

Aus der Anatomischen Anstalt
der Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gratzl

Charakterisierung der Zellen des Glomus caroticum

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

vorgelegt von

Pia Körner

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

- 1. Berichterstatter:** Prof. Dr. Manfred Gratzl
- 2. Berichterstatter:** PD Dr. Ch. Auernhammer
- Mitberichterstatter:** Prof. Dr. R.A.W. Rupp
- Prof. Dr. J. Herms
- Dekan:** Prof. Dr. Dietrich Reinhardt
- Tag der mündlichen Prüfung:** 17.11.2005

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	9
1.1	Sauerstoffmessung im Organismus	9
1.2	Das Glomus caroticum	10
1.3	Zielsetzung.....	13
2	Material	14
2.1	Herstellerverzeichnis	14
2.2	Antikörper	16
2.3	Lösungen	18
3	Methoden	19
3.1	Präparation des Glomus caroticum und der Lunge	19
3.2	Herstellung von Lebendschnitten aus dem Glomus caroticum.....	20
3.3	Immunhistochemie	21
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	22
3.4	Proteinbiochemie.....	22
3.4.1	Immunoblotting.....	22
3.4.2	Proteinbestimmung	23
3.5	Histamingehalt des Glomus caroticum und Freisetzung von Histamin.....	24
3.5.1	Histamingehalt des Glomus caroticum.....	24
3.5.2	Radioimmunoassay zur Histaminbestimmung	25
3.5.3	Statistische Auswertung der Histamin-Freisetzungsexperimente.....	26
3.6	Zellbiologie: Zellkultur.....	27
3.7	Molekularbiologie	27
3.7.1	RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen.....	27
3.7.2	Reverse Transkription (RT)	28
3.7.3	Primer	29
3.7.4	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	30
3.7.5	Gelelektrophorese.....	31
3.8	Aktivitätsbestimmung von GTP-CH im Glomus caroticum mittels HPLC....	31
3.9	Amperometrie.....	33
3.9.1	Prinzip der Amperometrie	33
3.9.2	Elektroden und Karbonfasern.....	33

3.9.3	Aufbau und Komponenten	35
3.9.4	Ablauf einer Messung und Auswertung.....	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Histamin und Dopamin als Transmitter im Glomus caroticum.....	37
4.1.1	Nachweis der Exozytoseproteine	37
4.1.2	Biosynthese und Speicherung in Vesikeln	39
4.1.3	Histamin im Glomus caroticum und Freisetzung bei Hypoxie	42
4.1.4	Freisetzung von Dopamin bei Hypoxie.....	44
4.1.5	RT-PCR-Analyse der Rezeptoren H1, H2, H3	45
4.2	Identifikation der GTP-CH in Typ I Zellen.....	46
4.2.1	Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen....	46
4.2.2	Aktivität der GTP-CH in verschiedenen Geweben der Ratte.....	47
5	Diskussion	48
5.1	Histamin, ein neuer Transmitter im Glomus caroticum.....	48
5.2	Freisetzung von Dopamin: eine Voraussetzung für die Autotransplantation in das Striatum bei M. Parkinson	50
5.3	GTP-CH wird im Glomus caroticum exprimiert und ist aktiv.....	53
6	Zusammenfassung	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Anhang	63

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1-1: Aufbau eines Glomus caroticum.....	10
Abbildung 1-2: Signalweitergabe zwischen Sensorzelle und Carotis Sinus Nerv	11
Abbildung 3-1: Versuchsaufbau: Histaminfreisetzung aus dem Glomus caroticum..	25
Abbildung 3-2: Aufbau einer Amperometrie-Elektrode	34
Abbildung 3-3: Skizze eines Amperometriesignals bei Transmitterfreisetzung.....	36
Abbildung 4-1: Immunhistochemischer Nachweis von SNAP25 und Syntaxin	37
Abbildung 4-2: Expression von SNAP25 und Syntaxin.....	38
Abbildung 4-3: SNAP25 im Neuroepithelialen Körperchen der Lunge.....	39
Abbildung 4-4: Nachweis der Biosyntheseenzyme für Dopamin und Histamin.....	40
Abbildung 4-5: Expression der vesikulären Amintransporter	41
Abbildung 4-6: Vergleich von Histamin, Dopamin und Acetylcholin im Glomus.....	42
Abbildung 4-7: Freisetzung von Histamin bei Normoxie und Hypoxie	43
Abbildung 4-8: Amperometrische Messung der Dopaminfreisetzung	44
Abbildung 4-9: Nachweis der Histaminrezeptoren mRNA	45
Abbildung 4-10: Identifikation der GTP-CH im Glomus caroticum	46
Abbildung 4-11: Aktivität der GTP-CH in verschiedenen Geweben der Ratte	47
Abbildung 5-1: Übersicht über die Tetrahydrobiopterin-Biosynthese.....	54

Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
AET	2-Aminoethyl-isothiuronium-bromid
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
D2	Dopaminrezeptor 2
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enterochromaffin-like
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
GTP-CH	GTP-Cyclohydrolase
H1, H2, H3	Histaminrezeptor 1,2 und 3
HDC	Histidindecarboxylase
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IU	Internationale Einheit Enzymaktivität
M	Molar (mol / l)
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	messenger-RNA
NEB	Neuroepithelial bodies
p	Wahrscheinlichkeit für einen irrtümlich gefundenen Unterschied zweier Beobachtungsgruppen für die vorliegende Stichprobe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC12	Phaeochromocytoma Zelllinie
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pipes	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfon-säure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PS	Pferdeserum
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNAP25	Synaptosom-assoziiertes Protein (25 kDa)
TBE	Tris / Borat / EDTA
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Sauerstoffmessung im Organismus

Die Zellen und Gewebe des Körpers sind auf eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff angewiesen. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) können sie nur kurze Zeit überleben. Daher ist es von allergrösster Bedeutung, dass im Organismus Sensoren vorhanden sind, die laufend den aktuellen Gehalt an Sauerstoff im arteriellen Blut und in der eingeatmeten Luft bestimmen und die Atemtätigkeit daran anpassen.

Sauerstoffsensoren müssen eine Hypoxie schnell erkennen und in ein neuronales Signal übersetzen. Im Atemzentrum der Medulla oblongata entsteht dann der Befehl zur vertieften und beschleunigten Atmung, um das Sauerstoffdefizit auszugleichen.

Die Sensorzellen benötigen Übertragungstoffe (Transmitter) zur Weitergabe der Information „Hypoxie“ auf afferente Neurone. Transmitter werden in der Regel in der Zelle synthetisiert, in Vesikeln aufgenommen und gespeichert. Bei einem

entsprechenden Reiz (hier Hypoxie) werden die Transmitter mittels Exozytose freigesetzt. Transmitter kommen im ganzen Körper vor: bei der Übertragung eines Signals von Neuron auf Neuron oder Muskelzelle, im Magen-Darm-Trakt, in Sinneszellen etc. Sie können erregende (exzitatorische) oder hemmende (inhibitorische) Wirkung haben, je nach Typ, Wirkungsort und Konzentration.

Beispiele für Transmitter sind Acetylcholin, Noradrenalin und Adrenalin, Glutamat, Serotonin, GABA, Glycin, Dopamin und Histamin.

Transmitter binden an der Zielzelle und lösen dort eine Kette von Reaktionen aus. Im Nervensystem ändert sich dadurch das Membranpotential. In der Folge werden elektrische Signale ausgelöst, über die schnell und effektiv Informationen im Nervensystem weitergeleitet werden. Im Falle des Glomus caroticum wird durch die Bindung eines Transmitters ein Signal im Carotis Sinus Nerv induziert, der die Information zum Atemzentrum im Gehirn weiterleitet.

1.2 Das Glomus caroticum

Als wichtigster Sauerstoffsensor im Körper der Säugetiere und des Menschen liegt das Glomus caroticum an einer strategisch günstigen Stelle: an der Aufgabelung der Halsschlagader, Arteria carotis communis, die sich in die Arteria carotis interna und Arteria carotis externa verzweigt. So wird der Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut auf dem Weg zum Gehirn ständig überwacht. Das Glomus caroticum enthält neben den eigentlichen Sensorzellen (Typ I Zellen) auch Glia- oder Stützzellen (Typ II Zellen). Ausserdem ist das Glomus caroticum reich an Kapillaren und an Dendriten des Carotis Sinus Nervs.

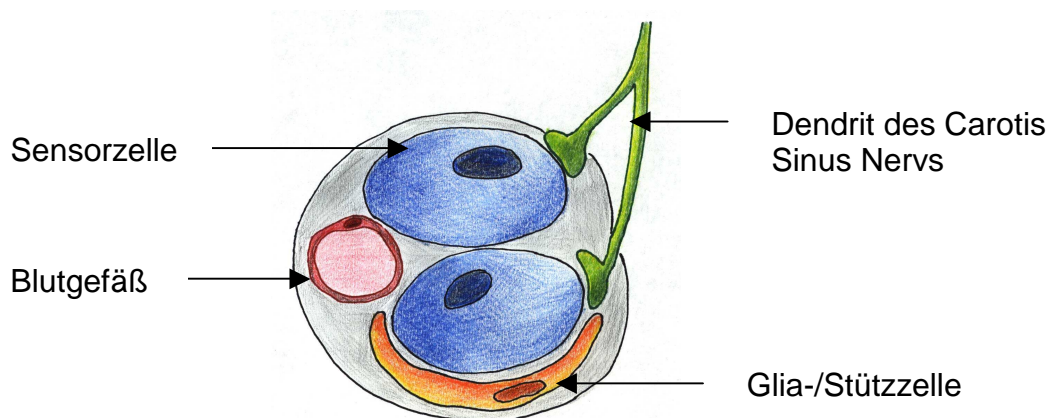


Abbildung 1-1: Aufbau eines Glomus caroticum

Neben den eigentlichen Sensorzellen (Typ I Zellen) besteht das Glomus caroticum aus Glia- oder Stützzellen (Typ II Zellen). Die Sensorzellen stehen in engem Kontakt zu Dendriten des Carotis Sinus Nervs. Daneben ist das Glomusorgan reich an Blutgefässen.

Das Glomus caroticum kann neben den Partialdrücken von Sauerstoff und Kohlendioxid auch Glucose sowie den pH-Wert messen und in ein Signal umsetzen [37]. Wie die Sensorzellen den Sauerstoff messen, ist noch weitgehend unbekannt. Ein interessanter neuer Mechanismus wurde kürzlich beschrieben. Dabei dient eine bestimmte Hämoxxygenase zusammen mit Calcium-abhängigen Kaliumkanälen (BK-Kanälen) als molekularer Sauerstoffsensor [51]. Die nachfolgenden Reaktionen sind

weit besser untersucht: die Sensorzellen des Glomus caroticum depolarisieren durch Hemmung der BK-Kanäle und es öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle. Dadurch steigt der intrazelluläre Kalziumspiegel an und mittels Exozytose werden in Vesikeln gespeicherte Neurotransmitter freigesetzt [31]. Nach gängiger Meinung handelt es sich dabei um Dopamin, ATP und Acetylcholin [46, 52]. Die Transmitter induzieren ein elektrisches Signal im Carotis Sinus Nerv und im Atemzentrum wird die Atemtätigkeit entsprechend geregelt.

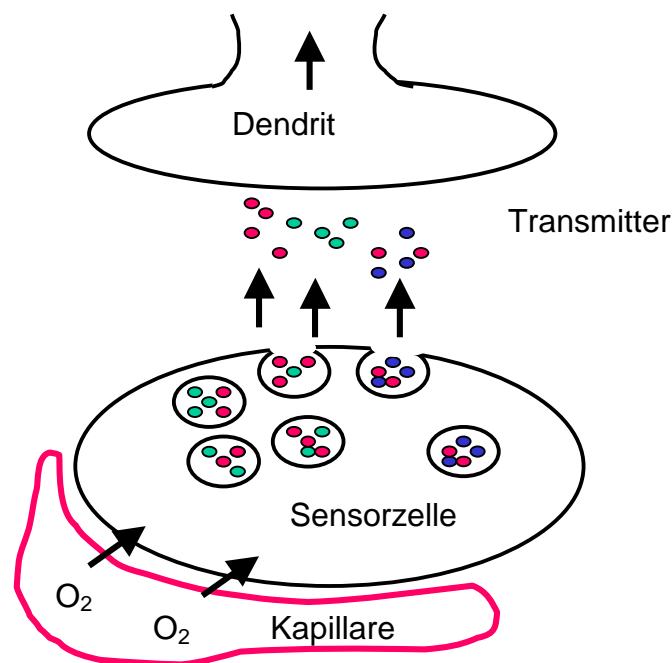


Abbildung 1-2: Signalweitergabe zwischen Sensorzelle und Carotis Sinus Nerv

Wenn die Sensorzelle über einen bisher nicht genau bekannten Mechanismus das Signal „Hypoxie“ misst, werden über eine Kaskade von Reaktionen Transmitter aus gespeicherten Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt. Diese treffen auf einen Dendriten des Carotis Sinus Nervs und induzieren ein Signal, das zum Atemzentrum geleitet wird und dort die Atemtätigkeit reguliert.

Im respiratorischen Epithel des Bronchialbaumes finden sich besonders in der Nähe von Verzweigungen und an den Übergängen zu Alveolen Zellgruppen, die ebenfalls als Sauerstoffsensoren dienen: sogenannte Neuroepitheliale Körperchen (engl. neuroepithelial bodies, NEB). Sie messen kontinuierlich den Gehalt an Sauerstoff in der vorbeiströmenden Atemluft. Das Prinzip von Messung, Übersetzung und Weiterleitung ist bei diesen Sensoren noch weitgehend unbekannt. Offensichtlich enthalten sie Serotonin [30] und setzen dieses bei Hypoxie frei [16]. NEBs sind besonders bei Neugeborenen entwickelt. Bei älteren Individuen scheint die Sauerstoffmessung in der Atemluft eine untergeordnete Rolle zu spielen. In den Lungen Erwachsener finden sich sehr selten NEBs [9].

1.3 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit soll zur Charakterisierung der Sensorzellen im Glomus caroticum beigetragen werden. Es ist bereits bekannt, dass die Sensorzellen des Glomusorgans Dopamin produzieren können. Das Glomusgewebe eignet sich daher möglicherweise zur Therapie des Morbus Parkinson durch Autotransplantation in das Striatum, um den dabei vorhandenen Dopaminmangel auszugleichen. Eine erfolgreiche Therapie durch Autotransplantation setzt jedoch eine genaue Kenntnis der Eigenschaften des Glomus caroticum voraus.

Eine entscheidende Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die Glomuszellen in der Lage sind, den für die Dopaminbiosynthese limitierenden Kofaktor, das Tetrahydrobiopterin, zu synthetisieren.

Diese Arbeit hatte daher zunächst das Ziel, die Expression und Aktivität des Tetrahydrobiopterin synthetisierenden Enzyms im Glomus caroticum nachzuweisen.

Wichtig für die Charakterisierung der Glomuszellen ist ferner die Identifizierung von bisher im Glomus caroticum unbekanntem Transmittern, die bei Hypoxie ausgeschüttet werden. Daher wurde gleichzeitig nach weiteren im Glomus caroticum vorhandenen Transmittern gesucht. Erste Experimente ergaben Hinweise auf Histamin als möglichen Transmitter im Glomus caroticum der Ratte.

2 Material

2.1 Herstellerverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland
Alpha diagnostics, San Antonio, USA
American Can Company, Greenwich, USA
Amersham Life Science Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
AutoMate Scientific Inc., San Francisco, USA
Beckman Coulter, München, Deutschland
Biochrom AG, Berlin, Deutschland
BIORAD, München, Deutschland
BioLabs, Schwalbach, Deutschland
Biosciences, St Louis, USA
BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
BioWhittaker Molecular Applications,
Walkersville, USA
Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf, Deutschland
Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Deutschland
DNASTAR Inc., Madison, USA
Dow Corning, Midland, USA
Eppendorf–Netheler–Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Euro-diagnostics, Arnheim, Holland
GraphPad Software Inc., San Diego, USA
HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland
Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland
Instrutech, Great Neck, USA
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA
Leica GmbH, Bensheim, Deutschland
Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland
MJ Research, Watertown, USA
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
NEN Life Science Products Inc., Boston, USA
Novocastra Lab Ltd, Newcastle, UK
NUNC, Wiesbaden, Deutschland
PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
P.A.L.M. GmbH, Bernried, Deutschland
PeQLAB, Erlangen, Deutschland
Pharmazia Biotech, Freiburg, Deutschland
Pierce / Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Portex Limited, Hythe, UK
Promega, Mannheim, Deutschland
Qiagen AG, Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Sternberger monoclonals Inc., Lutherville, USA
Techlab, Erkerode, Deutschland
Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wallac / Perkin Elmer, Boston, USA
World Precision Instruments, Sarasota, USA
Zeiss Jena GmbH, München, Deutschland

2.2 Antikörper

Alle primären und sekundären spezifischen Antikörper, die im Westernblot und in der Immunhistochemie verwendet wurden, sind im folgenden aufgeführt.

Bezeichnung	Antikörper	ImmunH	Western	Hersteller
SNAP25	monoklonaler Maus-IgG-AK	1:500	1:2000	Sternberger monoclonals
Syntaxin	monoklonaler Maus-IgG-AK	1:500	1:2000	Biosciences
VMAT 1	polyklonaler Kaninchen-IgG-AK	1:4000		Alpha diagnostic
VMAT 2	polyklonaler Kaninchen-IgG-AK	1:500		Alpha diagnostic
HDC	polyklonaler Kaninchen-IgG-AK	1:8000	1:10 000	Euro-diagnostica
TH	monoklonaler Maus-IgG-AK	1:40		Novocastra
GTP-CH	monoklonaler Ratte-IgG-AK	1:250	1:500	[21]
Maus-IgG	Biotin konjugierter 2. AK Ziege-IgG	1:500		Jackson ImmunoResearch
Maus-IgG	POX konjugierter 2. AK Ziege-IgG		1:5000	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen-IgG	Biotin konjugierter 2. AK Ziege-IgG	1:500		Jackson ImmunoResearch
Kaninchen-IgG	POX konjugierter 2. AK Ziege-IgG		1:5000	Jackson ImmunoResearch

Ratte-IgG	Biotin konjugierter 2. AK Maus-IgG	1:500		Jackson ImmunoResearch
Ratte-IgG	POX konjugierter 2. AK Maus-IgG		1:5000	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 1: Bezeichnung, Herkunft und Konzentrationen aller verwendeten Antikörper. Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf den Einsatz in der Immunhistochemie (ImmunH) und im Westernblot (Western).

2.3 Lösungen

Im folgenden ist die Zusammensetzung von Lösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, angegeben. H₂O wurde zweifach destilliert verwendet. Alle Zahlenangaben sind in der Einheit mM bezeichnet, soweit sie nicht anders angegeben sind. Die Prozentangaben entsprechen Gewichtsprozent.

Avertin:	0,333 g Tribromethanol, 0,63 ml 2-Methyl-2-Butanol, 25 ml H ₂ O bidest
PBS (10 mM; 1 l):	0,386 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 1,282 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 8,776 g NaCl; pH 7,4
KPBS:	PBS; 140 KCl; 15 NaPi; 10 Glucose; pH 7,4
LKPBS:	KPBS; 0,3% Ziegenserum; 0,1% Triton X-100; pH 7,4
TBE Puffer (5 x; 1 l):	4 g Tris; 27,5 Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0
Probenpuffer (1 x):	62,5 Tris; 2% SDS; 10% Saccharose; pH 6,8
DEPC H ₂ O:	500 µl DEPC in 1 l H ₂ O über Nacht rühren lassen
DNA-Auftragspuffer (6 x):	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 40% Saccharose
Elektrophoresepuffer (10 x; 1 l):	30,28 g Tris; 144,12 g Glycin; 10 g SDS; pH 8,3
Trenngelpuffer (1 x):	1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8
Sammelgelpuffer (1 x):	0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8
Transferpuffer (1 x):	192 Glycin; 25 Tris; 20% Methanol
Ponceau S (10 x; 0,5 l):	1 g Ponceau S; 3% Trichloressigsäure
TBS (10 x):	0,5 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6
TBS-Tween (10 x; 1 l):	0,05% Tween 20; 100 ml 10 x TBS
SDS 10% (1 x; 0,1 l):	10 g Sodiumdodecylsulfat
Homogenisationspuffer:	0,6 K ₂ PO ₄ pH 7,1; 0,5% Triton X-100; 1 AET; 1PMSF
Tyrode - Lösung:	148 NaCl; 2 KCl; 2 CaCl ₂ ; 1 MgCl ₂ ; 10 HEPES; 10 Glucose; pH 7,4
Tyrode ohne Calcium:	148 NaCl; 2 KCl; 3 MgCl ₂ ; 10 HEPES; 10 Glucose
Tyrode mit 40 mM Kalium:	110 NaCl; 40 KCl; 2 CaCl ₂ ; 1 MgCl ₂ ; 10 HEPES; 10 Glucose; pH 7,4

3 Methoden

Alle Versuche wurden an Rattengewebe durchgeführt. Dieses wurde entweder nach Präparation in Paraformaldehyd fixiert bzw. bei -80°C konserviert und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet oder vor Versuchsbeginn frisch präpariert.

3.1 Präparation des Glomus caroticum und der Lunge

Das Glomus caroticum konnte aus der Ratte mit Hilfe eines Binoculars präpariert und isoliert werden. Es wurden ausschliesslich junge Ratten im Alter von bis zu 25 Tagen verwendet. Die Ratten entstammten der Rasse Sprague - Dawley und waren beiderlei Geschlechts.

Sie wurden durch intraperitoneale Injektion von $20\ \mu\text{l} / \text{gKG}$ Avertin betäubt. Die Bifurkation der A. carotis communis wurde ohne Vergrösserung vorsichtig dargestellt. Nach Abklemmen der A. carotis communis konnte die Aufgabelung im ganzen extrahiert werden. Bis zum folgenden Schritt wurde die Bifurkation in eiskalter oxygenierter Tyrode -Lösung (ohne Calcium) aufbewahrt. Es wurden stets beide Bifurkationen nacheinander aus der Ratte entnommen und in Tyrode - Lösung gehalten. Erst dann wurde unter dem Binocular das Glomus caroticum identifiziert und herausgelöst. Dazu wurde die Bifurkation in einer mit Silikon (*Sylgard*, Dow Corning) beschichteten Petrischale fixiert. Mit feinen chirurgischen Instrumenten konnte das Glomus freipräpariert und herausgelöst werden. Das vom umgebenden Bindegewebe befreite Glomus wurde nun den nachfolgenden Experimenten entsprechend aufbereitet.

Die Lunge konnte nach Eröffnung des Thorax einfach mobilisiert werden. Zur Extraktion wurden die Lungenhili abgeklemmt und die Lungenflügel vorsichtig herausgelöst. Zur Vorbereitung für die nachfolgende Immunhistochemie wurden die Lungen in 4%igem Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert.

3.2 Herstellung von Lebenschnitten aus dem *Glomus caroticum*

Agarose (*Nusieve GTG*, BioWhittaker) wurde gemäss Herstelleranweisung zu 3% in destilliertem Wasser gelöst, im Wasserbad erhitzt und die Temperatur mittels Thermometer kontrolliert. Zur Einbettung des *Glomus* in die Agarose wurde eine auf 1,5 cm abgeschnittene Insulinspritze als Form verwendet. Diese Form wurde auf einer Seite mit Parafilm (American Can Company) verschlossen und mit heisser, flüssiger Agarose luftblasenfrei befüllt. Nach sorgfältiger Präparation des *Glomus caroticum* wurde das Organ unter dem Binocular von angrenzendem Bindegewebe vollkommen getrennt und mit einer feinen Pinzette vorsichtig in die 39°C warme Agarose eingebracht.

Die Agarose wurde nach Erkalten säulenförmig aus der Form geschoben, mit Sekundenkleber in der Schneidekammer des Vibratoms (Leica) aufgeklebt und mit kalter Tyrode-Lösung umspült. Die Schnitte wurden mit einer Rasierklinge in einer Dicke von 150 µm hergestellt. Pro *Glomus* liessen sich drei bis vier Lebenschnitte gewinnen.

Diese Schnitte wurden unter der Sterilbank dreimal mit sterilem PBS gewaschen und anschliessend für mindestens 48 Stunden in folgendem Medium bei 37°C inkubiert: DMEM (Sigma) mit 10% FKS (FCS Gold, PAA), 1% L-Glutamin (Biochrom), 5×10^4 IU / l Penicillin (Biochrom) und 5×10^4 µg / l Streptomycin (Biochrom).

Zur Messung wurde ein Schnitt aus dem Medium entnommen, mit PBS gewaschen und in wenig Tyrode-Lösung unter dem Mikroskop platziert.

3.3 Immunhistochemie

Die Einbettung der Glomera erfolgte in Paraffin. Schnitte von 1 bis 5 μm Dicke wurden auf Glasobjektträger aufgezogen und bei 37°C für 2 Stunden getrocknet. Anschliessend sind folgenden Schritte durchgeführt worden:

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe
(Xylol: 4 x 5 min, Isopropanol 2 x 100%, 96 %, 80 %, 70 %, je 5 min)
- 3 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit 0,1% Methanol in 25% H_2O_2
für 20 Min
- 3 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer
- Demaskierung der Antigene in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle
(800 W 10 – 15 Min und 400 W 15 Min)
- Nach Abkühlen der Schnitte 3 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer
- Blockieren mit 5% Normalserum der Spezies des zweiten Antikörpers in PBS
für 30 Min bei Raumtemperatur
- Kurz mit PBS waschen, endogenes Biotin blockieren mit Avidin Biotin Blocking
Kit (Vector Laboratories), 30 Min bei Raumtemperatur
- Inkubation mit erstem Antikörper über Nacht bei 4°C
- 3 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer
- Inkubation mit zweitem Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur
- 3 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer
- Inkubation mit Avidin-biotin complex method kit (Vector Laboratories) für 1 bis
2 Stunden bei RT
- 2 mal 5 Min waschen in PBS-Puffer, 5 Min waschen mit Tris-HCl 50mM pH 7,6
- Tris-HCl mit DAB (Diaminobenzidin) mit H_2O_2 für max. 10 Min bei
Raumtemperatur
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Eukitt

Für Fluoreszenzimmunhistochemie wurden die Glomera in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend mit Hilfe eines Cryostats in 10 µm dünne Scheiben geschnitten. Folgende Schritte wurden zur Färbung durchgeführt:

- Waschen: 3 mal 10 Min mit 0,02 M KPBS, 10 Min mit LKPBS
- Inkubation mit erstem Antikörper über Nacht bei 4°C
- Waschen: 2 mal 10 Min mit LKPBS, 10 Min mit KPBS
- Inkubation mit zweitem Antikörper für 1 Stunde, lichtgeschützt
- 3 mal 10 Min waschen in KPBS
- 20 Min trocknen bei Raumtemperatur, lichtgeschützt
- Eindecken mit *ProLong Antifade Kit* (Invitrogen)
- Aufbewahrung bei 4°C, lichtgeschützt

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV (Zeiss) wurden die Schnitte im abgedunkelten Raum betrachtet und fotografiert (Filterset 00: Anregung 530 – 589 nm, Emission > 615 nm). Um einen geringen Objektivabstand erreichen zu können, wurde Immersionsöl (40x Objektiv) verwendet.

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Immunoblotting

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die mit Probenpuffer versetzten Zell- bzw. Gewebelysate zunächst durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 1% Bromphenolblau versetzt sowie durch 10% β-Mercaptoethanol und Kochen bei 95°C für 5 min denaturiert. Durch Zugabe von SDS 10% wurden die Proteinproben negativ geladen. Es wurden 10 cm breite und 7 cm hohe Gele mit einer Dicke von 0,75 mm gegossen (*Mini-Protean*, BIORAD). Das Trenngel enthielt 12,5% Acrylamid und wurde mit einem Sammelgel mit 4% Acrylamid überschichtet. Zur Größenbestimmung der Proteine diente der

Molekulargewichtsmarker *LMW* (14,4–94 kDa) von Pharmazia. Die Elektrophorese erfolgte im Elektrophoresepuffer bei 180 V für 60 min.

Im Westernblot Verfahren wurden nun die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden die Proteine in einer *Mini Trans-Blot* Kammer (BIORAD) bei 100 V für 60 min im Transferpuffer von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Nach dem Anfärben der Membran mit Ponceau-S-Lösung zum Sichtbarmachen des Molekulargewichtsmarkers und der Transferbanden wurde die Membran 60 min in 5% Milchpuffer / TBS-Tween blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper in 0,5% Milchpulver / TBS-Tween erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgten 3 Waschschriffe für 5 min in TBS-Tween und dann die Inkubation mit dem sekundären Peroxidase (POX) gekoppelten Antikörper in 0,5% Milchpulver / TBS-Tween für 60 min. Nach 3 weiteren Waschschriffen mit TBS-Tween für 5 min wurde die immunologische Reaktion mit Hilfe von *ECL-Reagenz* (Amersham Life Science) als photochemische Reaktion auf einem *Hyper Film ECL* (Amersham Life Science) sichtbar gemacht.

3.4.2 Proteinbestimmung

Sowohl bei den zur Analyse der GTP-CH-Aktivität, als auch bei den im Westernblot eingesetzten Proben wurde der Proteingehalt mittels Bicinchoninsäurereaktion (*protein assayreagent*, Pierce) ermittelt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte durch Absorptionsmessung eines Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes bei 562 nm. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Albumin-Lösungen von 0-20 mg / ml in 1 x Probenpuffer verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Spektrophotometer *DU 640* (Beckman).

3.5 Histamingehalt des Glomus caroticum und Freisetzung von Histamin

3.5.1 Histamingehalt des Glomus caroticum

Um den Histamingehalt der Glomera zu bestimmen, wurden insgesamt 47 Glomera isoliert, mittels feiner Pinzetten in jeweils 100 µl 0.2 M HClO₄ überführt und darin dreimal kurz nacheinander im flüssigen Stickstoff eingefroren und sofort wieder aufgetaut, um die Zellen des Gewebes aufzuschliessen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 000 rpm für 5 Min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und bei –80°C bis zur Messung des Histamingehaltes gelagert.

Für die Bestimmung der Freisetzung von Histamin bei Normoxie und Hypoxie wurden die frisch isolierten Glomera für jeweils 30 Minuten bei 37°C in 500 µl calciumhaltiger Tyrode-Lösung in 1500 µl Eppendorf-Tubes inkubiert. Für hypoxische Bedingungen wurde die Tyrode-Lösung über eine halbe Stunde mit Stickstoff vorgesättigt. Die Deckel der Eppendorf-Tubes waren mit einer Injektions-Kanüle (20G) durchstoßen, sodass die Kanülenspitze oberhalb des Flüssigkeitsspiegels platziert wurde (Abb. 3-1). Damit wurde verhindert, dass der Gasstrom eine Verwirbelung in der Lösung und damit eine mechanische Reizung des Glomus verursachen könnte. Für Hypoxiebedingungen wurde gasförmiger Stickstoff (Linde AG) mittels Silikonschläuchen an die Kanüle angeschlossen. Für Normoxie wurde kein Gas durch die Kanüle geleitet, sondern Equibrillation der Lösung mit Raumluft angestrebt. Der Sauerstoffgehalt betrug in der mit Stickstoff gesättigten Lösung 3,5%, in der mit Raumluft equilibrierten Lösung 21% (Sauerstoffmesssonde, World Precision Instruments)

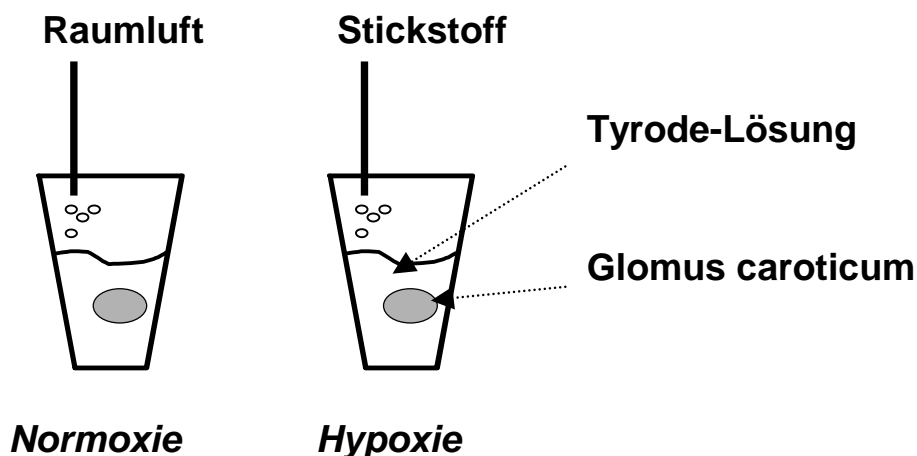


Abbildung 3-1: Versuchsaufbau: Histaminfreisetzung aus dem Glomus caroticum

In einem 1500 µl Eppendorf-Gefäss wurde das frisch präparierte Glomusorgan in 500 µl Tyrodelösung für 30 Minuten inkubiert. Über eine Kanüle wurde für Hypoxiebedingung Stickstoff zugeführt, für Normoxiebedingungen mit Raumlufte equilibriert.

Nach Ablauf von 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen des Glomus nach oben beschriebenen Verfahren aufgeschlossen und, ebenso wie die Lösung, in welcher das Glomus inkubiert worden war, bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt. Zur Neutralisation der Säure wurde vor Messung mit 1 M Natriumborat in gleicher Menge neutralisiert.

3.5.2 Radioimmunoassay zur Histaminbestimmung

Die Mengenbestimmung von Histamin in den gewonnenen Lösungen wurde mit einem Radioimmunoassay Kit der Firma Beckman Coulter gemäss Herstelleranweisung durchgeführt. Dabei wurde das vorhandene Histamin bei einem pH von 6 bis 8 acetyliert. Es konkurrierte mit ^{125}I -acetyliertem Histamin um eine limitierte Zahl von Antikörperbindungsstellen. Nach Inkubation über Nacht und Entfernung der nicht gebundenen Bestandteile wurde die verbliebene Radioaktivität in einem Gamma Counter bestimmt (*Wizard*, Wallac).

Die Anzahl der gemessenen counts per minute (cpm) ist indirekt proportional zur Konzentration des Histamins in der Probe. Die Konzentration konnte auf der Basis einer Standardkurve bestimmt werden, die mit den mitgelieferten Standards zuvor festgelegt wurde.

Um auf die Konzentration von Histamin pro Glomus zu schliessen, wurde folgende Berechnung durchgeführt:

Das Ergebnis der direkten Messung (in nmol / l) wurde mit Verdünnungsfaktor 16,5 multipliziert und auf das Volumen von 500 μ l Stimulationslösung bezogen.

Zur Berechnung der Histaminkonzentration pro Glomus caroticum wurde ein Gewicht von 50 μ g pro Glomus caroticum zugrunde gelegt.

Die Summe aus dem Histamingehalt im Glomus caroticum nach Stimulation *plus* dem Histamingehalt in der dazugehörigen Stimulationslösung wurde als ursprünglicher Histamingehalt des entsprechenden Glomus definiert und mit 100% gleichgesetzt. Die Menge des in die Umgebungslösung freigesetzten Histamins konnte somit in Prozent des ursprünglichen Histamingehaltes im Glomus angegeben werden. Die statistische Auswertung erfolgte anhand dieser Angaben in Prozent.

3.5.3 Statistische Auswertung der Histamin-Freisetzungsexperimente

Die insgesamt fünf Experimente lieferten Ergebnisse, die in zwei Gruppen unterteilbar waren: Histaminfreisetzung bei Normoxie und bei Hypoxie. Die Ergebnisse beschreiben, welcher Anteil (in Prozent) an Gesamthistamin des Glomus in die Umgebungslösung freigesetzt wurde. Die Glomera wurden während des Experimentes den Gruppen zufällig zugeordnet, als Test zur statistischen Auswertung wurde deshalb der „unpaired t-test“ gewählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism software. Die Ergebnisse der Auswertung wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.6 Zellbiologie: Zellkultur

Die Zellkultur der PC12 - Zellen wurde gemäss Greene et al. [18] durchgeführt.

Die PC12 Zellen wurden in RPMI-Medium (pH 7,2; Sigma) plus 5×10^4 IU / l Penicillin (Biochrom), 5×10^4 μg / l Streptomycin (Biochrom), 1% L-Glutamin (Biochrom), 1% Natrium-Pyruvat (Biochrom), 5% FKS (FCS Gold, PAA) und 10% PS (Biochrom) bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre in 60ml Kulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Dazu wurde der Flascheninhalt abzentrifugiert und die Zellen in 15 ml frischem Medium resuspendiert. Zum Splitten der Zellen wurde einmal wöchentlich der Flascheninhalt abzentrifugiert und die Zellen in je 15 ml Medium auf zwei neue Kulturflaschen verteilt.

3.7 Molekularbiologie

3.7.1 RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen

Das im Stickstoff gefrorene Gewebe wurde mittels Mörser und Stößel zerkleinert und in 500 μl RLT-Puffer (versetzt mit 1% β -Mercaptoethanol) aus dem Qiagen RNA *Mini Kit Extraction Kit* aufgenommen. PC12 - Zellen wurden abzentrifugiert, in PBS gewaschen und anschliessend wurde die RNA mittels Quiagen RNA Mini Kit isoliert. In 10 μl RNase freiem Wasser wurde die RNA bei -80°C bis zur reversen Transkribierung aufbewahrt.

Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel geprüft (Beschreibung siehe 3.7.5 Gelelektrophorese). Dazu wurden pro Spur 1 μl der gewonnenen RNA aufgetragen. Liegt intakte RNA vor, dann verhält sich die Intensität von ribosomaler 28S zu 18S RNA in etwa wie 2:1. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch an einer 1:70 verdünnten Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Mit Hilfe der Absorption A_{260} berechnet sich die RNA-Konzentration wie folgt:

RNA-Konzentration = $A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$)

3.7.2 Reverse Transkription (RT)

Zur RT von mRNA in cDNA wurde das Enzym MMRT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) verwendet. Alle weiteren verwendeten Produkte der RT sowie auch der PCR wurden von Promega bezogen. Ein RT-Reaktionsansatz zu 20 μ l ist in **Tabelle 2** dargestellt.

Reagenz	Volumen
RNA in DEPC-H ₂ O	11,8 μ l
RQ1 RNase free DNase (1 IU / μ l)	1 μ l
10x First strand Buffer	1 μ l
RNAse Block Ribonuclease Inhibitor (40 IU / μ l)	0,2 μ l
EDTA (84 mM)	1 μ l
Oligo dT15 (85 μ M)	1 μ l
10x First strand Buffer	1 μ l
dNTPs (25 mM)	1 μ l
MMLV-RT (20 IU / μ l)	1 μ l
MgCl ₂ (180 mM)	1 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Tabelle 2: Reaktionsansatz einer Reversen Transkription, Gesamtvolumen 20 μ l

Zuerst wurde das einer Menge von etwa 200 ng RNA entsprechende Volumen mit RNAse freiem Wasser auf 11,8 μ l aufgefüllt. Der DNase-Verdau wurde anschliessend nach Zugabe von RQ1 Rnase, 10x First Strand Buffer und Rnase Block Ribonuclease Inhibitor durchgeführt (Inkubation bei 37°C für 20 Minuten). Nach Zugabe von Oligo dT15 und EDTA wurde die Lösung für 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlung auf 4°C wurden 10x First Strand Buffer, dNTPs, MMLV-RT und MgCl₂ dazugegeben. Danach erfolgte die RT bei 37°C für 60 Minuten. Abschliessend wurde bei 90°C für 5 Minuten denaturiert, auf 4°C gekühlt und die so gewonnene cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.3 Primer

Die cDNA aus Glomera der Ratte wurde mittels PCR untersucht. Die genspezifischen Primer wurden anhand publizierter Sequenzen der Genbank erstellt. In **Tabelle 3** ist ein Überblick über die verwendeten Primer zusammengestellt. Die PCR wurde mit dem Thermocycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt. Primer für VMAT1 und VMAT2 wurden eingesetzt wie beschrieben [19].

mRNA		Sequenz (5' - 3')	Genbank - Zugangsnummer	Position	Fragment- grösse kB
HDC	forward	5' CAT GAA TAC CAA GCT AGA GG 3'	M29591	97 - 116	294
	reverse	5' CAA GCA GTT GAT GGC ATC AG 3'		390 - 371	183
	nested reverse	5' GAT GAT TTG CTC AAT GTC CC 3'		279 - 260	
SNAP25	forward	5' ATG GCC GAG GAC GCA GAC ATG CGT AAT 3'	NM030991	209 - 235	621
	reverse	5' TTA ACC ACT TCC CAG CAT CTT TGT TGC 3'		829 - 803	
GTP-CH	forward	5' CGA GAT GGT GAT TGT GAA GG 3'	NM024356	481 - 500	308
	reverse	5' TGG TGC TAG TGA CAG TCT TG 3'		788 - 769	
H1	forward	5' CCT CTA CCT TCG AAG ACA AG 3'	NM017018	20 - 39	405
	reverse	5' GTC TTG GTT CGG TAC CTC AG 3'		425 - 406	221
	nested reverse	5' TGA CAA CTG CCC CTA CAA TC 3'		241 - 222	
H2	forward	5' ATG GCA TTG AAA GTC ACC 3'	NM012965	43 - 60	377
	reverse	5' GAC CAA AGA GAT GGC AAC 3'		420 - 403	193
	nested reverse	5' TGG TAA ATG GCA GAG AAG 3'		236 - 219	
H3	forward	5' CAG CGT TAC CTT CTT CAA CC 3'	NM053506	636 - 655	511
	reverse	5' CAG CTC GGA TGA TCA TTA GG 3'		1147-1128	359
	nested reverse	5' GAT GCT GAA GAT GCT GAT GG 3'		995 - 976	

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt Name, Sequenz und Position der verwendeten PCR-Primer und nested PCR-Primer sowie die Größe der jeweiligen PCR-Produkte.

3.7.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Der Reaktionsansatz für eine PCR ist in **Tabelle 4** dargestellt, wobei alle Reagenzien von Promega bezogen wurden.

Reagenz	Volumen
10x Taq-Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
H ₂ O	33 µl
Primer 5` (50 µM)	1 µl
Primer 3` (50 µM)	1 µl
Probe (200 ng cDNA) in H ₂ O	1,5 µl
Taq-Polymerase (20 IU / µl)	0,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz für eine PCR, Gesamtvolumen 50 µl

Zuerst wurde ein Mix aus 5 µl 10 x Taq-Buffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM dNTPs und 33 µl H₂O erstellt. Diesem Mix wurde dann jeweils 1 µl 50 µM Primer 5`, 1 µl 50 µM Primer 3`, sowie 200 ng cDNA als Template in 1,5 µl H₂O zugegeben. Zur Denaturierung des Templates wurde zunächst auf 94° C erhitzt und dann 0,5 µl Taq-Polymerase (20 IU / µl) zugegeben. Anschließend erfolgten 35 Zyklen der folgenden Reaktionsschritte:

- Denaturierung bei 94° C für 15 s
- Annealing der Primer bei 60° C für 30 s
- Elongation bei 72° C für 30 s

Danach wurde eine Temperatur von 4° C konstant gehalten, bis der Ansatz zunächst eingefroren oder sofort elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Bei allen PCR - Untersuchungen mit Ausnahme von SNAP25 und GTP-CH wurde eine zweite PCR durchgeführt. Diese wurde als nested PCR zur Erhöhung der

Sensitivität nach dem gleichen Ablauf wie bereits beschrieben durchgeführt. Als Template wurden 5 µl des Reaktionsprodukts der ersten PCR nach Aufreinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN verwendet. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurde mit Hilfe der mitgelieferten Säule und den Puffern die DNA von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen gereinigt.

Alle PCR-Ergebnisse wurden durch Sequenzierungen verifiziert. Dazu wurden die PCR-Produkte zuerst mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN aufgereinigt. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit den Originalprimern von einem kommerziellen Dienst (AGOWA) direkt sequenziert und ihre Übereinstimmung mit der jeweiligen Sequenz der Genbank verifiziert (*MegAlign*., DNASTAR).

3.7.5 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung des durch PCR amplifizierten Fragments wurde der Ansatz mit DNA-Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch horizontal in einem 1% Agarose-Gel (*SeaKemL*, Biozym) mit 1x TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde, aufgetrennt. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit einem 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche Diagnostics) bestimmt. Die Elektrophorese (*Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System*, Biorad) erfolgte für 30 min bei 100 V. Die durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid angereicherten DNA-Banden wurde anschließend mit einem Kamerasystem detektiert und digitalisiert.

3.8 Aktivitätsbestimmung von GTP-CH im *Glomus caroticum* mittels HPLC

Bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatographie = HPLC) handelt es sich um eine chromatographische Technik zur Auftrennung und Analyse von Stoffgemischen. Sie gehört zur Gruppe der Säulen-Chromatographien. Man nutzt das Prinzip der Wechselwirkung zwischen einer mobilen Phase (enthält die zu trennenden Moleküle) und der in der Säule enthaltenen stationären Phase.

Die Eluation des zu messenden Stoffs aus der Säule erfolgt verschieden schnell, abhängig von dem Umfang der Seitenketten und deren Wechselwirkung mit der stationären Phase. Beim Austritt aus der Säule kann man die einzelnen Stoffe mit einem geeigneten Detektor nachweisen.

Zur Bestimmung der Aktivität der GTP-CH wurde aus Gewebe extrahiertes Protein mit GTP inkubiert und das Reaktionsprodukt Dihydroneopterintriphosphat anschliessend chemisch zu Neopterintriphosphat reduziert. Anhand von Standards zur Pterin-Bestimmung mittels HPLC ergab sich der Eliminationszeitpunkt von Neopterintriphosphat aus der Säule nach 16 Minuten. Der Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion. Das im Stickstoff gefrorene Gewebe wurde mittels Mörser und Stössel zerkleinert und pro Milligramm Gewebe 300 µl Tris-Puffer (50 mM, pH 8,0) plus 2,5 mM EDTA zugegeben.

Nach Zentrifugation (20 000 rpm für 15 min) wurde der Überstand für die weitere Analyse vorbereitet: die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte gemäss Abschnitt 3.4.2.

Der jeweilige Gewebsextrakt wurde mit GTP (Gesamtkonzentration 0,75 mM; Sigma) bei 37°C für 90 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Das Reaktionsprodukt (Dihydroneopterintriphosphat) wurde durch Zugabe von 0.1 M Jodsäure (Sigma) zu Neopterintriphosphat reduziert. Nachdem das aus dieser Reaktion verbleibende freie Iod mit Hilfe von Ascorbinsäure reduziert wurde, wurden 10 µl der zu messenden Lösung auf die HPLC-Säule (Techlab) aufgetragen. Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte durch eine Anregung bei 350 nm und einer Messung der Fluoreszenz bei 450 nm.

3.9 Amperometrie

3.9.1 Prinzip der Amperometrie

Bei der Amperometrie handelt es sich um eine elektrophysiologische Technik zur direkten Darstellung der Exozytose. Dabei nutzt man die Tatsache, dass Moleküle, und damit auch einige freigesetzte Botenstoffe, ein bestimmtes Redoxpotential besitzen, bei dem sie oxidiert werden, d.h. Elektronen abgeben. An eine nur wenige μm starke Karbonfaser wird ein Spannungspotential angelegt, das etwas über dem Redoxpotential des zu messenden Moleküls liegt. Befindet sich die Faser nah genug an der Zelloberfläche, wird jedes freigesetzte Molekül, dessen Redoxpotential unter der gewählten Spannung liegt, beim Kontakt mit der Faser oxidiert und gibt Elektronen an die Faser ab. Der dadurch induzierte Strom in der Karbonfaser kann mittels Verstärker und zugehöriger Software als Funktion von Zeit und Stromstärke sichtbar gemacht werden. Für die Messung von Dopamin wird z.B. eine Spannung von + 800 mV auf die Karbonfaser angelegt, da das Redoxpotential von Dopamin bei + 750 mV liegt. Allerdings können Moleküle, die nicht elektrisch oxidierbar sind, mit dieser Technik nicht dargestellt werden, wie z.B. Acetylcholin oder Glutamat. Sie müssten erst chemisch modifiziert werden, was eine der Exozytose zeitnahe Messung verhindert. Als Referenzelektrode wurde ein Ag / AgCl – Pellet verwendet und über einen isolierten Draht mit dem Verstärker verbunden.

3.9.2 Elektroden und Karbonfasern

Zur Messung des Stroms wurden Ag / AgCl-Elektroden verwendet. Zu ihrer Herstellung wurden zwei Silberdrähte in eine angesäuerte 4 M KCl-Lösung (pH 2,0) getaucht. Die zu chlorierende Elektrode wurde mit dem Pluspol, die Platinkathode mit dem Minuspol verbunden. Bei 4 V Gleichspannung wurde ein Strom von 7 mA pro cm chloriertem Draht angelegt, bis sich auf der Oberfläche ein schwarzer Belag bildete. Dies wurde bei Bedarf erneut durchgeführt.

Für die Herstellung der Karbonfasern wurden Polyethylen- (PE-) schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Aussendurchmesser von 0,8 mm verwendet (Portex Limited, England). In 2,5 cm lange Stücke des PE-Schlauches wurde mit Hilfe des Binoculars jeweils eine Karbonfaser (Durchmesser 10 μm)

eingeführt. An einer stromdurchflossenen Drahtschleufe (2,5 A) wurde der PE-Schlauch mittig vorsichtig erwärmt und durch leichtes Auseinanderziehen in zwei gleichgrosse Schlauchstücke unterteilt, sodass an der Spitze die Karbonfaser von einer dünnen PE-Schicht umhüllt war.

Die so präparierten PE-Schlauchstücke wurden in einer ca. 4 cm langen Glaskapillare mit Hilfe von wenig Silikon (*Sylgard*, Dow corning) so befestigt, dass der PE-Anteil mit Karbonfaser zu etwa 1 cm überstand. Zur Aushärtung des Silikons wurden die Elektroden bei 50°C für 1 bis 2 Stunden aufbewahrt.

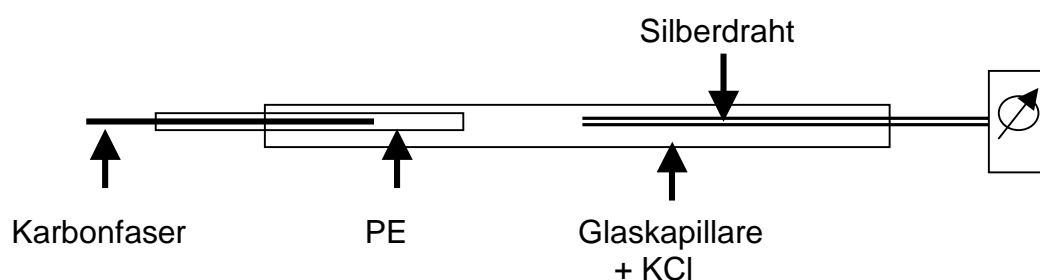


Abbildung 3-2: Aufbau einer Amperometrie-Elektrode

Die zum Grossteil von einem PE-Schlauch ummantelte Karbonfaser war in einer Glaskapillare befestigt. Über die 3 M KCl - Lösung und einen chlorierten Silberdraht wurde der Kontakt zum Vorverstärker hergestellt.

Vor jeder Messung wurden die Elektroden zuerst an ihrer Spitze mit Hilfe der stromdurchflossenen Drahtschleufe kurz erhitzt. Das PE konnte dadurch von der Spitze der Karbonfaser zurückweichen. Anschliessend wurden sie über die Glaskapillare mit 3 M KCl befüllt, sodass die Karbonfaser in direktem Kontakt zur KCl-Lösung stand.

Nach mehreren Messungen wurde die Spitze der Karbonfaser mittels einer sehr scharfen Rasierklinge um wenige μm gekürzt, da das bei der Messung an der Karbonfaser adhärierende Zellmaterial die folgenden Messungen beeinträchtigen könnte.

3.9.3 Aufbau und Komponenten

Auf einem pneumatisch schwingungsgedämpften Arbeitstisch (*VH-3848-OPT-8*, Newport) wurde ein aufrechtes Mikroskop (*Axioskop 2 FS plus*, Zeiss) installiert, sodass Schwingungen als mögliche störende Einflüsse minimiert waren. Der Mikromanipulator 5171 (Eppendorf) wurde über einen Stahlträger befestigt. Die Schrittmotoren des Manipulators erlaubten eine Vor- und Rückwärtsbewegung mit einer Auflösung von 50 nm.

Die sorgfältige Erdung der Apparatur war für rauscharme Messungen unerlässlich. Dazu wurden ausgehend vom Erdungsanschluss des Patch-Clamp Verstärkers EPC9 (HEKA) die Arbeitsplatte, der Träger des Manipulators und ein zentraler Punkt auf dem Mikroskoptisch mit einem Kupfergewebeband verbunden. Von diesem Punkt aus erfolgte die Erdung anderer kritischer Punkte der Apparatur, insbesondere freie Metalloberflächen in der Nähe der Messsonde. Die so erreichte Rauschamplitude (Rauschanalyseoption der Messsoftware *Pulse*, HEKA) betrug zwischen 800 fA und 5 pA.

Der Lebenschnitt wurde in einer Zellkulturschale (Durchmesser 4 cm) unter das Mikroskop platziert, mit einer zu passender Grösse gebogenen Drahtschleife fixiert und mit einer 63-fachen Vergrößerung (Objektiv *Acroplan*, Zeiss) fokussiert.

Der Zu- und Ablauf der Lösungen wurde mit Hilfe eines doppelt angelegten Perfusionssystems durchgeführt. Zur Zufuhr von frischer Tyrode-Lösung wurde die Spritzenpumpe Valve link 8 (AutoMate Scientific) verwendet. Das Absaugen überschüssiger Badlösung erfolgte mit einer Membranpumpe (Roth).

Die Lösungen (pH 7,4) wurden vor Zugabe über eine halbe Stunde mit einer Gasmischung aus 95% N₂ und 5% CO₂ (für hypoxische Bedingungen) oder mit einer Gasmischung aus 20% O₂, 5% CO₂ und 75% N₂ (für Normoxie) vorgesättigt und im Wärmebad auf eine Temperatur von 37°C angewärmt. Der Sauerstoffpartialdruck betrug in der Hypoxie-Lösung 20 mmHg, für Normoxie 140 mmHg.

Die Elektrode wurde über einen direkt an der Messkammer angebrachten Vorverstärker mit dem Patch-Clamp-Verstärker EPC9 verbunden. Zur Aufzeichnung wurde die Messsoftware *Pulse* (HEKA) verwendet.

3.9.4 Ablauf einer Messung und Auswertung

Unter mikroskopischer Sicht stellten sich die Glomuszellen als kugelige, hellgrün leuchtende Zellgruppen dar. Die Elektrode wurde mit + 800 mV polarisiert und mit Hilfe des Mikromanipulators unter mikroskopischer Kontrolle nahe der Zelloberfläche einer Glomuszelle positioniert. Die amperometrischen Signale wurden mit dem EPC9-Verstärker aufgezeichnet, bei 100 Hz gefiltert und zu 250 Hz digitalisiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Aufzeichnungssoftware Pulse (HEKA). Als amperometrisches Signal (Spike) wurden Stromstärken von mindestens 1 pA bei einem Grundrauschen von ca 800 fA angesehen. Ein typisches Signal ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

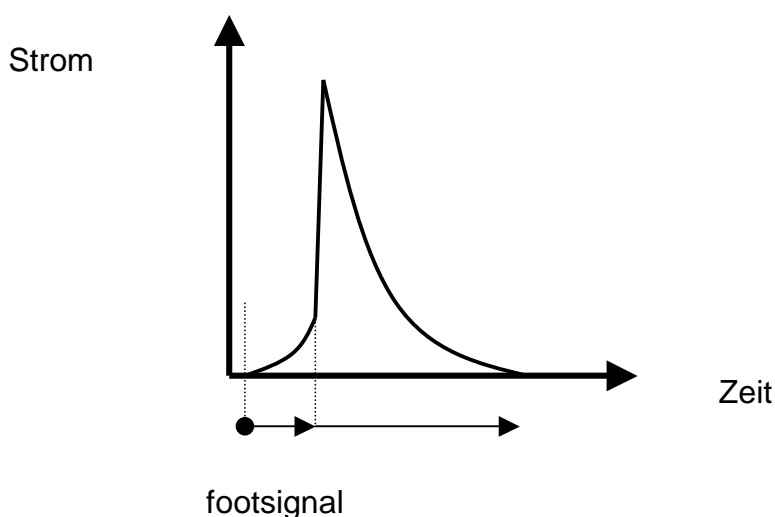


Abbildung 3-3: Skizze eines Amperometriesignals bei Transmitterfreisetzung

Ein typischer Spike stellte sich mit einem zuerst langsamen Anstieg des Stromes (= footsignal, etwa 8 ms) und einer darauffolgenden plötzlichen Stromspitze dar (bis zu mehreren nA). Die Grösse der Spitze war direkt proportional zur Menge des freigesetzten Moleküls. Im Anschluss an die Spitze folgte eine über 50 ms andauernde Abnahme des Stromes. Dieser Ablauf repräsentierte die initial geringe Freisetzung von Transmitter aus den Vesikeln (footsignal), gefolgt von explosionsartiger Freisetzung (Spitze) und „langsamem“ Wegdiffundieren der Moleküle von der Karbonfaser (Signalabfall).

4 Ergebnisse

4.1 Histamin und Dopamin als Transmitter im Glomus caroticum

4.1.1 Nachweis der Exozytoseproteine

Für die Freisetzung von Aminen durch Nerven- und endokrine Zellen werden verschiedene Proteine des Exozytoseapparates benötigt [26]. Die Typ I Zellen des Glomus caroticum exprimieren zwei wichtige Komponenten dieses Apparates: SNAP25 und Syntaxin. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass beide Proteine in den Typ I Zellen vorhanden sind (Abb. 4-1).

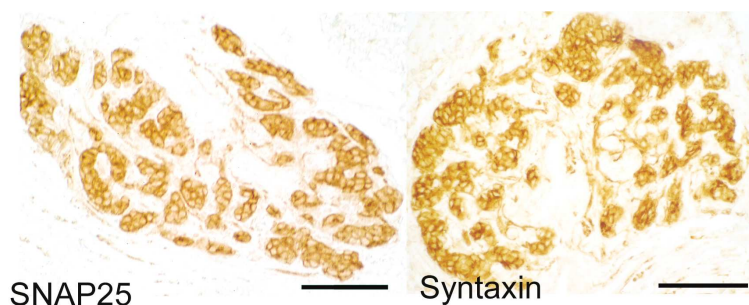


Abbildung 4-1: Immunhistochemischer Nachweis von SNAP25 und Syntaxin

Mit monoklonalen Antikörpern gegen SNAP25 und Syntaxin, zwei Komponenten des Exozytoseapparates, wird die Expression dieser Proteine im Glomus caroticum gezeigt. Die Balkenlänge in den Abbildungen entspricht 100 µm.

Durch Westernblots konnte die Expression von SNAP25 und Syntaxin im Glomus caroticum bestätigt werden. Dabei diente das Striatum der Ratte als Positivkontrolle (Abb. 4-2 a). Mittels RT-PCR wurde darüber hinaus die Expression von SNAP25 mRNA im Glomus caroticum gezeigt (Abb. 4-2 b). Die Zelllinie PC12, eine Tumorzelllinie des Nebennierenmarks der Ratte, wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt.

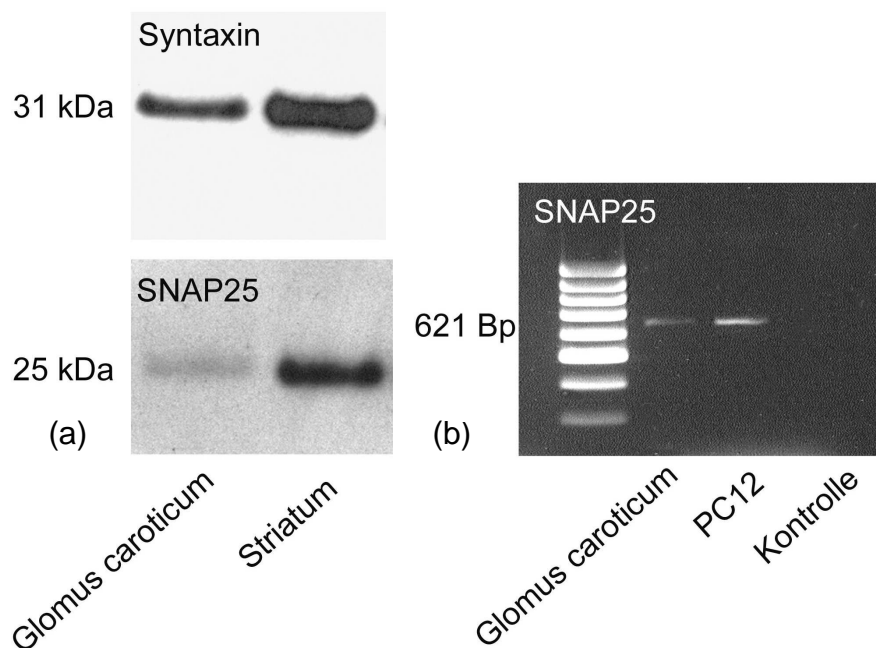


Abbildung 4-2: Expression von SNAP25 und Syntaxin

Westernblots belegen die Expression von SNAP25 und Syntaxin im Glomus caroticum anhand der Banden bei einem Molekulargewicht von 25 bzw. 31 kDa. Als Positivkontrolle wurde Gewebe aus dem Striatum verwendet (a). SNAP25 mRNA wurde mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte nachgewiesen. Die cDNA aus PC12 - Zellen diente als Positivkontrolle, Wasser als Negativkontrolle (b).

Der immunhistochemische Nachweis von SNAP25 gelang auch in den Neuroepithelialen Körperchen (NEBs) der Lunge. Sie finden sich hauptsächlich im respiratorischen Epithel der Bronchiolen junger Ratten im Alter weniger Wochen. Sie treten vereinzelt auf, meist in Gruppen von wenigen Zellen und befinden sich zumeist an Verzeigungen der Bronchiolen bzw. am Übergang zwischen Bronchiolen und Alveolen. Die Zellen haben apikal Kontakt zur Atemluft. Basal sind sie von Nervenfasern (afferent und / oder efferent) innerviert.

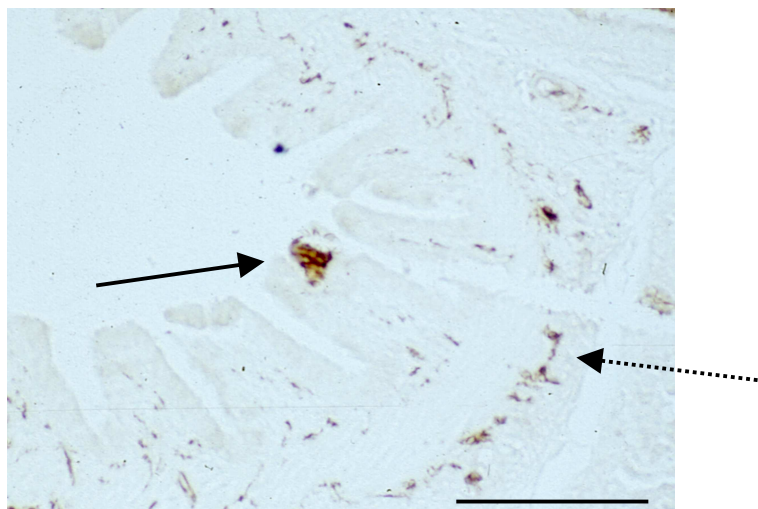


Abbildung 4-3: SNAP25 im Neuroepithelialen Körperchen der Lunge

Mittels immunhistochemischer Färbung gelang der Nachweis von SNAP25 auch in den NEBs der Lunge. Die NEBs sind als Gruppen einzelner Zellen im respiratorischen Epithel von Bronchiolen lokalisiert (durchgezogener Pfeil). Mit SNAP25-Antikörpern lassen sich auch Nervenfasern innerhalb und basal des Epithels anfärben (gestrichelter Pfeil). Die Länge des Balkens entspricht etwa 100 µm.

4.1.2 Biosynthese und Speicherung in Vesikeln

Zur Biosynthese von Dopamin benötigen Zellen unter anderem Tyrosinhydroxylase (TH) und zur Synthese von Histamin Histidindecaboxylase (HDC). Die Typ I Zellen des Glomus caroticum exprimieren sowohl TH als auch HDC, wie mittels Immunhistochemie in Folgeschnitten dargestellt ist (Abb. 4-4 a). Fluoreszenzhistochemische Färbungen zeigen deutlich die Kolo-kalisation dieser beiden Enzyme in den Typ I Zellen (Abb. 4-4 b). Die Ergebnisse des Westernblots und der RT-PCR bestätigen, dass HDC sowohl auf der Protein- als auch auf mRNA-Ebene vertreten ist (Abb. 4-4 c + d). Typ I Zellen sind also in der Lage, sowohl Dopamin als auch Histamin zu synthetisieren.

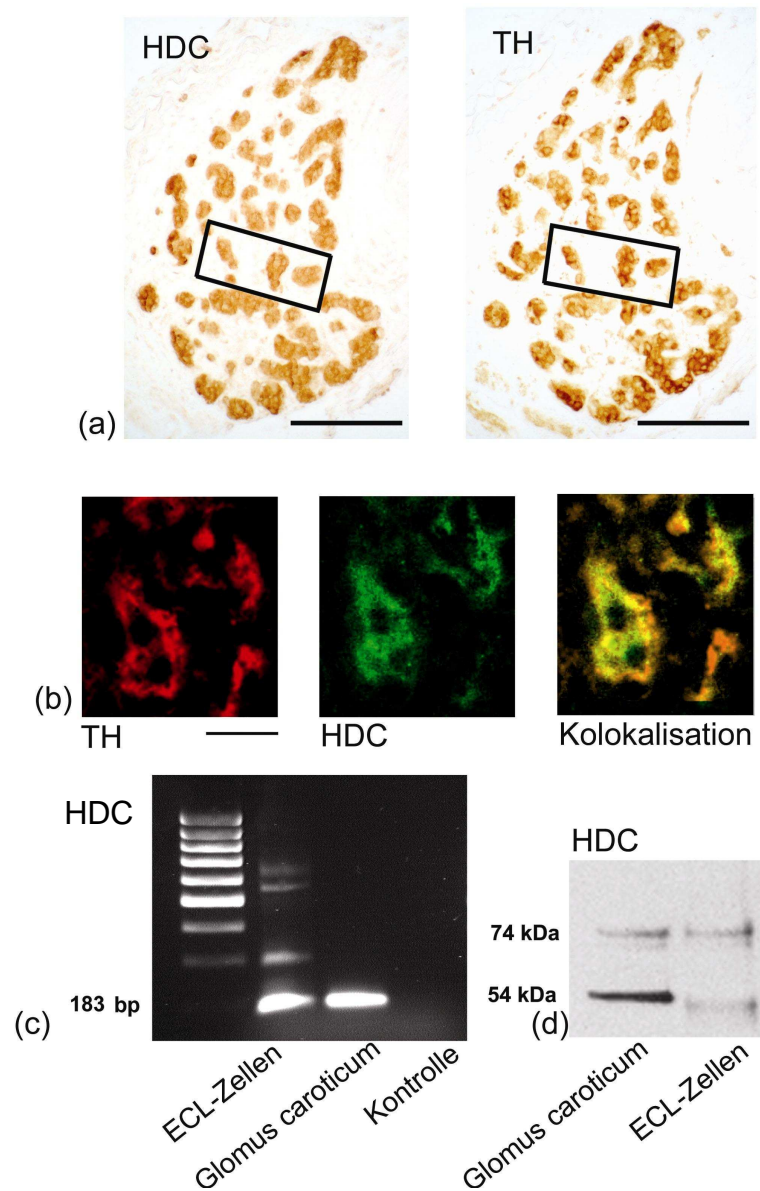


Abbildung 4-4: Nachweis der Biosyntheseenzyme für Dopamin und Histamin

Folgeschnitte des in Paraffin eingebetteten Glomus caroticum wurden mit polyklonalem HDC-Antiserum und monoklonalen TH-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Alle TH-positiven Zellgruppen exprimieren auch HDC (Vergleiche Kasten). Die Balkenlänge entspricht 100 μm (a). Fluoreszenzdoppelfärbungen zeigen die Kolokalisation von TH und HDC in den Sensorzellen. Die Balkenlänge entspricht 20 μm (b). Die Expression von HDC im Glomus wurde mittels RT-PCR (c) und Westernblot (d) gezeigt. ECL-Zellen und Mastzellen dienen jeweils als Positivkontrolle, Wasser als Negativkontrolle (c und d).

Im Anschluss an die Biosynthese werden Dopamin und Histamin in Vesikel transportiert und dort bis zur Freisetzung gespeichert. Der Transport in die Speichervesikel geschieht mittels vesikulären Monoamin - Transportern (VMAT1 und VMAT2). Es konnte bestätigt werden, dass Typ I Zellen eine positive Immunreaktion bei der Färbung mit Antikörpern gegen VMAT1 und 2 zeigen ([42] und Abb. 4-5 a). Mittels RT-PCR und Sequenzierung konnte auch die mRNA von VMAT1 und 2 nachgewiesen werden (Abb. 4-5 b). Folglich sind die Sensorzellen sowohl mit VMAT1 als auch mit VMAT2 ausgestattet.

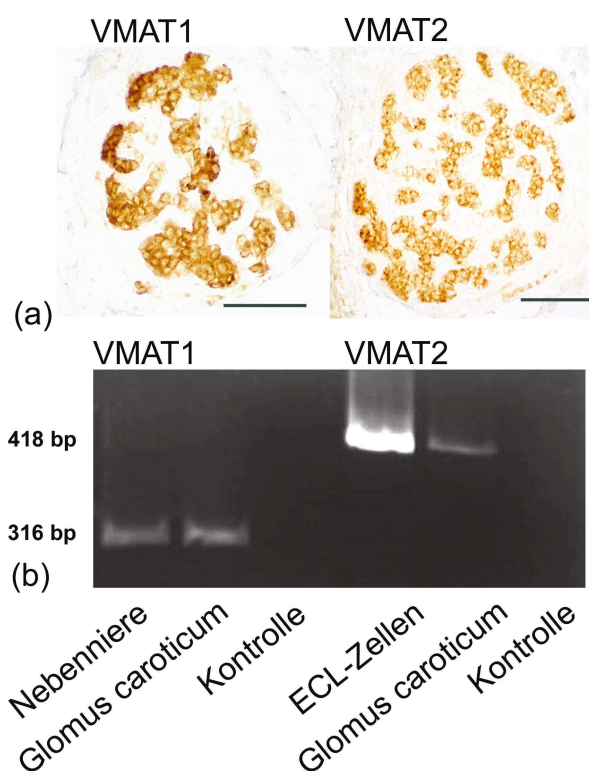


Abbildung 4-5: Expression der vesikulären Amintransporter

Immunhistochemische Färbungen mit polyklonalen Antikörpern gegen VMAT1 und VMAT2 zeigen die Expression in den Sensorzellen des Glomus caroticum. Die Balkenlänge entspricht 100 μm (a). Mittels RT-PCR wurde die mRNA von VMAT1 und VMAT2 nachgewiesen. Dabei wurden die Nebenniere und ECL-Zellen als Positivkontrolle und Wasser als Negativkontrolle verwendet (b).

4.1.3 Histamin im Glomus caroticum und Freisetzung bei Hypoxie

Um zu untersuchen, ob Histamin von den Glomera selbst synthetisiert wird, wurde der Histamingehalt in 47 isolierten Glomera mittels eines Radioimmunoassays bestimmt (Gewicht pro Glomus ca. 50 µg). Die Glomera enthalten grosse Mengen an Histamin: 164 ± 41 pmol Histamin pro Glomus (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die Gesamtmenge an Histamin in einem Glomus caroticum ist damit um ein vielfaches grösser als die gemessenen Mengen an Dopamin (10,5 pmol) und Acetylcholin (5,6 pmol) [28, 48].

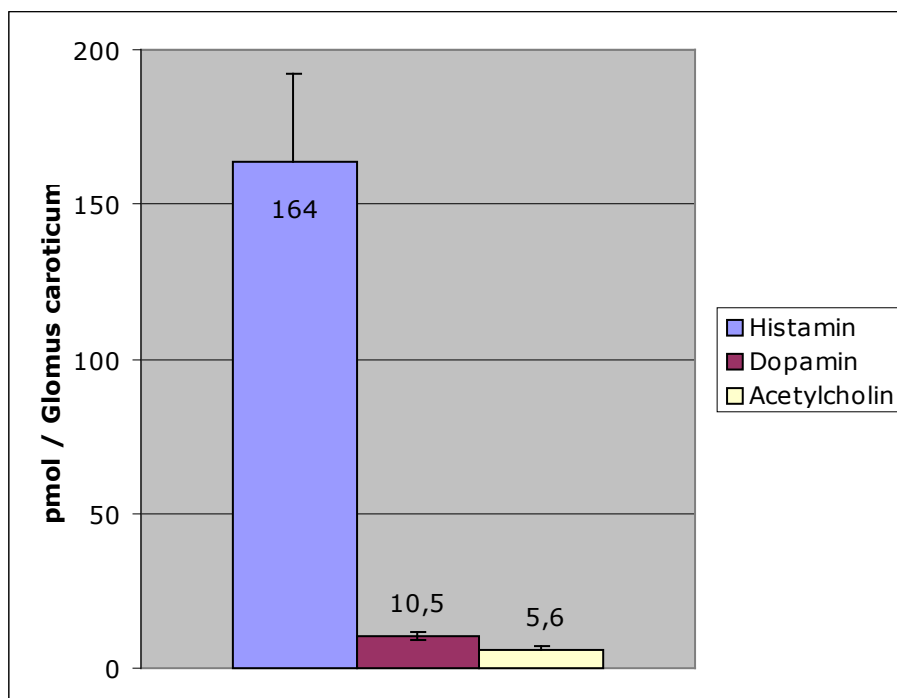


Abbildung 4-6: Vergleich von Histamin, Dopamin und Acetylcholin im Glomus

Im Vergleich zu den bekannten Mengen an Dopamin und Acetylcholin ist die Menge an Histamin im Glomus caroticum um ein Vielfaches höher. Die Werte für Dopamin und Acetylcholin entstammen den Messungen anderer Arbeitsgruppen [28, 48].

Darüber hinaus wurde untersucht, ob Hypoxie (3,5% O₂) die Histaminfreisetzung aus dem isolierten Glomus caroticum auslösen kann. Die Menge an freigesetztem Histamin wurde wiederum mittels eines Radioimmunoassays bestimmt. In insgesamt fünf Experimenten setzten die Glomera bei Normoxie innerhalb von 30 Minuten $28 \pm 5\%$ ihres gesamten Histamingehaltes frei. Unter hypoxischen Bedingungen erhöhte sich die Histaminausschüttung auf $45 \pm 7\%$ ($p < 0,05$) (Abb. 4-7).

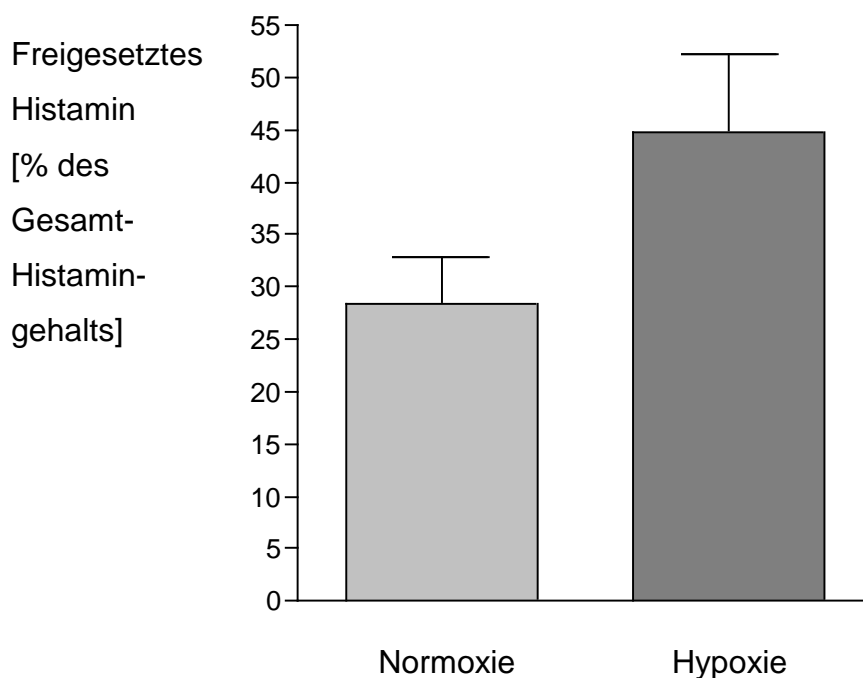


Abbildung 4-7: Freisetzung von Histamin bei Normoxie und Hypoxie

Effekt von Normoxie und Hypoxie auf die Histaminfreisetzung des Glomus caroticum *in vitro*: im Vergleich zu Normoxiebedingungen ($28 \pm 5\%$) setzten die Glomusorgane unter Hypoxiebedingungen im Mittel $45 \pm 7\%$ ihres gesamten Histamingehalts frei ($p < 0,05$, $n=5$).

4.1.4 Freisetzung von Dopamin bei Hypoxie

Mittels Amperometrie konnte die Freisetzung von Dopamin aus den Zellen des Glomus caroticum bei Hypoxie gezeigt werden. Die freigesetzten Transmittermoleküle wurden beim Kontakt mit der polarisierten Karbonfaser oxidiert. Dieser Strom wurde nach Verstärkung gemessen; die Darstellung erfolgte durch eine Funktion von Stromstärke in Abhängigkeit von der Zeit. Die Oxidation jedes einzelnen Moleküls erzeugte dabei einen plötzlichen Anstieg der Stromstärke um ein Vielfaches. Die Höhe der Spikes war direkt proportional zur Menge der freigesetzten Moleküle. Bei Zugabe von stickstoffangereichertem Medium (Hypoxie) zum Lebenschnitt des Glomus wurde eine deutliche Zunahme von Häufigkeit und Amplitude der charakteristischen Spikes beobachtet (Abb. 4-8). Diese Beobachtung konnte ebenso bei Depolarisation durch 40 mM KCl gemacht werden. Bei Zugabe von oxygeniertem Medium waren Frequenz und Amplitude der Spikes wiederum rückläufig.

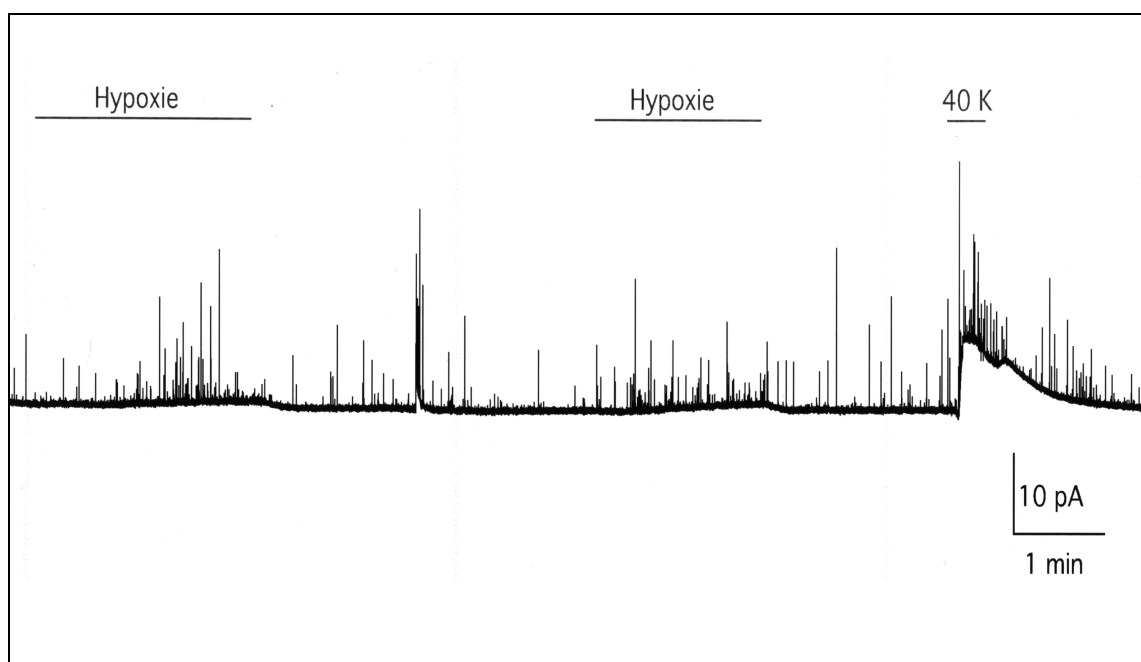


Abbildung 4-8: Amperometrische Messung der Dopaminfreisetzung

Die Zugabe von mit Stickstoff gesättigter Badlösung und von 40 mM Kaliumlösung führte zu einer Zunahme der Frequenz und der Amplitude der charakteristischen Spikes. Die

Anhebung der Grundlinie bei Zugabe von 40 mM Kalium erklärt sich aus dem zusätzlichen Flüssigkeitsstrom, der eine Bewegung der Karbonfaser bewirkt hat (n=4).

4.1.5 RT-PCR-Analyse der Rezeptoren H1, H2, H3

Der Nachweis der mRNA von Histaminrezeptoren im Glomus caroticum wurde mit RT-PCR geführt. Die Amplifikation mit genspezifischen Primern zeigte die Expression von mRNA der Rezeptoren H1 und H2 sowie der L-Isoform von H3. Die Ergebnisse wurden durch Sequenzierung bestätigt (Abb. 4-9).

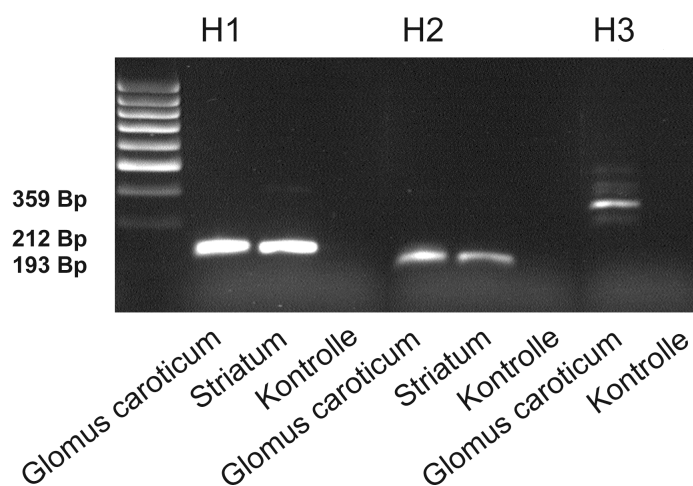


Abbildung 4-9: Nachweis der Histaminrezeptoren mRNA

Der Nachweis von mRNA der Histaminrezeptoren H1, H2 und H3 wurde mittels RT-PCR und nachfolgender Sequenzierung geführt. Als Positivkontrolle diente Gewebe aus dem Striatum, als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt.

4.2 Identifikation der GTP-CH in Typ I Zellen

4.2.1 Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen

Für die Biosynthese von Dopamin wird nicht nur Tyrosinhydroxylase (TH) sondern auch der Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) benötigt. TH wird von den Typ I Zellen des Glomus caroticum exprimiert [39]. Bisher war aber nicht bekannt, ob dort auch der Kofaktor BH₄ synthetisiert wird. Mittels Immunhistochemie und Westernblots wurde hier gezeigt, dass das limitierende Enzym der Biosynthese, GTP-Cyclohydrolase (GTP-CH) in Typ I Zellen vorhanden ist (Abb. 4-10 a + c).

Die Kontrollen wurden ohne den ersten Antikörper inkubiert und zeigten keine Farbreaktion. Mit RT-PCR und nachfolgender Sequenzierung wurde gezeigt, dass tatsächlich GTP-CH mRNA vorhanden ist (Abb. 4-10 b).

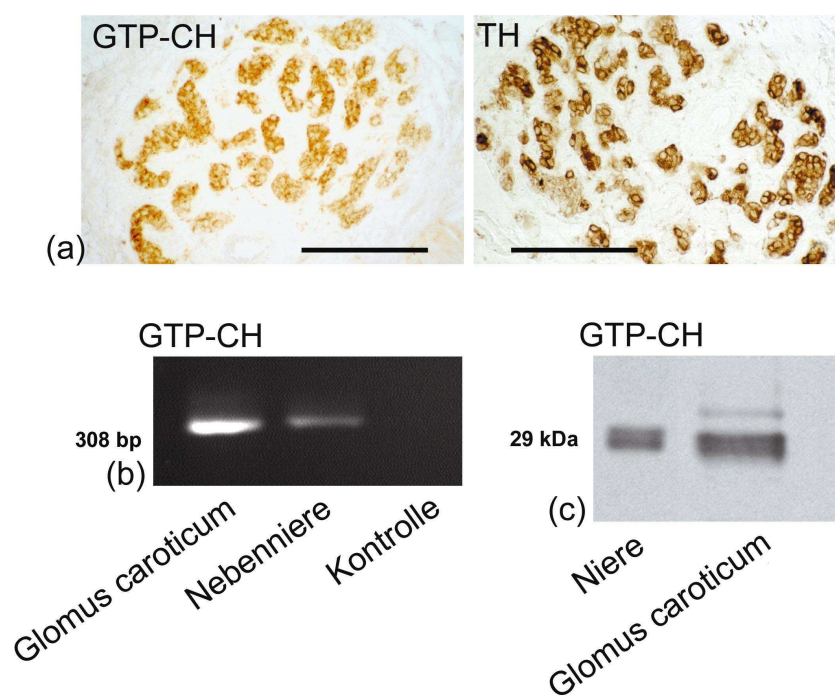


Abbildung 4-10: Identifikation der GTP-CH im Glomus caroticum

Immunhistochemische Färbungen zeigen die Expression von GTP-CH und TH in den Sensorzellen. Die Balkenlänge entspricht 100 µm (a). RT-PCR-Analysen zeigen die Anwesenheit der GTP-CH mRNA. Es wurde Gewebe der Nebenniere als Positivkontrolle

und Wasser als Negativkontrolle verwendet (b). Westernblots bestätigten die Expression der GTP-CH im Glomus caroticum und in der Positivkontrolle (Niere) (c).

4.2.2 Aktivität der GTP-CH in verschiedenen Geweben der Ratte

Mittels HPLC-Technik konnte die Aktivität des Enzyms in verschiedenen Geweben der Ratte bestimmt werden. Dazu wurde die Konzentration des Produktes der GTP-CH bestimmt, des Neopterin-Triphosphat-Komplexes. Anhand der gemessenen Konzentration dieses Produktes bezogen auf die Konzentration des Ausgangssubstrates und die für die Synthese benötigten Zeit, kann auf die Aktivität des Enzyms geschlossen werden (Einheit: pmol / mg / min).

In Glomus und Striatum wurden vergleichbare Enzymaktivitäten gefunden (0,04 bzw. 0,05 pmol / mg / min). Als Positivkontrolle wurden Leber und Medulla oblongata verwendet (0,3 bzw. 0,2 pmol / mg / min), als Negativkontrolle die Aorta (0,007 pmol / mg / min).

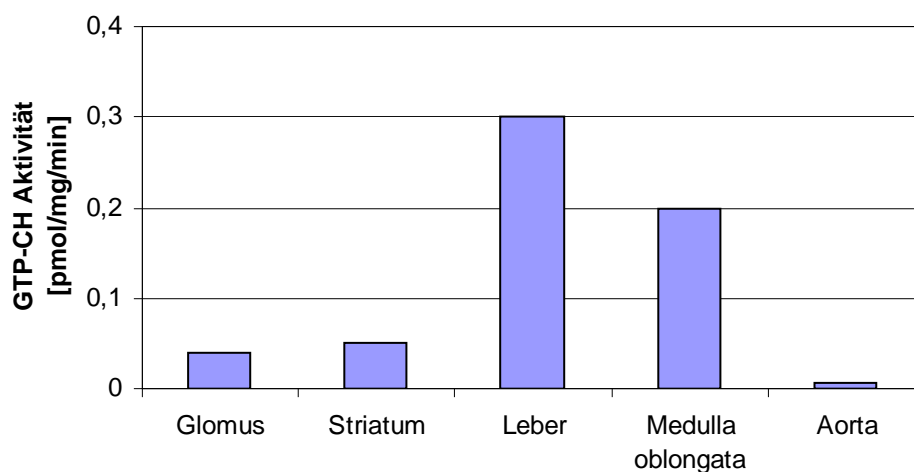


Abbildung 4-11: Aktivität der GTP-CH in verschiedenen Geweben der Ratte

Die Aktivität der GTP-CH im Glomus caroticum ist vergleichbar mit der Aktivität im Striatum. Die Aktivität in den Positivkontrollen (Leber und Medulla oblongata) ist um ein Mehrfaches grösser. In der Aorta als Negativkontrolle konnte keine nennenswerte Aktivität gemessen werden.

5 Diskussion

5.1 Histamin, ein neuer Transmitter im Glomus caroticum

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Glomus caroticum der Ratte über alle notwendigen Komponenten zur Biosynthese, Speicherung und Freisetzung von Histamin verfügt. Darüber hinaus wird die mRNA für die Histaminrezeptoren H1, H2 und H3 exprimiert. Zum ersten Mal wurde nachgewiesen, dass die Glomera grosse Mengen an Histamin enthalten und dass bei Hypoxie die Histaminfreisetzung zunimmt. Folglich erfüllt Histamin die notwendigen Kriterien als wichtiger Transmitter in den Sensorzellen. Diese Zellen sind unentbehrlich für die Kontrolle des respiratorischen Gleichgewichts und der Sauerstoffversorgung des Organismus, ganz besonders des Gehirns [37, 40].

Die Typ I Zellen des Glomus caroticum sind einzigartig, da sie nicht nur eine Immunreaktion für VMAT1 zeigen, sondern auch für VMAT2 ([42] und diese Arbeit). Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass auch die mRNA für beide vesikulären Transporter im Glomus exprimiert wird. VMAT2 unterscheidet sich von VMAT1 insbesondere durch seine höhere Affinität zu Histamin [13, 32] und wird daher vor allem in histaminergen Zellen exprimiert, wie zum Beispiel in den Enterochromaffinlike (ECL-) Zellen des Magens [41].

Im Glomus caroticum wird Histamin von den Sensorzellen synthetisiert. Dies wurde durch die Kolokalisation zweier Enzyme in den Sensorzellen belegt. Es ist bekannt, dass sie das limitierende Enzym der Dopaminbiosynthese, die Tyrosinhydroxylase (TH) exprimieren [39]. Durch immunhistochemische Verfahren konnte gezeigt werden, dass diese Zellen auch über die Histamin synthetisierende Histidindecaboxylase (HDC) verfügen. Damit scheiden Mastzellen oder andere Strukturen des Glomus als primäre Histaminquelle aus. Ähnlich wie typische neuroendokrine histaminerge Zellen, wie z.B. die ECL-Zellen, verfügen die Sensorzellen über alle für die Biosynthese, Speicherung und Freisetzung von Histamin notwendigen Proteine [22, 41]. Die Menge an Histamin, die im gesamten Glomusorgan bestimmt wurde (164 pmol pro Glomus), ist etwa zehnmal grösser als die im Glomus gemessene Dopaminmenge [20, 48].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und immunhistochemische Untersuchungen (nicht veröffentlicht) ergaben, dass im Glomus caroticum nur wenige Mastzellen vorhanden sind und damit nicht zum hohen Histamingehalt beitragen können.

Der Histamingehalt im Glomus ist höher als in vielen anderen Geweben der Ratte, wie z.B. Haut (234 nmol / g), Magenschleimhaut (396 nmol / g) und Cortex cerebri (0,3 nmol / g) und ist vergleichbar zum Histamingehalt in den peritonealen Mastzellen (10-30 pg pro Zelle) [1, 23, 33, 36].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Histamin im Glomus nicht nur vorhanden ist, sondern auch, dass dessen Freisetzung bei Hypoxie gesteigert wird. Deshalb ist Histamin, das von den Sensorzellen synthetisiert, gespeichert und freigesetzt wird, ein möglicher Transmitter in der Kommunikation zwischen den Sensorzellen und dem Nervensystem.

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von Histamin als Botenstoff im Glomus caroticum ist der Nachweis der mRNA der Histaminrezeptoren H1, H2 und H3. Bisher nicht näher identifizierte Zellen des Glomus caroticum besitzen folglich Histaminrezeptoren. Diese erfüllen, falls auf den Sensorzellen lokalisiert, möglicherweise eine autokrine Funktion, oder, falls auf Dendriten lokalisiert, eine Funktion bei der Signalweiterleitung.

Es ist bekannt, dass Histamin bei der Weiterleitung des Signals „Hypoxie“ an noch nicht näher bezeichneten Stellen der Signalkette eine wichtige Rolle spielt [12]. Während einerseits bei Zugabe von Histamin zum Glomus caroticum keine Zunahme der Impulsfrequenz im Carotis Sinus Nerv beobachtet wurde [29], konnte durch Histamin eine Erhöhung des cAMP-Spiegels im Glomus caroticum der Ratte ausgelöst werden [34]. Letzteres legt eine Beteiligung der H2-Rezeptoren nahe, deren mRNA in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Es sind weitere Studien über die genaue Lokalisation der Rezeptoren im Glomus selbst, im Ganglion Petrosus oder an anderen Stellen des respiratorischen Systems geplant.

Im Glomus caroticum der Ratte wurde auch die mRNA des H3-Rezeptors gefunden (eine Isoform mit zusätzlichen 30 Aminosäuren im intrazellulären Anteil), welcher ursprünglich als Autorezeptor beschrieben wurde und welcher die Histaminsynthese und -freisetzung im Gehirn reguliert [5]. Möglicherweise erfüllt Histamin, ähnlich wie Dopamin, afferente und / oder autokrine Regulationsaufgaben im Glomus caroticum.

5.2 Freisetzung von Dopamin: eine Voraussetzung für die Autotransplantation in das Striatum bei M. Parkinson

Es ist bekannt, dass die Tyrosinhydroxylase, das limitierende Enzym der Katecholamin- und damit Dopaminbiosynthese, in den Sensorzellen des Glomus caroticum vorhanden ist [39]. Dopamin wird mit Hilfe von VMAT1 in den Vesikeln gespeichert und mit Hilfe verschiedener Proteine des Exozytoseapparates, wie zum Beispiel SNAP25 und Syntaxin, freigesetzt [50]. Mittels Amperometrie konnte die qualitative und quantitative Freisetzung von Dopamin bei Hypoxie an der Oberfläche der Sensorzellen gemessen werden ([38] und diese Arbeit). Die Technik erlaubte eine Echtzeitbeobachtung der zellulären Antwort der Sensorzellen auf Hypoxie durch Exozytose von Dopamin.

Die Reaktion der Sensorzellen im Glomus caroticum der Ratte ist vergleichbar mit der Beobachtung an isolierten Glomuszellen des Kaninchens [35, 46]: in beiden Fällen wird die Dopaminfreisetzung von Hypoxie gesteigert und ist von der Anwesenheit von Calcium abhängig.

Darüber hinaus zeigten frühere Analysen auf pharmakologischer und molekularer Ebene, dass Dopamin wahrscheinlich eine autokrine Funktion an den Sensorzellen via D2-Rezeptoren übernimmt: Untersuchungen an D2-Knock-out-Mäusen ergaben, dass diese die Fähigkeit zur Anpassung an dauerhafte Hypoxie und akute Hyperkapnie verloren haben [24]. Mittels molekularbiologischer Techniken wurden am Glomus caroticum des Kaninchens die Typ I Zellen als Ort der Expression der D2-Rezeptoren beschrieben [47]. Dies sind Hinweise dafür, dass Dopamin über vorhandene D2-Rezeptoren ein autokriner Botenstoff der Typ I Zellen im Glomus caroticum ist.

Analysen am Glomus caroticum der Katze zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Dopamin und einer Zunahme der Impulsfrequenz im Carotis Sinus Nerv. Dabei wurde amperometrisch die Exozytose von Dopamin bestimmt und zeitgleich das elektrische Potential des Carotis Sinus Nervs abgeleitet. Ein Signal im Nerven konnte auch durch Stimulation von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren induziert werden, ohne dass dabei Dopamin freigesetzt wurde [10].

Ebenfalls am Glomus caroticum der Katze wurde gezeigt, dass die hypoxiebedingte Freisetzung von Dopamin und Noradrenalin durch Acetylcholin über muskarinerge Rezeptoren auf den Glomuszellen moduliert wird [49]. Dies sind Hinweise darauf, dass Acetylcholin möglicherweise regulatorische Aufgaben bei der Transmitterfreisetzung im Glomus caroticum erfüllt.

Die genaue Charakterisierung der Zellen des Glomus caroticum ist auch für eine mögliche Therapie des Morbus Parkinson von grosser Bedeutung. Etwa 1-2 % der Bevölkerung über 65 Jahren leidet an dieser Erkrankung.

Beim M. Parkinson gehen dopaminproduzierende Neurone zugrunde, deren Zellkerne in der Substantia nigra liegen und deren Nervenendigungen in das Striatum projizieren. Die dopaminergen Neurone haben eine wesentliche Funktion für den Bewegungsantrieb, indem sie einen inhibierenden Einfluss auf die Hemmung der motorischen Impulse des Grosshirns ausüben. Fällt diese Funktion weg, resultiert die typische, durch Bewegungsarmut und Antriebslosigkeit gekennzeichnete Klinik des M. Parkinson [27].

Gemäss neuester Erkenntnisse könnten die Glomera des erkrankten Individuums in das Striatum (auto-) transplantiert werden, dort Dopamin freisetzen und somit den Dopaminmangel im Striatum ausgleichen. Dies wurde bisher erfolgreich an Ratten und an Menschenaffen gezeigt. Dabei wurden in einem Tiermodell eines experimentellen Parkinsonismus die eigenen Glomera in das Striatum transplantiert. Nach drei Monaten konnte eine messbare Verbesserung der klinischen Symptomatik festgestellt werden [11, 14, 45]. Erste klinische Versuche am Menschen verliefen bereits erfolgsversprechend: dabei wurden insgesamt sechs an M. Parkinson erkrankten Patienten jeweils beide Glomera entnommen, als Zellsuspension aufbereitet und in das Striatum injiziert. Bei fünf von sechs Patienten konnte eine Verbesserung klinischer Parameter erzielt werden, welche sechs Monate nach Transplantation ihr Maximum erreichte [4]. In diesem Zeitraum werden möglicherweise neuronale Verbindungen gebildet, deren Ausbildung durch im Glomus caroticum enthaltene Wachstumsfaktoren stimuliert wird. So könnte das Glomus caroticum nicht nur als Dopaminquelle dienen, sondern auch als Quelle für neuronienstimulierende Wachstumsfaktoren [6].

Aus der Autotransplantation des Glomus caroticum in das Striatum ergibt sich eine neue Therapieoption dieser schweren chronischen Erkrankung, die den bisherigen therapeutischen Möglichkeiten in einigen Aspekten überlegen wäre.

Die medikamentöse Therapie des M. Parkinson ist oft problematisch. Sie ist nebenwirkungsreich und erfordert meist eine stetige Dosiserhöhung. Nach jahrelanger Einnahme zeigen die Medikamente oft keine Wirkung mehr [43].

Ein weiterer neuer Therapieansatz ist die Transplantation von embryonalem dopaminproduzierendem Gewebe in das Striatum. Studien ergaben Hinweise, dass diese Gewebstransplantation bei Patienten unter 60 Jahren eine Verbesserung der Symptome, wie Bewegungsarmut und Muskelsteife, bewirkte [15].

Bei der Transplantation embryonalen Nervengewebes ergeben sich jedoch gravierende Nachteile: erstens ist eine allogene Transplantation stets mit dem Risiko der immunologischen Abstossungsreaktion vergesellschaftet. Dieses Risiko kann nur durch die nebenwirkungsreiche Einnahme von Immunsuppressiva vermindert werden. Eine autologe Transplantation dagegen erfordert keine medikamentöse Immunsuppression. Zweitens ist die Verwendung von embryonalem Gewebe ethisch umstritten, nicht so die autologe Transplantation.

Weitere Therapieansätze, wie der Gentransfer von neuronienstimulierenden Wachstumsfaktoren in das Striatum [8], die direkte Einbringung von Wachstumsfaktoren [17] oder der Einsatz von Stammzellen zur Gewinnung dopaminproduzierender Zellen, sind noch in der Entwicklung.

Möglicherweise spielt auch die Produktion von Histamin im transplantierten Gewebe eine Rolle. Es wurde beschrieben, dass der Dopaminmangel bei M. Parkinson eine Zunahme der histaminergen Innervation in der Substantia nigra bewirkt. Dies ist möglicherweise ein Kompensationsmechanismus des Dopaminmangels [3]. Falls der stimulierende Effekt der histaminergen Fasern auch auf das Striatum, den Ort der Transplantation, übertragbar wäre, könnte die Autotransplantation des Glomus caroticum nicht nur den Dopaminmangel vermindern, sondern zusätzlich durch die Histaminproduktion einen dopaminstimulierenden Effekt zeigen.

5.3 GTP-CH wird im Glomus caroticum exprimiert und ist aktiv

Die GTP-Cyclohydrolase (GTP-CH) spielt bei der Biosynthese verschiedener Transmitter im Organismus eine wesentliche Rolle. Sie dient als limitierendes Enzym in der Synthese von Tetrahydrobiopterin (BH₄), einem wichtigen Kofaktor in der Synthese verschiedener Transmitter (siehe Abbildung 5-1 und [44]). Zum Beispiel ist die Synthese der Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin) von BH₄ abhängig, da der Ausgangsstoff L-DOPA von der Tyrosinhydroxylase (TH) nur in Anwesenheit von BH₄ synthetisiert wird. Ebenso ist die Biosynthese von Serotonin, Melanin und auch Stickoxid (NO) von BH₄ abhängig.

BH₄ wird in mehreren Schritten aus GTP synthetisiert. GTP-CH ist das katalysierende Enzym des ersten Syntheseschrittes, dabei entsteht Dihydroneopterintriphosphat aus GTP.

Die Expression von TH in den Sensorzellen des Glomus caroticum ist bereits lange bekannt [39]. Jedoch war bisher unklar, ob diese auch GTP-CH exprimieren. Es wurde gezeigt, dass auch die für die Dopaminbiosynthese benötigte GTP-CH im Glomus caroticum vorhanden ist. Ähnliche Befunde wurden gleichzeitig von einer anderen Arbeitsgruppe erhoben [25]. Darüber hinaus ist die GTP-CH im Glomus caroticum der Ratte nicht nur vorhanden, sondern auch enzymatisch aktiv, wie mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die Aktivität des Enzyms im Glomus caroticum ist vergleichbar mit der gemessenen Aktivität im Striatum der Ratte. Somit wurde bestätigt, dass das Glomus caroticum über aktive GTP-CH als ein wichtiges Enzym der Dopaminbiosynthese verfügt und es bei der Autotransplantation in das Striatum als Therapie bei M. Parkinson bereitstellen kann.

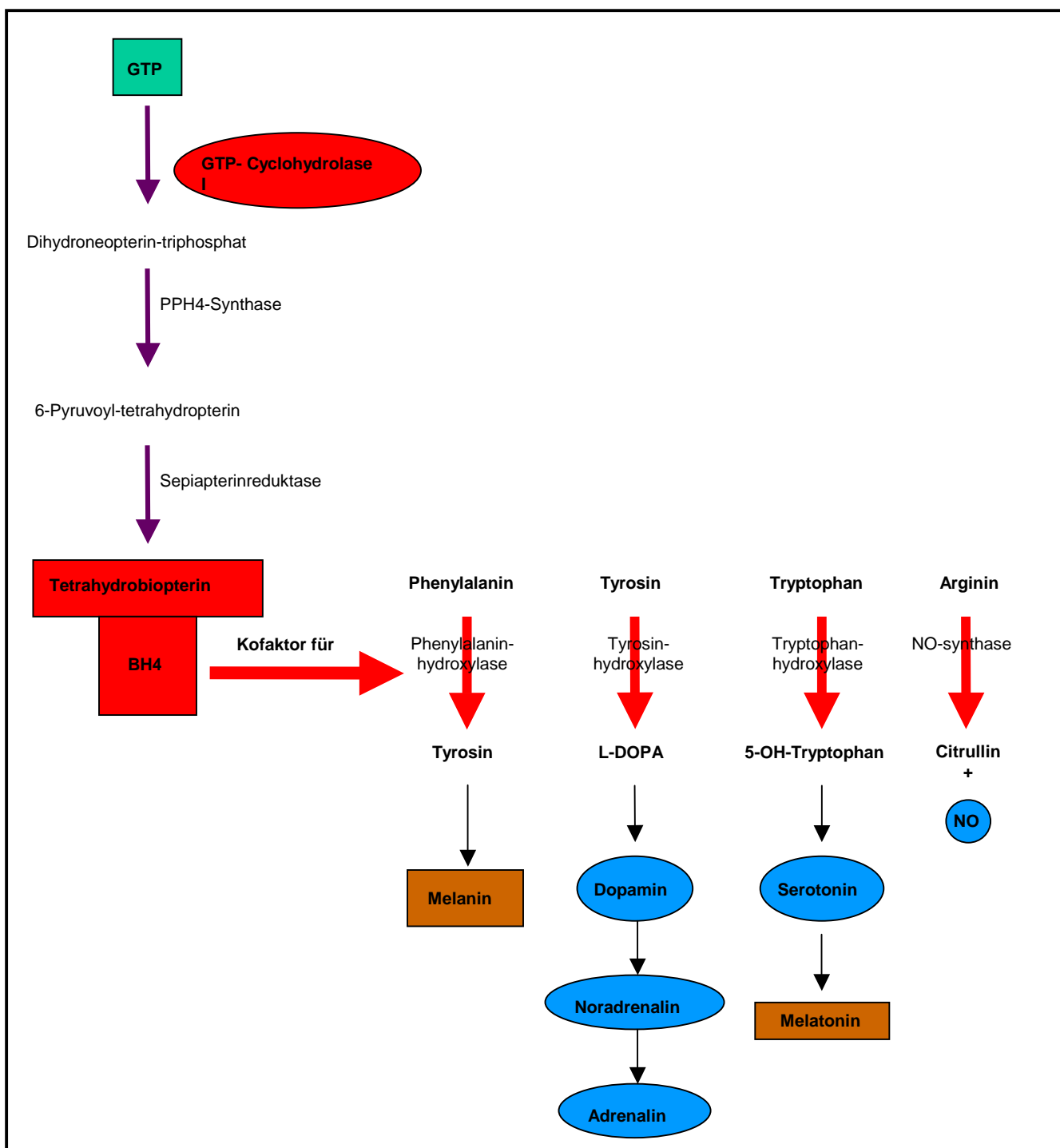


Abbildung 5-1: Übersicht über die Tetrahydrobiopterin-Biosynthese

BH4 wird in mehreren Schritten aus GTP synthetisiert. Das hierbei limitierende Enzym ist die GTP-CH. BH4 dient wiederum als Kofaktor für die Biosynthese von Katecholaminen, wie z.B Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sowie für die Biosynthese von Serotonin, Melanin und anderen Botenstoffen.

Hypoxische Bedingungen führen nicht nur zu einer schnellen Reaktion der Glomuszellen durch Freisetzung von Transmittern. Auch chronische Hypoxie hat einen regulierenden Einfluss auf die Expression der Biosyntheseenzyme. So gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur die Expression der TH durch Hypoxie gesteigert wird, sondern auch die Expression von GTP-CH [25]. Dies ist für eine Anpassung des Transmitter-Syntheseapparates an veränderte Gegebenheiten von grosser Bedeutung, denn somit kann auch auf langfristige hypoxische Bedingungen adäquat reagiert werden, wie es z.B. bei der Höhenanpassung der Fall ist.

Das Enzym GTP-CH wird ausser durch Hypoxie auch durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. So wurde anhand embryonaler dopaminerger Neurone der Ratte nachgewiesen, dass GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) einen stimulierenden Einfluss auf die Expression der GTP-CH hat [7]. Auch die Wachstumsfaktoren NGF (Nerve growth factor) und EGF (Epidermal growth factor) bewirken in der PC12-Zelllinie eine Zunahme der Aktivität der GTP-CH [2].

GTP-CH ist damit ein Enzym, das von verschiedenen Umweltbedingungen reguliert wird und dadurch einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Dopaminbiosynthese trägt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zellen des Glomus caroticum der Ratte alle notwendigen Komponenten zur Biosynthese, Speicherung und Freisetzung von Dopamin und Histamin besitzen und diese Transmitter bei Hypoxie freisetzen können.

Erstmals wurde hier Histamin als Transmitter im Glomus caroticum nachgewiesen: es wurde gezeigt, dass die Sensorzellen des Glomus caroticum das Histamin synthetisierende Enzym exprimieren. Die Speicherung von Histamin in Vesikeln erfolgt mit Hilfe eines vesikulären Monoamintransporters (VMAT2). Bisher bekannte immunhistochemische Ergebnisse über die Expression dieses Transportproteins in den Sensorzellen konnten bestätigt und mittels RT-PCR-Untersuchungen belegt werden. Ferner wurde nachgewiesen, dass die Sensorzellen auch über wichtige Komponenten des Exozytoseapparates verfügen. Darüber hinaus zeigten RT-PCR-Untersuchungen, dass im Glomus caroticum die mRNA der Histaminrezeptoren H1, H2 und H3 exprimiert wird.

Die Menge an Histamin im Glomus caroticum wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. Im Glomus caroticum ist mehr Histamin enthalten als in anderen Geweben der Ratte, und die Menge an Histamin ist um ein Vielfaches größer als die Menge des im Glomus caroticum enthaltenen Dopamins.

In vitro Experimente zeigten, dass die Freisetzung von Histamin aus dem Glomus caroticum durch Hypoxie verstärkt wird. Eine vermehrte Freisetzung bei Hypoxie konnte amperometrisch auch für Dopamin bestätigt werden. Es wurde hier zum ersten Mal beschrieben, dass ein Zelltyp zwei verschiedene Amine als Transmitter nutzt. Damit spielt sowohl Dopamin als auch Histamin eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Sauerstoffversorgung des Organismus und, aufgrund der Lage des Glomus caroticum, besonders des Gehirns.

Mit dem Nachweis von Expression und Aktivität des limitierenden Enzyms für die Tetrahydrobiopterin-Synthese wurde gezeigt, dass das Glomus caroticum sämtliche für die Dopaminsynthese notwendigen Schritte selbst durchführen kann. Damit erfüllt das Glomus caroticum die notwendigen Eigenschaften für eine erfolgreiche Autotransplantation in das Striatum bei Morbus Parkinson.

7 Literaturverzeichnis

- [1] **Alam MK, Sasaki M, Watanabe T and Maeyama K** (1995) Simultaneous determinations of histamine and N tau-methylhistamine by high-performance liquid chromatography-chemiluminescence coupled with immobilized diamine oxidase. *Anal Biochem* 20;229: 26-34.
- [2] **Anastasiadis PZ, Kuhn DM, Blitz J, Imerman BA, Louie MC and Levine RA** (1996) Regulation of tyrosine hydroxylase and tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes in PC12 cells by NGF, EGF and IFN-gamma. *Brain Res* 713: 125-133.
- [3] **Anichtchik OV, Rinne JO, Kalimo H and Panula P** (2000) An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 163: 20-30.
- [4] **Arjona V, Minguéz-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardal R, Mendez-Ferrer S, Martin JM, Perez M, Katati MJ, Valencia E, Garcia T and Lopez-Barneo J** (2003) Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 53: 321-328.
- [5] **Arrang JM, Garbarg M and Schwartz JC** (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302: 832-837.
- [6] **Barinaga M** (1998) Unusual Cells May Help Treat Parkinson's Disease. *Science* 279: 1301.
- [7] **Bauer M, Suppmann S, Meyer M, Hesslinger C, Gasser T, Widmer HR and Ueffing M** (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. *J Neurochem* 82: 1300-1310.
- [8] **Bjorklund A and Lindvall O** (2000) Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med* 6 (11): 1207-1208.

-
- [9] **Bolle T, Lauweryns JM and Lommel AV** (2000) Postnatal maturation of neuroepithelial bodies and carotid body innervation: a quantitative investigation in the rabbit. *J Neurocytol* 29: 241-248.
- [10] **Buerk DG, Lahiri S, Chugh D and Mokashi A** (1995) Electrochemical detection of rapid DA release kinetics during hypoxia in perfused-superfused cat CB. *J Appl Physiol* 78: 830-837.
- [11] **Cao X, Sun S and Tong E** (2002) Experimental study on heterograft of glomus cells of carotid body for hemiparkinsonian rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 22: 129-131.
- [12] **Dutschmann M, Bischoff M, Busselberg D and Richter W** (2003) Histaminergic modulation of the intact respiratory network of adult mice. *Pflugers Arch* 445: 570-576.
- [13] **Erickson JD, Eiden LE, Schafer MK and Weihe E** (1995) Reserpine- and tetrabenazine-sensitive transport of (3)H-histamine by the neuronal isoform of the vesicular monoamine transporter. *J Mol Neurosci* 6: 277-287.
- [14] **Espejo EF, Montoro RJ, Armengol JA and Lopez-Barneo J** (1998) Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 20: 197-206.
- [15] **Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D and Fahn S** (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719.
- [16] **Fu XW, Nurse CA, Wong V and Cutz E** (2002) Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *J Physiol* 539: 503-510.
- [17] **Gill S, Patel NK and Hotton GR** (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Nat Med* 9: 589.

-
- [18] **Greene LA and Tischler AS** (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2424-2428.
- [19] **Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, Yamamoto A and Moriyama Y** (1999) Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* 73: 2538-2545.
- [20] **Hertzberg T, Hellstrom S, Lagercrantz H and Pequignot JM** (1990) Development of the arterial chemoreflex and turnover of carotid body catecholamines in the newborn rat. *J Physiol* 425: 211-225.
- [21] **Hesslinger C, Kremmer E, Hultner L, Ueffing M and Ziegler I** (1998) Phosphorylation of GTP cyclohydrolase I and modulation of its activity in rodent mast cells. GTP cyclohydrolase I hyperphosphorylation is coupled to high affinity IgE receptor signaling and involves protein kinase C. *J Biol Chem* 273: 21616-21622.
- [22] **Hohne-Zell B, Galler A, Schepp W, Gratzl M and Prinz C** (1997) Functional importance of synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffin-like cells. *Endocrinology* 138: 5518-5526.
- [23] **Huang ZL, Mochizuki T, Watanabe H, Kagoshima M and Maeyama K** (1998) Biphasic elevation of plasma histamine induced by water immersion stress, and their sources in rats. *Eur J Pharmacol* 360: 139-146.
- [24] **Huey KA, Low MJ, Kelly MA, Juarez R, Szewczak JM and Powell FL** (2000) Ventilatory responses to acute and chronic hypoxia in mice: effects of dopamine D(2) receptors. *J Appl Physiol* 89: 1142-1150.
- [25] **Hui AS, Striet JB, Gudelsky G, Soukhova GK, Gozal E, Beitner-Johnson D, Guo SZ, Sachleben LR, Jr., Haycock JW, Gozal D and Czyzyk-Krzeska MF** (2003) Regulation of catecholamines by sustained and intermittent hypoxia in neuroendocrine cells and sympathetic neurons. *Hypertension* 42: 1130-1136.
- [26] **Jahn R, Lang T and Sudhof TC** (2003) Membrane fusion. *Cell* 112: 519-533.

-
- [27] **Jellinger KA** (2002) Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 62: 347-376.
- [28] **Kim DK, Prabhakar NR and Kumar GK** (2004) Acetylcholine release from the carotid body by hypoxia: evidence for the involvement of autoinhibitory receptors. *J Appl Physiol* 96: 376-383.
- [29] **Landgren S, Lilliestrand G and Zotterman Y** (1954) Impulse activity in the carotid sinus nerve following intracarotid injections of sodium-iodo-acetate, histamine hydrochloride, lergitin, and some purine and barbituric acid derivatives. *Acta Physiol Scand* 30: 149-160.
- [30] **Lauweryns JM, Van Ranst L and Verhofstad AA** (1986) Ultrastructural localization of serotonin in the intrapulmonary neuroepithelial bodies of neonatal rabbits by use of immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res* 243: 455-459.
- [31] **Lopez-Barneo J** (1996) Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. *Trends Neurosci* 19: 435-440.
- [32] **Merickel A and Edwards RH** (1995) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology* 34: 1543-1547.
- [33] **Metcalf DD, Baram D and Mekori YA** (1997) Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033-1079.
- [34] **Mir AK, Pallot DJ and Nahorski SR** (1983) Biogenic amine-stimulated cyclic adenosine-3',5'-monophosphate formation in the rat carotid body. *J Neurochem* 41: 663-669.
- [35] **Montoro RJ, Urena J, Fernandez-Chacon R, Alvarez dT and Lopez-Barneo J** (1996) Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 107: 133-143.
- [36] **Nakamura S, Watanabe H, Yokota T, Matsui H, Onji M and Maeyama K** (2000) Effect of rabeprazole on histamine synthesis in enterochromaffin-like cells of mast cell-deficient (Ws/Ws) rats. *Eur J Pharmacol* 394: 9-16.

-
- [37] **Pardal R and Lopez-Barneo J** (2002) Low glucose - sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* 5: 197-198.
- [38] **Pardal R, Ludewig U, Garcia-Hirschfeld J and Lopez-Barneo J** (2000) Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2361-2366.
- [39] **Paulding WR, Schnell PO, Bauer AL, Striet JB, Nash JA, Kuznetsova AV and Czyzyk-Krzeska MF** (2002) Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells. *Microsc Res Tech* 59: 178-187.
- [40] **Peers C and Kemp PJ** (2001) Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respir Res* 2: 145-149.
- [41] **Prinz C, Zanner R and Gratzl M** (2003) Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annu Rev Physiol* 65: 371-382.
- [42] **Schutz B, Schafer MK, Eiden LE and Weihe E** (1998) Vesicular amine transporter expression and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut. *Brain Res Dev Brain Res* 106: 181-204.
- [43] **Tarsy D** (2004) Treatment of advanced Parkinson's disease. *UpToDate* 12 3, Internet Database for clinical topics, www.uptodate.com.
- [44] **Thony B, Auerbach G and Blau N** (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347: 1 -16.
- [45] **Toledo-Aral JJ, Mendez-Ferrer S, Pardal R and Lopez-Barneo J** (2002) Dopaminergic cells of the carotid body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57: 847-853.
- [46] **Urena J, Fernandez-Chacon R, Benot AR, Alvarez dTG and Lopez-Barneo J** (1994) Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10208-10211.

-
- [47] **Verna A, Schamel A, Le Moine C and Bloch B** (1995) Localization of dopamine D2 receptor mRNA in glomus cells of the rabbit carotid body by in situ hybridization. *J Neurocytol* 24: 265-270.
- [48] **Vicario I, Rigual R, Obeso A and Gonzalez C** (2000) Characterization of the synthesis and release of catecholamine in the rat carotid body in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C490-C499.
- [49] **Wang HY and Fitzgerald RS** (2002) Muscarinic modulation of hypoxia-induced release of catecholamines from the cat carotid body. *Brain Res* 927: 122-137.
- [50] **Weihe E and Eiden LE** (2000) Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J* 14: 2435-2449.
- [51] **Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C and Kemp PJ** (2004) Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306: 2093-2097.
- [52] **Zhang M, Zhong H, Vollmer C and Nurse CA** (2000) Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *J Physiol* 525: 143-158.

8 Anhang

Eigene Veröffentlichungen:

Zeitschriftenartikel

P. Koerner, C. Hesslinger, A. Schaefermeyer, C. Prinz und M. Gratzl
Evidence for histamine as a transmitter in rat carotid body sensor cells.
Journal of Neurochemistry, 2004 Oct; 91 (2): 493-500;

Kongressbeiträge

P. Koerner, C. Hesslinger, M. Gratzl
Presence and activity of GTP-cyclohydrolase I in oxygen sensing cells of the rat
carotid body
10th Meeting of the European Neuroendocrine Association,
München, Sept. 2002.

P. Koerner, C. Hesslinger, A. Schaefermeyer, C. Prinz und M. Gratzl
Dopaminergic and histaminergic signalling in rat carotid body sensor cells
Meeting of The University of Colorado School of Medicine: Biology of Hypoxia: The
Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function and Disease,
Colorado, USA, März 2004

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Manfred Gratzl danke ich sehr herzlich für die hervorragende und intensive Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit sowie für die jederzeit engagierte Unterstützung in Theorie und Praxis.

Frau Dr. Martina Haasemann und Frau Dr. Karen Schmidt-Bäse danke ich für die qualifizierte und freundschaftliche Betreuung im Graduiertenkolleg 333 der DFG.

Herrn Dr. Ricardo Pardal und Herrn Prof. José Lopez-Barneo danke ich für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Amperometrie und Herrn Dr. Christian Hesslinger für die intensive Beratung und tatkräftige Hilfestellung bei der HPLC-Messung und der Erstellung der Westernblots.

Für die ausführliche Unterstützung mit Rat und Tat bei der Durchführung des Radioimmunoassays bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Agnes Schäfermeyer und Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Prinz.

Für weitere kritische Diskussionen und Durchsicht dieser Arbeit danke ich besonders Dr. Lars Kunz und Klaus Metzeler. Gisela Liebhaber danke ich herzlich für die Einweisung in das Themengebiet und in die immunhistochemische Arbeitstechnik.

Für die gute Zusammenarbeit und eine freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich ausserdem Dr. Martin Albrecht, Dr. Andreas Bulling, Dr. Katia Didelon-Gamel, Dr. Nicola Dimitrijevic, Richard Doepner, Katrin End, Dr. Angela Finzel, Dr. Stefanie Fritz, Dr. Mónica B. Frungieri, Dr. Ágnes Ágoston, Dr. Christof Geigerseder, Robert Grünert, Annette Krieger, Andreas Mauermayer, Univ.-Prof. Dr. Artur Mayerhofer, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämisch, Marlies Rauchfuß, Dr. Axel W. Reinhardt, Johanna Richter, Andrea Thalhammer, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher, Univ.-Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger und Barbara Zschiesche.

Lebenslauf

Pia Körner, geboren am 29.07.78 in Waiblingen;
nicht verheiratet; deutsche Staatsangehörigkeit;

Schulbildung:

1998: Abitur am Gymnasium Ottobrunn;

Studium:

Nov.1998 - Studium der Medizin an der Technischen Universität München;
Mai 2005 : Abschlussnote: 1,82

Ärztliche Tätigkeit:

seit 1. Okt 2005: Klinik für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum Greifswald;

Stipendien:

Okt. 2000 - Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Sept. 2003: im Graduiertenkolleg 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“
der Universität München;
Aug. 2003 : Famulatur-Reisestipendium (Schweden) der Allianz Privat
Versicherung;

Veröffentlichung:

P. Koerner, C. Hesslinger, A. Schaefermeyer, C. Prinz und M. Gratzl
Evidence for histamine as a transmitter in rat carotid body sensor cells.
Journal of Neurochemistry, 2004 Oct; 91 (2): 493-500;

Kongressbeiträge:

P. Koerner, C. Hesslinger, M. Gratzl
Presence and activity of GTP-cyclohydrolase I in oxygen sensing cells of the rat
carotid body, 10th Meeting of the European Neuroendocrine Association,
München, Sept. 2002.

P. Koerner, C. Hesslinger, A. Schaefermeyer, C. Prinz und M. Gratzl
Dopaminergic and histaminergic signalling in rat carotid body sensor cells,
Meeting of The University of Colorado School of Medicine: Biology of Hypoxia: The
Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function and Disease,
Colorado, USA, März 2004