

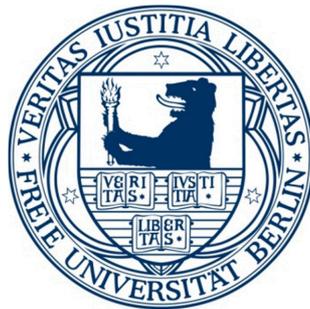
# **Der $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor als Zielstruktur für Arzneistoffe zur Behandlung des Raynaud-Phänomens, von Lungenödemen und der Schizophrenie**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



Vorgelegt von

**Florian Jantschak**

aus Berlin

Februar 2013

Die Dissertation wurde vom 01.04.2008 bis 28.02.2013

unter Leitung von Prof. Dr. H. H. Pertz

am Institut für Pharmazie angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. H. Pertz

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Weindl

Disputation am 12.06.2013

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. H. H. Pertz danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation, den anregenden Gesprächen und kritischen Reflektionen.

*„Promovieren ist wie Bergsteigen.“*

Martina Jantschak und Jenny Sonnenstädt danke ich für die Hilfe bei der Reisevorbereitung und die liebevolle Betreuung im Basecamp.

Prof. Dr. G. Weindl danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Claudia Methner danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Das Leben ist kurz,

Lang ist die Kunst,

Der rechte Augenblick ist knapp bemessen,

Der Versuch ist trügerisch,

Die Entscheidung ist schwierig.

*Hippokrates von Kos / Maria Börno*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Der <math>\alpha_{2C}</math>-Adrenozeptor als Zielstruktur für Arzneistoffe zur Behandlung des Raynaud-Phänomens und von Lungenödemen .....</b>	<b>07</b>
1.1.	Einleitung .....	07
1.2.	$\alpha$ -Adrenozeptoren in dermalen Gefäßen .....	11
1.2.1.	Das Raynaud-Phänomen .....	11
1.2.2.	Die Rattenschwanzarterie als Modell der kutanen Zirkulation .....	12
1.2.3.	Die Charakterisierung des kontraktilen $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyps in Rattenschwanzarterien .....	13
1.2.4.	Der Einfluss von Temperaturänderungen auf die durch $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelten kontraktilen Effekte .....	14
1.2.5.	Zusammenfassung .....	15
1.2.6.	<i>Postjunctional <math>\alpha_{2C}</math>-adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity .....</i>	<i>16</i>
1.3.	$\alpha$ -Adrenozeptoren in pulmonalen Gefäßen .....	28
1.3.1.	Das Höhenlungenödem.....	28
1.3.2.	Das neurogene Lungenödem .....	29
1.3.3.	Der Einfluss des intrazellulären Calciumspiegels auf die kontraktilen Effekte von UK14304 .....	30
1.3.4.	Die Charakterisierung des kontraktilen $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyps in Pulmonalarterien.....	32
1.3.5.	Zusammenfassung .....	33
1.3.6.	<i>Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries.....</i>	<i>34</i>

## Inhaltsverzeichnis

<b>2.</b>	<b>Der <math>\alpha_{2C}</math>-Adrenozeptor als Zielstruktur für Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie .....</b>	<b>44</b>
2.1.	Einleitung .....	44
2.2.	Die Bedeutung von $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren bei der Behandlung schizophrener Syndrome .....	45
2.3.	Dopamin $D_2$ -Partialagonisten als Neuroleptika .....	48
2.4.	Tergurid .....	50
2.5.	Derivate von Tergurid als Antagonisten an $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren .....	51
2.6.	Die pharmakologische Charakterisierung von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid .....	53
2.6.1.	Effekte an Dopamin $D_2$ -Rezeptoren.....	54
2.6.2.	Effekte an 5-HT <sub>2A</sub> -Rezeptoren .....	55
2.6.3.	Effekte an $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren .....	56
2.6.4.	Effekte an Histamin $H_1$ -Rezeptoren .....	58
2.7.	Die Untersuchung von 2-Bromotergurid an präklinischen Tiermodellen .....	59
2.8.	Zusammenfassung .....	60
<b>3.</b>	<b>Die antiserotonergen Eigenschaften von Tergurid auf Blutgefäße .....</b>	<b>61</b>
3.1.	Einleitung .....	61
3.2.	Tergurid hemmt die durch Serotonin induzierte Bildung von pERK1/2 .....	61
3.3.	Zusammenfassung .....	62
3.4.	<i>Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets, and Valvular Interstitial Cells</i> .....	63

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Poster .....</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>90</b>

# 1. Der $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor als Zielstruktur für Arzneistoffe zur Behandlung des Raynaud-Phänomens und von Lungenödemem

## 1.1. Einleitung

Nach Aktivierung des Sympathikus werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus postganglionären Neuronen und dem Nebennierenmark ausgeschüttet. Diese wirken als Agonisten an  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - sowie  $\beta$ -Adrenozeptoren und verursachen im Organismus eine ergotrope Wirkung. Über  $\alpha$ -Adrenozeptoren werden vor allem kontraktile Effekte auf die glatte Muskulatur vermittelt, sie sind aber auch in verschiedenen anatomischen und funktionellen Strukturen des zentralen Nervensystems zu finden.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren werden in  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - und  $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptorsubtypen, die überwiegend  $G_{q/11}$ -Proteine aktivieren und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren in  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptorsubtypen, die  $G_{i/o}$ -Proteine aktivieren, unterteilt (Alexander et al., 2011).  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtypen sind in Säugetieren evolutionär hoch konserviert, allerdings weist der  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor von Nagetieren aufgrund der Substitution einer entscheidenden Aminosäure pharmakologische Unterschiede auf. Er wird oft als  $\alpha_{2D}$ -Adrenozeptor bezeichnet und repräsentiert ein Homolog zum menschlichen  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor (MacDonald et al., 1997).  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren sind wichtige Regulatoren der Sympathikusaktivität, von Neurotransmitterfreisetzung, Blutdruck und Augeninnendruck (Philipp et al., 2002).

Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt über eine Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin zu einer Kontraktion glatter Muskulatur. Nach Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten sind Myosinköpfe zur Interaktion mit Aktin in der Lage. Eine Relaxation wird durch Dephosphorylierung von einer basal aktiven Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) hervorgerufen. Der Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Ketten ist entscheidend für die Auslösung und die Stärke der glattmuskulären Kontraktion und wird durch die relative Aktivität der beiden gegensätzlich arbeitenden Enzyme MLCK und MLCP bestimmt.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird entweder durch den Einstrom von Calcium durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle oder durch Aktivierung von  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren erhöht. Diese regen über die Phospholipase C die Bildung von Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) an.  $IP_3$  bewirkt dann über den  $IP_3$ -Rezeptor eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle wird hauptsächlich über die Aktivität von Kalium- und Chloridkanälen gesteuert. Second Messengers wie cAMP und cGMP spielen nur eine

untergeordnete Rolle (Sanders, 2001). Der durch den  $IP_3$ -Rezeptor vermittelte Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration führt über eine Aktivierung calciumgesteuerter Chloridkanäle zu einer Depolarisation der Zellmembran. Dies öffnet spannungsgesteuerte Calciumkanäle, Calcium strömt in die Zelle und eine Kontraktion wird ausgelöst (Hartzell et al., 2005). Die Aktivierung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen bewirkt über eine Hyperpolarisation der Zellmembran die Relaxation glatter Muskelzellen (Brayden, 2002).

Neben den spannungsgesteuerten Calciumkanälen gibt es noch eine weitere Möglichkeit, die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Einstrom aus dem Extrazellularraum zu erhöhen: Das entleerte sarkoplasmatische Retikulum produziert einen Calcium Influx Faktor, der über eine Signalkaskade speichergesteuerte Calciumkanäle öffnet (Smani et al., 2004). Dies trägt unabhängig von den calciumgesteuerten Chloridkanälen zur Depolarisation der Zellmembran und damit zur Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle bei (Leung et al., 2008). Eine Relaxation über die Senkung des Calciumspiegels kann entweder durch Rücktransport von Calcium in den Extrazellularraum oder durch Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher erfolgen. Calcium-ATPasen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die sarkoplasmatisch/endoplasmatisch retikuläre Calcium-ATPase (SERCA) pumpt Calcium gegen den Konzentrationsgradienten in das Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums, die plasmamembranständige Calcium-ATPase transportiert Calcium aus der Muskelzelle heraus (Sanders, 2001).

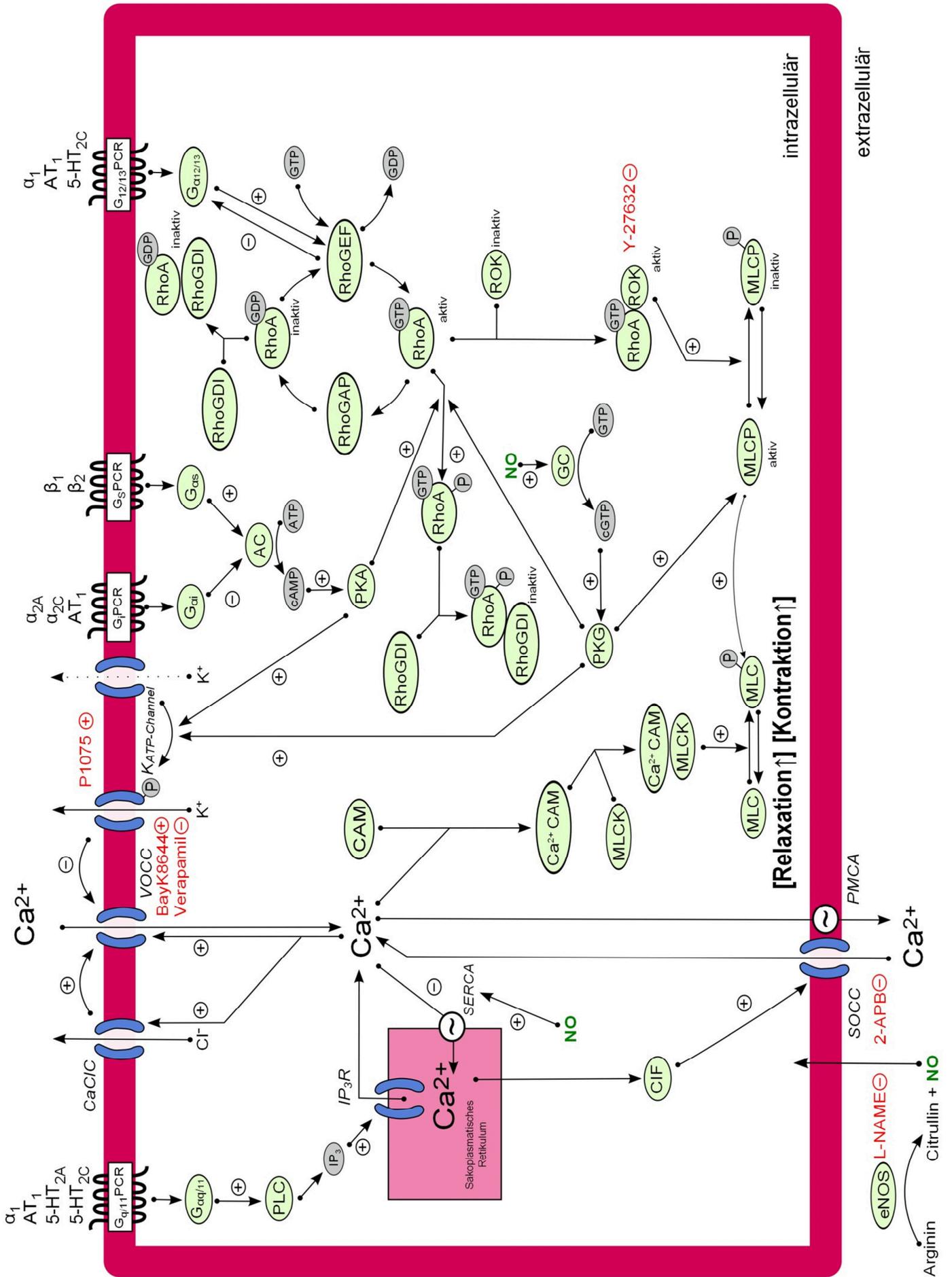
Viele Agonisten aktivieren über ihren spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) mehr als nur ein G-Protein. Der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor, der Endothelin  $ET_A$ , der Thromboxan  $A_2$ , der muskarinerge  $M_1$ - und  $M_3$ , der  $5-HT_{2C}$ - oder der Angiotensin  $AT_1$ -Rezeptor sind sowohl mit  $G_q$ - als auch  $G_{12/13}$ -Proteinen gekoppelt (Puetz et al., 2009; Siehler, 2009). Bei einer Bindung von  $G_{\alpha_{12/13}}$  zu RhoGEFs beeinflussen sich beide Proteine wechselseitig.  $G_{\alpha_{12/13}}$  steigert einerseits die Affinität von RhoGEFs zu RhoA, gleichzeitig wirken RhoGEFs aber auch als GTPase-aktivierende Proteine gegenüber  $G_{\alpha_{12/13}}$  und begrenzen somit das Signal durch negative Rückkopplung. RhoGEFs beeinflussen die Konformation von RhoA und erleichtern dadurch den Austausch von GDP zu GTP. Dies führt zu einer weiteren Konformationsänderung von RhoA, welche schließlich die Bindung zur Rho-Kinase (ROK) ermöglicht. RhoGAPs hemmen RhoA, indem sie dessen GTPase-Aktivität steigern. Im Komplex mit RhoA ist die Aktivität der Rho-Kinase (ROK) erhöht (Puetz et al., 2009; Siehler, 2009). ROK ist eine Serin/Threoninkinase, welche durch Phosphorylierung der regulatorischen Myosinbindungsuntereinheit die MLCP hemmt. Dies führt zu erhöhten Spiegeln von Myosinköpfen mit phosphorylierten regulatorischen leichten Ketten. Eine verstärkte glattemuskuläre Kontraktion wird auf diese Weise bei gleichbleibender

intrazellulärer Calciumkonzentration erreicht; die Calciumsensitivität ist also erhöht. Die Aktivität von RhoA wird auch von RhoGDIs durch Bildung eines inaktiven Komplexes gehemmt. RhoA kann in diesem Komplex nicht durch RhoGEFs aktiviert werden (*Puetz et al., 2009; Siehler, 2009*).

In vielen glattmuskulären Zellen wird die Hemmung der MLCP über die  $G\alpha_{12/13}$ -RhoA-ROK Achse und die Aktivierung der MLCK über  $G\alpha_q$  gleichzeitig durch einen GPCR vermittelt. Das über  $G\alpha_q$  vermittelte Signal wird also durch  $G\alpha_{12/13}$  verstärkt.

Stickstoffmonoxid (NO) wird im Organismus kontinuierlich freigesetzt, um den basalen pulmonalen und systemischen Gefäßtonus zu regulieren (*Stamler et al., 1994*). Stickstoffmonoxid (NO) tritt direkt mit der sarkoplasmatisch/endoplasmatisch retikuläre Calcium-ATPase (SERCA) in Wechselwirkung und steigert deren Aktivität. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Calciumkonzentration gesenkt, was zu einer Relaxation von Herz-, Skelett- und Gefäßmuskulatur führt (*Adachi et al., 2004*). Stickstoffmonoxid NO relaxiert die glatte Gefäßmuskulatur indirekt durch eine cGMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase G. Diese phosphoryliert ATP-sensitive Kaliumkanäle und erhöht deren Aktivität, was zu einer Hyperpolarisation der Zellemembran führt (*Han, 2001; Brayden, 2002*). Spannungsgesteuerte Calciumkanäle schließen sich, der intrazelluläre Calciumspiegel sinkt und der glatte Muskel relaxiert.

Auch die Proteinkinase A ist nach Aktivierung durch cAMP in der Lage, ATP-sensitive Kaliumkanäle zu phosphorylieren. In einigen Blutgefäßen sind ATP-sensitive Kaliumkanäle unter Basalbedingungen aktiv, um den physiologischen Ruhetonus zu regulieren (*Brayden, 2002*). Die starken vasodilatorischen Effekte der aktivierten Proteinkinase G beinhalten auch ein Absenken der Calciumsensitivität: Nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase G ist auch aktiviertes RhoA in der Lage, inaktive Komplexe mit RhoGDIs zu bilden (*Sauzeau et al., 2000*). Zusätzlich besitzt die durch cGMP aktivierte Proteinkinase G die Fähigkeit, direkt an die regulatorische Myosinbindungsuntereinheit der MLCP zu binden und deren Aktivität zu steigern (*Surks et al., 1999*). Beide Vorgänge reduzieren die vorhandene Menge an Myosinköpfen mit phosphorylierten regulatorischen leichten Ketten und hemmen somit den kontraktile Prozess.



## 1.2. $\alpha$ -Adrenozeptoren in dermalen Gefäßen

Die Kontraktion von Hautarterien ist ein essentieller Mechanismus der Thermoregulation des Körpers (*Charkoudian, 2003*). Nervenendigungen des Sympathikus setzen als Reaktion auf Kältereize Noradrenalin frei, welches postsynaptische  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren in Hautarterien aktiviert und dadurch eine Gefäßkontraktion hervorruft, die den Wärmeverlust des Körpers reduziert. Im Gegensatz zu postsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren, die ein verstärktes Ansprechen bei lokaler Kälteeinwirkung zeigen, scheinen kontraktile  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren keine Rolle bei der Thermoregulation zu spielen (*Flavahan, 1991*).

### 1.2.1. Das Raynaud-Phänomen

Das Raynaud-Phänomen ist durch eine episodische aber langanhaltende spastische Kontraktion von Arterien, Arteriolen und arteriovenösen Shunts der Finger und Zehen gekennzeichnet. Die dadurch bedingte Mangeldurchblutung verursacht hauptsächlich Schmerzen und Parästhesien, kann aber in einigen Fällen auch zu Gewebeschäden führen (*Cooke und Marshall, 2005*). Die Prävalenz des Raynaud-Phänomens liegt in westlichen Industrieländern bei ca. 3 - 5%, Frauen sind häufiger betroffen als Männer (*Block und Sequeira, 2001*). Die Ursachen des Raynaud-Phänomens sind höchstwahrscheinlich multifaktoriell, beinhalten aber eine verstärkte Aktivierung sympathischer Nerven in Reaktion auf Kälte und emotionalen Stress (*Cooke und Marshall, 2005*). Im Gegensatz zum idiopathischen, primären Raynaud-Phänomen tritt das sekundäre Raynaud-Phänomen im Zusammenhang mit einer systemischen Grunderkrankung wie Sklerodermie, rheumatoider Arthritis oder Lupus erythematodes auf (*Block und Sequeira, 2001*).

Es konnte gezeigt werden, dass beim idiopathischen, primären Raynaud-Phänomen die Funktion der Digitalarterien im Sinne einer erhöhten Kälteempfindlichkeit postsynaptischer  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren beeinträchtigt ist (*Freedman et al., 1995*). Untersuchungen zur Charakterisierung des Rezeptorsubtyps haben demonstriert, dass es zu einem verstärkten Ansprechen von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren unter Einwirkung von akuter Kälte kommt (*Flavahan, 2008*). Zur symptomatischen Behandlung des primären Raynaud-Phänomens werden Calciumkanalblocker (Nifedipin, Amlodipin, Felodipin) als Mittel der Wahl empfohlen. Andere gefäßerweiternde Substanzen sind entweder schlechter wirksam, oder zeigen nicht vertretbare unerwünschte Effekte (*Vinjar und Stewart, 2008; Levien, 2010*).

### 1.2.2. Die Rattenschwanzarterie als Modell der kutanen Zirkulation

Ratten regulieren ihre Körpertemperatur über die Durchblutung ihres Schwanzes (*Rand et al., 1965*). Deshalb wurde in der Studie „*Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity*“ die Rattenschwanzarterie als Bioassay der kutanen Zirkulation genutzt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die Rattenschwanzarterie empfänglich für Kontraktionen durch Noradrenalin ( $\alpha$ -Adrenozeptoragonist), Phenylephrin ( $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonist) und UK14304 ( $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist) ist. Die durch Noradrenalin in Gegenwart von Idazoxan ( $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonist) verursachte Kontraktion wird sowohl durch  $\alpha_{1A}$ - als auch  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptoren vermittelt (*Jähnichen et al., 2004*). In einem in vitro Model zur Untersuchung der schädigenden Effekte von Vibrationen auf die Gefäßfunktion, ist gezeigt worden, dass UK14304 in Rattenschwanzarterien eine vasokonstriktorische Reaktion hervorruft, die durch den potenten  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptorantagonist MK912 inhibiert werden kann (*Krajnak et al., 2006*). Die antagonistischen Eigenschaften von MK912 in diesem Model gleichen denen, welche dieser Wirkstoff in der Mausschwanzarterie besitzt, wo das Ansprechen von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren durch Kälte verstärkt werden konnte (*Chotani et al., 2000*). Im glatten Muskel der Rattenschwanzarterie wurde mRNA für den  $\alpha_{2C}$ - und  $\alpha_{2AD}$ -Subtyp, aber keine mRNA für den  $\alpha_{2B}$ -Subtyp detektiert (*McNeill et al., 1999*). Dieser Befund schließt die Existenz eines  $\alpha_{2B}$ -Rezeptorproteins in der Rattenschwanzarterie aus.

Bei 32°C, der physiologischen Temperatur des Rattenschwanzes (*Neild und Kotecha, 1987*), rief der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist UK14304 keine oder nur eine marginale Vasokonstriktion in Gefäßringen von Rattenschwanzarterien hervor. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Laboratorien, welche UK14304 benutzten, um die durch den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor vermittelte Gefäßkontraktion in diesem Gewebe zu untersuchen (*Templeton et al., 1989; MacLean und McGrath, 1990; Harker et al., 1991; Redfern et al., 1995*). Wurde allerdings der Gefäßtonus mit Vasopressin, Endothelin, Serotonin, Angiotensin II, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  oder Kaliumchlorid erhöht, beobachtete man eine Verstärkung der durch Stimulation von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren hervorgerufenen kontraktile Effekte (*Templeton et al., 1989; MacLean und McGrath, 1990; Harker et al., 1991; Redfern et al., 1995; Schümann und Lues, 1983*). Diese Verstärkung steht wahrscheinlich mit dem zuvor erfolgten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Zusammenhang (*Templeton et al., 1989*).

Wenn Ringe der Rattenschwanzarterie mit moderaten Konzentrationen von Serotonin vorbehandelt wurden, konnte in der Studie „*Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on*

vasoreactivity" eine deutlich verstärkte kontraktile Reaktion auf UK14304 beobachtet werden. Die Vorstimulation der Rattenschwanzarterie mit physiologischen Konzentrationen eines Vasokonstriktors könnte Vorgänge initiieren, die natürlicherweise in der Haut vorkommen, da das vasokonstriktorische System der Haut auch in thermoneutraler Umgebung tonisch aktiv ist (Charkoudian, 2003; Cooke et al., 1997). Serotonin aktiviert 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren in der Rattenschwanzarterie (Frenken und Kaumann, 1987; Pertz und Elz, 1995; Watts, 1996). 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren sind mit G<sub>q/11</sub>-Proteinen gekoppelt und erhöhen somit über Inositoltrisphosphat den intrazellulären Calciumspiegel, gefolgt von einer glattmuskulären Kontraktion (Hannon und Hoyer, 2008).

Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der Rho-Kinase (ROK) die Translokation von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren aus dem Golgi-Apparat zur Zellmembran auslöst (Flavahan, 2008). Der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonist Phenylephrin und der Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptoragonist U46619 waren in der Lage, ROK-abhängige Kontraktionen in der Rattenschwanzarterie zu verursachen (Tsai und Jiang, 2006). In Experimenten an der Mauseorta und der Femoralarterie des Kaninchens konnte gezeigt werden, dass auch Serotonin über den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor die ROK aktivieren kann (Nuno et al., 2007; Nishihira et al., 2008). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass bei der durch 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren induzierten Vorstimulation der Rattenschwanzarterie eine Aktivierung der ROK mit beteiligt sein könnte.

### **1.2.3. Die Charakterisierung des kontraktilen $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyps in Rattenschwanzarterien**

Die pharmakologische Charakterisierung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyps basierte auf einer Auswahl von  $\alpha_2$ -Antagonisten (WB4101, MK912, Rauwolscin, Yohimbin, ARC239, Prazosin und BRL44408), welche hohe Selektivität für  $\alpha_{2C}$ - im Vergleich zu  $\alpha_{2A/2D}$ -Adrenozeptoren im cerebralen Cortex der Ratte aufweisen (Uhlén et al., 1992). Die Substanzen wirkten im verwendeten Konzentrationsbereich in moderat vorstimulierten Ringen der Rattenschwanzarterie als reine kompetitive Antagonisten gegen UK14304. Eine Analyse der Schild Regression von allen sieben getestete Antagonisten zeigte, dass UK14304 mit diesen Substanzen um dieselbe Bindungsstelle des postsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptors konkurriert (Kenakin, 1993). Die an der Rattenschwanzarterie bestimmten Affinitäten für WB4101, MK912, Rauwolscin und Yohimbin stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die bei Untersuchungen an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren des cerebralen Cortex der Ratte bestimmt wurden (Uhlén et al., 1992). Die Affinität (voller pA<sub>2</sub>) von 10.05 für MK912, dem stärksten Antagonisten dieser Studie, ist in guter Übereinkunft mit Messwerten, die an vibrierten Rattenschwanzarterien (Krajnak et al., 2006), Rattenschwanzvenen (Yao und Abel, 2008)

und Mausschwanzarterien (*Chotani et al., 2000*) gewonnen wurden. In diesen Geweben wird die kontraktile Reaktion auf UK14304 von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelt. Die für BRL44408 an der Rattenschwanzarterie bestimmte Affinität (voller  $pA_2$ ) von 7.2 ist gering und weicht stark von den Bindungsdaten ab, die für  $\alpha_{2A/2D}$ -Adrenozeptoren am cerebralen Cortex der Ratte bestimmt wurden (*Uhlén et al., 1992*).

Die Ergebnisse der funktionellen Studien konnten durch Western-Blot Experimente bestätigt werden. Mausschwanzarterien und Schweinepulmonalvenen wurden als Kontrollgewebe eingesetzt, da die Existenz von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren in diesen Geweben bereits beschrieben wurde (*Chotani et al., 2000; Görnemann et al., 2007*). Die Bande mit ca. 43 kDa, welche sowohl in Proben der Rattenschwanzarterie, Mausschwanzarterie als auch der Schweinepulmonalvene detektiert wurde, stimmt mit der des  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorproteins aus bisher von anderen Arbeitsgruppen publizierten Studien überein (*Chotani et al., 2000; Small et al., 2006*). Bei der Bande mit ca. 95 kDa könnte es sich um ein Dimer des  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorproteins handeln (*Small et al., 2006*).

#### **1.2.4. Der Einfluss von Temperaturänderungen auf die durch $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelten kontraktile Effekte**

Experimente mit UK14304 an nicht vorkontrahierten Mausschwanzarterien zeigten, dass bei 37°C ausschließlich der  $\alpha_{2A/2D}$ -Adrenozeptorsubtyp an der durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelten Gefäßkontraktion beteiligt ist (*Chotani et al., 2000*). In vorstimulierten Rattenschwanzarterien löste UK14304 bei 37°C, 32°C oder 27°C jedoch vergleichbare kontraktile Effekte aus, die durch Rauwolscin im selben Ausmaß gehemmt werden konnten. Dies spricht für eine von der Temperatur unabhängige Beteiligung des  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptors an der durch UK14304 ausgelösten kontraktile Reaktion. Speziesunterschiede oder abweichende Experimentalbedingungen könnten für die offensichtliche Diskrepanz zwischen den Beobachtungen an Ratten und den Beobachtungen von *Chotani et al. (2000)* an Mäusen verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu den Effekten von UK14304 bei 37°C, 32°C oder 27°C induzierte schnelles Abkühlen von 37°C auf 27°C ein verstärktes Ansprechen der Rattenschwanzarterie auf UK14304. Diese Beobachtung konnte allerdings nur in vorstimulierten Gefäßringen gemacht werden. Anschließendes Erwärmen auf 37°C hob die kälteinduzierte Verstärkung der maximalen durch UK14304 ausgelösten Kontraktion wieder auf. Es könnte sich daher bei der Vorstimulation durch Serotonin, welche den physiologischen Gefäßtonus imitiert, um eine Grundvoraussetzung für ein verstärktes Ansprechen von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren auf Kälte

handeln. Die durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelte Gefäßkontraktion wurde von Rauwolscin vor und nach der Kühlung im selben Ausmaß inhibiert. Das spricht für eine Beteiligung des  $\alpha_{2C}$ -Subtyps sowohl bei 37°C als auch nach Verringerung der Temperatur auf 27°C. Diese Experimente zeigen, dass der akute Kältereiz, also das Absenken der Organbadtemperatur innerhalb eines kurzen Zeitraumes, eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der  $\alpha_{2C}$ -vermittelten Effekte in der Gefäßmuskulatur spielt und nicht die Umgebungstemperatur per se. Es besteht der Verdacht, dass die ROK auch durch Kältereize aktiviert werden kann und dann eine Translokation von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren auslöst, was ein verstärktes Ansprechen von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten wie UK14304 ermöglicht (Jeyaraj et al., 2001; Bailey et al., 2004 und 2005).

### **1.2.5. Zusammenfassung**

Die Studie „*Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity*“ zeigt, dass die durch UK14304 induzierte Gefäßkontraktion in moderat mit Serotonin vorstimulierten Rattenschwanzarterien durch den  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor hervorgerufen wird. Eine verstärkte Kontraktilität in Reaktion auf akute Kältereize ist nur in vorstimulierten Rattenschwanzarterien detektierbar und kann durch anschließendes Erwärmen wieder aufgehoben werden. Da  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren an der Pathologie des Raynaud-Phänomens beteiligt sein könnten (Block und Sequeira, 2001), stellt die isolierte Rattenschwanzarterie ein geeignetes in vitro Bioassay dar, um neue Wirkstoffe für die Behandlung dieses Syndroms zu testen.

### 1.2.6.

## Postjunctional $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity

Florian Jantschak, Alexander M. Popp, Raik A. Hofmann, Carlos M. Villalón, David Centurión und Heinz H. Pertz

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Received: 4 May 2010 / Accepted: 6 September 2010

<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0564-z>

Design:	Pertz, Jantschak
Organbadstudien:	Jantschak, Hofmann, Popp
Western Blotting:	Jantschak
Auswertung:	Jantschak
Manuskript:	Pertz, Jantschak, Villalón, Centurión

### 1.3. $\alpha$ -Adrenozeptoren in pulmonalen Gefäßen

Der pulmonale Blutkreislauf beinhaltet Arterien, Mikrogefäße und Venen, die ausgehend von der rechten Herzkammer nacheinander angeordnet sind (Gao und Raj, 2005). Neben den Mikrogefäßen wird ein erheblicher Anteil des pulmonalen Gefäßwiderstandes von kleineren Pulmonalarterien und Pulmonalvenen verursacht (Nagasaka et al., 1984; Raj und Chen, 1986; Raj et al., 1990 und 1992). Die Kontraktion im pulmonalen Gefäßbett wird durch postsynaptische  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelt (Hyman und Kadowitz, 1985; Shebuski et al., 1986 und 1987). In vitro Studien an isolierten Lungenarterien der Ratte haben gezeigt, dass der  $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptorsubtyp die Kontraktionen von Phenylephrin und Noradrenalin vermittelt (Hussain und Marshall 1997; Oriowo et al., 2003). Pulmonalvenen enthalten sowohl  $\alpha_1$ - als auch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren, wie in Versuchen an Hunden demonstriert werden konnte (Ohlstein et al., 1989). Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die durch postsynaptische  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelte Kontraktion in Schweinepulmonalvenen durch den  $\alpha_{2C}$ -Subtyp verursacht wird (Görnemann et al., 2007).

#### 1.3.1. Das Höhenlungenödem

Das Höhenlungenödem ist ein lebensbedrohliches nicht-kardiogenes Lungenödem, das nach schnellem Aufstieg in Höhen über 2500 Meter auftreten kann und oft in Zusammenhang mit körperlicher Anstrengung steht (Bärtsch et al., 2007; Hall et al., 2011). Sauerstoffmangel führt dann zu einer intensiven Kontraktion von Widerstandsgefäßen der Lunge, was sich in pulmonalem Hochdruck äußert. Dieser ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entstehung eines Höhenlungenödems. Der genaue Mechanismus, der unter Sauerstoffmangel zu einer pulmonalen Gefäßkontraktion führt, ist nicht abschließend geklärt, allerdings hat eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems unter hypoxischen Bedingungen einen verstärkenden Effekt (Duplain et al., 1999; Bärtsch et al., 2007; Hainsworth et al., 2007). Die erhöhte kardiale Auswurfleistung und eine zusätzliche Erhöhung der Sympathikusaktivität unter körperlicher Belastung führen zu einem weiteren Anstieg des pulmonalen arteriellen Drucks. In vielen Fällen ist die körperliche Belastung unter hypoxischen Bedingungen der entscheidende Auslöser, welcher letztendlich zur Bildung eines Lungenödems führt (Bärtsch et al., 2007; Berger et al., 2011). Unter Sauerstoffmangel waren die Aktivität des sympathischen Nervensystems und der Anstieg des pulmonalen arteriellen Blutdrucks bei Personen mit einem Höhenlungenödem in der Krankengeschichte signifikant höher als bei einer vergleichbaren Kontrollgruppe (Duplain et al., 1999). Individuelle Prädisposition scheint also die Höhenverträglichkeit zu beeinflussen (Duplain et al., 1999; Hall et al., 2011). Als frühe Symptome des Höhenlungenödems werden nach zwei bis fünf Tagen Belastungs-

dyspnoe und ein trockener Husten beobachtet. Später folgt dann Ruhedyspnoe mit intensiven Hustenanfällen und einem rötlichen schaumigen Auswurf (*Bärtsch et al., 2007; Hall et al., 2011*). Die Entstehung von Höhenlungenödem kann verhindert werden, wenn der pulmonale arterielle Druck durch Nifedipin oder Phosphodiesterase-Hemmer gesenkt wird. Medikamentöse Prävention ist allerdings nur notwendig, wenn ein schneller Aufstieg unvermeidlich ist (*Bärtsch et al., 2007; Luks et al., 2010*). Zur Therapie werden hauptsächlich Sauerstoff und Nifedipin eingesetzt, wenn möglich sollte aber immer versucht werden, auf geringere Höhen abzustiegen (*Bärtsch et al., 2007; Luks et al., 2010*).

### **1.3.2. Das neurogene Lungenödem**

Das neurogene Lungenödem ist eine lebensbedrohliche Komplikation einer Verletzung des Zentralnervensystems. Es entwickelt sich rasch und verschlechtert zusätzlich den kritischen Allgemeinzustand des Patienten (*Baumann et al., 2007; Sedý et al., 2008*). Neurogene Lungenödeme unterscheiden sich im klinischen Bild nicht von akuten Lungenödem, treten aber ohne Beteiligung eines Linksherzversagens auf und stehen immer in Verbindung mit einer Läsion des ZNS (*Baumann et al., 2007*). Neurogene Lungenödeme finden sich gehäuft nach Subarachnoidalblutungen (*Solenski et al., 1995; Muroi et al., 2008*) und traumatischen Kopfverletzungen (*Rogers et al., 1995; Simmons et al., 1969*). Neben einer Infektion sind neurogene Lungenödeme ein Hauptgrund dafür, dass nur 20% aller Organspender eine für die Transplantation brauchbare Lunge liefern (*Trulock, 1997*). Eine verletzungsbedingte Erhöhung des Hirndrucks beeinflusst Triggerzonen in Hypothalamus und Medulla Oblongata und führt über eine starke Aktivierung des Sympathikus zu einer exzessiven Sekretion von Katecholaminen. Dies bewirkt eine ausgeprägte Kontraktion pulmonaler Arterien und Venen, die den Gefäßwiderstand und den Blutdruck in der Lunge ansteigen lässt und schließlich die Bildung eines Lungenödems verursacht (*Baumann et al., 2007*). Wenn die zugrunde liegende Hirnverletzung adäquat behandelt wird, klingen neurogene Lungenödeme zwar meist von allein wieder ab, sie sollten aber besondere Beachtung finden, wenn ein Patient mit akuten Hirnverletzungen kurzatmig wird und die Sauerstoffsättigung des Blutes abfällt. Da eine spezifische Therapie nicht existiert, wird nur symptomatisch behandelt (*Baumann et al., 2007*).

### 1.3.3. Der Einfluss des intrazellulären Calciumspiegels auf die kontraktile Effekte von UK14304

Erste in vitro Versuche der Studie „*Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries*“ zeigten, dass  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren scheinbar nur eine untergeordnete Rolle bei der Kontraktion von Pulmonalarterien spielen. Die durch UK14304 hervorgerufenen Effekte waren im Gegensatz zu Pulmonalvenen äußerst gering. Interessanterweise sprachen pulmonale  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bei Versuchen an Hunden deutlich besser an, wenn der basale pulmonale Gefäßtonus durch Gabe von U46619, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , oder Serotonin erhöht wurde (Shebuski et al., 1986). U46619, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , und Serotonin vermitteln Gefäßkontraktionen über  $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren (Alexander et al., 2011). Im Gegensatz zu Pulmonalarterien, konnte in Pulmonalvenen der basale Gefäßtonus durch 3  $\mu$ M Verapamil, 100  $\mu$ M 2-APB oder 0.03  $\mu$ M P1075 stark gesenkt werden. Verapamil hemmt spannungsgesteuerte Calciumkanäle. P1075 öffnet ATP-sensitive Kaliumkanäle. Die dadurch verursachte Hyperpolarisation relaxiert die glatte Gefäßmuskulatur (Gojkovic-Bukarica et al., 2011). Speichergesteuerte Calciumkanäle werden durch 100  $\mu$ M 2-APB gehemmt, ohne dabei spannungsgesteuerte Calciumkanäle zu beeinflussen (Bootman et al., 2002). Die Fähigkeit von Verapamil, 2-APB und P1075 den basalen Gefäßtonus in Pulmonalvenen abzusenken, spricht für einen hohen intrazellulären Calciumspiegel in diesem Gewebe. Das könnte bedeuten, dass UK14304 unter normalen in vitro Experimentalbedingungen in Pulmonalvenen einen durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelten Effekt hervorruft, während Pulmonalarterien eine zusätzliche kontraktile Stimulation benötigen, um eine UK14304-induzierte Gefäßkontraktion zu zeigen. Allerdings konnten in einer Reihe von isolierten Arterien und Venen auch relaxierende  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren gefunden werden. Agonisten bewirken dort eine endothelabhängige Relaxation, welche von Inhibitoren der Stickstoffmonoxid-Synthase aufgehoben werden kann (Vanhoutte, 2001). In Pulmonalarterien von Kaninchen wurde die kontraktile Reaktion auf Noradrenalin, UK14304 oder elektrische Stimulation in Gegenwart des Stickstoffmonoxid-Synthase Inhibitors  $N^{\omega}$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME) verstärkt (MacLean et al., 1993a und 1993b).

Es wurde deshalb untersucht, ob eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und/oder eine Hemmung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase die durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelte Kontraktion von Pulmonalarterien verstärken kann. (S)-(-)-Bay K 8644, ein Calciumkanalagonist aus der Gruppe der Dihydropyridine, erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsgesteuerter Calciumkanäle und kann so den glattmuskulären Calciumspiegel erhöhen (Navedo et al., 2005). (S)-(-)-Bay K 8644 dient als spezifischer Stimulus, da eine Gefäßkontraktion ausgelöst wird, die allein auf einer Erhöhung der intrazellulären

Calciumkonzentration beruht, ohne die Rho-Kinase zu beeinflussen (Alvarez et al., 2010). Die durch UK14304 induzierte Kontraktion von Pulmonalarterien wurde durch (S)-(-)-Bay K 8644 enorm verstärkt, aber auch L-NAME, ein Inhibitor der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, konnte in den Experimenten die Reaktion auf UK14304 steigern.

Der beobachtete Effekt von L-NAME könnte auf verschiedene Weise zustande kommen: Postsynaptische  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermitteln kontraktile Effekte, denen endotheliale  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren durch relaxierende Effekte über die Bildung von Stickstoffmonoxid entgegenwirken. Wenn allerdings die Bildung von Stickstoffmonoxid durch L-NAME blockiert wird, kommt die durch UK14304 ausgelöste Kontraktion stärker zur Geltung. Die basale Freisetzung von Stickstoffmonoxid ist entscheidend für die Aufrechterhaltung eines niedrigen Gefäßtonus im pulmonalen Gefäßbett (Zapol et al., 1994). Eine Blockade der basalen Produktion von Stickstoffmonoxid durch L-NAME würde einerseits die durch direkte Wechselwirkung mit der Proteinkinase G bedingte Aktivierung der MLCP verringern, andererseits könnte sich die Aktivität der Rho-Kinase erhöhen, da die Proteinkinase G nun weniger RhoA phosphoryliert und inaktiviert (Bolz et al., 2003; Sauzeau et al., 2000). In beiden Fällen würde die Calciumsensitivität des glatten Gefäßmuskels erhöht. Da Stickstoffmonoxid die Aktivität der SERCA steigert, ist L-NAME auch in der Lage, die intrazelluläre Calciumkonzentration zu erhöhen (Cohen et al., 1999; Adachi et al., 2004).

Die Studie „*Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries*“ demonstriert, dass eine mechanische Entfernung des Endothels keine Verstärkung der durch UK14304 vermittelten Kontraktion hervorruft. Weiterhin zeigte (S)-(-)-Bay K 8644 gleichartige Effekte auf die Gefäßkontraktion mit UK14304, unabhängig davon ob das Endothel vorhanden war oder nicht. In Schweinepulmonalarterien sind also keine relaxierenden  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren zu finden. Die Wirkung von L-NAME ist deshalb nicht durch eine Hemmung der endothelabhängigen Relaxation zu erklären. Die Beobachtung, dass die  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion in der Gegenwart von L-NAME in Pulmonalarterien verstärkt ist, könnte aber durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration begründet werden. Die Hemmung der basalen Bildung von Stickstoffmonoxid senkt auch die Aktivität der SERCA. Die Beobachtung, dass die Ansprechbarkeit von Pulmonalarterien auf UK14304 durch (S)-(-)-Bay K 8644 und L-NAME um denselben Betrag erhöht wurde und dass eine Kombination beider Wirkstoffe keine weitere Steigerung dieses Effektes bewirkt, spricht für eine herausragende Rolle der intrazellulären Calciumkonzentration bei  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-vermittelten Kontraktionen in diesem Gewebe.

Noradrenalin und Adrenalin aktivieren sowohl  $\alpha_1$ - als auch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren. Demzufolge gibt es keinen endogenen, körpereigenen Agonisten, der selektiv an  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren wirkt. In Experimenten, in denen Labortiere oder isolierte Gewebe benutzt werden, rufen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten wie UK14304 nur geringe kontraktile Effekte hervor. Wird allerdings die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht, lässt sich eine verstärkte Reaktion messen. Die Aktivierung von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermittelt eine glattnuskuläre Kontraktion, allerdings auf verschiedenen Wegen. Die schnelle Rekrutierung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum nach Stimulation des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors über  $G_{q/11}$  schafft vielleicht erst die Voraussetzung für eine Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren. Diese sind  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelt und eine glattnuskuläre Kontraktion wird zumindest teilweise durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium induziert (*Bhattacharya und Roberts, 2003*). Es könnte also eine physiologische Verbindung zwischen postsynaptischen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bestehen. (S)-(-)-Bay K 8644 kann den maximalen kontraktile Effekt von Noradrenalin nicht verstärken, da die Grundvoraussetzung für eine Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren schon durch Noradrenalin selbst erfüllt ist. Der notwendige Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels wird über die Aktivierung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermittelt. Eine Blockade von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch Prazosin ( $\alpha_1$ -Adrenozeptorantagonist) hemmt indirekt auch den durch  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren hervorgerufenen kontraktile Anteil der noradrenergen Reaktion. Wird allerdings der intrazelluläre Calciumspiegel in Gegenwart von Prazosin durch (S)-(-)-Bay K 8644 erhöht, ist eine signifikant geringere Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Noradrenalin, verbunden mit einer Senkung des Hill-Slopes zu beobachten.

#### **1.3.4. Die Charakterisierung des kontraktile $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyps in Pulmonalarterien**

Um den kontraktile  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyp von Schweinepulmonalarterien zu bestimmen, wurden die Effekte von UK14304 in Anwesenheit und Abwesenheit von MK912 und BRL44408 in Gefäßringen untersucht, deren basaler Tonus durch (S)-(-)-Bay K 8644 erhöht war. MK912 zeigt eine 15fach erhöhte Selektivität für  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren gegenüber  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2B}$ -Adrenozeptoren. BRL44408 zeigt 30 - 120fach erhöhte Selektivität für  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren gegenüber  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren (*Uhlén et al., 1994*). Die Ergebnisse sprechen eindeutig für die Beteiligung von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren an den durch UK14304 hervorgerufenen kontraktile Effekten in Pulmonalarterien.

Eine Affinität (scheinbarer  $pA_2$ ) von 9.75 und 9.62 für 0.3 und 1.0 nM MK912 ist in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen, welche für diesen Wirkstoff in Schweinepulmonalvenen,

Rattenschwanzarterien und Digitalvenen des Pferdes bestimmt wurden. In allen genannten Geweben wird die durch UK14304 hervorgerufene Kontraktion über den  $\alpha_{2C}$ -Subtyp vermittelt (Görnemann et al., 2007; Jantschak et al., 2010; Zerpa et al., 2010). An klonierten humanen  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren wurde für BRL44408 ein  $pK_i$  von 8.25, an klonierten humanen  $\alpha_{2B}$ -Adrenozeptoren ein  $pK_i$  von 6.19 ermittelt (Uhlén et al., 1994). Eine Affinität (scheinbarer  $pA_2$ ) von 7.40 für 0.1 und 0.5  $\mu$ M BRL44408, ist nicht mit der Existenz von  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2B}$ -Adrenozeptoren zu vereinbaren und ähnelt dem Wert, der in Schweinepulmonalvenen bestimmt wurde (Görnemann et al., 2007). Die Ergebnisse der funktionellen Studien konnten durch Western-Blot Experimente bestätigt werden. Als Kontrolle wurden Proben aus Schweinepulmonalvenen genutzt, da die Existenz von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren in diesem Gewebe bereits nachgewiesen wurde (Görnemann et al., 2007). Für das  $\alpha_{2C}$ -Rezeptorprotein wurden in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp und den experimentellen Bedingungen verschiedene molekulare Spezies identifiziert. Die Bande mit ca. 50 kDa von humaner Lunge zeigt vermutlich das kernglykosylierte Protein des  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptors (Chotani und Flavahan, 2011). Es war nicht möglich, eine Bande mit ca. 70 - 80 kDa zu identifizieren, welche ein umfangreicher glykosyliertes Rezeptorprotein repräsentiert (Chotani und Flavahan, 2011). Die Bande mit ca. 45 kDa welche in Schweinepulmonalvenen und Schweinepulmonalarterien detektiert wurde, scheint die nicht glykosylierte molekulare Variante des  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptors zu sein (Chotani und Flavahan, 2011).

### 1.3.5. Zusammenfassung

Die Studie „*Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries*“ zeigt, dass  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren starke Kontraktionen in der mit (S)-(-)-Bay K 8644 vorstimulierten Schweinepulmonalarterie vermitteln. Sowohl in Pulmonalarterien als auch in Pulmonalvenen ist der  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor der dominierende  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtyp (Görnemann et al., 2007). Beide Gefäße sind für einen großen Anteil des pulmonalen Gefäßwiderstandes verantwortlich. Verletzungen des Zentralnervensystems und körperliche Belastung unter hypoxischen Bedingungen verursachen eine verstärkte Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Interessanterweise, konnte die Entwicklung von neurogenen Lungenödemen verhindert werden, wenn Ratten mit Yohimbin, einem  $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonisten, vorbehandelt wurden (Sedý et al., 2012). Bei Menschen, die an Höhenlungenödemen litten, senkte Phentolamin, ein nichtselektiver  $\alpha$ -Adrenozeptorantagonist, den pulmonalen arteriellen Blutdruck und Gefäßwiderstand stärker als Nifedipin (Hackett et al., 1992). Daher könnten sich Antagonisten von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren als wirkungsvolle Arzneistoffe für Behandlung und Prophylaxe von Krankheiten erweisen, bei denen der pulmonale Gefäßtonus pathologisch erhöht ist.

### 1.3.6.

## Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries

Florian Jantschak und Heinz H. Pertz

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Received: 5 January 2012 / Accepted: 10 February 2012

<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0741-3>

Design:	Jantschak, Pertz
Organbadstudien:	Jantschak
Western Blotting:	Jantschak
Auswertung:	Jantschak
Manuskript:	Jantschak, Pertz

## 2. Der $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptor als Zielstruktur für Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie

### 2.1. Einleitung

Es wird vermutet, dass die Schizophrenie vorwiegend auf einer Fehlfunktion des Striatums basiert. Eine erhöhte präsynaptische dopaminerge Aktivität in diesem subcorticalen Gebiet könnte für einen Teil der Symptome bei vielen Patienten verantwortlich sein (*Howes und Kapur, 2009; Simpson et al., 2010*). Ziele der Behandlung akuter und chronischer schizophrener Syndrome sind eine Reduzierung der Krankheitssymptome, eine Verbesserung der Lebensqualität und die Rezidivprophylaxe (*Lehmann et al., 2004*). Mit verfügbaren Neuroleptika können Positivsymptome wie Halluzinationen und wahnhaftes Verhalten gut behandelt werden (*Meltzer et al., 2012*). Die Negativsymptomatik einer Schizophrenie wie Affektverflachung, emotionaler Rückzug, Sprachverarmung und Antriebslosigkeit spricht oft schlecht auf eine medikamentöse Therapie mit Neuroleptika an und bleibt eine große klinische Herausforderung. Persistierende Negativsymptome nach einer akuten Krankheitsphase schränken Patienten stark in ihrer Lebensqualität ein und erschweren eine gesellschaftliche Wiedereingliederung (*Reynolds, 2004; Phan und Kreys, 2011*).

Typische Neuroleptika zeichnen sich durch hohe antagonistische Potenz an Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren aus, besitzen aber dadurch ein beträchtliches Risiko, extrapyramidale Symptome und erhöhte Prolaktinspiegel zu verursachen (*Baldessarini und Tarazi, 2006*). Im Gegensatz dazu zeigen atypische Neuroleptika neben hoher Affinität zu  $D_2$ -Rezeptoren, auch erhöhte Affinität zu Serotonin-Rezeptoren ( $5-HT_{2A}$ ,  $5-HT_{2C}$ ,  $5-HT_7$ ), Histamin  $H_1$ -Rezeptoren sowie  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptorsubtypen (*Tabelle 1*) (*Kroeze et al., 2003; Roth et al., 2004; Meltzer et al., 2012*). Interessanterweise besteht in Bezug auf  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren immer eine Präferenz für die Blockade von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren (*Kroeze et al., 2003; Kalkman und Loetscher, 2003*). Das Risiko extrapyramidale Symptome zu verursachen, ist bei atypischen Neuroleptika geringer ausgeprägt als bei typischen Neuroleptika (*Reynold, 2004; Leucht et al., 2009*). Die unter Therapie mit atypischen aber auch einigen typischen Neuroleptika auftretende ausgeprägte Gewichtszunahme korreliert mit der hohen Affinität dieser Wirkstoffe zum Histamin  $H_1$ -Rezeptor (*Kroeze et al., 2003*).

In therapeutisch wirksamen Konzentrationen blockieren alle zugelassenen Neuroleptika Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren des Striatums (*Frankle und Laruelle, 2002; Howes und Kapur, 2009*). Durch die Blockade präsynaptischer  $D_2$ -Autorezeptoren kommt es bei Ratten dort allerdings zunächst zu einem kompensatorischen Anstieg der extrazellulären Dopamin-

konzentration (*Westerink et al., 2001; Gobert et al., 2004*). Dies hat vermutlich keinen klinisch wahrnehmbaren Effekt, da postsynaptische D<sub>2</sub>-Rezeptoren in gleichem Maße blockiert werden und die dopaminerge Neurotransmission wirksam unterdrücken. Nach chronischer Gabe von Haloperidol über einen Zeitraum von 12 - 14 Tagen fiel bei Ratten die Konzentration von Dopamin allerdings wieder ab und lag schließlich sogar unter dem Basalwert (*Amato et al., 2011*). Auch die nach elektrischer Stimulation freigesetzte Menge an Dopamin verringerte sich (*Amato et al., 2011*). Die Hemmung von D<sub>2</sub>-Autorezeptoren könnte trotzdem die erhöhte präsynaptische Aktivität im Striatum schizophrener Patienten negativ beeinflussen und an den häufig beschriebenen Problemen beim Absetzen vieler Neuroleptika mit beteiligt sein (*Howes und Kapur, 2009*).

Clozapin nimmt aufgrund seiner vergleichsweise niedrigen Affinität zu Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der atypischen Neuroleptika ein. Trotzdem zeichnet sich Clozapin durch überlegene antipsychotische Potenz aus, sowohl Positivsymptome als auch Negativsymptome können deutlich verringert werden (*Leucht et al., 2009*). Auch bei der Therapie von behandlungsresistenter Schizophrenie wurden Erfolge erzielt (*Kane et al., 1988; Terevnikov et al., 2010*). Clozapin (5 mg/kg) zeigt einen robusten Effekt auf das Verhalten von Ratten (*Natesan et al., 2008*) und führt zu einer Blockade von ~95% der striatalen  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren.  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren werden unter gleichen Bedingungen zu ~65%, D<sub>2</sub>-Rezeptoren nur zu ~45% blockiert (*Marcus et al., 2005*). Daher ist ein  $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonismus möglicherweise an der hervorragenden antipsychotischen Wirkung von Clozapin beteiligt (*Marcus et al., 2005*). Trotz ausgezeichneter Wirksamkeit besteht neben einer ausgeprägten Gewichtszunahme das Risiko, unter Behandlung mit Clozapin eine Agranulozytose oder Myokarditis zu entwickeln.

## **2.2. Die Bedeutung von $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren bei der Behandlung schizophrener Syndrome**

$\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren sind im Zentralnervensystem sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch lokalisiert (*Lee et al., 1998; Bücheler et al., 2002*). Als präsynaptische Autorezeptoren regulieren sie dort die Freisetzung von Noradrenalin (*Bücheler et al., 2002; Devoto et al., 2006*). Die hypotensiven und sedierenden Effekte von Clonidin und UK14304 werden hauptsächlich durch den Agonismus dieser Wirkstoffe an präsynaptischen  $\alpha_{2A}$ -Autorezeptoren vermittelt (*MacDonald et al., 1997; Philipp et al., 2002*). Im Gegensatz zu  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptoren, welche in verschiedensten Gebieten des Gehirns zu finden sind, konzentriert sich die Präsenz von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren auf begrenzte Areale. Im Striatum von Maus, Ratte und Mensch ist eine hohe  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptordichte zu finden (*Scheinin et al.,*

1994; Uhlén et al., 1997; Holmberg et al., 2003; Fagerholm et al., 2008). Der  $\alpha_{2B}$ -Adrenozeptor scheint im Gehirn nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Scheinin et al., 1994; Uhlén et al., 1997).

Der Einfluss eines Arzneistoffs auf die konditionierte Vermeidungsreaktion (CAR) von Ratten ist ein allgemein akzeptiertes Tiermodell, um dessen antipsychotische Potenz abschätzen zu können (Porsolt et al., 2010). Der potente  $\alpha_2$ -Antagonist Idazoxan (1.5 mg/kg) induzierte eine Besetzung von ~75% der  $\alpha_{2A}$ -, aber von ~90% der  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren im Hirn der Ratte (Marcus et al., 2005). Die alleinige Gabe von Idazoxan (1.5 mg/kg) hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse eines CAR-Tests. Wenn Idazoxan aber zusätzlich zu geringen Dosen des  $D_2/D_3$ -Rezeptorantagonisten Racloprid (0.05 mg/kg) gegeben wurde, erhöhte es deutlich dessen Effekt auf die CAR von Ratten (Hertel et al., 1999a). Ähnliches konnte beobachtet werden, wenn Idazoxan (1.5 mg/kg) geringen Dosen von Haloperidol (0.025 mg/kg) oder Risperidon (0.25 mg/kg) beigefügt wurde (Wadenberg et al., 2007; Marcus et al., 2010). Risperidon zeigt zwar hohe Affinität zu  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren, eine Gabe von 0.5 mg/kg führte aber nur zu einer Besetzung von ~12% der  $\alpha_{2A}$ - und von ~19% der  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren im Hirn der Ratte (Marcus et al., 2010).

Racloprid, Haloperidol und Risperidon bewirken aufgrund niedriger Affinität oder geringer Dosis nur eine unzureichende Besetzung von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren. Die Kombination mit Idazoxan, einem potenten  $\alpha_2$ -Antagonisten, senkte die CAR in allen drei Studien auf ein Level, welches ausreichende antipsychotische Aktivität erwarten lässt und mit der alleinigen Gabe dieser Wirkstoffe nicht zu erreichen war. Die minimale effektive Dosis bestimmter Neuroleptika könnte also reduziert werden, wenn man diese mit potenten  $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonisten kombiniert. Auf dieser Basis könnte die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Therapie verbessert werden.

Die Schlussfolgerungen, welche aus den Versuchen an Ratten gezogen wurden, können durch die Ergebnisse klinischer Studien bestätigt werden. Wenn man das typische Neuroleptikum Fluphenazin mit dem  $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonisten Idazoxan kombinierte, verbesserten sich die Krankheitssymptome schizophrener Patienten signifikant stärker als unter Behandlung mit Fluphenazin allein (Litman et al., 1996). Mirtazapin gehört zur Gruppe der tetrazyklischen Antidepressiva und zeichnet sich wie Idazoxan durch hohe Affinität zu  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren aus. Der Nutzen einer Kombinationstherapie von typischen Neuroleptika mit Mirtazapin (30 mg) wurde in Studien von Berk et al. (2001), Joffe et al. (2009) und Terevnikov et al. (2010) untersucht. In diesen Studien führt eine zusätzliche Gabe von Mirtazapin übereinstimmend zu einer signifikant stärkeren Verbesserung der Krankheits-

symptome als unter alleiniger Therapie mit einem typischen Neuroleptikum. Es ließ sich in keiner der genannten Studien ein Einfluss von Mirtazapin oder Idazoxan auf die Symptomatik einer Depression oder Angsterkrankung bei den behandelten Patienten feststellen. Dem entsprechend zeigte eine Kombination von Haloperidol mit dem als Antidepressivum genutzten selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer Reboxetin keinen zusätzlichen Effekt (*Schutz und Berk, 2001*). Die positive Wirkung von Mirtazapin und Idazoxan kann also nicht auf antidepressive Eigenschaften dieser Wirkstoffe zurückgeführt werden. In den mit Mirtazapin behandelten Studiengruppen litten die Patienten häufig unter einer starken Sedierung und einer Gewichtszunahme, was auf die hohe Affinität von Mirtazapin zu Histamin  $H_1$ -Rezeptoren zurückzuführen ist. Das Auftreten von extrapyramidalen Symptomen wurde von Mirtazapin oder Idazoxan nicht signifikant beeinflusst (*Litman et al., 1996; Berk et al., 2001; Joffe et al., 2009; Terevnikov et al., 2010*). Eine Blockade von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren kann also extrapyramidale Symptome beim Menschen nicht verhindern, obwohl präklinische Versuche an Ratten andere Ergebnisse zeigten (*Imaki et al., 2009; Wadenberg et al., 2007*).

Hohe Affinität eines Neuroleptikums zu  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren im Allgemeinen und im Vergleich zu  $D_2$ -Rezeptoren ist eine Grundvoraussetzung, um eine hohe striatale  $\alpha_{2C}$ -Besetzung innerhalb therapeutischer Blutkonzentrationen zu erreichen. Ein Quotient der Affinitäten ( $K_i$  in nM) von  $D_2/\alpha_{2C} \geq 1$  spricht deshalb für eine substantielle Beteiligung der  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptorblockade am antipsychotischen Profil eines Arzneistoffs (*Kalkman und Loetscher, 2003*). Quotienten für  $D_2/\alpha_{2C} \geq 1$  findet man für die atypischen Neuroleptika Quetiapin (8.4), Clozapin (7.5), Risperidon (5.0) und Olanzapin (1.2) (*Kroeze et al., 2003*). Typische Neuroleptika zeigen Quotienten  $\leq 1$  (*Tabelle 1*) (*Kroeze et al., 2003; Schotte et al., 1996*). Patienten die mit den atypischen Neuroleptika Quetiapin, Clozapin, Risperidon oder Olanzapin behandelt wurden, bekamen in der Studie von *Berk et al. (2009)* zusätzlich zu ihrer Standardmedikation ein Placebo oder Mirtazapin (30 mg). Die Gabe von Mirtazapin zeigte hier keinen signifikanten Effekt. Die eingesetzten atypischen Neuroleptika weisen eine höhere Affinität zu  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren als zu Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren auf ( $D_2/\alpha_{2C} \geq 1$ ). Die zusätzliche Gabe von Mirtazapin kann also die  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptorokkupation nur geringfügig erhöhen. Positive Effekte, wie sie bei Kombination von typischen Neuroleptika mit Mirtazapin oder Idazoxan beobachtet wurden, traten deshalb nicht auf.

Der potente  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist UK14304 hemmte während elektrischer Stimulation konzentrationsabhängig die Freisetzung von [ $^3H$ ]Noradrenalin aus Hirnpräparaten der Maus. Es war allerdings auch möglich, die Freisetzung von [ $^3H$ ]Dopamin mit UK14304 stark zu vermindern. Sowohl  $\alpha_{2A}$ - als auch  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren können für die beobachteten Effekte

verantwortlich gemacht werden und sind demzufolge in der Lage, neben Noradrenalin auch die Freisetzung von Dopamin zu beeinflussen (Bücheler et al., 2002). Dies scheint vor allem im präfrontalen Cortex von Bedeutung zu sein (Hertel et al., 1999b; Devoto et al., 2006).

Neuroleptika beeinflussen über eine Blockade von Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren die Neurotransmission im Striatum. Dies wirkt sich positiv auf die Symptomatik schizophrener Syndrome aus. Da sowohl Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren als auch α<sub>2C</sub>-Adrenozeptoren intrazelluläre Effekte über ein inhibitorisches G-Protein vermitteln, wäre es möglich, über die Blockade von α<sub>2C</sub>-Adrenozeptoren zusätzliche antipsychotische Effekte zu erzielen (Litman et al., 1996; Zhang et al., 1999).

**Tabelle 1:** Affinitäten (K<sub>i</sub> in nM) verschiedener Psychopharmaka zu rekombinanten humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in Radioligand-Bindungsstudien (Jasper et al., 1998; Toll et al., 1998; Millan et al., 2002; Kroeze et al., 2003; Fernández et al., 2005)

	D <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	α <sub>2A</sub>	α <sub>2C</sub>	H <sub>1</sub>	D <sub>2</sub> /α <sub>2C</sub>
Fluphenazin	0.5	30	314	29	21	0.017
Haloperidol	4	53	1130	550	1800	0.007
Trifluoperazin	1.3	13	654	392	63	0.003
Clozapin	256	5.4	142	34	1.2	7.5
Olanzapin	34	2	314	29	2	1.2
Quetiapin	245	101	3630	29	11	8.4
Risperidon	6.5	0.2	151	1.3	15	5
Idazoxan	>5000	>5000	9.8	20	nicht bestimmt	-
Mirtazapin	>5000	69	20	18	1.6	-
Aripiprazol	0.7	8.7	74	37	30	0.019
Tergurid	0.8	4.8	0.3	0.8	339	1

### 2.3. Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten als Neuroleptika

Aripiprazol, ein partieller Agonist an Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren, bietet eine neue therapeutische Option bei der Behandlung der Schizophrenie (Croxall, 2012). Die Wirksamkeit ist mit der von Risperidon vergleichbar, wobei Aripiprazol den Serum-Prolaktinspiegel nur wenig beeinflusst (Potkin et al., 2003; Chang et al., 2007). Andere in Deutschland zugelassene Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten (Lisurid, Pramipexol, Ropinirol) werden hauptsächlich zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt. D<sub>2</sub>-Partialagonisten können sowohl die Signaltransduktion in cortikalen Strukturen mit Dopaminmangel erhöhen, als auch den dopaminergen Tonus in Arealen mit dopaminergem Überaktivität vermindern (Stahl, 2008).

Voraussetzung für die antipsychotische Wirksamkeit eines D<sub>2</sub>-Partialagonisten ist eine hohe D<sub>2</sub>-Rezeptorokkupation in therapeutischen erreichbaren Konzentrationen bei gleichzeitig niedriger intrinsischer Aktivität, um die dopaminerge Neurotransmission im Striatum ausreichend stark senken zu können (Natesan et al., 2011). Eine Restaktivität im nigrostriatalen System bleibt allerdings bestehen und verringert das Risiko Dyskinesien und extrapyramidale Symptome zu entwickeln (Potkin et al., 2003). Bis heute ist Aripiprazol der einzige als Neuroleptikum zugelassene Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonist. Andere D<sub>2</sub>-Partialagonisten wie OPC-4392, Bifeprunox oder Tergurid lieferten zwar erfolgversprechende Ergebnisse in vorklinischen Untersuchungen, scheiterten aber in Humanstudien aufgrund geringer Wirksamkeit (Benkert et al., 1995; Stahl, 2008).

Durch alternatives Splicen werden zwei Isoformen des D<sub>2</sub>-Rezeptors gebildet. Ein zusätzlicher Abschnitt von 29 Aminosäuren in der dritten intrazellulären Schleife unterscheidet den D<sub>2L</sub> (long) Rezeptor vom D<sub>2S</sub> (short) Rezeptor (Giros et al., 1989). Der D<sub>2S</sub>-Rezeptor ist in der Substantia nigra stärker vertreten als der D<sub>2L</sub>-Rezeptor. Im Striatum sind beide Isoformen in vergleichbarer Menge exprimiert (Khan et al., 1998). Dort wird der D<sub>2S</sub>-Rezeptor hauptsächlich auf Axonen, aber auch auf den Zellkörpern und Dendriten dopaminergener Neurone gefunden, wohingegen der D<sub>2L</sub>-Rezeptor stärker auf GABAergen und cholinergen Neuronen exprimiert wird (Khan et al., 1998). Im Striatum scheint die D<sub>2S</sub>-Isoform überwiegend als präsynaptischer Autorezeptor zu fungieren, während die D<sub>2L</sub>-Isoform postsynaptisch modulierende Effekte vermittelt (Khan et al., 1998). Die funktionelle Konsequenz einer Blockade postsynaptischer D<sub>2L</sub>-Rezeptoren wäre eine Abnahme der Neurotransmission, die der primären dopaminergen Dysregulation nachgeschaltet ist (Howes und Kapur, 2009).

Es existiert kein wissenschaftlicher Konsens bezüglich der Wechselwirkung von Aripiprazol und anderen Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten wie Preclamol, OPC-4392 und Terguride mit der langen und kurzen Isoform des D<sub>2</sub>-Rezeptors in den einzelnen anatomischen Strukturen des menschlichen Gehirns. In Abhängigkeit von Rezeptordichte und Signaltransduktion des verwendeten in vitro Bioassays sowie der eingesetzten Wirkstoffkonzentration kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen: Aripiprazol, Preclamol, OPC-4392 und Tergurid zeigten sowohl partialagonistische Aktivität als auch antagonistische Effekte an humanen D<sub>2L</sub>- und D<sub>2S</sub>-Rezeptoren (Lawler et al., 1999; Burris et al., 2002; Shapiro et al., 2003; Newman-Tancredi et al., 2002a; Tadori et al., 2005). Im Vergleich zu OPC-4392, Bifeprunox oder Tergurid zeigte Aripiprazol die niedrigste intrinsische Aktivität an Dopamin D<sub>2S</sub>-Rezeptoren (Tadori et al., 2005, 2009; Natesan et al., 2011).

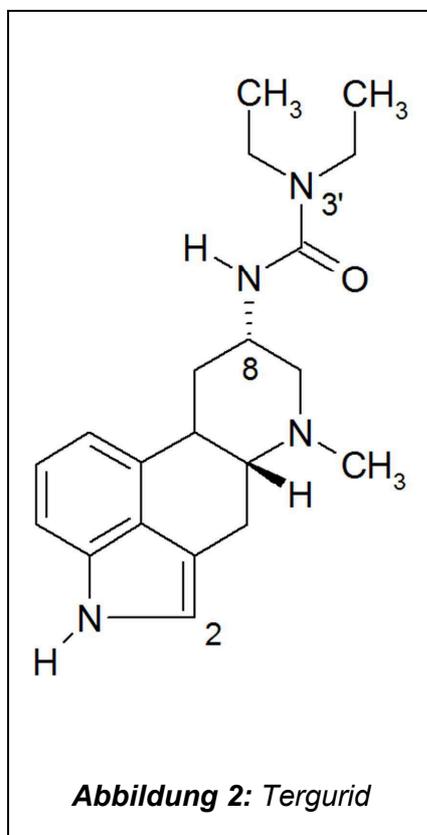
Ein Anstieg der c-Fos-Konzentration in Hirnregionen wie dem Nucleus accumbens und dem dorsolateralen Striatum ist als ein Marker für antipsychotische Effektivität potentieller Neuroleptika identifiziert worden (*Robertson et al., 1994; Sumner et al., 2004*). Im Gegensatz zu Tergurid, Bifeprunox und OPC-4392 waren sowohl Haloperidol als auch Aripiprazol in der Lage, die c-Fos-Expression im Nucleus accumbens und im dorsolateralen Striatum der Ratte konzentrationsabhängig zu erhöhen (*Natesan et al., 2011*). Aripiprazol besitzt neben seiner hohen Affinität zu D<sub>2</sub>-Rezeptoren ausgeprägte Affinität zu Serotoninrezeptoren (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> und 5-HT<sub>7</sub>) sowie zu α<sub>2C</sub>-Adrenozeptoren und Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren (*Tabelle 1*) (*Kroeze et al., 2003*).

#### **2.4. Tergurid**

Bei Tergurid [1,1-Diethyl-3-(6-methyl-8α-ergolinyl)harnstoff] handelt es sich um einen gut klassifizierten Arzneistoff, der zur Behandlung des Parkinson-Syndroms, der Schizophrenie, der Hyperprolaktinämie und des Fibromyalgie-Syndroms am Menschen erprobt wurde (*Corsini et al., 1985; Olbrich und Schanz, 1988 und 1991; Martignoni et al., 1995; Ciccarelli und Camanni, 1996; Distler et al., 2010*). Tergurid erfüllt die Kriterien eines nichtselektiven Arzneistoffs, der mit einer Vielzahl von Rezeptoren interagiert, die in der Pathophysiologie und Therapie der Schizophrenie eine Rolle spielen (*Tabelle 1*) (*Roth et al., 2004*). Trotz eines potenten Antagonismus an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren sowie partialagonistischer Aktivität an Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren (*Newman-Tancredi et al., 2002a,b*) ist Tergurid nicht antipsychotisch wirksam (*Olbrich und Schanz, 1991*). Die im Vergleich zu Aripiprazol merklich höhere intrinsische Aktivität an D<sub>2S</sub>-Rezeptoren könnte dafür verantwortlich sein (*Tadori et al., 2005; Natesan et al., 2011*). Die Negativsymptome einer Patientengruppe, die nach einem akuten psychotischen Schub mit Tergurid behandelt wurde, verringerten sich allerdings deutlich (*Olbrich und Schanz, 1988*). Zusätzlich zeichnet sich Tergurid durch subnanomolare Affinität zu α<sub>2C</sub>-Adrenozeptoren aus (*Millan et al., 2002*). Diese stellen eine für die Behandlung der Schizophrenie interessante pharmakologische Zielstruktur dar. Ein Quotient der Affinitäten (K<sub>i</sub> in nM) von D<sub>2</sub>/α<sub>2C</sub> ≥ 1 kann ein Indiz für die gute Wirksamkeit eines atypischen Neuroleptikums sein (*Kalkman und Loetscher, 2003*). Tergurid zeichnet sich außerdem durch gute Verträglichkeit aus. Unter der Therapie traten bei einigen Patienten Übelkeit, Schlaflosigkeit und Kopfschmerzen auf. Diese Nebenwirkungen waren allerdings nur von geringer Intensität und lediglich zu Beginn der Behandlung zu beobachten (*Olbrich und Schanz, 1988; Krause et al., 1990; Větr et al., 1990; Pacchetti et al., 1993; Distler et al., 2010*). Zusammenfassend betrachtet stellt Tergurid einen interessanten Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer antipsychotischer Wirkstoffe mit Ergolinstruktur dar.

## 2.5. Derivate von Tergurid als Antagonisten an $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren

Zunächst sollten 16 Derivate von Tergurid auf ihre funktionelle Aktivität an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren geprüft werden. Die zu testenden Verbindungen wurden von Alfarma s.r.o. käuflich erworben. Die Effekte von neuartigen Arzneistoffen auf  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren lassen sich sowohl an Schweinepulmonalvenen als auch an Schweinepulmonalarterien untersuchen (Görnemann *et al.*, 2007; Jantschak *et al.*, 2012). Aufgrund der relativ kurzen Versuchsdauer eignet sich die Pulmonalvene des Schweins als zuverlässiges Screening-Assay, um die antagonistische Aktivität der 16 Ergoline im Rahmen der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu studieren. Experimente an Schweinepulmonalarterien sind weniger störanfällig und die Konzentrations-Wirkungskurven zeichnen sich durch stabile Plateaukontraktionen aus. Messwerte lassen sich dadurch sehr genau bestimmen, allerdings mit deutlich höherem Zeitaufwand. Strukturmodifikationen an Position 1, 2, 6, 8 und 3' von Tergurid wurden getestet, um Verbindungen zu identifizieren, welche im Vergleich zur Muttersubstanz erhöhte oder ähnlich hohe Affinität zu  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren aufweisen (Abbildung 2). In weiteren Untersuchungen sollte dann beurteilt werden, wie sich die strukturellen Veränderungen auf die intrinsische Aktivität und die Affinität der Substanzen zu Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren auswirken.



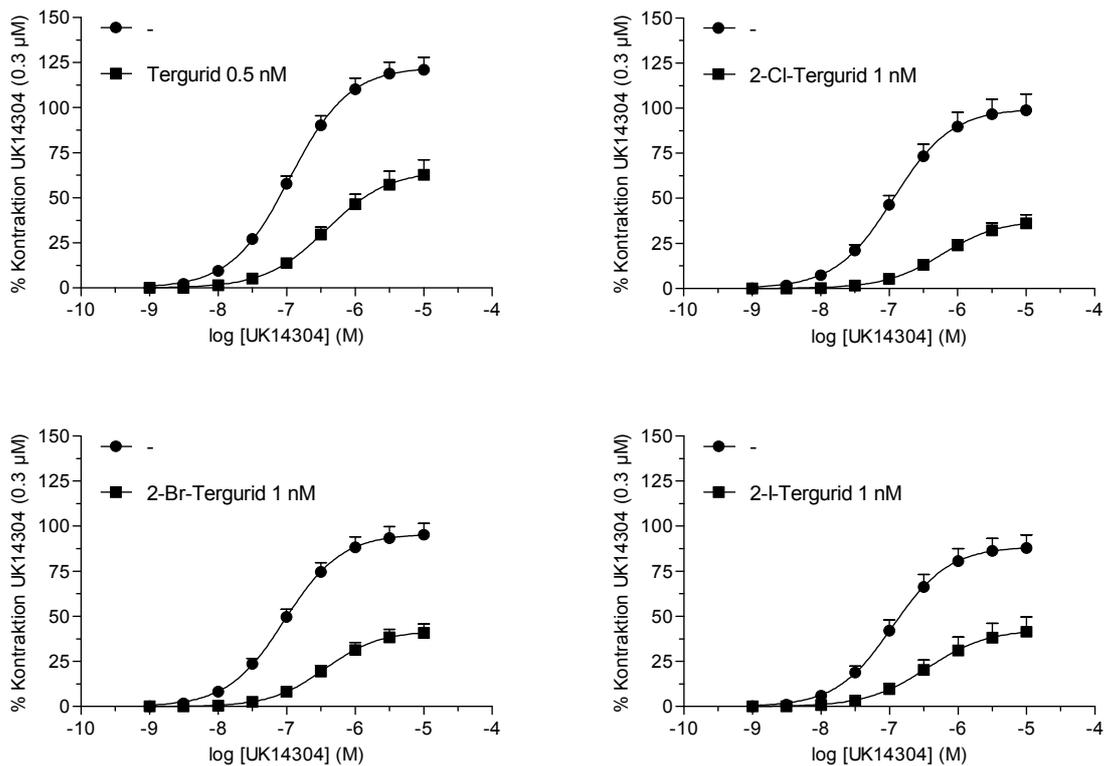
Pulmonalvenen aus Schweinelungen wurden präpariert und in Ringen von 2 - 3 mm Länge und 3 - 4 mm Durchmesser unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen bei 37°C in ein Organbad mit Krebs-Henseleit-Lösung zur isometrischen Messung der Kraftentwicklung gehängt. Die Ruhekraft wurde auf 10 mN eingestellt. Nach einer Stabilisierungsperiode von 90 Minuten wurden die Gefäßringe in mehreren Intervallen einmal mit 45 mM KCl und nachfolgend viermal mit je 0.3  $\mu$ M UK14304 vorkontrahiert. Mit UK14304 wurden dann kumulative Konzentrations-Wirkungskurven in Abwesenheit oder Anwesenheit der Testantagonisten aufgenommen. Die Effekte wurden als Prozent der vierten Vorkontraktion mit UK14304 berechnet. Alle Experimente wurden in ständiger Anwesenheit von Cocain (10  $\mu$ M), Indometacin (5  $\mu$ M), Ketanserin (0.3  $\mu$ M), Mepyramin (0.3  $\mu$ M), Prazosin (0.03  $\mu$ M) und Propranolol (1  $\mu$ M) durchgeführt.

Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist UK14304 verursachte konzentrationsabhängige Kontraktionen von Gefäßringen der Schweinepulmonalvenen ( $pEC_{50}$   $6.89 \pm 0.06$ ,  $n = 20$ ). Die agonistische Potenz von UK14304 stimmte mit der von *Görnemann et al. (2007)* ermittelten überein. Alle untersuchten Verbindungen wirkten antagonistisch gegen UK14304. Modifikationen an Position 1, 6, 8 und 3' des Ergolinpharmakophors führen zu einer Abnahme der Affinität zu  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren (*Tabelle 2*).

**Tabelle 2:** Antagonistische Potenz (scheinbarer  $pA_2$ ) von Tergurid-Derivaten gegen UK14304 an Pulmonalvenen des Schweins. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Substanz	$pA_2 \pm$ SEM (n)
Tergurid	$9.66 \pm 0.08$ (7)
<i>Modifikation in Position 1</i>	
1-Methyltergurid	$9.02 \pm 0.09$ (6)
1-Allyltergurid	$8.57 \pm 0.12$ (6)
<i>Modifikation in Position 2</i>	
2-Chlorotergurid	$9.62 \pm 0.03$ (7)
2-Bromotergurid	$9.49 \pm 0.11$ (7)
2-Iodotergurid	$9.44 \pm 0.07$ (7)
<i>Modifikation in Position 6</i>	
6-Ethyltergurid	$8.75 \pm 0.10$ (5)
6-Nortergurid	$8.72 \pm 0.08$ (5)
<i>Modifikation in Position 8</i>	
8 $\beta$ -Tergurid	<7.0 (4)
<i>Modifikation in Position 3'</i>	
Metergurid	$9.01 \pm 0.08$ (6)
Dipergurid	$8.79 \pm 0.11$ (6)
Pipergurid	$8.09 \pm 0.10$ (6)
Pyrrgurid	$7.67 \pm 0.02$ (5)
N''-Desethyltergurid	$7.94 \pm 0.05$ (5)
<i>Modifikation in zwei Positionen</i>	
1-Allylmetergurid	$8.43 \pm 0.07$ (5)
1-Allyl-6-ethyltergurid	$8.12 \pm 0.10$ (5)
1-Allyl-6-propyltergurid	$7.60 \pm 0.06$ (5)

Die antagonistische Aktivität von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid ist mit der Muttersubstanz Tergurid vergleichbar (Tabelle 2, Abbildung 3). Somit stellt sich eine Modifikation der Struktur in Position 2 durch Halogenierung als besonders interessant heraus. Ein großer lipophiler Substituent wie Brom oder Iod beeinflusst kaum die Aktivität an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren, könnte sich aber auf andere Rezeptoren oder die Bioverfügbarkeit auswirken.



**Abbildung 3:** Hemmung der durch  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelten Kontraktion von UK14304 durch Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid in Schweinepulmonalvenen. Dargestellt sind die Effekte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) als Prozent der vierten Vorkontraktion mit UK14304 (0,3 µM) von sieben Einzelerperimenten.

## 2.6. Die Pharmakologische Charakterisierung von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid

Ziel war es nun die pharmakologischen Eigenschaften von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid an dopaminergen ( $D_2$ ), serotonergen ( $5\text{-HT}_{2A}$ ) adrenergen ( $\alpha_{2C}$ ) und histaminergen ( $H_1$ ) Rezeptoren zu untersuchen, da diese Rezeptoren bei Pathophysiologie und Behandlung der Schizophrenie von Bedeutung sind (Roth et al., 2004). Zusätzlich wurde die Wirkung von 2-Bromotergurid auf Ratten mit präklinischen Tiermodellen getestet.

### 2.6.1. Effekte an Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren

Die Effekte von Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid auf rekombinante humane D<sub>2S</sub>- und D<sub>2L</sub>-Rezeptoren wurden in einem [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay untersucht. Diese Experimente führte Herr Dr. Hübner vom Department Chemie und Pharmazie der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg durch. Dass Tergurid stillen Antagonismus an D<sub>2L</sub>-Rezeptoren und partielle agonistische Effekte an D<sub>2S</sub>-Rezeptoren zeigt, bestätigt die Ergebnisse von *Newman-Tancredi et al. (2002a)* und *Tadori et al. (2005)*. Die geringe Wirksamkeit von Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten wie Tergurid, Preclamol oder OPC-4392 bei der Behandlung der Schizophrenie (*Benkert et al., 1995*) könnte durch deren vergleichsweise hohe intrinsische Aktivität an D<sub>2S</sub>-Rezeptoren begründet sein (*Natesan et al., 2011*). Aripiprazol besitzt eine intrinsische Aktivität, die nur halb so hoch ist wie die von Tergurid, Preclamol oder OPC-4392 (*Natesan et al., 2011*). Es zeigte sich, dass ein Halogenatom in der 2-Position von Tergurid die intrinsische Aktivität um 46 - 68% reduziert. 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid sind bezüglich der Effekte an Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren mit Aripiprazol vergleichbar (*Tabelle 3*).

**Tabelle 3:** *Pharmakologische Parameter von Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid an rekombinanten humanen D<sub>2S</sub>- und D<sub>2L</sub>-Rezeptoren in einem [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von acht Einzelexperimenten.*

	D <sub>2S</sub>		D <sub>2L</sub>
	pEC <sub>50</sub>	i.A.*	pK <sub>B</sub> **
Tergurid	8.96 ± 0.08	0.28	9.87 ± 0.19
2-Chlorotergurid	8.68 ± 0.16	0.15	9.76 ± 0.23
2-Bromotergurid	8.87 ± 0.15	0.12	9.86 ± 0.15
2-Iodotergurid	8.56 ± 0.18	0.09	9.62 ± 0.19

\* *intrinsische Aktivität bezogen auf den vollen Agonisten Quinpirol*

\*\* *berechnet nach Lazareno und Birdsall (1993)*

Aufgrund ihrer niedrigen intrinsischen Aktivität an D<sub>2S</sub>-Rezeptoren und hohen Affinität zu D<sub>2L</sub>- und D<sub>2S</sub>-Rezeptoren könnten 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid in der Lage sein, die striatale Neurotransmission von schizophrenen Patienten wirksam zu verringern. Trotz einer funktionellen Blockade von D<sub>2</sub>-Rezeptoren bleibt eine dopaminerge Restaktivität bestehen, die das Risiko reduzieren könnte, Dyskinesien und unerwünschte extrapyramidale Effekte zu verursachen (*Potkin et al., 2003*).

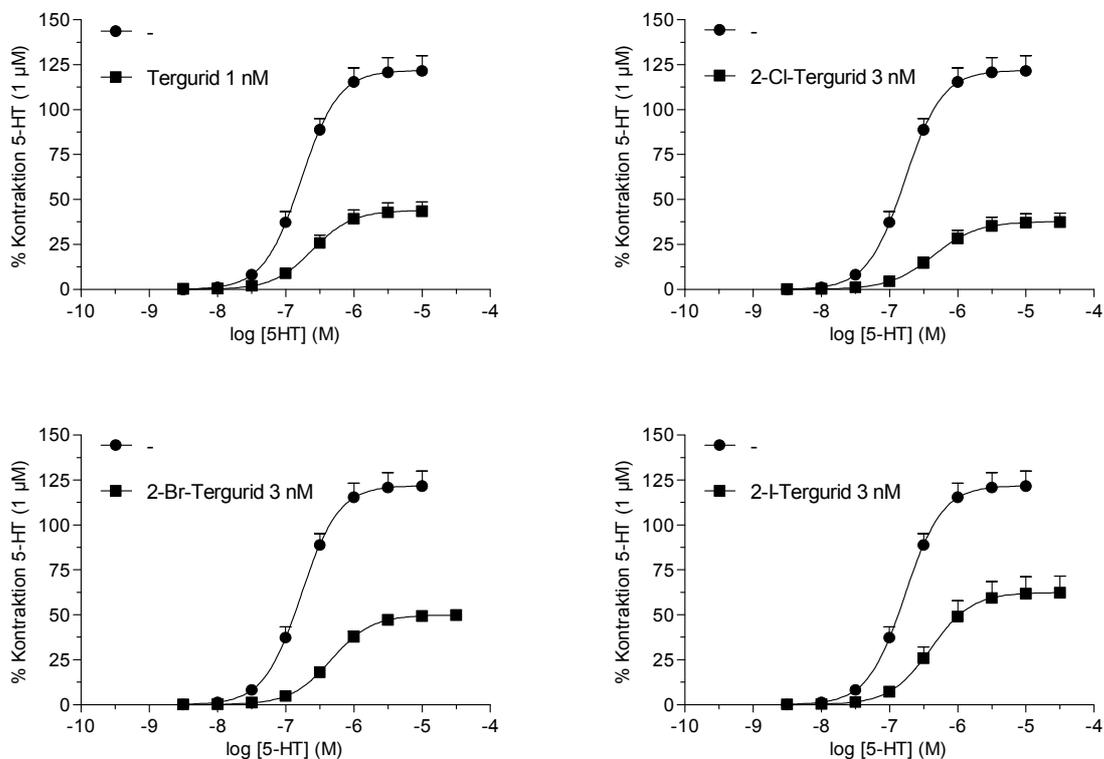
## 2.6.2. Effekte an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren

Eine höhere Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>- im Vergleich zu D<sub>2</sub>-Rezeptoren wird als ein signifikantes, aber nicht exklusives Kriterium beschrieben, um typische von atypischen Neuroleptika zu unterscheiden (Meltzer et al., 2012). Eine hohe Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren könnte sich positiv auf die Negativsymptomatik der Schizophrenie auswirken und das Auftreten von extrapyramidalen Nebenwirkungen verringern (Meltzer et al., 2012). Während atypische Neuroleptika wie Quetiapin, Risperidon, Olanzapin und Clozapin 2 – 47fach höhere Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>- gegenüber D<sub>2</sub>-Rezeptoren aufzeigen (Kroeze et al., 2003), ist dies für Aripiprazol, Iloperidon, Lurasidon und Amisulprid nicht der Fall. Die Affinität von Aripiprazol zu D<sub>2</sub>-Rezeptoren ist höher als zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren, Iloperidon und Lurasidon weisen vergleichbare Affinität zu beiden Rezeptoren auf (Kroeze et al., 2003; Kalkman et al., 2001; Meyer et al., 2009). Amisulprid, ein Benzamidderivat mit hoher Affinität zu Dopamin D<sub>2</sub>- und D<sub>3</sub>-Rezeptoren interagiert nicht mit 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren, zeigt aber trotzdem überdurchschnittliche klinische Effektivität (Natesan et al., 2008; Leucht et al., 2009). Die linke Koronararterie des Schweins dient als etabliertes und zuverlässiges Testassay, um die Effekte von Wirkstoffen auf 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren zu untersuchen (Cushing und Cohen, 1993; Görnemann et al., 2008).

Nach der Präparation aus Schweineherzen wurden Gefäßringe der linken Koronararterie von 3 - 4 mm Länge unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen bei 37°C in ein Organbad mit Krebs-Henseleit-Lösung zur isometrischen Messung der Kraftentwicklung gehängt. Die Ruhekraft wurde auf 20 mN eingestellt. Nach einer Stabilisierungsperiode von 60 Minuten wurden die Präparate zweimal mit 50 mM KCl vorkontrahiert. Nach Zugabe von N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginin Methyl Ester (100 µM) folgte eine weitere Vorkontraktion der Gefäßringe mit Serotonin (1 µM). Kumulative Konzentrations-Wirkungskurven von Serotonin wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit der Testantagonisten aufgenommen. Die Effekte wurden als Prozent der Vorkontraktion mit Serotonin berechnet. Alle Experimente wurden in ständiger Anwesenheit von Cocain (10 µM), Indometacin (5 µM) und Prazosin (0.1 µM) durchgeführt.

Serotonin induzierte konzentrationsabhängige Kontraktionen von Gefäßringen der linken Schweinekronararterie (pEC<sub>50</sub> 6.79 ± 0.06, n = 6). Die agonistische Potenz stimmte mit der von Görnemann et al. (2008) ermittelten überein. Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid zeigten ausgeprägte antagonistische Aktivität gegen Serotonin. Die Verbindungen verursachten zwar nur eine geringe Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven, führen aber zu einer deutlichen Abnahme der maximalen durch Serotonin

ausgelösten Kontraktion (*Abbildung 4*). 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid zeigen dabei etwas geringere antagonistische Aktivität als Tergurid (*Tabelle 4*).



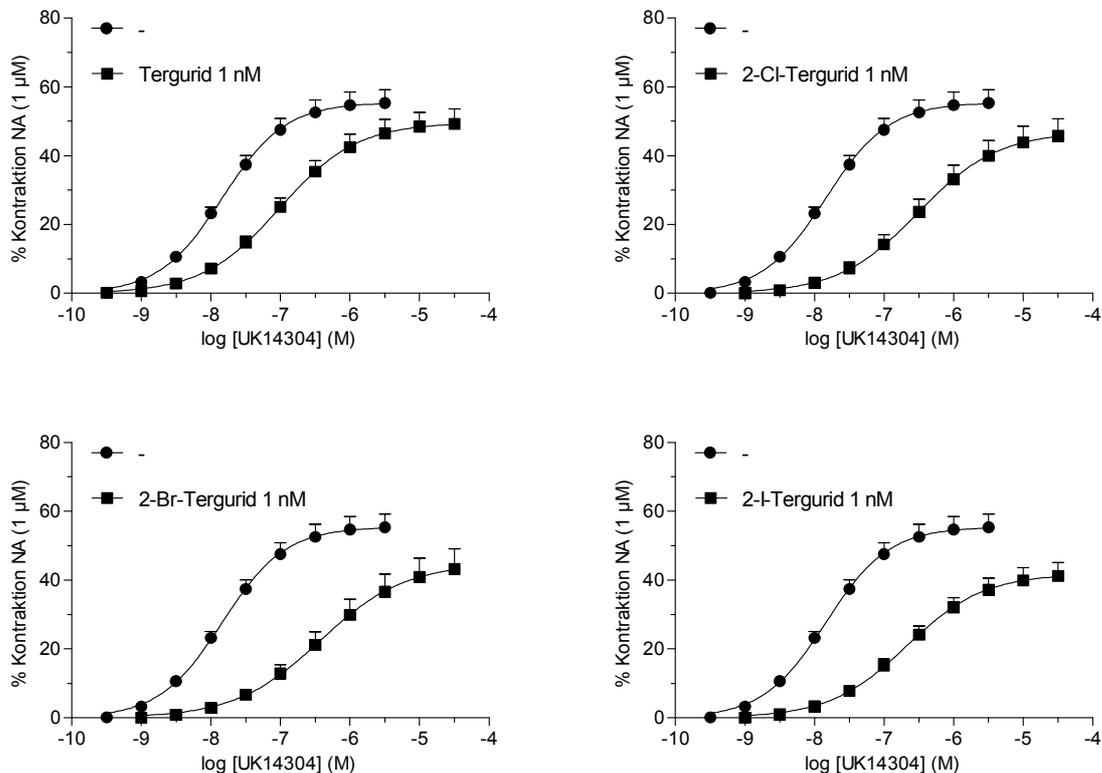
**Abbildung 4:** Hemmung der durch  $5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptoren vermittelten Kontraktion von Serotonin durch Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid in Schweinekoronararterien. Dargestellt sind die Effekte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) als Prozent der Vor- kontraktion mit Serotonin ( $1\ \mu\text{M}$ ) von sechs Einzelexperimenten.

### 2.6.3. Effekte an $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren

Ein Neuroleptikum, welches sowohl Dopamin  $D_2$ -Rezeptoren als auch  $\alpha_{2C}$ -Rezeptoren effektiv blockiert, könnte sich genau wie Clozapin durch gute Wirksamkeit auszeichnen (*Imaki et al., 2009*). Die antagonistische Potenz von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid wurde an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren von Schweinepulmonalarterien bestimmt (*Jantschak und Pertz, 2012*).

Pulmonalarterien aus Schweinelungen wurden präpariert und in Ringen von 2 - 3 mm Länge und 3 - 4 mm Durchmesser unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen bei  $37^\circ\text{C}$  in ein Organbad mit Krebs-Henseleit-Lösung zur isometrischen Messung der Kraftentwicklung gehängt. Die Ruhekraft wurde auf 20 mN eingestellt. Nach einer Stabilisierungsperiode von 90 Minuten wurden die Präparate in mehreren Intervallen viermal mit je  $1\ \mu\text{M}$  Noradrenalin

vorkontrahiert. Nach der Vorstimulation mit 0.1  $\mu\text{M}$  (S)-(-)-Bay K 8644 wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven von UK14304 in Abwesenheit oder Anwesenheit der Testantagonisten aufgenommen. Die Effekte wurden als Prozent der vierten Vorkontraktion mit Noradrenalin berechnet. Die Experimente wurden in ständiger Anwesenheit von Cocain (10  $\mu\text{M}$ ), Prazosin (0.03  $\mu\text{M}$ ) und Propranolol (1  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt.



**Abbildung 5:** Hemmung der durch  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelten Kontraktion von UK14304 durch Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid in Schweinepulmonalarterien. Dargestellt sind die Effekte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) als Prozent der vierten Vorkontraktion mit Noradrenalin (1  $\mu\text{M}$ ) von sechs Einzelexperimenten.

Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist UK14304 verursachte konzentrationsabhängige Kontraktionen der mit 0.1  $\mu\text{M}$  (S)-(-)-Bay K 8644 vorstimulierten Gefäßringe der Schweinepulmonalarterien ( $p\text{EC}_{50}$   $7.84 \pm 0.03$ ,  $n = 6$ ). Die agonistische Potenz von UK14304 stimmte mit der von *Jantschak und Pertz (2012)* ermittelten überein. 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid hemmen  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren der Schweinepulmonalarterien mit subnanomolarer Affinität und sind stärker wirksam als Tergurid (*Abbildung 5, Tabelle 4*).

#### 2.6.4. Effekte an Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren

Die hohe Affinität vieler typischer und atypischer Neuroleptika zum Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptor korreliert mit der Gewichtszunahme, die während einer Therapie mit diesen Wirkstoffen auftritt (Kroeze *et al.*, 2003). Der Einfluss von H<sub>1</sub>-Antagonisten auf die Körpergewichtsentwicklung ist auch tierexperimentell nachgewiesen worden (Deng *et al.*, 2010). Weiterhin sind auch die durch den Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten schlafanstößenden Effekte oft nicht erwünscht, da sie die Lebensqualität vieler Patienten zusätzlich einschränken.

Pulmonalvenen aus Schweinelungen wurden präpariert und in Ringen von 1 - 2 mm Länge und 3 - 4 mm Durchmesser unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen bei 37°C in ein Organbad mit Krebs-Henseleit-Lösung zur isometrischen Messung der Kraftentwicklung gehängt. Die Ruhekraft wurde auf 10 mN eingestellt. Nach einer Stabilisierungsperiode von 60 Minuten wurden die Gefäßringe dreimal mit je 3 µM Histamin vorkontrahiert. Anschließend wurden mit Histamin kumulative Konzentrations-Wirkungskurven in Abwesenheit oder Anwesenheit der Testantagonisten (Referenzantagonist Mepyramin) aufgenommen. Die Effekte wurden als Prozent der dritten Vorkontraktion mit Histamin berechnet. Die Experimente wurden in ständiger Anwesenheit von Cocain (10 µM) und Propranolol (1 µM) durchgeführt.

Histamin verursachte konzentrationsabhängige Kontraktionen von Gefäßringen der Schweinepulmonalvenen ( $pEC_{50}$   $6.68 \pm 0.02$ ,  $n = 4$ ). Die Effekte von Histamin wurden überwindbar von Mepyramin (Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist) gehemmt. Der scheinbare  $pA_2$  ( $8.70 \pm 0.08$ ,  $n= 5$ ) von Mepyramin spricht für eine substantielle Beteiligung von Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren an den von Histamin in diesem Gewebe vermittelten kontraktile Effekten. Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid zeigen im Vergleich zu Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren, 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren und  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren nur äußerst geringe Affinität zu Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren von Schweinepulmonalvenen (Tabelle 3, Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Antagonistische Potenz von Tergurid, 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der Schweinekoronararterie, α<sub>2C</sub>-Adrenozeptoren von Schweinepulmonalarterien und Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren von Schweinepulmonalvenen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von (n) Einzelexperimenten.

	5-HT <sub>2A</sub>	α <sub>2C</sub>	H <sub>1</sub>
	pA <sub>2</sub> <sup>*</sup>	pA <sub>2</sub> <sup>*</sup>	pA <sub>2</sub> <sup>*</sup>
Terguride	9.25 ± 0.09 (6)**	9.77 ± 0.05 (6)	6.55 ± 0.04 (5)***
2-Chloroterguride	8.76 ± 0.04 (6)	10.33 ± 0.08 (6)	6.25 ± 0.05 (4)
2-Bromoterguride	8.78 ± 0.05 (6)	10.45 ± 0.08 (6)	5.96 ± 0.04 (4)
2-Iodoterguride	8.73 ± 0.05 (6)	10.15 ± 0.04 (6)	5.91 ± 0.06 (4)

\* scheinbarer pA<sub>2</sub>

\*\* pD'<sub>2</sub>, nichtkompetitiver Antagonistenparapeter (van Rossum, 1963)

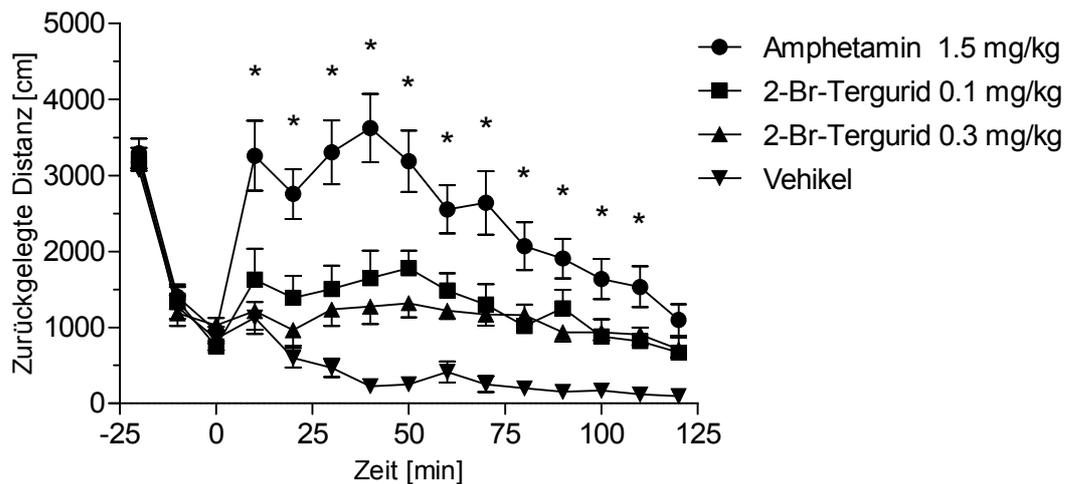
\*\*\* partialagonistische Affinität (Marano und Kaumann, 1976)

## 2.7. Untersuchung von 2-Bromotergurid an präklinischen Tiermodellen

Für die in vivo Experimente wurden präklinische Tiermodelle mit hoher prognostischer Validität benutzt. Diese Versuche führten Herr Dr. Brosda und Herr Franke vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Fachbereich Veterinärmedizin) der Freien Universität Berlin durch. Zunächst wurden die Effekte von 2-Bromotergurid auf das Spontanverhalten von Ratten untersucht. Die Gabe von 2-Bromotergurid dämpfte die motorische Aktivität und das Explorationsverhalten der Versuchstiere im Open-Field. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien, die eine dämpfende Wirkung von Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten auf das Spontanverhalten zeigten (Svensson *et al.*, 1991; Nordquist *et al.*, 2008). Mit dem Katalepsie-Test soll die Wirkung eines Neuroleptikums auf das extrapyramidale System beurteilt werden, um das Auftreten von unerwünschten Effekten beim Menschen abschätzen zu können (Porsolt *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu typischen Neuroleptika tritt kataleptisches Verhalten bei Nagetieren nach Gabe von atypischen Neuroleptika weniger deutlich in Erscheinung (Arnt und Skarsfeldt, 1998; Natesan *et al.*, 2006; Wadenberg *et al.*, 2001). Wie Aripiprazol und anderen Dopamin D<sub>2</sub>-Partialagonisten, löste 2-Bromotergurid keine Katalepsie bei Ratten aus (Natesan *et al.*, 2011).

Die durch Amphetamin induzierte Lokomotion ist ein häufig genutztes Tiermodell zur Identifizierung potentiell antipsychotischer Wirkstoffe (Koch, 2006). Psychotomimetisch-induzierte Hyperlokomotion spiegelt eine Aktivierung von Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren im Nucleus accumbens wieder (Porsolt *et al.*, 2010). Dieser Effekt kann von typischen und atypischen Neuroleptika gehemmt werden und korreliert mit deren antipsychotischer Potenz

(Geyer und Ellenbroek, 2003; Porsolt et al., 2010). Die Beobachtung, dass 2-Bromotergurid (0.1 mg/kg und 0.3 mg/kg) die durch Amphetamin induzierte Lokomotion hemmt, weist klar auf die starken antidopaminergen Eigenschaften dieser Verbindung hin (Abbildung 6). Die Möglichkeit, dass einige der durch 2-Bromotergurid in präklinischen Tests verursachten Effekte von sedierenden Nebenwirkungen beeinflusst wurden, ist aufgrund der niedrigen Affinität zu Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren wenig wahrscheinlich.



**Abbildung 6:** Wirkung der intraperitonealen Gabe von 2-Bromotergurid auf die durch Amphetamin induzierte Lokomotion. Dargestellt sind die Effekte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zehn Ratten. \*:  $P < 0.05$  für 2-Bromotergurid (0.1 mg/kg und 0.3 mg/kg) vs. Amphetamin.

## 2.8. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen, dass es sich bei 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid um Partialagonisten mit geringer intrinsischer Aktivität an humanen D<sub>2S</sub>-Rezeptoren sowie um potente Antagonisten an humanen D<sub>2L</sub>- und 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren handelt. Die in vivo Ergebnisse von 2-Bromotergurid lassen starke antipsychotische Aktivität bei nur geringem Risiko für das Auftreten von extrapyramidalen Symptomen vermuten. Zusätzlich werden  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren von allen drei Verbindungen schon in subnanomolarer Konzentration gehemmt. Dass  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid in geringerer Dosierung als Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren gehemmt werden, deutet auf vorteilhafte therapeutische Eigenschaften hin. Die Substanzen zeigen zudem nur sehr geringe Affinität zu Histamin H<sub>1</sub>-Rezeptoren. Sedierende Effekte und eine medikamenteninduzierte Zunahme des Körpergewichtes sind deshalb nicht zu erwarten. Dieses pharmakologische Profil macht 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid zu aussichtsreichen Kandidaten für nebenwirkungsarme Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie.

### **3. Die antiserotonergen Eigenschaften von Tergurid auf Blutgefäße**

#### **3.1. Einleitung**

Die Einnahme von Ergolinderivaten wie Methysergid, Pergolid oder Cabergolin kann fibrotische Herzklappenschäden verursachen (*Bhattacharyya et al., 2009*). Diese schwere Nebenwirkung führte schließlich zur teilweisen Marktrücknahme der genannten Arzneistoffe. Methysergid setzte man als wirkungsvolles Medikament zur Prophylaxe eines Migräneanfalls ein, Pergolid und Cabergolin werden zur Behandlung des Morbus Parkinson verwendet. Die aufgeführten Substanzen wirken alle als Agonisten an 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren (*Newman-Tancredi et al., 2002b; Rothmann et al., 2000*), deren Aktivierung an der Entstehung von Herzklappenfibrosen und idiopathischen Lungenfibrosen beteiligt sein soll (*Roth, 2007; Yabanoglu et al., 2009; Königshoff et al., 2010; Hutcheson et al., 2011*). Auch das als Appetitzügler genutzte Fenfluramin kann Herzklappenschäden verursachen. Dieser Arzneistoff besitzt allerdings nur geringe Affinität zu 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren (*Rothmann et al., 2000*). Hier ist es der aktive Metabolit, der die fibrotischen Veränderungen von kardiopulmonalem Gewebe verursacht (*Launay et al., 2002; Roth, 2007*). Norfenfluramin zeigt deutlich höhere Affinität und agonistische Potenz an 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren als die Muttersubstanz Fenfluramin (*Rothman et al., 2000*).

#### **3.2. Tergurid hemmt die durch Serotonin induzierte Bildung von pERK1/2**

In der Studie „*Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets, and Valvular Interstitial Cells*“, wurden zunächst die Effekte von Tergurid auf 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren in kardiopulmonalem Gewebe des Schweins untersucht. Tergurid verhielt sich dabei als potenter stiller Antagonist an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der Schweinekoronararterie ( $pD'_2$  9.43). Obwohl Tergurid nahezu identische Affinitäten zu 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren von Mensch und Schwein aufweist (*Nelson et al., 1993*), konnten an rekombinanten humanen 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren partialagonistische Effekte beobachtet werden (*Newman-Tancredi et al., 2002b*). Diese Diskrepanz zeigt, dass sich funktionelle Reaktionen in transfizierten Zellen von Reaktionen in nativem Gewebe unterscheiden können, da transfizierte Zellen oft eine deutlich höhere Rezeptordichte aufweisen (*Sanders-Bush und Canton, 1995*). Tergurid wirkte auch als potenter Antagonist an 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie (scheinbarer  $pA_2$  8.87). Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (*Jähnichen et al., 2005*) und mit Beobachtungen, die an humanen 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren gemacht wurden (*Newman-Tancredi et al., 2002b*). Offensichtlich scheint ein

5-HT<sub>2B</sub>-Agonismus kein Klasseneffekt von Ergolinen zu sein (*Jähnichen et al., 2005*). Neben der Bildung von IP<sub>3</sub> ist eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 am Signaltransduktionsweg von 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren beteiligt (*Xu et al., 2002; Knauer et al., 2009*). Die Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK1/2) fördert Zellteilung, Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, was in Verbindung mit fibrotischen Veränderungen von Herzklappen steht (*Nagai et al., 2005; Connolly et al., 2009; Mebratu und Tesfaigzi, 2009; Oyama und Levy, 2010*). Zusätzlich werden apoptotische Vorgänge nach Aktivierung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren über pERK1/2-abhängige Signalwege gehemmt (*Liu et al., 2013*). Bisherige Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Serotonin und das Ergolinderivat Cabergolin die Bildung von pERK1/2 in Interstitialzellen von Aorten- und Mitralklappen (VICs) des Schweins steigern (*Kekewska et al., 2011*). Die aktuelle Untersuchung demonstriert, dass Tergurid die Bildung von pERK1/2 nicht stimuliert und die durch Serotonin gesteigerte Produktion von pERK1/2 hemmen kann. Man ist sich einig, dass eine Aktivierung von 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren an der Entstehung von fibrotischen Herzklappenschäden mit beteiligt ist (*Roth, 2007; Hutcheson et al., 2011*). Der aktivierende Effekt von Serotonin auf die Bildung von pERK1/2 in VICs von Menschen, Hunden und Schweinen ist allerdings nur für die Blockade durch selektive 5-HT<sub>2A</sub>-Antagonisten empfänglich. 5-HT<sub>2B</sub>-Antagonisten erwiesen sich unter gleichen Bedingungen als wirkungslos (*Connolly et al., 2009; Kekewska et al., 2011*). Experimente an VICs können die Situation in vivo nur eingeschränkt widerspiegeln, da morphologische Veränderungen von Herzklappen als Folge chronischer Prozesse auftreten. Diese Ergebnisse sprechen aber für eine Beteiligung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren an den inhibitorischen Effekten von Tergurid auf die durch Serotonin induzierte Bildung von pERK1/2.

### **3.3. Zusammenfassung**

Die Studie „*Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets, and Valvular Interstitial Cells*“ zeigt, dass Tergurid die durch Serotonin induzierte Bildung von pERK1/2 in VICs vermindert. Dafür ist wahrscheinlich eine Hemmung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren verantwortlich. Tergurid könnte also aufgrund des kombinierten Antagonismus an 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen genutzt werden. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Cabergolin und Pergolid machten deutlich, dass die Kettenlänge des Substituenten an N(6) ein entscheidendes Kriterium für agonistische Aktivität an 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren ist. Substanzen mit Methylsubstituent an dieser Stelle wirken in Organbadstudien als stille Antagonisten (*Jähnichen et al., 2005; Görnemann et al., 2007; Kekewska et al., 2011*). Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass die Einnahme der Ergolinderivate 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid oder 2-Iodotergurid fibrotische Herzklappenschäden verursacht.

### 3.5.

## Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets and Valvular Interstitial Cells

Alexandra Kekewska, Tilo Görnemann, Florian Jantschak, Erika Glusa und Heinz H. Pertz

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Received: 9 September 2011 / Accepted: 28 October 2011

<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.111.187906>

Design:	Pertz, Glusa
Organbadstudien:	Kekewska, Görnemann, Pertz, Glusa
Zellkultur:	Kekewska
Western Blotting:	Jantschak
Auswertung:	Pertz
Manuskript:	Kekewska, Jantschak, Pertz, Glusa

#### 4. Zusammenfassung

Die isolierte Rattenschwanzarterie kann als in vitro Modell der kutanen Zirkulation genutzt werden. Ziel der Studie „*Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity*“ war es, in Organbadstudien und durch Western-Blotting den postsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptor in diesem Gewebe zu charakterisieren. Nach Vorstimulation arterieller Gefäßringe des Rattenschwanzes mit Serotonin wurde die durch den  $\alpha_2$ -Agonisten UK14304 hervorgerufene Kontraktion deutlich verstärkt. Die Effekte von UK14304 konnten unter dieser Voraussetzung durch MK912, Rauwolscin, Yohimbin, WB4101, BRL44408, ARC239 und Prazosin kompetitiv gehemmt werden. Eine Analyse der Schild Regression aller sieben getesteten Antagonisten zeigte, dass UK14304 mit diesen Substanzen um dieselbe Bindungsstelle des postsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptors konkurriert. Die Affinitäten von MK912, Rauwolscin, Yohimbin und WB41104 waren mit Bindungsdaten vergleichbar, welche diese Wirkstoffe an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren des Rattencortex zeigen. Zusätzlich konnte die Existenz von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren durch Western-Blotting bestätigt werden. Nach schnellem Abkühlen von 37°C auf 27°C steigerte sich die maximale durch UK14304 hervorgerufene Kontraktion. Dieser Effekt konnte allerdings nur in vorstimulierten arteriellen Gefäßringen beobachtet werden. Die antagonistische Potenz von Rauwolscin wurde durch das Absenken der Organbadtemperatur nicht beeinflusst. Nach anschließendem Erwärmen auf 37°C verringerte sich die anfänglich verstärkte Kontraktion wieder auf den Ausgangswert. Die Experimente zeigen, dass die durch UK14304 hervorgerufene Kontraktion der mit Serotonin vorstimulierten Rattenschwanzarterie hauptsächlich durch  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren vermittelt wird. Die Stärke der Kontraktion kann durch Einwirkung von Kältereizen erhöht werden. Da  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren an der Pathologie des Raynaud-Phänomens beteiligt sein sollen, kann die isolierte Rattenschwanzarterie als in vitro Bioassay genutzt werden, um neue Wirkstoffe zur Behandlung dieses Syndroms zu untersuchen.

Verletzungen des Zentralnervensystems und körperliche Belastungen unter hypoxischen Bedingungen führen zu einer starken Aktivierung des Sympathikus. Die dadurch ausgelöste pulmonale Gefäßkontraktion kann Lungenödeme verursachen. Ziel der Studie „*Alpha $_{2C}$ -adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries*“ war es, in Organbadstudien und durch Western-Blotting den postsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptor der Schweinepulmonalarterie zu charakterisieren. Verglichen mit Pulmonalvenen rief der  $\alpha_2$ -Agonist UK14304 in Pulmonalarterien nur eine schwache Gefäßkontraktion hervor. Verapamil (hemmt spannungsgesteuerte Calciumkanäle), 2-APB (hemmt speichergesteuerte Calciumkanäle) und P1075 (öffnet ATP-sensitive Kaliumkanäle)

verursachten nur in Pulmonalvenen eine deutliche Abnahme des basalen Gefäßtonus. Dies spricht für einen hohen intrazellulären Calciumspiegel in diesem Gewebe unter in vitro Experimentalbedingungen, der für die Aktivität von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren von Bedeutung ist. Folglich konnte die durch UK14304 induzierte Kontraktion von Pulmonalarterien nach Vorstimulation mit Bay K 8644 (aktiviert spannungsgesteuerte Calciumkanäle) deutlich verstärkt werden. Die maximale durch Noradrenalin (nichtselektiver  $\alpha$ -Agonist) oder Phenylephrin ( $\alpha_1$ -Agonist) ausgelöste Kontraktion wurde durch Bay K 8644 hingegen nicht zusätzlich verstärkt. Die Konzentrations-Wirkungskurve von Noradrenalin in Gegenwart von Prazosin ( $\alpha_1$ -Antagonist) und Bay K 8644 zeigte eine geringere Rechtsverschiebung und wies eine deutlich geringere Steigung auf, als in Gegenwart von Prazosin allein. Die Grundvoraussetzung für die Aktivität von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren erfüllt Noradrenalin also selbst, da der notwendige Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels über eine Aktivierung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermittelt wird. Im Gegensatz zu BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ -Antagonist) war MK912 ( $\alpha_{2C}$ -Antagonist) in der Lage, die Wirkung von UK14304 zu hemmen. Die hohe Affinität von MK912 und die Ergebnisse des Western-Blottings sprechen für eine substantielle Beteiligung des  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptors an der durch Noradrenalin in Pulmonalarterien hervorgerufenen Kontraktion. Es wird deutlich, dass ein großer Anteil des pulmonalen Gefäßwiderstandes von postsynaptischen  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren in Pulmonalarterien und Pulmonalvenen verursacht wird. Deshalb könnten Antagonisten von  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren hilfreich bei der Behandlung von Lungenödemen sein.

Dopaminerge, serotonerge und adrenerge Rezeptoren sind pharmakologische Zielstrukturen bei der Behandlung der Schizophrenie. Dopamin  $D_2$ -Partialagonisten wie Aripiprazol stellen eine neue Behandlungsoption für schizophrene Patienten dar und zeichnen sich durch wenig extrapyramidale Nebenwirkungen aus. Die geringe Wirksamkeit des  $D_2$ -Partialagonisten Tergurid wird in Zusammenhang mit dessen hoher intrinsischer Aktivität an  $D_2$ -Rezeptoren gebracht. Ziel war es, die Effekte von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid auf  $D_2$ -,  $5\text{-HT}_{2A}$ -,  $\alpha_{2C}$ - sowie  $H_1$ -Rezeptoren in Bindungsstudien und Organbadstudien zu untersuchen und mit Tergurid zu vergleichen. In einem [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsassay zeigten 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid eine nur halb so hohe intrinsische Aktivität an  $D_{2S}$ -Rezeptoren wie Tergurid. Die Verbindungen verhielten sich als potente Antagonisten an  $D_{2L}$ -Rezeptoren. Sie waren außerdem hochaffine Antagonisten an  $5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptoren von Schweinekoronararterien und an  $\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren von Schweinepulmonalarterien. Die niedrige Affinität von 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid zum  $H_1$ -Rezeptor spricht gegen eine medikamenteninduzierte Gewichtszunahme, eine spezifische Nebenwirkung zahlreicher typischer und atypischer Neuroleptika. Zusätzlich wurde 2-Bromotergurid in präklinischen Tiermodellen getestet. Der Wirkstoff

hemmte das Spontanverhalten und die durch Amphetamin induzierte Lokomotion von Ratten, induzierte aber keine Katalepsie. Aufgrund ihrer in vitro Eigenschaften und der ermutigenden in vivo Effekte könnte es sich bei 2-Chlorotergurid, 2-Bromotergurid und 2-Iodotergurid um aussichtsreiche Kandidaten für gut verträgliche Arzneistoffe zur Behandlung der Schizophrenie handeln.

Serotonin ist an der Entstehung von Herzklappen- und Lungenfibrosen beteiligt. Die antiserotonergen Eigenschaften von Tergurid wurden in der Studie „*Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets, and Valvular Interstitial Cells*“ in Organbadstudien und an Zellkulturen untersucht. Tergurid verhielt sich als potenter Antagonist an 5-HT<sub>2A</sub>- und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren. In Interstitialzellen von Aorten- und Mitralklappen des Schweins wurde die durch Serotonin induzierte Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch Tergurid gehemmt. Dies kann als Zeichen verringerter fibrotischer Aktivität gewertet werden. Tergurid könnte also therapeutisches Potenzial für die Behandlung fibrotischer Erkrankungen besitzen.

## 5. Summary

The isolated rat tail artery represents an in vitro model of the cutaneous circulation. The aim of the study „*Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity*“ was to characterize the postjunctional  $\alpha_2$ -adrenoceptor in this tissue. In arterial rings UK14304 elicited only slight contractions which were markedly enhanced after prestimulation with serotonin. Under the condition of elevated vascular tone, the contractile UK14304 response was competitively antagonised by MK912, rauwolscine, yohimbine, WB4101, BRL44408, ARC239 and prazosin. Schild regressions were linear and had slopes of unity. Affinities for MK912, rauwolscine, yohimbine and WB41104 were in the same range as binding data for these drugs at  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors of rat cerebral cortex. In addition, the presence of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors was confirmed by Western blotting. After rapid cooling from 37°C to 27°C, the maximal UK14304 response was enhanced only in prestimulated arteries; antagonism by rauwolscine was the same before and after cooling. The enhancement of the maximal UK14304 response was abolished by rewarming to 37°C. It is concluded that  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors predominantly mediate vasoconstriction in rat tail arteries prestimulated with serotonin. An enhanced contractility is detectable in response to cold stimuli. Because  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors may be involved in Raynaud's phenomenon, the isolated rat tail artery represents a convenient in vitro bioassay to test novel compounds for the treatment of this syndrome.

Enhanced pulmonary vasoconstriction in response to injuries of the central nervous system and physical strain under hypoxic conditions results in pulmonary edema due to increased sympathetic activation. The study „*Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries*“ aimed at characterizing  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated responses in porcine pulmonary arteries using a tissue bath protocol. The  $\alpha_2$ -adrenoceptor protein was determined by Western blotting. UK14304 ( $\alpha_2$ -agonist) elicited only a slight contraction in pulmonary arteries compared to veins. Verapamil (voltage-operated calcium channel blocker), 2-APB (store-operated calcium channel inhibitor), and P1075 ( $K_{ATP}$  channel opener) induced a marked decrease of the basal tone in veins, but not in arteries. It is supposed, that high intracellular calcium levels are a prerequisite for  $\alpha_2$ -adrenoceptor function. Consequently, the UK14304-induced contraction in arteries was enhanced by prestimulation with Bay K 8644 (L-type calcium channel activator). Bay K 8644 did not increase the maximal response to noradrenaline (nonselective  $\alpha$ -agonist) or phenylephrine ( $\alpha_1$ -agonist). The rightward shift of the concentration–response curve to noradrenaline by prazosin ( $\alpha_1$ -antagonist) in combination with Bay K 8644 was smaller and non-parallel compared to that in the presence of prazosin alone. Therefore, the prerequisite for the  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation is fulfilled due to the  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated increase in calcium by noradrenaline itself. UK14304 responses were inhibited by MK912 ( $\alpha_{2C}$ -antagonist) but not by BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ -antagonist). Affinity of MK912 and Western blotting analysis argue for an involvement of  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors in contraction induced by noradrenaline in pulmonary arteries. It is concluded that postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors predominantly mediate contraction in porcine pulmonary arteries and veins. Thus,  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor antagonists may be beneficial in the treatment of pulmonary edema.

Dopaminergic, serotonergic and adrenergic receptors are pharmacological targets for therapeutic actions in schizophrenia. Dopamine  $D_2$  receptor partial agonists such as aripiprazole represent a new treatment option for patients with schizophrenia due to a lower risk to develop extrapyramidal side-effects. The ineffectiveness of terguride, another  $D_2$  receptor partial agonist, in treating schizophrenia was recently attributed to its considerably high intrinsic activity at  $D_2$  receptors. This study aimed at characterizing the effects of terguride, 2-chloroterguride, 2-bromoterguride and 2-iodoterguride at  $D_2$ , 5-HT<sub>2A</sub>,  $\alpha_{2C}$ -adrenergic, and histamine  $H_1$  receptors using binding and functional assays. Furthermore, we studied the antipsychotic-like effects of 2-bromoterguride using amphetamine-induced locomotion. Extrapyramidal side-effect liability was evaluated by catalepsy test. As determined by [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding, 2-chloroterguride, 2-bromoterguride, and 2-iodoterguride produced intrinsic activities at  $D_{2S}$  receptors that were half as high as the intrinsic activity of

terguride. The compounds behaved as potent antagonists at  $D_{2L}$  receptors. They were high-affinity antagonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors of porcine coronary arteries and  $\alpha_{2C}$  adrenoceptors of porcine pulmonary arteries. Low affinities of the compounds for H<sub>1</sub> receptors argue against drug-induced weight gain, a specific feature of numerous antipsychotics. In vivo, 2-bromoterguride inhibited spontaneous behavior and amphetamine-induced locomotion but did not induce catalepsy. Due to their in vitro properties and the promising in vivo antipsychotic-like activity, 2-chloroterguride, 2-bromoterguride and 2-iodoterguride may be strong candidates for the treatment of schizophrenia with a lower risk to induce extrapyramidal side-effects.

Serotonin is involved in heart valve tissue fibrosis and pulmonary fibrosis. The study „*Antiserotonergic Properties of Terguride in Blood Vessels, Platelets, and Valvular Interstitial Cells*“ aimed at characterizing the antiserotonergic properties of terguride by using functional receptor assays and valvular interstitial cell cultures. Terguride behaved as a potent antagonist at 5-HT<sub>2A</sub>-receptors and 5-HT<sub>2B</sub>-receptors. In porcine valvular interstitial cells, serotonin-induced activation of ERK1/2, an initiator of cellular proliferation and activity, was inhibited by terguride as shown by Western blotting. Because of the inhibition of 5-HT<sub>2A</sub>-receptors, 5-HT<sub>2B</sub>-receptors and ERK1/2 activity, terguride may have therapeutic potential in the treatment of fibrotic disorders.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA (2004). S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 10:1200–1207.
- Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol.* 164(suppl 1):S1-324.
- Alvarez SM, Miner AS, Browne BM, Ratz PH (2010). Failure of Bay K 8644 to induce RhoA kinase-dependent calcium sensitization in rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol.* 160:1326–1337.
- Amato D, Natesan S, Yavich L, Kapur S, Müller CP (2011). Dynamic regulation of dopamine and serotonin responses to salient stimuli during chronic haloperidol treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14:1327-39.
- Arnt J and Skarsfeldt T (1998). Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology.* 18:63–101.
- Bailey SR, Eid AH, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2004). Rho kinase mediates cold-induced constriction of cutaneous arteries: role of  $\alpha_2C$ -adrenoceptor translocation. *Circ Res.* 94:1367–1374.
- Bailey SR, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2005). Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H243–H250.
- Baldessarini RJ, Tarazi FJ (2006). Pharmacotherapy of psychosis and mania, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Brunton LL, Lazo JS, Parker KL eds) 11th ed, pp 461–500, McGraw-Hill, New York
- Bärtsch P, Gibbs JS (2007). Effect of altitude on the heart and the lungs. *Circulation.* 116:2191-202.
- Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM (2007). Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand.* 51:447–455.
- Benkert O, Müller-Siecheneder F, Wetzel H (1995). Dopamine agonists in schizophrenia: a review. *Eur Neuropsychopharmacol.* 5:S43–S53.
- Berger MM, Luks AM, Bailey DM, Menold E, Robotti GC, Mairbörl H, Dehnert C, Swenson ER, Bärtsch P (2011). Transpulmonary plasma catecholamines in acute high-altitude pulmonary hypertension. *Wilderness Environ Med.* 22:37-45.
- Berk M, Ichim C, Brook S (2001). Efficacy of mirtazapine add-on therapy to haloperidol in the treatment of the negative symptoms of schizophrenia: a double-blind randomized placebo-controlled study. *Int Clin Psychopharmacol.* 16:87-92.
- Berk M, Gama CS, Sundram S, Hustig H, Koopowitz L, D'Souza R, Malloy H, Rowland C, Monkhouse A, Monkhouse A, Bole F, Sathiyamoorthy S, Piskulic D, Dodd S (2009). Mirtazapine add-on therapy in the treatment of schizophrenia with atypical antipsychotics: a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. *Hum Psychopharmacol.* 24:233-8.
- Bhattacharya B, Roberts RE (2003). Enhancement of  $\alpha_2$ -adrenoceptor mediated vasoconstriction by the thromboxane-mimetic U46619 in the porcine isolated ear artery: role of the ERK-MAP kinase signal transduction cascade. *Br J Pharmacol.* 139:156–162.
- Bhattacharyya S, Schapira AH, Mikhailidis DP, Davar J (2009). Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet.* 374:577-85.

- Block JA, Sequeira W (2001). Raynaud's phenomenon. *Lancet*. 357:2042–2048.
- Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G, Pohl U (2003). Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*. 107:3081–3087.
- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM (2002). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *FASEB J*. 16:1145–1150.
- Brayden JE (2002). Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29:312-6.
- Bücheler MM, Hadamek K, Hein L (2002). Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience*. 109:819-26.
- Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, Yocca FD, and Molinoff PB (2002). Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 302:381–389.
- Chan HY, Lin WW, Lin SK, Hwang TJ, Su TP, Chiang SC, Hwu HG (2007). Efficacy and safety of aripiprazole in the acute treatment of schizophrenia in Chinese patients with risperidone as an active control: a randomized trial. *J Clin Psychiatry*. 68:29-36.
- Charkoudian N (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc*. 78:603–612.
- Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D, Flavahan NA (2000). Silent α<sub>2C</sub>-adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278:H1075–H1083.
- Chotani MA, Flavahan NA (2011). Intracellular α<sub>2C</sub>-adrenoceptors: storage depot, stunted development or signaling domain? *Biochem Biophys Acta*. 1813:1495–1503.
- Ciccarelli E, Camanni F (1996). Diagnosis and drug therapy of prolactinoma. *Drugs*. 51:954-965.
- Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM (1999). Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Circ Res*. 84:210–219.
- Connolly JM, Bakay MA, Fulmer JT, Gorman RC, Gorman JH 3rd, Oyama MA, and Levy RJ (2009). Fenfluramine disrupts the mitral valve interstitial cell response to serotonin. *Am J Pathol*. 175:988–997.
- Cooke JP, Creager SJ, Scales KM, Ren C, Tsapatsaris NP, Beetham WP Jr, Creager MA (1997). Role of digital artery adrenoceptors in Raynaud's disease. *Vasc Med*. 2:1–7.
- Cooke JP, Marshall JM (2005). Mechanisms of Raynaud's disease. *Vasc Med*. 10:293-307.
- Corsini GU, Bonuccelli U, Rainer E, Del Zompo M (1985). Therapeutic efficacy of a partial dopamine agonist in drug-free parkinsonian patients. *J Neural Transm*. 64:105-11.
- Croxtall JD (2012). Aripiprazole: a review of its use in the management of schizophrenia in adults. *CNS Drugs*. 26:155–183.
- Cushing DJ, Cohen ML (1993). Serotonin-induced contraction in porcine coronary artery: use of ergolines to support vascular 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub>-receptor heterogeneity. *J Pharmacol Exp Ther*. 264:193–200.

- Deng C, Weston-Green K, Huang XF (2010). The role of histaminergic H1 and H3 receptors in food intake: a mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34:1-4.
- Devoto P, Flore G (2006). On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr Neuropharmacol*. 4:115-25.
- Distler O, Eich W, Dokoupilova E, Dvorak Z, Fleck M, Gaubitz M, Hechler M, Jansen JP, Krause A, Bendszus M, Pache L, Reiter R, Müller-Ladner U (2010). Evaluation of the efficacy and safety of terguride in patients with fibromyalgia syndrome: results of a twelve-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum*. 62:291-300.
- Duplain H, Vollenweider L, Delabays A, Nicod P, Bärtsch P, Scherrer U (1999). Augmented sympathetic activation during short-term hypoxia and high-altitude exposure in subjects susceptible to high-altitude pulmonary edema. *Circulation*. 99:1713-8.
- Fagerholm V, Rokka J, Nyman L, Sallinen J, Tiuhonen J, Tupala E, Haaparanta M, Hietala J (2008). Autoradiographic characterization of alpha(2C)-adrenoceptors in the human striatum. *Synapse*. 62:508-15.
- Fernández J, Alonso JM, Andrés JI, Cid JM, Díaz A, Iturrino L, Gil P, Megens A, Sipido VK, Trabanco AA (2005). Discovery of new tetracyclic tetrahydrofuran derivatives as potential broad-spectrum psychotropic agents. *J Med Chem*. 48:1709-12.
- Flavahan NA (1991). The role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors as cutaneous thermosensors. *NIPS*. 6:103-109.
- Flavahan NA (2008). Regulation of vascular reactivity in scleroderma: new insights into Raynaud's phenomenon. *Rheum Dis Clin North Am*. 34:81-87.
- Frankle WG, Laruelle M (2002). Neuroreceptor imaging in psychiatric disorders. *Ann Nucl Med*. 16:437-46.
- Freedman RR, Baer RP, Mayes MD (1995). Blockade of vasospastic attacks by alpha 2-adrenergic but not alpha 1-adrenergic antagonists in idiopathic Raynaud's disease. *Circulation*. 92:1448-51.
- Frenken M, Kaumann AJ (1987). Allosteric properties of the 5-HT<sub>2</sub> receptor system of the rat tail artery. Ritanserin and methysergide are not competitive 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists but allosteric modulators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 335:359-366.
- Gao Y, Raj JU (2005). Role of veins in regulation of pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L213-L226.
- Geyer MA and Ellenbroek B (2003). Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27:1071-1079.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*. 342:923-6.
- Gobert A, Billiras R, Cistarelli L, Millan MJ (2004). Quantification and pharmacological characterization of dialysate levels of noradrenaline in the striatum of freely-moving rats: release from adrenergic terminals and modulation by alpha2-autoreceptors. *J Neurosci Methods*. 140:141-52.
- Gojkovic-Bukarica LC, Beleslin-Cokic BB, Novakovic AN, Peric MS, Markovic-Lipkovski JZ, Cirovic SZ, Nezic DG, Lesic AR, Kanjuh VI, Heinle H (2011). The effects of potassium channel opener P1075 on the human saphenous vein and human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 57:648-655.

- Görnemann T, von Wenckstern H, Kleuser B, Villalón CM, Centurión D, Jähnichen S, Pertz HH (2007). Characterization of the postjunctional  $\alpha_2$ C-adrenoceptor mediating vasoconstriction to UK14304 in porcine pulmonary veins. *Br J Pharmacol*. 151:186–194.
- Görnemann T, Hübner H, Gmeiner P, Horowski R, Latté KP, Flieger M, Pertz HH (2008). Characterization of the molecular fragment that is responsible for agonism of pergolide at serotonin 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> and 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 324:1136-45.
- Hackett PH, Roach RC, Hartig GS, Greene ER, Levine BD (1992). The effect of vasodilators on pulmonary hemodynamics in high altitude pulmonary edema: a comparison. *Int J Sports Med*. 13:S68-S71.
- Hainsworth R, Drinkhill MJ, Rivera-Chira M (2007). The autonomic nervous system at high altitude. *Clin Auton Res*. 17:13-9.
- Hall DP, Duncan K, Baillie JK (2011). High altitude pulmonary oedema. *J R Army Med Corps*. 157:68-72.
- Han J, Kim N, Kim E, Ho WK, Earm YE (2001). Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 276:22140-7.
- Hannon J, Hoyer D (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 195:198–213.
- Harker CT, Ousley PJ, Bowman CJ, Porter JM (1991). Cooling augments  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated contractions in rat tail artery. *Am J Physiol*. 260:H1166–H1171.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 67:719-58.
- Hertel P, Fagerquist MV, Svensson TH (1999a). Enhanced cortical dopamine output and antipsychotic-like effects of raclopride by alpha<sub>2</sub> adrenoceptor blockade. *Science*. 286:105-7.
- Hertel P, Nomikos GG, Svensson TH (1999b). Idazoxan preferentially increases dopamine output in the rat medial prefrontal cortex at the nerve terminal level. *Eur J Pharmacol*. 371:153-8.
- Holmberg M, Fagerholm V, Scheinin M (2003). Regional distribution of alpha<sub>2</sub>C-adrenoceptors in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the alpha<sub>2</sub>C-subtype: an autoradiographic study with [(3)H]RX821002 and [(3)H]rauwolscine. *Neuroscience*. 117:875-98.
- Honeydew B (1979). Bunsonium: a new treatment option for bipolar depression. *Muppet Labs Arch*. 13:317-331.
- Howes OD and Kapur S (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull*. 35:549–562.
- Hussain MB, Marshall I (1997). Characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol*. 122:849–858.
- Hutcheson JD, Setola V, Roth BL, and Merryman WD (2011). Serotonin receptors and heart valve disease—it was meant 2B. *Pharmacol Ther*. 132:146–157.
- Hyman AL, Kadowitz PJ (1985). Evidence for existence of postjunctional  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in cat pulmonary vascular bed. *Am J Physiol*. 249:H891–H898.
- Imaki J, Mae Y, Shimizu S, Ohno Y (2009). Therapeutic potential of alpha<sub>2</sub> adrenoceptor antagonism for antipsychotic-induced extrapyramidal motor disorders. *Neurosci Lett*. 454:143-7.
- Jähnichen S, Eltze M, Pertz HH (2004). Evidence that  $\alpha_1$ B-adrenoceptors are involved in noradrenaline-induced contractions of rat tail artery. *Eur J Pharmacol*. 488:157–167.
- Jähnichen S, Horowski R, and Pertz HH (2005). Agonism at 5-HT<sub>2B</sub> receptors is not a class effect of the ergolines. *Eur J Pharmacol*. 513:225–228.

- Jantschak F, Popp AM, Hofmann RA, Villalón CM, Centurión D, Pertz HH (2010). Postjunctional  $\alpha_2C$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 382:487–497.
- Jantschak F, Pertz HH (2012). Alpha $2C$ -adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 385:595-603.
- Jasper JR, Lesnick JD, Chang LK, Yamanishi SS, Chang TK, Hsu SA, Daunt DA, Bonhaus DW, Eglen RM (1998). Ligand efficacy and potency at recombinant alpha $2$  adrenergic receptors: agonist-mediated [ $^{35}S$ ]GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol.* 55:1035-43.
- Jeyaraj SC, Chotani MA, Mitra S, Gregg HE, Flavahan NA, Morrison KJ (2001). Cooling evokes redistribution of  $\alpha_2C$ -adrenoceptors from Golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol.* 60:1195–1200.
- Joffe G, Terevnikov V, Joffe M, Stenberg JH, Burkin M, Tiihonen J (2009). Add-on mirtazapine enhances antipsychotic effect of first generation antipsychotics in schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Schizophr Res.* 108:245-51.
- Kalkman HO, Subramanian N, and Hoyer D (2001). Extended radioligand binding profile of iloperidone: a broad spectrum dopamine/serotonin/norepinephrine receptor antagonist for the management of psychotic disorders. *Neuropsychopharmacology.* 25:904–914.
- Kalkman HO, Loetscher E (2003).  $\alpha_2C$ -Adrenoceptor blockade by clozapine and other antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol.* 462:33–40.
- Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H (1988). Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry.* 45:789–796.
- Kenakin T (1993). Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. 2nd edn. Raven, New York
- Kekowska A, Hübner H, Gmeiner P, and Pertz HH (2011). The bulky N6 substituent of cabergoline is responsible for agonism of this drug at 5-hydroxytryptamine 5-HT $2A$  and 5-HT $2B$  receptors and thus is a determinant of valvular heart disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 338:381–391.
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998). Prominence of the dopamine D $2$  short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:7731-6.
- Knauer CS, Campbell JE, Chio CL, and Fitzgerald LW (2009). Pharmacological characterization of mitogen-activated protein kinase activation by recombinant human 5-HT $2C$ , 5-HT $2A$ , and 5-HT $2B$  receptors. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 379:461–471.
- Koch M (2006). *Animal Models of Neuropsychiatric Diseases*, Imperial College Press, London.
- Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, and Eickelberg O (2010). Increased expression of 5-hydroxytryptamine 2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax.* 65:949–955.
- Krajnak K, Dong RG, Flavahan S, Welcome D, Flavahan NA (2006). Acute vibration increases  $\alpha_2C$ -adrenergic smooth muscle constriction and alters thermosensitivity of cutaneous arteries. *J Appl Physiol.* 100:1230–1237.
- Krause W, Träger H, Kühne G, Sauerbrey N, Gräf KJ, Dorow R (1990). Pharmacokinetics and endocrine effects of terguride in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 38:609-615.

- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, Roth BL (2003). H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 28:519–526.
- Launay JM, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 8:1129–1135.
- Lawler CP, Prioleau C, Lewis MM, Mak C, Jiang D, Schetz JA, Gonzalez AM, Sibley DR, and Mailman RB (1999). Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology*. 20:612–627.
- Lazareno S and Birdsall NJ (1993). Estimation of antagonist  $K_b$  from inhibition curves in functional experiments: alternatives to the Cheng-Prusoff equation. *Trends Pharmacol Sci*. 14:237–239.
- Lee A, Rosin DL, Van Bockstaele EJ (1998). Ultrastructural evidence for prominent postsynaptic localization of  $\alpha_2C$ -adrenergic receptors in catecholaminergic dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J Comp Neurol*. 394:218-29.
- Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, Kreyenbuhl J (2004). Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. *Am J Psychiatry*. 161:1-56.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*. 373:31-41.
- Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y (2008). Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 153:846-57.
- Levien TL (2010). Advances in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Vasc Health Risk Manag*. 6:167-77.
- Litman RE, Su TP, Potter WZ, Hong WW, Pickar D (1996). Idazoxan and response to typical neuroleptics in treatment-resistant schizophrenia. Comparison with the atypical neuroleptic, clozapine. *Br J Psychiatry*. 168:571-9.
- Liu Y, Tian H, Yan X, Fan F, Wang W, Han J (2013). Serotonin Inhibits Apoptosis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells through 5-HT(2A) Receptors Involved in the Pulmonary Artery Remodeling of Pulmonary Artery Hypertension. *Exp Lung Res*. [Epub ahead of print]
- Luks AM, McIntosh SE, Grissom CK, Auerbach PS, Rodway GW, Schoene RB, Zafren K, Hackett PH (2010). Wilderness Medical Society consensus guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness. *Wilderness Environ Med*. 21:146-55.
- MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M (1997). Gene targeting -- homing in on  $\alpha_2$ -adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci*. 18:211–219.
- MacLean MR, McGrath JC (1990). Effects of pre-contraction with endothelin-1 on  $\alpha_2$ -adrenoceptor- and (endothelium-dependent) neuropeptide Y-mediated contractions in the isolated vascular bed of the rat tail. *Br J Pharmacol*. 101:205–211.
- MacLean MR, McCulloch KM, MacMillan JB, McGrath JC (1993a). Influences of the endothelium and hypoxia on neurogenic transmission in the isolated pulmonary artery of the rabbit. *Br J Pharmacol*. 108:150–154.
- MacLean MR, McCulloch KM, McGrath JC (1993b). Influences of the endothelium and hypoxia on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated responses in the rabbit isolated pulmonary artery. *Br J Pharmacol*. 108:155–161.

- Marano M, Kaumann AJ (1976). On the statistics of drug-receptor constants for partial agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 198:518-525.
- Marcus MM, Jardemark KE, Wadenberg ML, Langlois X, Hertel P, Svensson TH (2005). Combined alpha2 and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8:315-327.
- Marcus MM, Wiker C, Frånberg O, Konradsson-Geuken A, Langlois X, Jardemark K, Svensson TH (2010). Adjunctive alpha2-adrenoceptor blockade enhances the antipsychotic-like effect of risperidone and facilitates cortical dopaminergic and glutamatergic, NMDA receptor-mediated transmission. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13:891-903.
- Martignoni E, Pacchetti C, Aufdembrinke B, Godi L, Albani G, Mancini F, Nappi G (1995). Terguride in stable Parkinson's disease. *Funct Neurol.* 10:143-6.
- McNeill AM, Leslie FM, Krause DN, Duckles SP (1999). Gender difference in levels of  $\alpha$ 2-adrenoceptor mRNA in the rat tail artery. *Eur J Pharmacol.* 366:233–236.
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle.* 8:1168-75.
- Meltzer HY, Massey BW, Horiguchi M (2012). Serotonin receptors as targets for drugs useful to treat psychosis and cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Biotechnol.* 13:1572-86.
- Meyer JM, Loebel AD, and Schweizer E (2009). Lurasidone: a new drug in development for schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs.* 18:1715-1726.
- Millan MJ, Maiofiss L, Cussac D, Audinot V, Boutin JA, Newman-Tancredi A (2002). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 303:791-804.
- Muroi C, Keller M, Pangalu A, Fortunati M, Yonekawa Y, Keller E (2008). Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol.* 20:188-92.
- Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A (2005). Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension.* 46:1039-45.
- Nagasaka Y, Bhattacharya J, Nanjo S, Gropper MA, Staub NC (1984). Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats. *Circ Res.* 54:90-95.
- Natesan S, Reckless GE, Nobrega JN, Fletcher PJ, and Kapur S (2006). Dissociation between in vivo occupancy and functional antagonism of dopamine D2 receptors: comparing aripiprazole to other antipsychotics in animal models. *Neuropsychopharmacology.* 31:1854-1863.
- Natesan S, Reckless GE, Barlow KB, Nobrega JN, Kapur S (2008). Amisulpride the 'atypical' atypical antipsychotic--comparison to haloperidol, risperidone and clozapine. *Schizophr Res.* 105:224-35.
- Natesan S, Reckless GE, Barlow KB, Nobrega JN, Kapur S (2011). Partial agonists in schizophrenia – why some work and others do not: insights from preclinical animal models. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14:1165-1178.
- Navedo MF, Amberg GC, Votaw VS, Santana LF (2005). Constitutively active L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:11112-11117.

- Neild TO, Kotecha N (1987). Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. *Circ Res.* 60:791-795.
- Nelson DL, Lucaites VL, Audia JE, Nissen JS, and Wainscott DB (1993). Species differences in the pharmacology of the 5-hydroxytryptamine 2 receptor: structurally specific differentiation by ergolines and tryptamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:1272–1279.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Nicolas JP, De Ceuninck F, Boutin JA, and Millan MJ (2002a). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D2-like receptor and  $\alpha 1/\alpha 2$ -adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 303:805–814.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Quentric Y, Touzard M, Verri le L, Carpentier N, and Millan MJ (2002b). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. III. Agonist and antagonist properties at serotonin, 5-HT1 and 5-HT2, receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 303:815–822.
- Nishihira K, Yamashita A, Tanaka N, Moriguchi-Goto S, Imamura T, Ishida T, Kawashima S, Yamamoto R, Kitamura K, Asada Y (2008). Serotonin induces vasoconstriction of smooth muscle cell-rich neointima through 5-hydroxytryptamine2A receptor in rabbit femoral arteries. *J Thromb Haemost.* 6:1207–1214.
- Nordquist RE, Risterucci C, Moreau JL, von Kienlin M, K nnecke B, Maco M, Freichel C, Riemer C, and Spooren W (2008). Effects of aripiprazole/OPC-14597 on motor activity, pharmacological models of psychosis, and brain activity in rats. *Neuropharmacology.* 54:405–416.
- Nuno DW, Korovkina VP, England SK, Lamping KG (2007). RhoA activation contributes to sex differences in vascular contractions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1934–1940.
- Ohlstein EH, Horohonich S, Shebuski RJ, Ruffolo RR Jr (1989). Localization and characterization of  $\alpha 2$ -adrenoceptors in the isolated canine pulmonary vein. *J Pharmacol Exp Ther.* 248:233–239.
- Olbrich R, Schanz H (1988). The effect of the partial dopamine agonist terguride on negative symptoms in schizophrenics. *Pharmacopsychiatry.* 21:389-390.
- Olbrich R, Schanz H (1991). An evaluation of the partial dopamine agonist terguride regarding positive symptoms reduction in schizophrenics. *J Neural Transm Gen Sect.* 84:233-236.
- Oriowo MA, Chandrasekhar B, Kadavil EA (2003).  $\alpha 1$ -Adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary artery from pulmonary hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 482:255–263.
- Oyama MA, Levy RJ (2010). Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med.* 24:27-36.
- Pacchetti C, Martignoni E, Bruggi P, Godi L, Aufdembrinke B, Miltenburger C, Voet B, Nappi G (1993). Terguride in fluctuating parkinsonian patients: a double-blind study versus placebo. *Mov Disord.* 8:463-465.
- Pertz H, Elz S (1995). In-vitro pharmacology of sarpogrelate and the enantiomers of its major metabolite: 5-HT2A receptor specificity, stereoselectivity and modulation of ritanserine-induced depression of 5-HT contractions in rat tail artery. *J Pharm Pharmacol.* 47:310–316.
- Phan SV, Kreys TJ (2011). Adjunct mirtazapine for negative symptoms of schizophrenia. *Pharmacotherapy.* 31:1017-30.
- Philipp M, Brede M, Hein L (2002). Physiological significance of  $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283:R287–R295.

- Porsolt RD, Moser PC, and Castagné V (2010). Behavioral indices in antipsychotic drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 333:632–628.
- Potkin SG, Saha AR, Kujawa MJ, Carson WH, Ali M, Stock E, Stringfellow J, Ingenito G, Marder SR (2003). Aripiprazole, an antipsychotic with a novel mechanism of action, and risperidone vs placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 60:681–690.
- Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G (2009). Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda).* 24:342-56.
- Raj JU, Chen P (1986). Micropuncture measurement of microvascular pressures in isolated lamb lungs during hypoxia. *Circ Res.* 59:398–404.
- Raj JU, Hillyard R, Kaapa P, Gropper M, Anderson J (1990). Pulmonary arterial and venous constriction during hypoxia in 3- to 5-wk-old and adult ferrets. *J Appl Physiol.* 69:2183–2189.
- Raj JU, Kaapa P, Anderson J (1992). Effect of pulsatile flow on microvascular resistance in adult rabbit lungs. *J Appl Physiol.* 72:73–81.
- Rand RP, Burton AC, Ing T (1965). The tail of the rat, in temperature regulation and acclimatization. *Can J Physiol Pharmacol.* 43:257–267.
- Redfern WS, MacLean MR, Clague RU, McGrath JC (1995). The role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the vasculature of the rat tail. *Br J Pharmacol.* 114:1724–1730.
- Reynolds GP (2004). Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 18:340-5.
- Robertson GS, Matsumura H, Fibiger HC (1994). Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:1058–1066.
- Rogers FB, Shackford SR, Trevisani GT, Davis JW, Mackersie RC, Hoyt DB (1995). Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *J Trauma.* 39:860-6; discussion 866-8.
- Roth BL, Sheffler DJ, and Kroeze WK (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov.* 3:353–359.
- Roth BL (2007). Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med.* 356:6–9.
- Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, and Roth BL (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT<sub>2B</sub> receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation.* 102:2836–2841.
- Sanders KM (2001). Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol.* 91:1438-49.
- Sanders-Bush E and Canton H (1995). Serotonin receptors. Signal transduction pathways, in *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (Bloom FE and Kupfer DJ eds) pp 431–441, Raven Press, New York.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 275:21722-9.
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT Jr (1994). Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 21:133–149.

- Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, De Loore K, Leysen JE (1996). Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)*. 124:57-73.
- Schümann HJ, Lues I (1983). Postjunctional  $\alpha$ -adrenoceptors in the isolated saphenous vein of the rabbit. Characterization and influence of angiotensin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 323:328–334.
- Schutz G, Berk M (2001). Reboxetine add on therapy to haloperidol in the treatment of schizophrenia: a preliminary double-blind randomized placebo-controlled study. *Int Clin Psychopharmacol*. 16:275-8.
- Sedý J, Zicha J, Kunes J, Jendelová P, Syková E (2008). Mechanisms of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res*. 57:499-506.
- Sedý J, Zicha J, Nedvidkova J, Kunes J (2012). The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Appl Physiol*. 112:1–8.
- Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo LA, Liu LX, Sibley DR, Roth BL, and Mailman R (2003). Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 28:1400–1411.
- Shebuski RJ, Fujita T, Ruffolo RR Jr (1986). Evaluation of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the in situ, autoperfused pulmonary circulation of the anaesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 238:217–223.
- Shebuski RJ, Ohlstein EH, Smith JM Jr, Ruffolo RR Jr (1987). Enhanced pulmonary  $\alpha$ 2-adrenoceptor responsiveness under conditions of elevated pulmonary vascular tone. *J Pharmacol Exp Ther*. 242:158–165.
- Siehler S (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 158:41-9.
- Simmons RL, Martin AM Jr, Heisterkamp CA 3rd, Ducker TB (1969). Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann Surg*. 170:39-44.
- Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E (2010). A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron*. 65:585-96.
- Small KM, Schwarb MR, Glinka C, Theiss CT, Brown KM, Seman CA, Liggett SB (2006).  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry*. 45:4760–4767.
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*. 6:113-20.
- Solenski NJ, Haley EC Jr, Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Torner JC (1995). Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med*. 23:1007-17.
- Stahl SM (2008). Do dopamine partial agonists have partial efficacy as antipsychotics? *CNS Spectr*. 13:279-82.
- Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA (1994). Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*. 89:2035-40.
- Sumner BE, Cruise LA, Slattery DA, Hill DR, Shahid M, Henry B (2004). Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology (Berl)*. 171:306–321.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I $\alpha$ . *Science*. 286:1583-7.

- Svensson K, Ekman A, Piercey MF, Lum JT, and Carlsson A (1991). Effects of the partial dopamine receptor agonists SDZ 208-911, SDZ 208-912 and terguride on central monoamine receptors. A behavioral, biochemical and electrophysiological study. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 344:263–274.
- Tadori Y, Miwa T, Tottori K, Burris KD, Stark A, Mori T, Kikuchi T (2005). Aripiprazole's low intrinsic activities at human dopamine D2L and D2S receptors render it a unique antipsychotic. *Eur J Pharmacol.* 515:10–19.
- Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, Kikuchi T (2009). Receptor reserve-dependent properties of antipsychotics at human dopamine D2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 607:35–40.
- Templeton AG, Macmillan J, McGrath JC, Storey ND, Wilson VG (1989). Evidence for prazosin-resistant, rauwolscine-sensitive  $\alpha$ -adrenoceptors mediating contractions in the isolated vascular bed of the rat tail. *Br J Pharmacol.* 97:563–571.
- Terevnikov V, Stenberg JH, Joffe M, Tiihonen J, Burkin M, Tchoukhine E, Joffe G (2010). More evidence on additive antipsychotic effect of adjunctive mirtazapine in schizophrenia: an extension phase of a randomized controlled trial. *Hum Psychopharmacol.* 25:431–8.
- Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L, Auh JS (1998). Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr.* 178:440–66.
- Trulock EP (1997). Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:789–818.
- Tsai MH, Jiang MJ (2006). Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflügers Arch.* 453:223–232.
- Uhlén S, Xia Y, Chhajlani V, Felder CC, Wikberg JE (1992). [3H]-MK912 binding delineates two  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes in rat CNS one of which is identical with the cloned pA2d  $\alpha$ 2-adrenoceptor. *Br J Pharmacol.* 106:986–995.
- Uhlén S, Porter AC, Neubig RR (1994). The novel alpha-2 adrenergic radioligand [3H]-MK912 is alpha-2C selective among human alpha-2A, alpha-2B and alpha-2C adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:1558–1565.
- Uhlén S, Lindblom J, Johnson A, Wikberg JE (1997). Autoradiographic studies of central alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptors in the rat using [3H]MK912 and subtype-selective drugs. *Brain Res.* 770(1-2):261–6.
- Van Rossum JM (1963). Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 143:299–330.
- Vanhoutte PM (2001). Endothelial adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38:796–808.
- Větr M, Talas M, Pohanka J, Gazárek F, Fingerová H (1990). Terguride in the treatment of hyperprolactinemia. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 125:155–160.
- Vinjar B and Stewart M (2008). Oral vasodilators for primary Raynaud's phenomenon. *Cochrane Database Syst Rev.* 16:CD006687.
- Wadenberg ML, Soliman A, VanderSpek SC, and Kapur S (2001). Dopamine D2 receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharmacology.* 25:633–641.

- Wadenberg ML, Wiker C, Svensson TH (2007). Enhanced efficacy of both typical and atypical antipsychotic drugs by adjunctive alpha2 adrenoceptor blockade: experimental evidence. *Int J Neuropsychopharmacol.* 10:191–202.
- Watts SW (1996). Serotonin activates the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle: use of the mitogenactivated protein kinase inhibitor PD098059. *J Pharmacol Exp Ther.* 279:1541–1550.
- Westerink BH, Kawahara Y, De Boer P, Geels C, De Vries JB, Wikström HV, Van Kalker A, Van Vliet B, Kruse CG, Long SK (2001). Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. *Eur J Pharmacol.* 412:127-38.
- Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, McGonigle P, Levy RJ, and Liang B (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT2 receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol.* 161:2209–2218.
- Yabanoglu S, Akkiki M, Seguelas MH, Mialet-Perez J, Parini A, Pizzinat N (2009). Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT2A receptors. *J Mol Cell Cardiol.* 46:518-25.
- Yao M, Abel PW (2008). Identification of the  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtype causing contraction of rat lateral tail vein. *FASEB J.* 22:912.20.
- Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH (1994). Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:1375–1380.
- Zerpa H, Berhane Y, Elliott J, Bailey SR (2010). Functional role of  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes in the cooling-enhanced vasoconstriction of isolated cutaneous digital veins of the horse. *Eur J Pharmacol.* 627:194–202.
- Zhang W, Klimek V, Farley JT, Zhu MY, Ordway GA (1999). alpha2C adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: potential activation by dopamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:1286-92.

## 7. Publikationen

Jantschak F, Pertz HH (2012). Alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors play a prominent role in sympathetic constriction of porcine pulmonary arteries. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 385:595-603.

Kekewska A, Görnemann T, Jantschak F, Glusa E, Pertz HH (2011). Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 340:369-76.

Jantschak F, Popp AM, Hofmann RA, Villalón CM, Centurión D, Pertz HH (2010). Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 382:487-497.

## 8. Poster

*Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Annual Meeting, March 30 – April 1, 2011, Frankfurt a. M., Germany*

F Jantschak, H H Pertz (2011). The Rho kinase pathway and a calcium dependent mechanism are both involved in alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptor-mediated vasoconstriction. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 383 (suppl. 1).

*Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Annual Meeting, August 29 - September 2, 2010, Berlin, Germany*

H H Pertz, F Jantschak (2010). Rauwolscine is a valuable tool to study the role of postjunctional  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes in rat cutaneous arteries at a physiological temperature of 32°C and after rapid cooling. *Planta Med.* Volume 76 (14).

*Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Annual Meeting, March 23 – 25, 2010, Mainz, Germany*

F Jantschak, H H Pertz (2010). UK14304-induced vasoconstriction of rat tail artery is mediated by postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 381 (suppl. 1).

## **9. Lebenslauf**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**