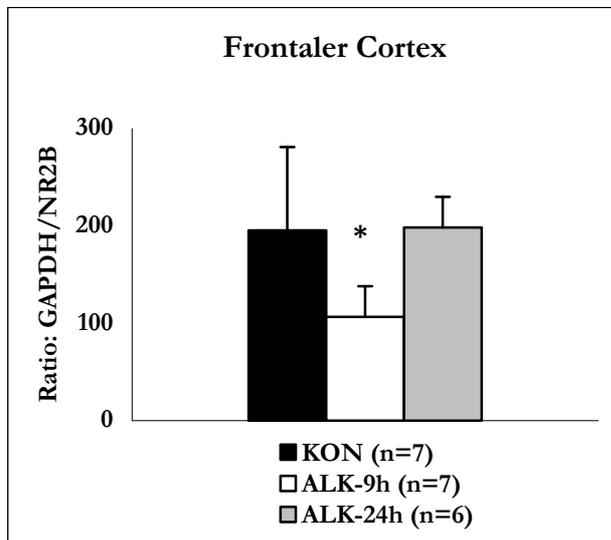


Abb. 37:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im frontalen Cortex dar.

Tab. 23:

Post-hoc Vergleich der relativen mRNA Expression von GAPDH/NR2B zwischen den Gruppen.

Gruppe	p
ALK-9h /KON	0,031*
ALK-9h /ALK-24h	0,033*
ALK-24h/KON	0,996

4.4 Relative mRNA Expression der Spleißvarianten und Unter-einheiten im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell

Tabelle 24 zeigt die Anzahl der im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell durchgeführten RNA Extraktionen, Reverser Transkriptionen (RT) und PCRs. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind für die Verumgruppe ALK (n = 5) sowie für die Kontrollgruppe KON (n = 4) entsprechend der jeweiligen Hirnregionen einzeln aufgelistet.

Tab. 24:

Anzahl der durchgeführten Versuche [RNA Extraktion; Reverser Transkription (RT) und PCR] sowie Anzahl der erhaltenen und zur Auswertung herangezogenen Einzelmessungen pro Gruppe. ALK stellt die Verumgruppe KON die Kontrollgruppe dar.

	RNA Ex-trak-tion	RT	PCR	Anzahl der Einzel-messungen NR1 +E5/-E5		Anzahl der Einzel-messungen NR2C/NR2A		Anzahl der Einzel-messungen GAPDH/NR2B	
				ALK (n = 5)	KON (n = 4)	ALK (n = 5)	KON (n = 4)	ALK (n = 5)	KON (n = 4)
Hippo-campus	A	2	2	28	23	26	21		
	B	2	2						
	C	2	2						
Striatum	A	2	2	40	29	30	22		
	B	2	3						
	C	2	3						
Cerebellum	A	2	2	33	27	26	17	11	10
	B	2	2						
	C	2	3						
Occipitaler Cortex	A	2	2	22	13	23	17		
	B	2	2						
	C	2	1						
Frontaler Cortex	A	2	2	26	22	26	20	20	15
	B	2	2						
	C	2	2						

4.4.1 Ratio NR1 +E5/-E5

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte relative mRNA Expression der Spleißvariante NR1+E5 im Striatum ($p = 0,020^*$) (Tab. 25, Abb. 38, 39). Hingegen fanden wir in den übrigen untersuchten Hirnregionen keine signifikante Veränderungen (Tab. 25).

Tab. 25:

Statistische Auswertung der relativen mRNA Expression der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 24 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Hippocampus	ALK	5	37 (6)	-0,059	7	0,954
	KON	4	38 (2)			
Striatum	ALK	5	126 (19)	3,008	7	0,020*
	KON	4	89 (18)			
Cerebellum	ALK	5	213 (13)	0,459	7	0,660
	KON	4	203 (44)			
Occipitaler Cortex	ALK	5	31 (9)	0,123	7	0,906
	KON	4	30 (16)			
Frontaler Cortex	ALK	5	87 (26)	-1,503	7	0,177
	KON	4	115 (30)			

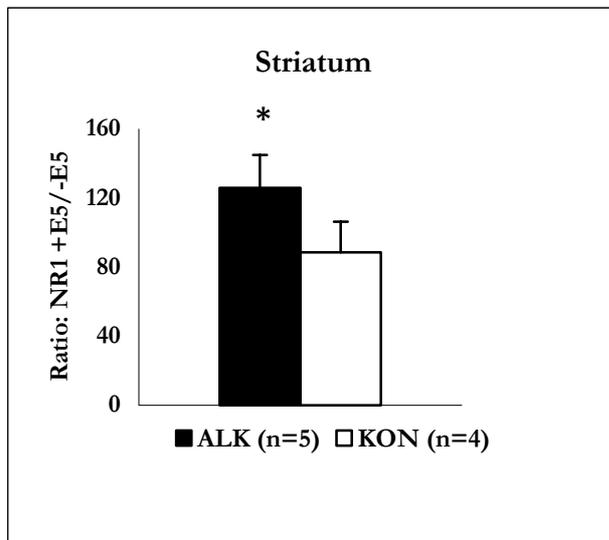


Abb. 39:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR1+E5 zu NR1-E5 im Striatum dar.

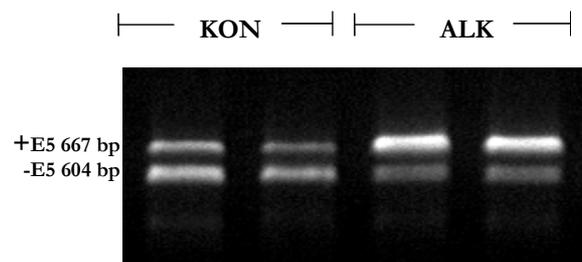


Abb. 38:

RT-PCR für NR1 +E5/-E5. Die Produkte von 604 bp (ohne Exon 5) und 667 bp (mit Exon 5) entsprechen den Spleißvarianten. Das Agarosegel zeigt die relative Expression im Striatum.

4.4.2 Ratio NR2C/NR2A

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Striatum eine signifikante relativ erhöhte NR2A mRNA Expression ($p = 0,009^*$) (Tab. 26, Abb. 40, 41). Hingegen fanden wir in den übrigen untersuchten Hirnregionen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 26).

Tab. 26:

Statistische Auswertung für die Untereinheiten NR2C/NR2A in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 24 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Hippocampus	ALK	5	99 (14)	-1,236	7	0,256
	KON	4	111 (15)			
Striatum	ALK	5	210 (30)	-3,58	7	0,009*
	KON	4	309 (53)			
Cerebellum	ALK	5	256 (66)	-1,399	7	0,205
	KON	4	305 (21)			
Occipitaler Cortex	ALK	5	184 (49)	0,195	7	0,851
	KON	4	179 (30)			
Frontaler Cortex	ALK	5	287 (74)	0,898	7	0,399
	KON	4	251 (34)			

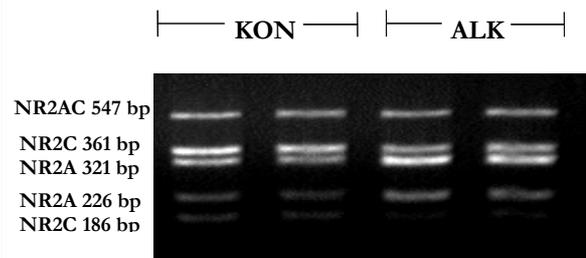
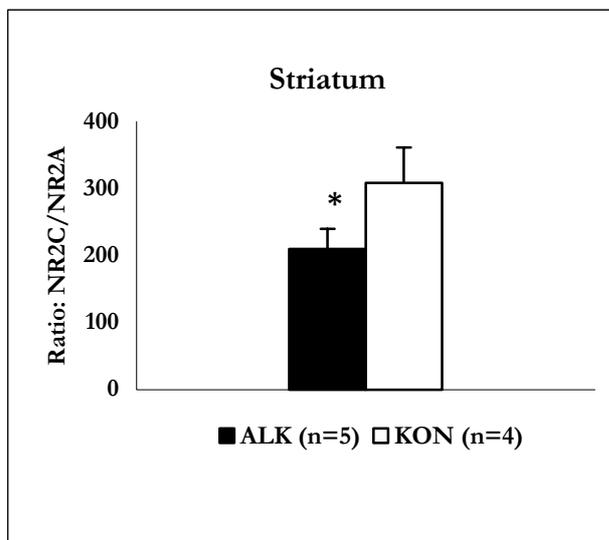


Abb. 40:

RT-PCR für NR2C/NR2A. Nach Verdau werden folgende Banden detektiert: 226 bp und 321 bp (NR2A) sowie 186 bp und 361 bp (NR2C). Das Agarosegel zeigt die relative Expression im Striatum.

Abb. 41:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von NR2C zu NR2A im Striatum dar.

4.4.3 Ratio GAPDH/NR2B

Die Untersuchungen der relativen NR2B mRNA Expression wurden nur im Cerebellum und frontalen Cortex durchgeführt.

Nach Auswertung mittels t-Test zeigte die Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Cerebellum eine tendenzielle relativ erhöhte NR2B mRNA Expression ($p = 0,098+$) (Tab. 27, Abb. 42, 43). Hingegen fanden wir im frontalen Cortex keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 27).

Tab. 27:

Statistische Auswertung für GAPDH und NR2A in den untersuchten Hirnregionen im Gruppenvergleich. In die Berechnung gingen die aggregierten Einzeldaten aus Tabelle 24 mit ein.

Hirnregion	Gruppen	N	MW (SD)	T	df	p
Cerebellum	ALK	5	583 (170)	-1,906	7	0,098+
	KON	4	992 (448)			
Frontaler Cortex	ALK	5	282 (44)	-0,756	7	0,474
	KON	4	301 (22)			

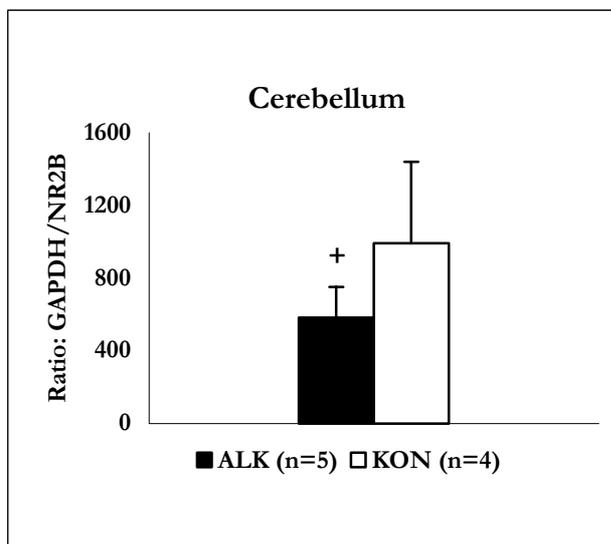


Abb. 43:

Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (\pm SD) der relativen mRNA Expression von GAPDH zu NR2B im Cerebellum dar. Das Kreuz „+“ zeigt den tendenziellen Unterschied zwischen Alkoholgruppe und Kontrollgruppe auf dem Niveau $p < 0,05$ an.

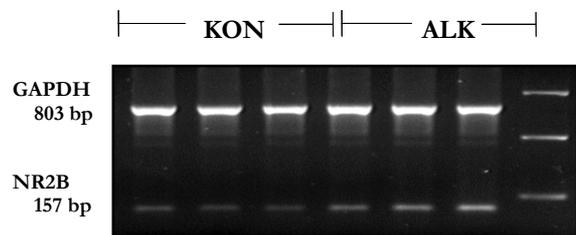


Abb. 42:

RT-PCR für GAPDH/NR2B. Die Produktlängen liegen bei 157 bp (NR2B) und 803 bp (GAPDH). Das Agarosegel zeigt die relative Expression im Cerebellum. Die 3 Banden rechts im Bild stellen den Längenstandard dar, der den Bereich von 200 bp – 1000 bp anzeigt.

5 Diskussion

5.1 Auswirkung chronisch niedrig dosierter MK-801 Applikation auf NMDA Rezeptoren

In unserem Tiermodell wurden erstmals die Auswirkungen einer zweiwöchigen chronisch niedrig dosierten MK-801 Applikation mit anschließendem 24 stündigem Entzug auf die relative mRNA Expression der Spleißvarianten NR1 +E5/-E5 und der Untereinheiten NR2A - NR2C des NMDA Rezeptors beschrieben. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass die Behandlungsdauer von zwei Wochen länger und die applizierte MK-801 Dosis von 0,02 mg/kg Körpergewicht niedriger war, als in allen anderen vergleichbaren Studien. Darüber hinaus existieren nach unserem Wissen keinerlei Daten, die von einer veränderten Expression der Spleißvarianten der NMDA Rezeptoruntereinheit NR1 mit und ohne N-terminaler Kasette berichten.

Im Folgenden werden nacheinander die Veränderungen der relativen mRNA Expression der NR1+E5 und NR1-E5 Spleißvarianten sowie die Änderungen der Untereinheiten NR2A und NR2B erläutert und mit Befunden aus der Literatur verglichen. Im Anschluss daran werden die erbrachten Befunde vor dem Hintergrund einer glutamatergen Dysfunktion interpretiert.

5.1.1 Relevanz des Tiermodells

Die Gabe psychotomimetischer Substanzen stellt das derzeit verbreitetste und am meisten akzeptierte experimentelle Psychosemodell dar.

Im Einleitungskapitel dieser Arbeit (Kapitel 1.3) wurde bereits beschrieben, dass die chronisch niedrig dosierte Gabe psychotomimetisch aktiver NMDA Rezeptorantagonisten (z.B. MK-801) in der Lage ist sowohl Positiv- als auch Negativsymptome hervorzurufen. Im Gegensatz zu anderen Psychotomimetika, induzieren sie darüberhinaus kognitive Defizite, die typischerweise bei Schizophrenie Patienten auftreten [83].

Unser verwendetes Tiermodell sollte diese Symptomatik bestmöglich simulieren. Um dies zu gewährleisten, wählten wir das Alter unserer Versuchstiere so, dass es dem Alter des pubertären Menschen entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass speziell in dieser Altersgruppe bei ca. 50% der Personen durch die Gabe von NMDA Rezeptorantagonisten psychotische Symptome hervorgerufen werden [29, 149]. Das Lebensalter scheint somit erheblichen Einfluß auf die Vulnerabilität gegenüber NMDA Rezeptorantagonisten zu haben. Weiterhin ist es wichtig, dass innerhalb der Tiergruppen keine signifikanten Altersunterschiede bestehen, da Expressionsmuster je nach Alter unterschiedlich ausgeprägt sein können.

In der vorliegenden Arbeit wurde MK-801 chronisch und in sehr niedriger Dosierung appliziert. Dies scheint die pathophysiologischen Befunde bei Schizophrenie Patienten besser beschreiben zu können als eine akute einmalige Gabe [81, 193]. Sowohl die Wahl des Psychotomimetikums (MK-801), als auch die Applikationsform (chronisch niedrigdosiert) entsprechen somit dem aktuell wohl wichtigsten und meist akzeptierten experimentellen Psychosemodell.

5.1.2 mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im pharmakologischen Psychosemodell

5.1.2.1 Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten

Auswirkungen von chronisch niedrig dosiertem MK-801 auf die NR1 +E5/-E5 Spleißvarianten zeigten sich im Hippocampus und Striatum behandelter Tiere. Dort war die relative mRNA Expression zugunsten der Exon 5 Einschlussvariante verschoben.

Die N-terminale Insertion beeinflusst die pharmakologischen Eigenschaften in sofern, als dadurch die Bindungsaffinität für Antagonisten erhöht wird [41, 72, 135]. Die erhöhte Bindungsneigung von MK-801 an NR1+E5 im Vergleich zu NR1-E5 [152] könnte dazu führen, dass gerade diese Spleißvariante durch chronische MK-801 Gabe gehemmt und kompensatorisch verstärkt exprimiert wird. Desweiteren scheint die NR1+E5 Spleißvariante siebenfach stärker von der Proteinkinase C (PKC) potenziert zu werden als die NR1-E5 Spleißvariante [41]. Ebenso sind die durch *patch-clamp* Methodik gemessenen Rezeptor-vermittelten Strömungsamplituden bei der NR1+E5 Spleißvariante dreifach größer als bei der NR1-E5 Variante [195, 197]. Beides weist darauf hin, dass die NR1+E5 Isoform die aktivere Form darstellt. Hieraus könnte man folgern, dass die Rezeptoren mit der NR1+E5 Variante aus zwei verschiedenen Gründen verstärkt exprimiert werden. Zum einen wird die NR1+E5 Variante aufgrund ihrer stärkeren Affinität zu MK-801 stärker blockiert, zum anderen stellt sie die aktivere Spleißvariante dar [41, 72, 135].

Bisher veröffentlichte tierexperimentelle Studien berichten lediglich von einer gesteigerten mRNA Expression der gesamten NR1 Untereinheit. So konnten Oh et al. dies nach chronischer MK-801 Applikation im Hippocampus, Striatum und Cortex von Ratten feststellen [138]. Larson et al. wiesen eine Erhöhung im Hippocampus sowohl nach akuter als auch nach chronischer Applikation von MK-801 nach [95].

Gleiche signifikante Veränderungen zeigten sich nach chronischer Gabe des NMDA Rezeptorantagonisten PCP in Bereichen des Vorderhirns, frontalen Cortex und Striatums von Ratten [183]. Arvanov et al. zeigten, dass Ratten nach chronischer Vorbehandlung mit PCP im Vergleich zu unbehandelten Tieren sensitiver auf eine exogene Gabe von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) reagierten [9]. Dies legt die Vermutung nahe, dass zum einen die NR1 Untereinheit

wiederum kompensatorisch verstärkt exprimiert wird, zum anderen die Rezeptorantwort durch erhöhte Sensivität des Rezeptors verstärkt wird. Beides wirkt einer Rezeptorblockade entgegen. Auch im Gehirn von Schizophrenie Patienten könnte ein verändertes Expressionsmuster der NMDA Rezeptoren zu einer Steigerung der NMDA Rezeptorfunktion führen, um eine Blockade der NMDA Rezeptoren kompensatorisch auszugleichen. Dies berichtet z. B. eine Studie, in der die Expression der NR1 Untereinheit im präfrontalen Cortex von Schizophrenie Patienten untersucht wurde. Es konnte hier eine erhöhte mRNA Expression der NR1 Untereinheit gemessen werden [118].

5.1.2.2 Relative mRNA Expression der NR2 Untereinheiten

5.1.2.2.1 Ratio GAPDH/NR2B

Die NR2B Untereinheit zeigte eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA Expression im Hippocampus und frontalen Cortex.

Auch eine verstärkte Expression der NR2B Untereinheit könnte, ähnlich der NR1+E5 Spleißvariante, zu einer gesteigerten NMDA Rezeptorfunktion führen. Glutamat besitzt eine höhere Bindungsaffinität zum NR1/NR2B Rezeptorkomplex verglichen mit NR1/NR2A Rezeptorkomplex. Durch das länger anhaltende Aktivierungsintervall des NR1/NR2B Komplexes resultieren länger anhaltende exzitatorische postsynaptische Potentiale [15, 30, 127, 131, 181], die zu einer gesteigerten Rezeptorfunktion führen könnten.

Auf der Suche nach Veränderungen der mRNA Expression von NR2B ließ sich in der Literatur folgender Befund finden, der mit unserem kongruent ist. Nach chronischer MK-801 Behandlung konnten Oh et al. im Cortex und im Striatum von Rattenhirnen eine erhöhte mRNA Expression der NR2B Untereinheit feststellen [138].

5.1.2.2.2 Ratio NR2C/NR2A

Nach chronisch niedrig dosierter MK-801 Behandlung zeigte sich die relative mRNA Expression der NR2A Untereinheit im Verhältnis zur NR2C Untereinheit im Hippocampus, occipitalen und frontalen Cortex signifikant erniedrigt.

Dies bestätigt die Beobachtung von Oh et al., die nach chronischer MK-801 Behandlung eine Erniedrigung der NR2A mRNA Expression im Hippocampus von Ratten feststellten [138]. Bemerkenswert ist, dass hier zum einen durch die siebentägige Behandlungsdauer von einer chronischen Applikation ausgegangen werden kann, zum anderen kann die gewählte Dosis von 1pmol/ μ l pro Stunde als „niedrig dosiert“ eingeschätzt werden. Daher konnten wir diese Daten zum direkten Vergleich unserer Ergebnisse heranziehen. Beide Studien stimmten sowohl

bezüglich der erniedrigten mRNA Expression der NR2A Untereinheit als auch der bereits erwähnten erhöhten mRNA Expression der NR2B Untereinheit überein.

5.1.3 Relevanz der Ergebnisse für das Psychosemodell

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, mittels chronisch niedrig dosierter Gabe eines NMDA Rezeptorantagonisten eine glutamaterge Dysfunktion im Gehirn der Ratte zu erzeugen. Die festgestellten Veränderungen gingen mit einer veränderten NMDA Rezeptorexpression einher. Diese werden nun im Zusammenhang mit dem Pathomechanismus einer glutamatergen Dysfunktion erläutert. Hierbei konnten wir die Hypothese einer veränderten NMDA Expression bestätigen.

Unser pharmakologisches Psychosemodell versucht die Wirkung einer chronischen Langzeit-Applikation des NMDA Rezeptorantagonisten MK-801 auf das glutamaterge System zu veranschaulichen.

An der postsynaptischen Membran könnte eine MK-801 induzierte Blockade eine Gegenregulation des NMDA Rezeptors hervorrufen, um einer verminderten Signalweiterleitung entgegenzuwirken. Diese könnte sich dabei zum einen in einer kompensatorischen Überexpression von NMDA Rezeptoren, zum anderen in einer veränderten Zusammensetzung des Rezeptors widerspiegeln. Daraus könnte insgesamt eine kompensatorische Funktionszunahme des NMDA Rezeptors resultieren. Diese Hypothese wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

5.1.4 Befunde zur Bestätigung dieses Modells

Die kompensatorische Funktionszunahme konnten wir mit unseren Ergebnissen insofern bestätigen, als wir nach chronischer MK-801 Gabe eine Veränderung im Expressionsmuster des NMDA Rezeptors nachweisen konnten. Eine erhöhte Expression der Exon 5 Einschlussvariante, die nach Literaturbefunden die aktivere der beiden Spleißvarianten zu sein scheint, könnte zu einer kompensatorischen Funktionszunahme des Rezeptors führen. Es gibt Hinweise, dass das Vorhandensein von NR1+E5 im Gegensatz zu NR1-E5 die NMDA Rezeptorantworten durch Aktivierung eines Agonisten (z. B. Glutamat) erhöhen kann [195, 197]. Desweiteren könnte auch die kompensatorisch gesteigerte Expression von NR2B zu einer Funktionszunahme des Rezeptors führen, um der antagonistischen Wirkung von MK-801 entgegenzuwirken.

Die Hauptergebnisse bei unseren Untersuchungen zeigen, dass eine chronisch niedrig dosierte Behandlung mit MK-801 eine veränderte NMDA Rezeptorexpression zur Folge hat. Dabei

konnten wir im Hippocampus die meisten Veränderungen finden. Dies könnte daraus resultieren, dass dieser eine hohe Dichte an NMDA Rezeptoren sowie eine hohe Affinität [121] und Sensitivität [79, 60] gegenüber MK-801 aufweist. Zusätzlich zeigten sich im Striatum, im occipitalen und frontalen Cortex Unterschiede im Vergleich zwischen MK-801 behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollen.

Die von uns festgestellten veränderten Expressionsmuster des NMDA Rezeptorkomplex könnten dabei in die Hypothese einer glutamatergen Dysfunktion mit eingebunden werden.

5.2 NMDA Rezeptoren und Entstehung von Alkoholsuchtverhalten

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von akutem und chronischem Alkoholkonsum auf die relative mRNA Expression von NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors in zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht.

Wir stellten dabei die Hypothese auf, dass kurzfristig forcierte und langfristig freiwillige Alkoholapplikation eine differentielle Regulation verschiedener NMDA Rezeptor Untereinheiten und Spleißvarianten zur Folge haben könnte.

Lange Zeit hielt man nur an der Hypothese einer verstärkten NMDA Rezeptorexpression nach Alkoholbehandlung fest, ohne eine mögliche Veränderung der Rezeptorzusammensetzung in Erwägung zu ziehen. Neuerdings wird zunehmend diskutiert, dass eine veränderte NMDA Rezeptorkomposition mit der Alkoholsuchtentwicklung und den auftretenden Alkoholentzugssymptomen zusammenhängt [176, 192].

5.2.1 Tiermodelle zum Beschreiben vom Suchtverhalten beim Menschen

Da jedes Verhalten von genetischen und umweltbedingten Faktoren beeinflusst wird, sind entsprechende Tiermodelle zur Analyse der verschiedenen Facetten der Alkoholabhängigkeit hilfreich. Die Entwicklung von speziell gezüchteten Tierstämmen haben insbesondere dem Studium der Toleranz und Abhängigkeit sowie der Häufigkeit von Rückfällen hinsichtlich neurobiologischer und molekularbiologischer Veränderungen einen großen Aufschwung verliehen. Bisher wurde kein Tiermodell entwickelt, in dem alle Aspekte des Alkoholismus dargestellt werden konnten. Verschiedene Tiermodelle können jedoch einzelne Aspekte der Alkoholsucht abbilden. In der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei Tiermodelle mit unterschiedlicher Alkoholbehandlung verwendet, um verschiedene Aspekte des Alkoholismus zu untersuchen. Dabei wurde zwischen kurzfristig forciertem und langfristig freiwilligem Alkoholkonsum differenziert.

5.2.2 mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im Tiermodell der forcierten Ethanolintoxikation

Im ersten Tiermodell wurde nach der Methode von Majchrowicz [110] Versuchstieren fünf Tage lang forciert Ethanol verabreicht. Die Methode der forcierten Ethanolapplikation ist zur Erzielung dauerhafter Intoxikation, hoher Blutalkoholwerte sowie zur Untersuchung von Toleranzentwicklung und Entzugerscheinungen geeignet.

Die Verumgruppen in diesem Tiermodell zeigten im Vergleich zu Kontrollen eine signifikant veränderte relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten sowie der NR2A und NR2B Untereinheiten.

Die relative mRNA Expression der Spleißvariante mit Exon 5 und die relative mRNA Expression von NR2A waren im Hippocampus und occipitalen Cortex der ethanolbehandelten Tiere nach 9 h Deprivation signifikant erhöht. Weiterhin konnten wir bei den ethanolbehandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen nach 9 h Deprivation eine Erhöhung der relativen NR2B mRNA Expression in allen Hirnregionen beobachten. Mit Ausnahme des Hippocampus hat sich diese nach 24 h Deprivation in allen Hirnregionen wieder normalisiert. Im Hippocampus persistierte die erhöhte NR2B Expression, was darauf hindeutet, dass sich diese dort langsamer normalisiert.

5.2.2.1 Relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten

Nach forcierter Ethanolbehandlung und 9 h Entzug zeigte sich im Hippocampus und im occipitalen Cortex, verglichen mit Kontrollen, eine signifikante relative Erhöhung der NR1 Exon 5 Einschlussvariante, die sich nach 24 h Deprivation wieder normalisierte. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer früheren Untersuchung. Putzke konnte in seiner Dissertation an einem Ethanolintoxikationsmodell mit Ratten, die zwei bzw. sechs Wochen lang ausschließlich Ethanol verabreicht bekamen, nach anschließendem Entzug eine erhöhte NR1+E5 mRNA Expression im Hippocampus und Cerebellum nachweisen [146].

Bemerkenswert ist die Parallele zwischen der Regulation der NR1+E5 mRNA Expression und dem zeitlichen Verlauf der Entzugssymptome. Dies führt zu der Vermutung, dass die auftretenden Entzugssymptome, die man bei ethanolbehandelten Tieren beobachten konnte, mit den Expressionsveränderungen der NR1+E5 Spleißvariante zusammenhängen. Diese Annahme stützt sich zum einen auf Literaturbefunde, in denen beschrieben wird, dass das Vorhandensein von NR1+E5 im Gegensatz zu NR1-E5 die NMDA Rezeptorantworten durch Aktivierung eines Agonisten (z. B. Glutamat) erhöhen kann [195, 197]. Zum anderen wurde in Tiermodellen for-

cierter Ethanolapplikation beobachtet, dass während der Deprivationsphase Entzugssymptome 6 – 10 h nach Entzug kulminierten und nach 48 h vollständig verschwanden [62, 77, 150]. Eine Normalisierung der NR1+E5 mRNA Expression während der Deprivationsphase könnte somit an der abnehmenden Erregbarkeit und Hyperreaktivität der Tiere im fortschreitenden Entzug beteiligt sein.

5.2.2.2 Relative mRNA Expression der NR2 Untereinheiten

5.2.2.2.1 Ratio NR2C/NR2A

Nach forcierter Ethanolbehandlung und 9 h Entzug zeigte sich die relative NR2A mRNA Expression (im Verhältnis zu NR2C) im Hippocampus und occipitalen Cortex, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant erhöht. Diese Veränderungen normalisierten sich nach 24 h Entzug. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit Vorbefunden. Follesa und Ticku konnten in einem Tiermodell forcierter Ethanolintoxikation im Hippocampus und Cortex ethanolbehandelter Ratten nach 9 h Deprivation erhöhte NR2A mRNA Expressionen beobachten. Diese Veränderungen waren nach 48 h nicht mehr nachweisbar, auch wurden zu diesem Zeitpunkt bei den Versuchstieren keine Intoxikationssymptome mehr beobachtet [48]. Wir führten unsere Versuche in Anlehnung an das Modell von Follesa und Ticku durch und konnten mit unserer Methodik diese Ergebnisse reproduzieren. Weiterhin beschreiben die Arbeitsgruppen Snell [165] und Kalluri [83] eine veränderte NR2A Rezeptorexpression im Hippocampus und Cerebellum von Mäusen [165] und Ratten [83] nach forcierter Ethanolintoxikation und anschließender Ethanoldeprivation.

Die Zusammenschau dieser Literaturbefunde und unserer Ergebnisse zeigt, dass nach forcierter Alkoholeinnahme die NR2A mRNA Expression während des anschließenden Entzugs gesteigert ist.

5.2.2.2.2 Ratio GAPDH/NR2B

Die relativen mRNA Expression der NR2B Untereinheit zeigte im Tierexperiment der forcierten Ethanolintoxikation die ausgeprägtesten Veränderungen. Diese war nach 9 h Deprivation im Vergleich zur Kontrollgruppe im Hippocampus, Cerebellum, sowie im occipitalen und frontalen Cortex erhöht. Im Hippocampus und Striatum der ethanolbehandelten Tiere wurde die numerisch relativ erhöhte mRNA Expression der NR2B Untereinheit nach 9 h Deprivation im Vergleich zu Kontrollen am ehesten aufgrund zu großer Standardabweichung nicht signifikant.

Mit Ausnahme des occipitalen Cortex konnten wir nach 9 h und 24 h Entzug in allen Hirnregionen signifikante Veränderungen zwischen den Verumgruppen beobachten.

Dort zeigte sich 9 h nach Alkoholentzug im Striatum, Cerebellum und im frontalen Cortex eine signifikant erhöhte relative NR2B mRNA Expression. Dies deutet darauf hin, dass sich die erhöhte NR2B mRNA Expression in einem zeitlichen Rahmen von 9 - 24 h wieder normalisiert. Die erniedrigte NR2B mRNA Expression, die wir in Cerebellum und Striatum nach 24 h Alkoholentzug im Vergleich zu 9 h Entzug und Kontrollen beobachteten, könnte auf einer kompensatorischen Gegenregulation dieser Untereinheit beruhen.

Hervorzuheben ist, dass sich 24 h nach Entzug im Hippocampus ethanolbehandelter Tiere noch immer eine signifikant erhöhte relative NR2B mRNA Expression zeigte. Diese war sowohl im Vergleich zu Kontrolltieren, als auch zu den Tieren mit 9 h Alkoholentzug signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass sich im Hippocampus die NR2B mRNA Expression im Vergleich zu den anderen Hirnregionen langsamer normalisiert. Diese Beobachtung wird durch Befunde aus der Literatur gestützt. So wurden anhaltende Veränderungen im Hippocampus bis zu 24h nach Deprivation beschrieben [48, 146].

Insgesamt scheint die NR2B Untereinheit im Vergleich zu den anderen untersuchten NR2 Untereinheiten am stärksten von den Effekten forcierter Ethanolintoxikation beeinflusst zu werden. Zahlreiche Studien erbrachten Hinweise, dass vor allem die NR2B Untereinheit beim Entstehen von Entzugssymptomen, die während der Deprivationsphase beobachtet werden, eine Rolle zu spielen scheint [96, 107, 131, 136, 187, 194]. Durch die Gabe des NMDA Rezeptorantagonisten Ifenprodil, welcher eine hohe Selektivität für NR1/NR2B aufweist [195] konnten Entzugssymptome unterdrückt werden [136, 187]. Ausserdem scheint die im Entzug auftretende Hyperexzitation des glutamatergen Erregungsstroms mit einer erhöhten NR2B Expression assoziiert zu sein [187, 131, 96]. Die dadurch erhöhte postsynaptische Neurotransmission könnte dabei mit dem Entstehen einer Entzugssymptomatik in Zusammenhang stehen.

5.2.2.3 Weitere Befunde

Im Hippocampus ethanolbehandelter Tiere zeigten nicht nur die NR2B, sondern auch die NR2A Untereinheit sowie die NR1 Exon 5 Einschlussvariante maßgebliche Veränderungen in ihrer relativen mRNA Expression. Die Regulation der mRNA der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors scheint dabei in einem zeitlich eingegrenzten Fenster stattzufinden.

Es ist anzunehmen, dass die verstärkte Expression der Spleißvarianten und Untereinheiten, eine kompensatorische Gegenregulation zur Ethanolinhibition darstellt. Dies könnte zu einer gesteigerten NMDA Rezeptorfunktion führen, um dem inhibitorischen Ethanoleffekt entgegen zu wirken. Dabei könnte sich infolge gesteigerter NMDA Rezeptorfunktion ein erhöhter

Einstrom von Calciumionen zum einen neurotoxisch auf Zellen auswirken [21, 35, 184] und zum anderen mit cerebralen Krampfanfällen im Alkoholentzug zusammenhängen [22, 176].

Aufgrund der forcierten Ethanolintoxikation sind die bei dieser Untersuchung beobachteten Veränderungen bezüglich einer veränderten NMDA Rezeptorexpression möglicherweise nicht nur auf Ethanoleffekte zurückzuführen. Es muss beachtet werden, dass die Tiere einer extremen Stressbehandlung unterlagen. Während der fünftägigen Ethanolintoxikation verloren die Tiere stark an Körpergewicht und litten unter Entzugssymptomen wie Hyperreaktivität, Zittern und Unruhe. Diese wurde bereits von Majchrowicz [110] und Sanna et al. [156] beschrieben. Es ist anzunehmen, dass Stress eine zusätzliche Rolle spielt, da allein dieser die NMDA mRNA Expression in Hippocampus und Hypothalamus verändern kann [11].

5.2.3 Relevanz des 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodells

Das zweite Tiermodell basiert auf freiwilliger Langzeit-Alkoholapplikation und scheint entscheidende Aspekte der Alkoholsucht darstellen zu können [189]. Es besteht Konsens darüber, dass Tiermodelle chronisch freiwilliger Substanzenanwendung wesentlich relevanter für die Untersuchung der zur Abhängigkeit führenden Faktoren sind als Modelle forcierter Ethanolapplikation, da sie die Freiwilligkeit und die Langfristigkeit des Substanzkonsums beinhalten [8]. Für Alkohol ist die Form der oralen Selbstapplikation zu bevorzugen, da dies am ehesten der Humansituation entspricht. Freiwillig bedeutet in der Regel, dass die Tiere die Wahl zwischen einer Alkohollösung und einer nichtalkoholischen Flüssigkeit (Wasser) haben. Obwohl forcierte Ethanolgabe zu Toleranz und physischer Abhängigkeit führen kann, scheint es unwahrscheinlich, dass Alkoholsuchtverhalten aus forcierter Ethanolapplikation resultiert [80], da sich dies u. a. eher aversiv auf das Trinkverhalten auswirkt [189]. Für die Suchtentstehung ist demnach entscheidend, dass die Tiere freiwillig Alkohol trinken [38]. Weder die insgesamt konsumierte Menge noch die Entstehung einer körperlichen Abhängigkeit scheinen diesbezüglich im Vordergrund zu stehen [38].

Dieses Modell wurde von Herrn Prof. Dr. Rainer Spanagel und Frau Dr. Sabine M. Höller am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München etabliert. Dabei hatten die Tiere freie Auswahl zwischen 5, 10, 20% igen Alkohollösungen und Wasser. Es wurden regelmäßig mehrere Tage andauernde Alkoholentzugsphasen durchgeführt [69, 70, 167, 168]. Dies erfolgte aufgrund der Vorstellung, dass durch die negative Erfahrung der Alkoholabstinenz Rückfalltrinken ausgelöst und anschließendes Trinkverhalten verstärkt werden kann [89]. Sowohl präklinische als auch klinische Befunde legen nahe, dass die Entzugssymptomatik durch wiederholte Entzugserfahrung intensiviert wird [12]. Das wiederholte Auftreten neuronaler Übererregbarkeit im Alkoholentzug

könnte einer weiteren Hypothese nach zu bleibenden neuronalen Veränderungen führen („limbic kindling“). Diese könnten dann spontane oder durch alkoholassoziierte Reize ausgelöste neuronale „Entladungen“ zur Folge haben. Dies könnte subjektiv als „Craving“ (siehe auch 1.4.5) oder Angst empfunden werden und an der Entstehung eines Rückfalls beteiligt sein [2, 20]. Die Gegenwart von Alkohollösungen nach einer Alkoholdeprivationsphase ruft ein erhöhtes Alkoholverlangen hervor, welches als Deprivationseffekt bezeichnet wird [161]. Da „Craving“ laut Berichten von Alkoholikern während der Abstinenz ansteigt und zu Beginn wiedereinsetzenden Alkoholkonsums sogar noch gesteigert sein kann, wurde der Alkoholdeprivationseffekt als geeignetes Modell für einen Rückfall beschrieben und als ein Maß für „Craving“ nach Alkohol vorgeschlagen [162, 68].

5.2.4 mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell

Die Untersuchungen im 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodell zeigten in der Verumgruppe im Vergleich zu Kontrollen eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA Expression der NR1 Exon 5 Einschlussvariante und der NR2A Untereinheit im Striatum. Im Cerebellum konnten wir eine tendentielle Erhöhung der relativen NR2B mRNA Expression der alkoholtrinkenden Tiere im Vergleich zu Alkoholnaiven feststellen.

Die beobachteten Veränderungen nach Langzeit- Alkoholeinnahme scheinen hirnregionsspezifisch aufzutreten. Diese zeigten sich ausschliesslich im Striatum (signifikant erhöhte relative mRNA Expression der NR2A Untereinheit und der Spleißvariante NR1+E5) und Cerebellum (tendentiell erhöhte Expression der NR2B Untereinheit) ethanolbehandelter Tiere.

Auch Darstein et al. [31] konnten im Striatum unter Verwendung eines ähnlichen 4-Flaschen-Langzeit-Alkoholmodells eine Veränderung des NMDA Rezeptors feststellen. Diese ging mit einer erhöhten Rezeptoraktivität einher und wurde anhand der NMDA-induzierten Freisetzung von [³H]-Acetylcholin in Schnitten des Striatums gemessen [31].

Ein weiterer Befund stammt aus der Dissertation von Putzke [146], der ein vergleichbares 4-Flaschen-Modell untersucht hat. In diesem konsumierten Tiere acht Monate lang (in unserem Modell zwei Jahre) mit wiederholten Deprivationsphasen freiwillig Alkohol. Danach erfolgte ein Entzug bis zu 72 h (in unserem Tiermodell 24 h). Im Hippocampus der alkoholtrinkenden Tiere zeigte sich dabei im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eine signifikant erhöhte mRNA Expression der Spleißvariante NR1+E5, die bis zu 72 h nach Entzug nachweisbar war.

Adinoff et al. vermuten, dass durch wiederholtes Auftreten neuronaler Übererregung im Alkoholentzug bleibende neuronale Veränderungen entstehen, welche wiederum zu neuronalen „Entladungen“ führen können, die durch spontane oder alkoholassoziierte Reize ausgelöst werden [2]. Diese Entladungen könnten subjektiv als „Craving“ oder Angst empfunden werden und an der Entstehung eines Rückfalls beteiligt sein [161] (siehe auch 1.4.5 und 5.2.4).

Man könnte nun postulieren, dass Parallelen zwischen diesen Entladungen und der von uns beobachteten verstärkten Expression der NR1+E5 Spleißvariante bestehen. Diese Annahme stützt sich auf bereits erwähnte Literaturbefunde, in denen beschrieben wird, dass das Vorhandensein von NR1+E5 die NMDA Rezeptorantwort durch Aktivierung eines Agonisten (z. B. Glutamat) erhöhen kann [195, 197]. Eine Normalisierung der NR1+E5 mRNA Expression während der Deprivationsphase könnte somit an der abnehmenden Erregbarkeit der Tiere im fortschreitenden Entzug erklärt werden.

Nur wenige tierexperimentelle Studien berichten von möglichen Veränderungen der relativen mRNA Expression von NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors nach freiwilligem Langzeit-Alkoholkonsum. Wir haben diese möglichen Veränderungen unseres Wissens nach zum ersten Mal in einem Tiermodell untersucht, in dem Ratten zwei Jahre, nahezu ihr ganzes Leben, freiwillig Alkohol tranken.

Insgesamt konnten wir in diesem Experiment zweijähriger freiwilliger Alkoholeinnahme und anschließendem Entzug von 24 Stunden hinsichtlich der relativen mRNA Expression von NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors viel weniger Veränderungen feststellen, als im Modell der forcierten Ethanolintoxikation. Im letzteren konnten wir zeigen, dass Ethanol, forciert appliziert, die NMDA Rezeptorexpression relativ stark beeinflusst. Dies wird durch Untersuchungen mehrerer Studien gestützt [48, 63, 76, 136, 146].

In unserem erstmals angewandten naturalistischen Tiermodell konnten verschiedene Facetten der Alkoholabhängigkeit widerspiegelt werden. Somit scheint dieses Tiermodell in der Lage zu sein, entscheidende Aspekte der Alkoholabhängigkeit beim Menschen nachzuahmen. Hierbei ist nicht auszuschliessen, dass die Langzeit-Effekte von Ethanol nach chronischem Alkoholkonsum besonders das Striatum beeinflussen.

Zusammenfassend können die Ergebnisse aus beiden Tiermodellen zeigen, dass die relative mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten mit und ohne Exon 5 Einschluss und der NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors nach kurzfristig forcierter und langfristig freiwilliger Alkoholapplikation während der Alkoholdeprivationsphase unterschiedlich reguliert werden.

Das Expressionsmuster des NMDA Rezeptors zeigt sich je nach Hirnregion unterschiedlich verändert, wobei die veränderte Rezeptorkomposition ein Indiz für eine gesteigerte Rezeptorfunktion im Entzug darstellen und eine entscheidende Rolle in der Alkoholsuchtentwicklung wie Abhängigkeit und Toleranz spielen könnte.

6 Zusammenfassung

Dem momentanen Forschungsstand nach scheint gesichert, dass der NMDA Rezeptor an der Entwicklung von Psychosen und Alkoholsucht beteiligt ist. Deshalb hat er in diesem Zusammenhang in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Im ersten Teil der Arbeit untersuchten wir den Einfluß des NMDA Rezeptorantagonisten MK-801 auf das glutamaterge Transmittersystem. Niedrig dosierte chronische Behandlung mit MK-801 kann sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen schizophrenieähnliche Symptome hervorrufen. Dabei gleichen diese nach chronisch niedrig dosierter Gabe eher den charakteristischen Merkmalen einer Schizophrenie.

Unsere Ergebnisse veranschaulichen, dass chronische MK-801 Behandlung Einfluss auf die mRNA Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen hat. Dabei zeigten sich die NR1+E5 Einschlussvariante und die Untereinheiten NR2A und NR2B in ihrer Expression verändert. Dies könnte in einer veränderten Zusammensetzung des NMDA Rezeptors resultieren, welche aufgrund der inhibitorischen Wirkung von MK-801, zu einer kompensatorischen Rezeptor Funktionssteigerung führen könnte.

Verschiedene Studien implizieren den NMDA Rezeptorkomplex in der Entwicklung von physischer Abhängigkeit und von Entzugsyndromen. Während akute Ethanolapplikation die NMDA Rezeptorfunktion zu inhibieren scheint, verändern chronische Ethanolexposition und anschließender Entzug die NMDA Rezeptoraktivität. Wir stellten die Hypothese auf, dass dies nicht nur durch eine Erhöhung der NMDA Rezeptordichte, sondern auch durch die differentielle Regulation verschiedener NMDA Rezeptor Untereinheiten und Spleißvarianten erfolgt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit, untersuchten wir anhand zweier verschiedener Tiermodelle mögliche Effekte von Ethanol auf die Expression der NR1 Spleißvarianten und NR2 Untereinheiten des NMDA Rezeptors. Die untersuchten Tiermodelle unterschieden sich hinsichtlich der Ethanolexposition. Im ersten Tiermodell wurde forciert über einen Zeitraum von fünf Tagen Alkohol appliziert, im zweiten dagegen erfolgte der Alkoholkonsum freiwillig über zwei Jahre mit wiederholten Deprivationsphasen.

In den Verumgruppen beider Tiermodelle konnten wir Expressionsveränderungen sowohl der NR1 +E5/-E5 Spleißvarianten als auch der NR2A und NR2B Untereinheiten feststellen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Ethanolexposition die lokale und zeitliche Regulation der Genexpression unterschiedlich beeinflussen kann. Möglicherweise haben diese

Veränderungen eine Bedeutung für die Entstehung von Toleranz, Suchtverhalten und Abhängigkeit. Auch ist ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Entzugssymptomen während der Deprivation möglich.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl die Applikation von MK-801 als auch von Ethanol eine hirnregionsspezifische Änderung in der NMDA Rezeptorexpression hervorruft. Beide Substanzen blockieren den NMDA Rezeptor, jedoch unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsstelle. MK-801 inhibiert als nicht-kompetitiver NMDA Rezeptorantagonist den Ionenkanal, während Ethanol vermutlich an einer extrazellulären Domäne des Rezeptors bindet [184]. Wir gehen davon aus, dass diese Veränderungen im Zusammenhang mit der Entwicklung von Psychosen und Alkoholsucht stehen könnten.

7 Abkürzungs- und Fachbegriffsverzeichnis

A	Adenosin
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazol
ATP	Adenosintriphosphat
Blot	Transfer
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
c[RNA]	Konzentration der Ribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxy-Ende
dATP	desoxy Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy Guanintriphosphat
dTTP	desoxy Tymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM- IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association
DTT	Dithiothreitol
+E5	N-terminaler Kasseteneinschluss
-E5	N-terminaler Kassettenausschluss
EAA	Exzitatorische Aminosäure
EC₅₀	Pharmakologische Konzentration, bei der 50% der maximalen Wirkung auftritt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPSP	Exzitatorische postsynaptische Potentiale
G	Guanin
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	Gamma-Amino-Buttersäure-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyddehydrogenase

GluR	Ionotroper Glutamatrezeptor
G-Protein	Guanin-Nukleotid Bindungsprotein
h	Stunde
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
5-HT₂-Rezeptor	Serotonin Rezeptortyp
i.p.	intraparenteral
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
KA	Kainat
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
M	Molar
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
MK-801	Dizolcipin, ((+)-5-Methyl-10, 11-Dihydro-5H- Dibenzo (a,d) Cyclohepten-5, 10-Imin)
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
N-Terminus	Amino- Ende
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NAAG	N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat
NAALADase	N-Acetyl-Alpha-linked-Acidic-Dipeptidase
(NH₄)₂SO₄	Ammoniumsulfat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR1	NMDA Rezeptoruntereinheit 1
NR1 +E5/-E5	Spleißvarianten der NR1 Untereinheit mit und ohne Exon 5 Einschluss
NR2A – NR2D	NMDA Rezeptoruntereinheiten NR2A–NR2D
p	Signifikanz, p-Wert
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PFC	Präfrontaler Cortex
RLT-Puffer	RNA Lysis Tissue (Guadinium-Isothiocyanat haltiger Puffer)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
RW-Puffer	RNA Wash
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Second messenger	Intrazelluläre Botenstoffe
Superscript™	RNase H Reverse Transkriptase
T	Anteile
T	Thymin
Taq	Thermostabile Polymerase
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA Puffer
TM	transmembran
UV	Ultraviolett
VTA	Ventraler tegmentaler Bereich/ Area ventralis tegmentalis
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

- 1 Aamont S.M., Constantine-Paton M.: *Advances in Neurology* 1999, (79): 133–44
The role of neuronal activity in synaptic development and its implications for adult brain function
- 2 Adinoff B., O'Neill H.K., Ballenger J.C.:
The American Journal on Addictions 1995,(4): 5–17
Alcohol withdrawal and limbic kindling
- 3 Akazawa C., Shigemoto R., Bessho Y., Nakanishi S., Mizuno N.:
J Comp Neurol 1994, (347), 1: 150–60
Differential expression of NMDAR2 receptor mRNA in the cerebellum of developing and adult rats
- 4 Akbarian S.: *Journal of Neuroscience* 1996, 16 (1): 19–30
Selective Alterations in Gene Expression for NMDA receptor subunits in pfc of schizophrenics
- 5 Allen R.M., Young S.J.: *Am J Psychiatry* 1978, (9): 1081–4
Phencyclidine-induced psychosis
- 6 Allgaier C., Scheibler P. Mueller D., Feuerstein T.J., Illes P.:
Br J Pharmacol 1999, 126 (1): 121–30
NMDA receptor characterization and subunit expression in rat cultured mesencephalic neurones
- 7 Allgaier C.: *Neurochem Int* 2002, (41), 6: 377
Ethanol sensitivity of NMDA receptors
- 8 Altmann J., Everitt B.J., Glautier S., Markou A., Nutt D., Oretti R., Phillips G.D.,
Robbins T.W.: *Psychopharmacology* 1996, (125): 285–345
The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate
- 9 Arvanov V.L., Wang R.Y.: *J Pharmacol Exp Ther* 1999, (2): 1000–6
*Clozapine, but not haloperidol, prevents the functional hyperactivity of N-Methyl-D-Aspartate
receptors in rat cortical neurons induced by subchronic administration of phencyclidine*
- 10 Audinat E., Lambolez B., Rossier J., Crépel F.:
European Journal of Neuroscience 1994, (6): 1792–1800
Activity-dependent regulation of NMDA receptor subunit expression in rat cerebellar granule cells
- 11 Bartanusz V., Aubry J.M., Steimer T., Baffi J., Kiss J.Z.:
Neuroscience 1995, 66 (2): 247–52
*Stress-induced changes in messenger RNA levels of N-Methyl-D-Aspartate and AMPA receptor
subunits in selected regions of the rat hippocampus and hypothalamus*
- 12 Becker H.C.: *Psychopharmacology* 1994, (116): 26–32
*Positive relationship between the number of prior ethanol withdrawal episodes and the severity of
subsequent withdrawal seizures*
- 13 Brosnan-Watters G., Wozniak D.F., Nardi A., Olney J.W.:
Pharmacol Biochem Behav 1996, (3): 701–11
Acute behavioral effects of MK-801 in the mouse

- 14 Brosnan-Watters G., Wozniak D.F., Nardi A., Olney J.:
Pharmacol Biochem Behav 1999, (1): 111–22
Parallel recovery of MK-801-induced spatial learning impairment and neuronal injury in male mice
- 15 Buller A.L., Larson H.C., Schneider B.E., Beaton J.A., Morisset R.A., Monaghan D.T.:
Journal of Neuroscience 1994, 14 (9): 5471–84
The molecular basis of NMDA subtypes: Native receptor diversity is predicted by subunit composition
- 16 Buller A.L., Larson HC, Morrisett RA, Monaghan DT.:
Mol Pharmacol 1995, 48 (4): 717–23
*Glycine modulates ethanol inhibition of heteromeric N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes**
- 17 Candeo P., Favaron M., Lengley I., Manev R.M., Rimland J.M., Manev H.:
J Neurochem 1992, (59): 1558
Pathological phosphorylation causes neuronal death: effect of okadaic acid in primary culture of cerebellar granule cells
- 18 Chazot P.L., Cik M., Stephenson F.A.: J of Neurochemistry 1992, (59) 3: 1176–8
Immunological detection of the NMDAR1 glutamate receptor subunit expressed in embryonic kidney 293 cells and in rat brain
- 19 Chen L., Huang L.Y.: Nature 1992, (356), 6369: 521–3
Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA- receptor channels as a mechanism of modulation
- 20 Chen L., Segal D.M, Mash D.C.: Brain Res Brain Res Protoc 1999, (4), 2: 132–9
Semi- quantitative reverse transkriptase polymerase chain reaction: an approach for measurement of target gene expression in human brain
- 21 Chen X., Moore-Nichols D., Nguyen H., Michaelis E.K.:
J Neurochem 1999, (72), 5: 1969–80
Calcium influx through NMDA receptors, chronic receptor inhibition by ethanol and 2- amino- 5- phosponopentanoic acid, and receptor
- 22 Choi D.: Science 1992, (258): 241–3
Excitotoxic cell death
- 23 Chu B., Anantharam V., Treistman S.N. et al.: J Neurochem 1995, (65): 140
Ethanol inhibition of recombinant heteromeric NMDA channels in the presence and absence of modulators
- 24 Ciabarra A.M., Sullivan J.M., Gahn L.G., Pecht G.: J Neurosci 1995 (15): 6498–508
Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family
- 25 Clineschmidt B.V.: Drug Dev Res 1982, (2): 123–134
Anticonvulsant activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties
- 26 Clineschmidt B.V.: Drug Dev Res 1982, (2): 135–146
Central sympathomimetic activity of (+)- 5-methyl- 10,11- dihydro- 5H -dibenzo (a,d) cyclohepten-

- 5,10- imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties*
- 27 Clineschmidt B.V.: Drug Dev Res 1982, (2): 147–163
Central sympathomimetic activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine (MK- 801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties
 - 28 Collins V.J.: Anaest Analg 1960, (39): 303–6
Intravenous nonbarbiturate nonnarcotic analgetics: preliminary studies: I. Cyclohexamines
 - 29 Corsson G., Domino E.F.: Anesth Analg 1966, (45), 1: 29–40
Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with phencyclidine derivate CI-581
 - 30 Cull-Candy S.G., Brickley S.G., Misra C., Feldmeyer D., Momiyama A., Farrant M.: Neuropharmacology 1998, (37), 10-11: 1369–80
NMDA receptor diversity in the cerebellum identification of subunits contributing to functional receptors
 - 31 Darstein M., Albrecht C.: Alcohol Clin Exp Res 1998, (22), 3: 704–9
Release and accumulation of neurotransmitter in the rat brain: acute effects of ethanol invitro and effects of longterm voluntary ethanol intake
 - 32 Das S., Sasaki Y.F., Rothe P., Premkumar L.S., Takasu M., Crandall J.E., Dikkes P., Conner D.A., Rayudu P.V., Cheung W., Chen H.S., Lipton S.A., Nakanishi N.: Nature 1998, (393): 377–81
Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A
 - 33 Daw N.W. et al.: Ann Rev Neurosci 1993, (16): 207–22
The role of NMDA receptors in information processing
 - 34 Devaud L., Morrow A.L.: European Journal of Pharmacology 1999, (369): 331–4
Gender selective effects of ethanol dependence on NMDA receptor subunit expression in cerebral cortex hippocampus and hypothalamus
 - 35 Dildy-Mayfield J.E., Leslie S.W.: J Neurochem 1991, (56): 1536–43
Mechanism of inhibition of N- methyl- D-aspartate- stimulated increases in free intracellular Ca^{2+} concentration by ethanol
 - 36 Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F.: Pharmacological Reviews 1999, (51), 1: 7–53
The Glutamate Receptor ion channels
 - 37 Dodd P.R., Beckmann A.M., Davidson M.S., Wilce P.A.: Neurochem Int 2000, (37): 509–33
Glutamate- mediated transmission, alcohol, and alcoholism
 - 38 Dole V.P., Ho A., Gentry R.T.: Proc Nat Acad Sci USA 1985, (82): 3469–71
Towards an analogue of alcoholism in mice

- 39 Domino E.F., Luby E.D.: (Ed) 1981, NPP Books: Ann Arbor: 401–18
Abnormal mental states induced by phencyclidine as a model of schizophrenia, in PCP (Phencyclidine): historical and current perspectives
- 40 Dunah A.W., Yasuda R.P., Luo J., Wang Y., Prybylowski K.L., Wolfe B.B.:
Molecular Neurobiology 1999, (19): 151–79
Biochemical Studies of the Structure and Function of NMDA subtype of glutamate receptors
- 41 Durand G.M., Bennett V.L., Zukin R.S.: Proc Natl Acad Sci USA 1993, (90): 6731–35
Splice variants of NMDAR1 identify domains involved in regulation by polyamines and PKC
- 42 Ebraldze A.K., Rossi D.J., Tonegawa S., Slater N.T.: J Neurosci 1996, (16): 5014
Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene
- 43 Eckardt M.J.: Alcohol Clin Exp Res 1995, (22): 72–81
Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system
- 44 Erard R., Luisada P.V., Peele R.: J Psychedelic Drugs 1980, (3-4): 235–51
The PCP psychosis: prolonged intoxication or drug-precipitated functional illness?
- 45 Fadda F., Rossetti Z.V.: Progress in Neurobiology 1998, (56): 385–431
Chronic ethanol consumption from neuroadaptation to neurodegeneration
- 46 Faingold C.L., Ni Gouemo P., Riaz A.: Prog Neurobiol 1998, (55), 5: 509–35
Ethanol and neurotransmitter interactions from molecular to integrative effects
- 47 Favaron M., Manev H., Siman R., Bertolino M., Szekely A.M., De Erausquin G., Guidotti A., Costa E.: Proc. Natl Acad Sci 1990, (5): 1983–7
Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death.
- 48 Follesa P., Ticku M.K.: Molecular Brain Research 1995, (29): 99–106
Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain
- 49 Follesa P., Ticku M.K.: J Biol Chem 1996, (271): 13297–9
Chronic ethanol mediated up-regulation of the NMDA receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture
- 50 Follesa P., Ticku M.K.: The Journal of Neuroscience 1996, 16 (7): 2172–8
NMDA receptor upregulation: Molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure
- 51 Forrest D., Yuzaki M., Soares H.D., Ng L., Luk D.C., Sheng M., Stewart C.L., Morgan J.I., Connor J.A., Curran T.: Neuron 1994, (13), 2: 325–38
Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death
- 52 Foster A.C.: Neurosci Lett 1987, (3): 307–11
Systemic administration of MK-801 prevents N-Methyl-D-Aspartate- induced neuronal degeneration in rat brain

- 53 Goldstein D.B., Pal N.: *Science* 1971, (172): 288–90
Alcohol dependence produces in mice by inhalation of ethanol: grading the withdrawal reaction
- 54 Gonzales R.A., Brown L.M.: *Life Science* 1995, (56), 8: 571–7
Brain regional differences in glycine reversal of ethanol-induced inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated neurotransmitter release
- 55 Grant E.R., Bacskai B.J., Anegawa N.J., Pleasure D.E., Lynch D.R.:
J Neurochem 1998, (71): 1471–81
Opposing contributions of NR1 and NR2 to PKC modulation of NMDA receptors
- 56 Grant K.A., Valverius P., Hudspith M., Tabakoff B.: *Eur J Pharmacol* 1990, (176): 289–96
Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex
- 57 Grant K.A., Colombo G.: *J Pharmacol Exp Ther* 1992, (264). 1241–7
Discriminative stimulus effects of ethanol: effect of training dose on the substitution of N-Methyl-D-Aspartate antagonists
- 58 Greengard P., Nairn A.C., Girault J.A., Ouimet C.C., Snyder G.L., Fisone G., Allen P.B., Fienberg A., Nishi A.: *Brain Res Brain Res Rev* 1998, (2-3): 274–84
The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration
- 59 Grimmwood S., Slater P., Deakin J.F., Hutson P.H.: *Neuroreport* 1999, (10): 461–5
NR2B-containing NMDA receptors are up-regulated in temporal cortex in schizophrenia
- 60 Grunze H.C. Rainnie D.G., Hasselmo M.E., Barkai E., Hearn E.F., McCarley R.W., Greene R.W.: *J Neurosci* 1996, (16), 6: 2034–43
NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition
- 61 Grunze H.C., Bender A., Wendhof S., Schäfer M., Rujescu D.:
Soc Neurosci Abstr 1997, (23): 2309
Neurotoxicity of NMDA antagonists: a glutamatergic theory of schizophrenia based on a selective impairment of local inhibitory feedback circuits
- 62 Gulya K., Grant K.A., Valverius P., Hoffman P.L., Tabakoff B.:
Brain Res 1991, (847): 129–34
Brain regional specificity and time course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal
- 63 Hardy P.A., Chen W., Wilce P.A.: *Brain Res* 1999, (819), 1-2: 33–9
Chronic ethanol exposure and withdrawal influence NMDA receptor subunit and splice variant mRNA expression in the rat cerebral cortex
- 64 Harris R.A., Mihic S.J., Valenzuela C.F.: *Ann NY Acad Sci* 1992, (654): 61–9
Possible substrate of ethanol reinforcement: GABA and dopamine
- 65 Harris R.A.: *Alcohol Clin Exp Res* 1999, (23), No 10
Ethanol Actions on Multiple ion Channels: Which are important?
- 66 Heale V., Harley C.: *Pharmacol Biochem Behav* 1990, (1): 145–9
MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze

- 67 Heresco-Levy U., Javitt D.C.: *Eur Neuropsychopharmacology* 1998, (2): 141–52
The role of NMDA receptor mediated neurotransmission in the pathology and therapeutics of psychiatric syndroms
- 68 Heyne A. May T., Goll P., Wolffgramm J.: *J Neural Transm*: 2000, (107): 613–38
Persisting consequence of drug intake
- 69 Hölter S.M., Engelmann M., Kirschke C., Liebsch G., Landgraf R., Spanagel R.:
Behavioural Pharmacology 1998, (9): 41–8
Long term ethanol self administration with repeated ethanol deprivation episodes changes ethanol drinking pattern and increases anxiety belated behaviour during ethanol deprivation in rats
- 70 Hölter S.M., Linthorst A., Reul J., Spanagel R.:
Pharmacology Biochemistry and Behavior 2000, 66 (1): 143–51
Withdrawal Symptoms in a long-term animal model of voluntary alcohol drinking wistar rats
- 71 Hoffman P.L., Tabakoff B.: *EXS* 1994, (7): 61–70
The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal
- 72 Hollmann M., Boulter J., Maron C., Beasley L., Sullivan J., Pecht G., Heinemann S.:
Neuron 1993, (10): 943–54,
Zinc potentiation agonist-induced currents at certain splice variants of NMDAR1
- 73 Hollmann M., Heinemann S.: *Annu Rev Neurosci* 1994, (17): 31–108
Cloned glutamat receptors
- 74 Horvath Z.C., Czopf J., Buzsaki G.: *Brain Res* 1997, 753 (2): 181–95
MK-801-induced neuronal damage in rats
- 75 Hu X.J., Ticku M.K.: *Mol Brain Res*, 1995, (30): 347–56
Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons
- 76 Hu X. J., Follesa P., Ticku M.K.: *Mol Brain Res* 1996, (36): 211–8
Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons
- 77 Ibbotson T., Field M.J., Boden P.R.: *Br J Pharmacol* 1997, (122), 5: 956–62
Effect of chronic ethanol treatment in vivo on excitability in mouse cortical neurones in vitro
- 78 Ishii T., Moriyoshi K., Sugihara H., Sakurada K., Kadotani H., Yokoi M., Akazawa C., Shigemoto R., Mizuno N., Masu M., Nakanishi S.: *J Biol Chem* 1993, (268): 2836–43
Molecular characterization of the family of the NMDA receptor subunits
- 79 Ito I., Futai K., Katagiri H., Watanabe M., Sakimura K., Mishina M., Sugiyama H.:
J Physiol 1997, (500), 2: 401–8
Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit
- 80 Jaffe J.H. in Goodman G. A. et al.(eds): *The Pharm Basis of Ther*, Pergamon Press, New York, 1990: 522–74
Drug addiction and drug use

- 81 Javitt D.C., Zukin S.R.: Am J Psychiatry 1991, (10): 1301–8
Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia [see comments]
- 82 Kadotani H., Hirano T., Masugi M., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Nakanishi S.: J Neurosci 1996, (16), 24: 7859–67
Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits
- 83 Kalluri H.S.G., Metha A.K., Ticku M.K.: Molecular Brain Res 1998, (58): 221–4
Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment
- 84 Kathleen M., Wu J.Y.: J Biomed Science 2001, (8): 7–19
Role of glutamatergic and GABAergic Systems in Alcoholism
- 85 Keshavan M.S.: J Psychiatr Res 1999, (6): 513–21
Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model
- 86 Koek W., Woods J.H., Winger G.D.: J Pharmacol Exp Ther 1988, (3): 969–74
MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys
- 87 Koltchine V., Anantharam V., Wilson A., Bayley H., Treistman S.N.: Neurosci Lett 1993, (152), 1-2: 13–6
Homomeric assemblies of NMDAR1 splice variants are sensitive to ethanol
- 88 Koob G.F., Bloom F.E.: Science 1988, (242): 715–23
Cellular and molecular mechanism of drug dependence
- 89 Koob G.F., Le Moal M.: Science 1997, (278): 52–8
Drug abuse: hedonic and homeostatic dysregulation
- 90 Koob G.F.: Ann N Y Acad Sci, 2000, (909): 170–85
Neurobiology of addiction. Towards the development of new therapies
- 91 Kumari M., Ticku M.K.: J Neurochem 1998 (70), 4: 1467–73
Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons
- 92 Kumari M., Ticku M. K.: Progress in Drug Research 2000, Vol 54 (E. Jucker, Ed.)
Regulation of NMDA receptors by ethanol
- 93 Kuner T., Schoepfer R., Korpi E.R.: Neuroreport 1993, (5): 297–300
Ethanol inhibits glutamate-induced current heteromeric NMDA receptor subunits
- 94 Kutsuwada T., Sakimura K., Manabe T., Takayama C., Katakura N., Kushiya E., Natsume R., Watanabe M., Inoue Y., Yagi T. et al: Neuron 1996, (2): 333–44
Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice
- 95 Lason W., Turchan J., Przewlocka B., Labuz D.: Pol J Pharmacol 1997, (49), 4: 249–53
Effects of repeated MK-801 administration on the glutamate receptor gene expression in the rat hippocampus

- 96 Laurie D.J., Seeburg P.H.:
European J Pharmacol; molecular pharmacology section 1994, (268): 335–45
Ligand affinities at recombinant NMDA receptors depend on subunit composition
- 97 Laurie D.J., Seeburg P.H.: The Journal of Neuroscience 1994, (14), 5: 3180–94
Regional and development heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA
- 98 Laurie D.J., Putzke J., Zieglgänsberger W., seeburg P.H., Tölle T.R.:
Mol Brain Res 1995, (32): 94–108
The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain
- 99 Le Magnen J.: Journal de Physiologie 1960, (529): 873–84
Etude de quelques facteurs associé à des modification de la consommation spontanée d'alcool éepar le rat
- 100 Li T.K., Lumeng L., Mc Bride W.J., Waller M.B., Hawkins T.D.: Drug & Alcohol Dependence 1979, (4): 45–60
Progress towards a voluntary oral consumption model of alcoholism
- 101 Li Y., Erzurumlu R.S., Chen C., Jhaveri S., Tonegawa S.: Cell 1994, (3): 427
Whisker- related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice
- 102 Linden A.M., Vasanen J., Storvik M., Lakso M., Korpi E.R., Wong G., Castren E.:
Pharmacol Toxicol 2001, (2): 98–105
Uncompetitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors alter the mRNA expression of proteins associated with the NMDA receptor complex
- 103 Liu J., Moghaddam B.: J Pharmacol Exp Ther 1995, (274), 3: 1209–15
Regulation of glutamate efflux by excitatory amino acid receptors: evidence for tonic inhibitory and phasic excitatory regulation
- 104 Lodge D., Anis N. A.: Eur J Pharmacol 1982, (2-3): 203–4
Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat
- 105 Lovinger D.M., White G., Weight F.F.: Science 1989, (243), 4899: 1721–4
Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons
- 106 Lovinger D.M., White G., Weight F.F.: Ann Med 1990, (22), 4: 247–52
Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function
- 107 Lovinger D.M. in M. Soyka (ed.): Springer Verlag New York 1996: 1–26
Acamprosate in relapse: prevention of alcoholism
- 108 Lovinger D.M.: Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1997, (356), 3: 267–82
Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future
- 109 Luby E.D.: Arch Neurol Psychiat 1959, (81): 363–9
Study of a new schizophrenic-like drug: Sernyl

- 110 Majchrowicz E.: *Psychopharmacologia* 1975, (43), 3: 245–54
Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats
- 111 Markou A., Weiss F., Gold L.H., Caine B., Schultheis G., Koob G.F.:
Psychopharmacology (112): 163–82
Animal models of drug craving
- 112 Martin D., Swartswelder H.S.: *Eur J Neuroscience* 1992, (219): 469–72
Ethanol inhibits release of excitatory amino acid from slices of hippocampal area
- 113 Masood K., Wu C., Brauneis U., Weight F.F.: *Mol Pharmacol* 1994, (45), 2: 324–9
Differential ethanol sensitivity of recombinant N-Methyl-D-Aspartate receptor subunits
- 114 Mc Bain C.J., Mayer M.L.: *Physiol Rev* 1994, (74), 3: 723
N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function
- 115 Mc Bride W.J., Li T.K.: *Critical Reviews in Neurobiology*, 1998, (12), 4: 339–69
Animal models of alcoholism: Neurobiology of high alcohol drinking behaviour rats
- 116 Mc Donald J. F., Xiong X.G., Lu W.Y. Raouf R., Orser B.A.:
Prog Brain Res 1998, (16): 191-208
Modulation of NMDA receptors
- 117 Meador-Woodruff J. H. et al.: *Abstr Am Coll Neuropsychopharmacology* 1997, (36): 167
Abnormal NMDA receptor expression in schizophrenic prefrontal cortex
- 118 Meador-Woodruff J. H., Healy D. J.: *Brain Res Brain Res Rev* 2000, (31), 2-3: 288–94
Glutamate receptor expression in schizophrenic brain
- 119 Meador-Woodruff J. H., Davis K.L., Haroutunian V.: *Neuropsychopharmacology* 2001, (5):
545–52
Abnormal kainate receptor expression in prefrontal cortex in schizophrenia
- 120 Meguro H., Mori H., Araki K., Kushiya E., Kutsuwada T., Yamazaki M., Kumanishi T.,
Arakawa M., Sakimura K., Mishina M.: *Nature* 1992, (357): 70–4
Functional characterization of heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs
- 121 Meoni P., Mugnaini M., Bunnemann B.H., Trist D.G., Bowery N.G.: *Brain Res Mol Brain
Res* 1998, (54), 1: 13-23
*[3H]MK-801 binding and the mRNA for the NMDAR1 subunit of the NMDA receptor are
differentially distributed in human and rat forebrain*
- 122 Meyer J.S.: *J Nerv Ment Dis* 1959, (129): 54–61
A new drug causing symptoms of sensory deprivation
- 123 Michaelis E.K.: *Biochem Pharmacol* 1978, (27), 12: 1685–91
Effects of acute and chronic ethanol intake on synaptosomal glutamate binding activity
- 124 Miles M.F., Wilke N., Elliot M., Taaner W., Shah S.: *Mol Pharmacol* 1994, (46): 873
*Ethanol-responsive genes in neural cells include the 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78)
and 94-kilodalton glucose-regulated protein (GRP94) molecular chaperones*

- 125 Moghaddam B, Adams BW. *Science* 1998, 281(5381):1349-52
Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats
- 126 Mohn A.R., Gainetdinov R.R., Caron M.G., Koller B.H.: *Cell* 1999, (98), 4: 427-36
NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia
- 127 Molinoff P.B., Williams K., Pritchett D.B., Zhong J.:
Progress in Brain Research 1994 (100): 39-45
Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits
- 128 Monaghan D.T., Andaloro V.J., Skifer A.: *Prog Brain Res* 1998, (116): 171-90
Molecular determinants of NMDA receptor diversity
- 129 Monaghan D.T., Larsen H.: *J Pharmacol Exp Ther* 1997, (280), 2: 614-20
NR1 and NR2 subunit contributions to NMDA receptor channel blocker pharmacology
- 130 Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakman B., Seeburg P.: *Science* 1992, (256): 1566-70.
Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes NR2A, B, C, D
- 131 Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakman B., Seeburg P.H.:
Neuron 1994, (12): 529-40
Development and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA Receptors
- 132 Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S.: *Nature* 1991, 354 (6348): 31-7
Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor
- 133 Morris R.G. Anderson E., Lynch G.S., Baudry M.: *Nature* 1986, (6056): 774-6
Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonist, AP5
- 134 Mullis K, Falona F.: *Meth Enzymol* 1987, (55): 335-50
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction
- 135 Nakanishi S., Axel R., Schneider N.A.: *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, (89), 18: 8552-6
Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors
- 136 Narita M., Soma M., Narita M., Mizoguchi H., Tseng L.F., Suzuki T.:
European Journal of Pharmacology 2000, (401): 191-5
Implications of the NMDA NR2B receptor subunit-containing NMDA receptor localized in mouse limbic forebrain forebrain in ethanol dependence
- 137 Nicholls D.G.: *Eur J Biochem* 1993, (212): 613-631
The glutamatergic nerve terminal
- 138 Oh S., Kim Y.H., Hann H.J., Lee H.L., Choi H.S., Kim H.S., Ho I.K.: *Neurochemistry Research* 2001, (5): 559-65
Modulation of the levels of NMDA receptor subunit mRNA and the binding of (³H) MK-801 in rat brain by chronic infusion of subtoxic dose of MK-801

- 139 Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K.: Prog Neurobiol 1998, (5): 581–618
Glutamate receptors in the mammalian central nervous system
- 140 Pearson B.J.: Schizophr Res 1999, (36): 75
Expression of the NR2B subunit of the NMDA receptor is increased in postmortem hippocampus of schizophrenics
- 141 Peoples R.W.: Neuropharmacology 2000, (39): 1681–91
Alcohol inhibit NMDA receptor via asite exposed to the extracellular enviroment
- 142 Piercey M.F., Hoffmann W.E., Kaczkofsky P.: Psychopharmacology 1988, (4): 561–2
Functional evidence for PCP- like effects of the anti-stroke candidate MK-801
- 143 Pitts F.N.: Clin Psychiatry 1981, (42), 5: 184
Angel dust and psychiatry (editoral)
- 144 Popp R.L., Lickteig R., Browning M.D., Lovinger D.M.:
Neuropharmacology 1998, (37), 1: 45–56
Ethanol sensitivity and subunit composition of NMDA receptors in cultured striatal neurons
- 145 Premkumar L.S., Auerbach A.: J Gen Physiol 1997, (110), 5: 485
Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns
- 146 Putzke J.: Dissertation an der Fakultät für Chemie u. Pharmazie der LMU München, 1997
Tierexperimentelle Studien zur Änderung der Genexpression während verschiedener Phasen der Alkoholabhängigkeit
- 147 Rabe C.S., Tabakoff B.: Mol Pharmacol 1990, (38): 753–7
Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-Methyl-D-Aspartate receptor
- 148 Rakic P., Bourgeois J.P., Goldman-Rakic P.S.: Prog. Brain Res 1994, (102): 227–43
Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning memory and mental illness
- 149 Reich D.L., Silvey G.: Biol Psychiatry 1990, (9): 1038–44
Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience
- 150 Ritzmann R.F., Tabakoff B.: J Pharmacol Exp Ther 1976 (1): 158–70
Body temperature in mice: a quantitative measure of alcohol tolerance and physical dependence
- 151 Robichon R., Ticku M.K.: Indian J Exp Biol 1998, (36), 10: 947
N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor: friend or foe?
- 152 Rodriguez-Paz J.M., Anantharam V., Treistman S.N.: Neuroscience Letters 1995, (190): 147–50
Block of NMDA receptor by PCP- like drugs is influenced by alternativer splicing
- 153 Rothman S.M., Olney J.W.: TINS 1987, (7): 299–302
Excitotoxicity and the NMDA receptor
- 154 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Science 1988; (239), 4839: 487–91
Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

- 155 Samson H.H., Harris R.A.: Trends Pharmacol Sci 1992, (5): 206–11
Neurobiology of alcohol abuse
- 156 Sanna E., Serra M., Cossu A., Colombo G., Follesa P., Cuccheddu T., Concas A., Biggio G.: Alcohol Clin Exp Res. 1993, (1): 115–23
Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain
- 157 Scheetz A.J., Markham J.A., Fifkova E.: Brain Res 1987, (409), 2: 329–34
The effect of chronic ethanol consumption on the fine structure of the CA1 stratum oriens in short-sleep and long-sleep mice short-term and long-term exposure
- 158 Seeburg P.H.: Trends Neurosci 1993, (9): 359-65
The molecular biology of mammalian glutamate receptor
- 159 Simpson M.D. et al.: Psychiatry Res 1992, (42): 273–82
Regionally selective deficits in uptake sites for glutamate and gamma-amino-butyric acid in the basal ganglia of schizophrenia
- 160 Simson P.E., Criswell H.E, Breese G.R.: Brain Research 1993, (607), 1-2: 9–16
Inhibition of NMDA- evoked electrophysiological activity by ethanol in selected brain regions
- 161 Sinclair J.D., Li T.K: Alcohol 1989, (6): 505–9
Long and short alcohol deprivation: effects on AA and P alcohol preferring rats
- 162 Sinclair J.D., Senter R.J.: Psychonomic Science 1967, (8): 11–2
Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation
- 163 Slusher B.S., Tsai G., Yoo G., Coyle J.T.: J Comp Neurol 1992, (315), 2: 217–29
Immunocytochemical localization of the N- acetyl- aspartyl- glutamate (NAAG) hydrolyzing enzyme N- acetylated alpha- linked acidic dipeptidase (NAALADase)
- 164 Snell L.D., Tabakoff B., Hoffman P.L.: Brain Research 1993, (602): 91–8
Radioligand binding to the N-Methyl-D-Aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ingestion
- 165 Snell L.D., Nunley K.R., Lickteig R.L., Browning M.D., Tabakoff B., Hoffman P.L.: Molecular Brain Research 1996, (40): 71–8
Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion
- 166 Spanagel R., Höltter S.M.: Journal of Neuronal Transmission 2000, (107): 669–80
Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism
- 167 Spanagel R., Höltter S.M.: Alcohol & Alcoholism 1999, (34): 231–43
Long term alcohol self administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism?
- 168 Spanagel R., Herz A, Shippenberg T.S.: Proc Natl Acad Sci USA 1992, (89), 6 : 2046–50
Opposing Tonicly Active Endogenous Opioid Systems Modulate the Mesolimbic Dopaminergic Pathway

- 169 Sprengel R., Suchanek B., Amico C., Brusa R., Burnashev N., Rozov A., Hvalby O., Jensen V., Paulsen O., Andersen P., Kim J.J., Thompson R.F., Sun W., Webster L.C., Grant S.G.N., Eilers J., Konnerth A., Li J., Mc Namara J.O., Seeburg P.H.:
Cell 1998, (92): 279–89
Importance of the intracellular Domain of NR2 Subunits for NMDA Receptor Function in Vivo
- 170 Sprengel R., Single F.N.: Ann NY Acad Sci 1999, (868): 494–501
Mice with genetically modified NMDA and AMPA receptors
- 171 Sucher N.J., Awobuluyi M., Choi Y.-B., Lipton S.A.: TIPS October 1996, (7): 348–55
From genes to channels: NMDA receptors
- 172 Sun L., Shipley M.T., Lidow M. S.: Synapse 2000, (35), 3: 212–21
Expression of NR1; NR2A- D and NR3 subunits of the NMDA receptor in the cerebral cortex and olfactory bulb of adult rat
- 173 Tavares M.A., Paula-Barbosa M.M., Cadete-Leite A.: Alcohol Clin Exp Res 1987, (3): 315–9
Chronic alcohol consumption reduces the cortical layer volumes and the number of neurons of the rat cerebellar cortex.
- 174 Tingley W.G., Ehlers D., Kameyama K., Doherty C., Ptak J.B., Riley C.T, Huganir R.L.:
J Biol Chem 1997, (272), 8: 5157–66
Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor NR1 subunit using
- 175 Trevisan L., Fitzgerald L.W., Brose N., Gasic G.P., Heinemann S.F., Duman R.S., Nestler E.J.: J Neurochem 1994, (62): 1635–8
Chronic ingestion of ethanol upregulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus
- 176 Trujillo K.A.: Drug and Alcohol Dependence 1995, (38): 139–54
Excitatory amino acids and drugs of abuse: A role for NMDA receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence
- 177 Tsai G., Gastfriend D.R., Coyle J.T.: Am J Psychiatry 1995, 152 (3): 332–40
The glutamatergic of human alcoholism
- 178 Tsai G., Passani L.A., Slusher B.S., Carter R.: Psychiatry 1995, (10): 829–36
Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains
- 179 Tsai G., Coyle J.T.: Arch Gen Annu Rev Med 1998, (49): 173–84
The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism
- 180 Veal W.L., Myers R.D.: Psychopharmacologia 1969, (15): 361–72
Increase of alcohol reference in rats following repeated exposures to alcohol
- 181 Vicini S., Wang J.F., Li J.H., Zhu W.J., Wang Y.H., Luo J.H., Wolfe B.B., Grayson D.R.:
J Neurophysiol 1998, (2): 555–66
Functional and pharmacological differences between recombinant NMDA receptors
- 182 Walker D.W., Heaton M.B., Lee N., King M.A., Hunter B.E.:
Alcohol Clin Exp Res 1993, (1): 12–8
Effect of chronic ethanol on the septohippocampal system: a role for neurotrophic factors?

- 183 Wang C., Pralong W.-F., Schulz M.-F., Rougon G., Aubry J.-M., Paguliusi S., Robert A., Kiss J.Z.: Soc Neurosci Abstr 1998, (24): 1970
Chronic phencyclidine treatment produces a selective upregulation of the NMDAR1 receptor subunit mRNA in rat forebrain
- 184 Webb B., Heaton M.B., Walker D.W.: Alcohol Clin Exp Res 1997, (21): 1643
Ethanol effects on cultured embryonic hippocampal neuronal calcium homeostasis are altered by nerve growth factor
- 185 Wenzel A., Scheurer L., Künzi R., Fritschy J.M., Mohler H., Benke D.: Neuroreport 1995, (7): 45–8
Distribution of NMDAR2A 2B 2C 2D in rat brain
- 186 Wilke N.: Birkhäuser Verlag Basel 1994, :49–59
Towards a molecular basis of alcohol use and abuse
- 187 Williams K.: Mol Pharmacol 1993, (44): 851–9
Ifenprodil discriminates subtypes of the NMDA receptor
- 188 Wirkner K., Poelchen W., Koles L., Muhlberg K., Scheibler P., Allgaier C., Illes P.: Neurochem Int 1999, (2): 153–62
Ethanol induced inhibition of NMDA receptor channels
- 189 Wolffgramm J.: Neuroscience Behavioural Review 1991, (15): 515–9
An ethopharmacological approach to the development of drug addiction
- 190 Wong E.H., Kemp J.A., Priestley T., Knight A.R.: Natl Acad Sci U S A 1986, (18): 7104–8
The anticonvulsant MK-801 is a potent N-Methyl-D-Aspartate antagonist
- 191 Wong E.H., Knight A.R., Woodruff G.N.: J Neurochem 1988, (1): 274–81
[³H] MK-801 labels a site on the N-Methyl-D-Aspartate receptor channel complex in rat brain membranes
- 192 Woodward J.J.: Critical reviews in Neurobiology 2000, (14), 1: 69–89
Ethanol and NMDA receptor signaling
- 193 Yago K.B., Pitts F.N. Jr., Burgoyne R.W., Aniline O.: J Clin Psychiatry 1981, (5): 193–6
The urban epidemic of phencyclidine (PCP) use: clinical and laboratory evidence from a public psychiatric hospital emergency service
- 194 Yang X., Criswell H.E., Simson P., Moy S., Breese G.R.: J Pharmacol Exp Ther 1996, (278): 114–24
Evidence for a selective effect of ethanol on N-Methyl-D-Aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil- sensitive N- methyl- D-aspartate receptors
- 195 Zheng X., Zhang L., Durand G.M., Zukin R.S.: Neuron 1994, (4): 811–8
Mutagenesis rescues spermine and Zn²⁺ potentiation of recombinant NMDA receptors
- 196 Zigmond M.J. (ed) : Academic Press : Fundamental Neuroscience 1999:251 (adapted Hollmann M., Heinemann S.: Annu Rev Neurosci 1994, (17): 31–108
Cloned glutamate receptors)

197 Zukin S.R., Bennett M.V.: Trends in Neuroscience 1995, (18): 306-13
Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dan Rujescu für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung und Förderung auch über die wissenschaftliche Tätigkeit hinaus. Er war zu jeder Zeit ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mein Interesse an dem faszinierenden Gebiet der molekularen Neurobiologie durch die umsichtige Auswahl des Themas dieser Arbeit geweckt hat.

Desweiteren danke ich Frau Dr. Sabine Hölter sowie Frau Dr. Frauke Ohl und Herrn Dr. Martin Keck, die eine Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie ermöglichten. Ohne deren Unterstützung, die in wertvoller tierexperimenteller Vorarbeit sowie in der Bereitstellung des biologischen Ausgangsmaterials für meine Untersuchungen lag, wäre die hier vorliegende Arbeit nicht denkbar gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. J. Möller dafür, dass ich diese Arbeit in der von ihm geleiteten Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Ein großer Dank geht an Ina Giegling, deren Vorschläge und Unterstützung bei der statistischen Auswertung für meine Ergebnisse unerlässlich waren.

Natürlich nicht zu vergessen sind all meine Arbeitskollegen der AG Molekulare Neurobiologie sowie Niko Kleindienst aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Greil, die mir mit vielen konstruktiven Gesprächen, Aufmunterungsbemühungen und netter Atmosphäre in Labor und Büro die Arbeit erleichtert haben. Hier möchte ich mich besonders herzlich bei Annette Hartmann, Anton Gietl, Chris Murgatroyd, Daniela Glatz und Frank Berendt bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich allen, die mich beim Korrekturlesen meiner Arbeit unterstützt haben ein Riesendankeschön aussprechen, wobei ich hier besonders Daniela Glatz und Sven Vopel für ihre Hilfe danke.

Jim, although such a long distance, I thank you for your love, support and encouragement.

10 Lebenslauf

Name, Vorname: Räder, Hanna Friederike

Anschrift: Marktplatz 32
88416 Ochsenhausen

Geburtsdatum, -ort: 18. Mai 1974 in Gross-Gerau

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung: 1980 – 1993 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 04/1994 – 04/ 1998 Pharmazie Studium an der Eberhard Karl
Universität Tübingen
04/1995 1. Staatsexamen
04/1998 2. Staatsexamen

05/1998 – 04/1999 Einjähriges Pharmazie-Praktikum:
05/1998 – 10/1998 Sonnenapotheke am Stachus, München
11/1998 – 04/1999 Internationale Ludwigsapotheke, München

Approbation: 06/1999 3. Staatsexamen,
Approbation zur Apothekerin

Promotion: Seit 08/1999 Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie,
Psychiatrische Klinik des Klinikums der
Universität München,
Klinikum Innenstadt der LMU München

München, im Januar 2003

10.1 Publikationen

- 1 Rujescu D., Bender A., Keck M., Ohl F., Räder H., Giegling I., Greene R., Hartmann A. M., Möller H.-J., Grunze H.C.: (in Vorbereitung)
A pharmacological model for psychosis based on NMDA receptor hypofunction. Molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities
- 2 Rujescu D., Hölder S.M., Räder H.: (in Vorbereitung)
NMDA receptor subunits and splice variants in two animal models of ethanol intake

10.2 Kongressbeiträge

- 1 Winterseminar „Biologische Psychiatrie“ in Oberlech, 2000:
Räder H., Hölder S. M., Rujescu D.:
Long- term voluntary ethanol intake & relative expression of NMDA receptor subunits and splice variants in the rat brain
- 2 Winterseminar „Biologische Psychiatrie“ in Oberlech, 2001:
Räder H., Hölder S. M., Rujescu D.:
NMDA receptor subunits and splice variants in two animal models of ethanol intake
- 3 3. Interdisziplinärer Kongress für Suchtmedizin, München, Juli 2002:
Räder H., Hölder S. M., Rujescu D.:
Effects of ethanol on the relative mRNA expression of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor subunits and splice variants in the rat brain

10.3 Posterpräsentationen

- 1 Räder H., Hölder S. M., Rujescu D.: 13th ECNP, Munich European Neuropsychopharmacology, 2000, Vol. 10, Suppl. 3, S380: P.5.014
Effects of long- term voluntary ethanol intake on the relative expression of NMDA receptor subunits and splice variants in the rat brain
- 2 Räder H., Hölder S.M., Rujescu D.: Research Festival, Psychiatrische Klinik der LMU München, 2001:
NMDA receptor subunits & splice variants in two animal models of ethanol intake
- 3 Räder H., Rujescu D., Grunze H.C.: Research Festival, Psychiatrische Klinik der LMU München, 2002:
Chronic MK-801 treatment on NMDA receptor subunits and splice variants in a pharmacological model for psychosis
- 4 Rujescu D., Bender A., Keck M., Ohl F., Räder H., Grunze H.: 10th World Congress of Psychiatric Genetics, Brussels/ Belgium 2002, American Journal of Medical Genetics 2002, Vol. 114 (7), 869: P319 A
A pharmacological model for psychosis