

AUS DER ANATOMISCHEN ANSTALT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
VORSTAND: PROF. DR. MED. MANFRED GRATZL

**Ein lokales GABAerges System in der
Nebennierenrinde des Menschen und der Ratte**

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

vorgelegt von Klaus Hans Metzeler
aus Memmingen

2005

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Gratzl

Prof. Dr. med. M. Reincke

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Auernhammer

Prof. Dr. med. M. Götz

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2005

INHALT

VERZEICHNIS HÄUFIG GEBRAUCHTER ABKÜRZUNGEN	6
I. EINFÜHRUNG.....	7
I.1 Die Nebenniere: Eine komplex aufgebaute endokrine Drüse mit multiplen Funktionen	7
I.1.1 Histologischer Aufbau und Embryogenese der Nebenniere	7
I.1.2 Die Nebennierenrinde: Funktion und morphologische Gliederung.....	8
I.1.3 Funktionelle Regulation der Nebennierenrinde - extrazelluläre und intrazelluläre Signalwege in der Kontrolle der Steroidproduktion	10
I.1.4 Neuroendokrine Eigenschaften in steroidproduzierenden Zellen	14
I.2 GABA - Neurotransmitter und parakrines Signalmolekül in endokrinen Organen.....	16
I.2.1 Physiologie GABAerger Signalübertragung.....	16
I.2.2 GABA als Botenstoff in peripheren endokrinen Organen	19
I.2.3 GABA und die Nebenniere.....	19
I.3 Zielsetzung.....	21
II. MATERIAL.....	22
II.1 Humane Gewebeproben	22
II.2 Versuchstiere	22
II.3 Zellkultur	22
II.4 Antikörper	24
III. METHODEN.....	25
III.1 Zellbiologie.....	25
III.1.1 Zellkultur.....	25
III.1.2 Proliferations-Assay	26
III.2 Immunzytochemie	28
III.3 Immunhistochemie	28
III.4 Protein-Präparation, SDS-PAGE und Western Blot.....	29
III.5 Molekularbiologie	31

III.5.1	RNA - Isolation	31
III.5.2	Reverse Transkription.....	32
III.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
III.5.4	Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung	37
III.6	<i>In vitro</i> -Bestimmung der GAD-Aktivität.....	38
III.7	Bestimmung des cAMP-Gehalts in NCI-H295R-Zellen.....	39
IV.	ERGEBNISSE	42
IV.1	Neuroendokrine Differenzierung in der Nebennierenrinde.....	42
IV.2	GABA-Produktion und -Speicherung in der Nebennierenrinde	43
IV.2.1	Immunhistochemische Befunde	43
IV.2.2	Untersuchung mittels RT-PCR.....	46
IV.3	GABA-Produktion in NCI-H295R-Zellen.....	48
IV.4	<i>In vitro</i> -Bestimmung der GAD-Aktivität.....	49
IV.5	GABA-Rezeptoren in der NCI-H295R-Zelllinie und der Nebenniere	50
IV.5.1	Expression von GABA _A -Rezeptoruntereinheiten in NCI-H295R-Zellen	50
IV.5.2	NCI-H295R-Zellen exprimieren GABA _B -Rezeptoren und die verkürzte Untereinheit GABA _{B(1e)}	51
IV.5.3	GABA _B Rezeptoren und spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle in der Nebennierenrinde	53
IV.6	Pharmakologische Beeinflussung von GABA _A - oder GABA _B -Rezeptoren hat keinen Effekt auf die Proliferation von NCI-H295R-Zellen.....	55
IV.7	Stimulation von GABA _B -Rezeptoren und der second messenger cAMP in NCI-H295R-Zellen	56
V.	DISKUSSION	60
V.1	Neuroendokrine Eigenschaften von Zellen der Nebennierenrinde	60
V.2	GABA-Synthese und -Speicherung in der Nebennierenrinde	63
V.3	Calciumkanäle vom L- und T-Typ in der Zona Glomerulosa	65
V.4	GABA-Rezeptoren in der Nebennierenrinde	66
V.5	GABA-Rezeptoren und die Zellproliferation in der Nebennierenrinde	68
V.6	GABA _B -Rezeptoren und ihre „second messenger“ in adrenokortikalen Zellen.	70

V.6.1	GABA _B -Rezeptoren und zytoplasmatisches cAMP in adrenokortikalen Zellen	71
V.6.2	Elektrophysiologie.....	72
V.6.3	Schlussfolgerungen: Die GABA _B -Signaltransduktion in NCI-H295R-Zellen	75
VI.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	77
VII.	PERSPEKTIVE: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NCI-H295R-ZELLEN	79
VII.1	Methoden.....	79
VII.2	Ergebnisse: GABA _B -Rezeptor-Stimulation inhibiert Calciumströme in NCI-H295R-Zellen..	82
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	86
IX.	LEBENS LAUF	96
X.	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	97
XI.	DANKSAGUNG	98

VERZEICHNIS HÄUFIG GEBRAUCHTER ABKÜRZUNGEN

A _x		Lichtabsorption einer Lösung bei der Wellenlänge x
ACE		Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH		Adrenokortikotropes Hormon
AT II		Angiotensin II
bp		Basenpaare
CaM		Calmodulin
cAMP		zyklisches Adenosinmonophosphat
DHEA(-S)		Dihydroepiandrosteron(sulfat)
DNA	Desoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymimmunassay
GABA	γ -Aminobutyric acid	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamate decarboxylase	Glutamatdecarboxylase
HEPES		4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HVA	High-voltage activated calcium channels	Bei hohem Membranpotential aktive Calciumkanäle
IP3		Inositol-Trisphosphat
KPBS	K ⁺ -phosphate buffered solution	Kaliumphosphat-gepufferte Lösung
LVA	Low-voltage activated calcium channels	Bei niedrigem Membranpotential aktive Calciumkanäle
NAD(P)		Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NSE		Neuronen-spezifische Enolase
PAGE		Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PTX		Pertussis-Toxin
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Natrium-Dodecylsulfat
SNAP	Synaptosome-associated protein	Synaptosomen-assoziiertes Protein
SNARE		SNAP-Rezeptor
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein	Akutes Regulationsprotein der Steroidogenese
RT	Reverse transcription	Reverse Transkription
Tris		Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VAMP	Vesicle-associated membrane protein	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter	vesikulärer Transporter inhibitorischer Aminosäuren

I. EINFÜHRUNG

I.1 Die Nebenniere: Eine komplex aufgebaute endokrine Drüse mit multiplen Funktionen

I.1.1 Histologischer Aufbau und Embryogenese der Nebenniere

Die Nebenniere ist eine endokrine Drüse, die bei allen Säugetieren nach dem selben Grundprinzip aus zwei Komponenten aufgebaut ist: zentral liegt das Mark, das allseits von der Nebennierenrinde umschlossen ist (Abbildung 1). Die beiden Anteile der Nebenniere sind dabei von unterschiedlicher entwicklungsgeschichtlicher Herkunft. Die Zellen der Rinde entstehen aus Zellen des intermediären Mesoderms, die Zellen des Nebennierenmarks dagegen wandern aus den Neuralleisten in die mesenchymale Drüsenanlage ein [7,74]. Obwohl die zwei Bestandteile der Nebennierenrinde morphologisch-anatomisch in enger Verbindung stehen, erfüllen sie aus physiologischer Sicht sehr unterschiedliche Funktionen: Während die Zellen der Nebennierenrinde Steroidhormone, insbesondere Gluko- und Mineralokortikoide, synthetisieren, sezernieren die chromaffinen Zellen des Marks Katecholamine (vor allem Adrenalin und Noradrenalin) und sind so Bestandteil des sympathischen Anteils des autonomen Nervensystems.

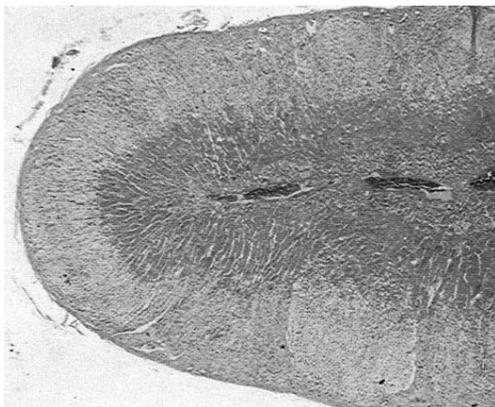


Abbildung 1: Histologische Gliederung der Nebenniere in die Rinde und das (hier bräunlich gefärbte) Mark. Aus Hammersen, F: Histology. Color Atlas of Microscopic Anatomy. 3rd ed., Urban & Schwarzenberg, München, 1985.

Nachdem diese funktionell so unterschiedlichen Gewebe in einem Organ zusammengefasst sind, stellt sich die Frage, ob ihre räumliche Nähe möglicherweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen beiden Bestandteilen hinweist. In der Tat zeigen licht- und elektronenmikroskopische Studien, dass chromaffine Zellen und steroidproduzierende Zellen nicht nur an der Mark-Rinden-Grenze der Nebenniere in innigem räumlichem Kontakt stehen, sondern dass sich auch in allen

Bereichen der Nebennierenrinde verstreute chromaffine Zellen, einzeln oder in Gruppen, finden lassen [9].

Weiterhin ist unter diesem Gesichtspunkt auch die Blutversorgung der Nebenniere bemerkenswert. Das Nebennierenmark erhält seine Blutzufuhr über zwei Wege: zum einen über den Kortex durchquerende Arteriae medullares, welche aus den großen, die Nebenniere versorgenden Arterien hervorgehen und direkt die Kapillarnetze des Markes speisen. Zum anderen wurde durch FLINT schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts beschrieben, dass auch die venösen Sinusoide der Nebennierenrinde in Verbindung mit den Markkapillaren stehen, so dass venöses Blut aus der Rinde die Zellen des Markes erreicht (Abbildung 2; [42], zitiert nach [8]). Eine funktionelle Interaktion von Kortex und Medulla erscheint also auch unter diesem Aspekt denkbar.

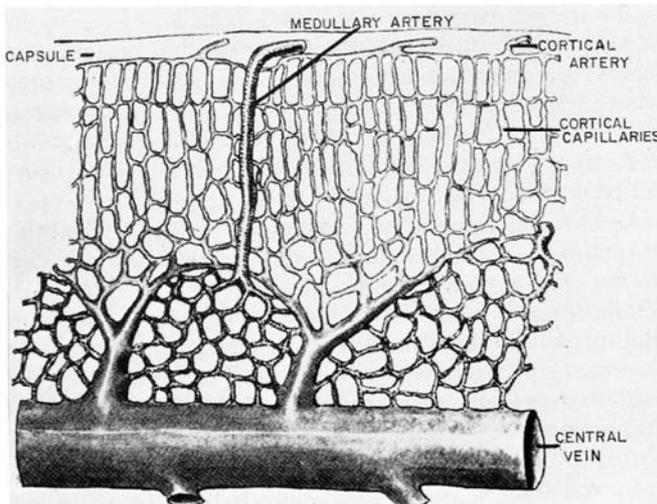


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blutversorgung der Nebenniere. Rindenarterien („cortical artery“) versorgen die Nebennierenrinde. Das Mark erhält eine doppelte Blutversorgung, zum einen aus den Kapillaren und Sinusoiden der Rinde, zum anderen aus Markarterien („medullary artery“), die von der Organoberfläche („capsule“) direkt ins Mark ziehen. Der Blutabfluss erfolgt über eine zentral im Mark gelegene Vene („central vein“). Aus Blaschko et al., 1975.

1.1.2 Die Nebennierenrinde: Funktion und morphologische Gliederung

Die Nebennierenrinde ist, neben den männlichen und weiblichen Keimdrüsen, der Hauptort der Synthese von Steroidhormonen im menschlichen Körper. Sie synthetisiert drei unterschiedliche Klassen von Steroidhormonen, nämlich Glukokortikoide (Cortisol und Cortison), Mineralokortikoide (Aldosteron) und C₁₉-Steroide mit androgener Wirkung, darunter Dihydroepiandrosteron (DHEA) und Dihydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) [118,119]. Abbildung 3 zeigt schematisch die Reaktionsabfolge bei der Synthese der unterschiedlichen Steroidprodukte sowie die subzelluläre Lokalisation der beteiligten Enzyme.

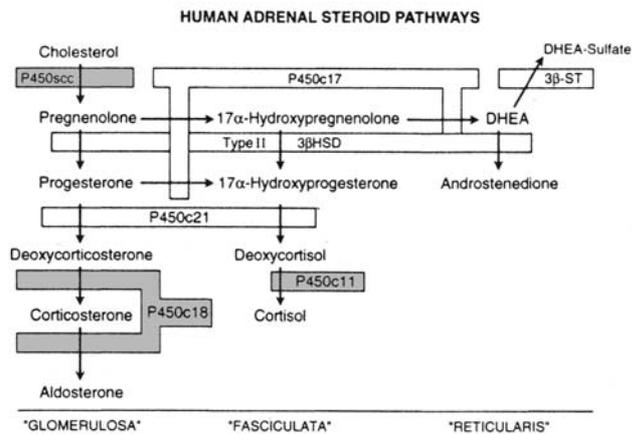


Abbildung 3: Biosynthese der unterschiedlichen Klassen von Steroidhormonen in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde. Gezeigt sind die beteiligten Enzyme und ihre Substrate. In weiß gezeigte enzymatische Reaktionen finden im glatten endoplasmatischen Retikulum statt, rot markierte sind an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Modifiziert nach Rainey et al., 1994.

Schon im 19. Jahrhundert erkannte man, dass sich in der Nebennierenrinde adulter Säuger anhand histomorphologischer Kriterien lichtmikroskopisch drei verschiedene Zonen unterscheiden lassen. ARNOLD benannte diese 1866 von außen nach innen als „Zona glomerulosa“, „Zona fasciculata“ und „Zona reticularis“ und prägte damit die bis heute benutzte Nomenklatur [4]. In der Zona glomerulosa bilden die Zellen rundliche Nester. Diese Zone nimmt, gemessen an der gesamten Rinde, nur einen relativ geringen Volumenanteil ein. In der Ratte wird sie nur durch wenige, subkapsuläre Zelllagen gebildet [140]. In der Zona fasciculata, dem relativ größten Teil der Rinde, sind die polygonal geformten Zellen in langen, parallelen Strängen angeordnet, während sie in der Zona reticularis irregulär-netzartige Strukturen ausbilden und ein Lipofuszin-ähnliches Pigment enthalten (Abbildung 4).

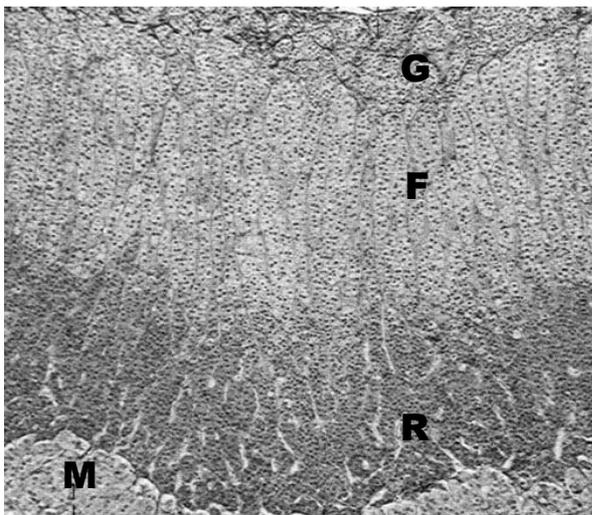


Abbildung 4: Histologische Gliederung der Nebennierenrinde in die drei Bereiche Zona glomerulosa (G), Zona fasciculata (F) und Zona reticularis (R, dunkel pigmentiert). Im unteren Bildteil ist das Nebennierenmark (M) angeschnitten. Aus Hammersen, F: Histology. Color Atlas of Microscopic Anatomy. 3rd. edition. Urban & Schwarzenberg, München, 1985.

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts legten biochemische und physiologische Studien dann die Vermutung nahe, dass die histomorphologische Zonierung der Nebennierenrinde ihre funktionelle Gliederung widerspiegelt: Mineralokortikoide werden demnach in der Zona

glomerulosa synthetisiert, Glukokortikoide in der Zona fasciculata und Zona reticularis, und C₁₉-Steroide bevorzugt in der Zona reticularis [8].

In den letzten Jahren konnte diese Theorie auf molekularer Ebene untermauert werden, indem mittels immunhistochemischer Methoden die Schlüsselenzyme in den Synthesewegen der einzelnen Steroidklassen innerhalb der Nebennierenrinde lokalisiert wurden (vgl. Abbildung 3). Aldosteron-Synthase (CYP11B2), das Enzym, das die letzten drei Schritte der Aldosteron-Biosynthese katalysiert, wird im Menschen und der Ratte ausschließlich in der Zona glomerulosa exprimiert [101,120]. Hingegen lässt sich das Enzym 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), das die letzten Schritte der Cortisol-Biosynthese vermittelt, in Nagern nur in der Zona fasciculata und der Zona reticularis nachweisen. Im Menschen dagegen ist noch nicht eindeutig geklärt, ob CYP11B1 auch in der Zona glomerulosa exprimiert wird [38].

1.1.3 Funktionelle Regulation der Nebennierenrinde - extrazelluläre und intrazelluläre Signalwege in der Kontrolle der Steroidproduktion

Anders als andere Transmittersubstanzen (wie etwa biogene Amine oder Neuropeptide) werden Steroide in ihren Ursprungszellen nicht in intrazelluläre Speicherorganellen aufgenommen und von dort aus freigesetzt. Vielmehr können diese Hormone aufgrund ihrer Lipophilie direkt durch die Zellmembran diffundieren. Deswegen erfolgt die Regulation der Hormonfreisetzung bereits auf der Ebene der Biosynthese und nicht erst bei der Exozytose des fertigen Botenstoffs [63,140].

Glukokortikoide und Mineralokortikoide als funktionell bedeutsamste Steroidprodukte der Nebennierenrinde üben im menschlichen Körper sehr unterschiedliche Funktionen aus. Zu den vielfältigen Effekten der Glukokortikoide gehören beispielsweise ihr Einfluss auf den Energiestoffwechsel (Glukoneogenese und Lipolyse) sowie die Immunfunktion. Die physiologische Bedeutung der Mineralokortikoide liegt in der Stimulation der Na⁺-Reabsorption sowie K⁺- und H⁺-Sekretion in den Epithelzellen der Sammelrohre der Niere. Dadurch beeinflusst Aldosteron den Natrium- und Kaliumhaushalt sowie die Säure - Base - Homöostase des Körpers. Durch Veränderungen der Natriumbilanz ist es außerdem an der Volumenregulation des Extrazellulärraums und der Kontrolle des Blutdrucks beteiligt [140]. Aufgrund der differierenden Funktionen ist es leicht verständlich, dass auch die Regulation der Synthese dieser Hormone in der Nebennierenrinde durch getrennte Mechanismen erfolgt.

1.1.3.1 Regulation der Glukokortikoid-Biosynthese

Hauptstimulus für die Glukokortikoid-Bildung ist das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), ein hypophysäres Peptid aus 39 Aminosäuren. ACTH-Rezeptoren gehören, zusammen mit den

Rezeptoren für das Melanozyten-stimulierende Hormon, zur Familie der Melanocortin-Rezeptoren. Sie werden in der Nebenniere der Maus sowohl in der Zona fasciculata wie auch in der Zona glomerulosa exprimiert, und sind in der menschlichen Nebenniere in allen Zonen des Kortex nachweisbar [122,158]. Nach Bindung des Peptids an seinen Rezeptor kommt es G-Protein-vermittelt zur Aktivierung der Adenylylzyklase und somit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration [61] - die Aufklärung dieses Mechanismus durch HAYNES gab den Anstoß zur Entwicklung des allgemeinen Konzepts der „second messenger“. Unter dem Einfluss von ACTH wird in der Zona fasciculata die Expression von steroidmetabolisierenden Enzymen, wie etwa der 11 β -Hydroxylase, stimuliert [120]. In der Vergangenheit wurde angenommen, dass der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Steroidhormon-Biosynthese die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon durch das Enzym Cytochrom P450_{sc} („side chain cleavage“) sei. Inzwischen ist aber experimentell gut belegt, dass die Steroidhormon-Syntheserate noch eine Stufe früher, nämlich durch das „steroidogenic acute regulatory“ (StAR)-Protein, kontrolliert wird. StAR ist höchstwahrscheinlich für den Cholesteroltransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran durch das lipophobe Milieu des Intermembranraums verantwortlich. Bei erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen kommt es zu einer verstärkten Expression von StAR, die durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor „steroidogenic factor“ (SF)-1 vermittelt wird (Übersicht bei [141]).

1.1.3.2 Steuerung der Aldosteron-Produktion in der Zona glomerulosa

Aldosteron ist das wichtigste Mineralokortikoid im menschlichen Organismus. In Anbetracht der großen Bedeutung des Aldosterons für den Wasser- und Elektrolythaushalt ist es nicht verwunderlich, dass seine Sekretion durch mehr als einen Signalweg geregelt wird. Unter physiologischen Bedingungen sind hier vor allem die prosekretorischen Faktoren Angiotensin II (AT II), extrazelluläres Calcium und ACTH und die inhibitorische Wirkung des antidiuretischen Hormons ADH funktionell relevant [140].

AT II entsteht aus dem in der Leber synthetisierten Vorläufermolekül Angiotensinogen durch die Wirkung der Proteasen Renin und Angiotensin-Converting-Enzym (ACE). Da Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere in Reaktion auf Na⁺- und Volumenmangel produziert wird, ist die Nebennierenrinde auf diesem Wege in den Regelkreis der Wasser- und Elektrolythomöostase eingebunden.

AT II bindet in der Nebennierenrinde an den G-Protein-gekoppelten Angiotensin-Rezeptor vom Typ 1 (AT₁) [6,151]. Dadurch werden zwei wesentliche Effekte ausgelöst:

Einerseits kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zur Bildung des „second messengers“ Inositol-Trisphosphat (IP₃), der an IP₃-Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum bindet und dadurch zu einer Calcium-Freisetzung aus diesem intrazellulären Speicher

ins Zytosol führt [57,142]. Die Entleerung intrazellulärer Speicher zieht außerdem einen als „kapazitativ“ bezeichneten sekundären Calciumeinstrom von extrazellulär nach sich, für den Homologe des Drosophila-Proteins *trp* verantwortlich gemacht werden. Trp 4 wird in der Nebennierenrinde des Rindes exprimiert, und verschiedene experimentelle Befunde deuten auf eine Rolle des kapazitativen Calciumeinstroms in der Kontrolle der Aldosteronproduktion hin (siehe [140]).

Andererseits kommt es nach AT₁-Rezeptoraktivierung G-Protein-vermittelt zur Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle und dadurch zu einem Einstrom von Calcium von extrazellulär [44,63]. Spannungsgesteuerte Calciumkanäle können in eingeteilt werden in solche, die bei relativ niedrigen (negativen) und solche, die bei relativ hohen Membranpotentialen aktiviert werden (low-voltage-activated [LVA] bzw. high-voltage-activated [HVA]-Kanäle). In Zona-glomerulosa-Zellen des Menschen und der Ratte werden sowohl LVA-Kanäle (vom sog. T-Typ) als auch HVA-Kanäle (vom L-Typ) exprimiert [34,110]. Während der Calciumeinstrom durch L-Typ-Kanäle in Glomerulosazellen der Ratte durch AT II inhibiert wird [89], werden Kanäle vom T-Typ aktiviert und scheinen so für den intrazellulären Calciumanstieg mitverantwortlich zu sein [27,80]. Zumindest in Zellen vom Rind ist gut dokumentiert, dass beide Effekte, Hemmung von L-Typ- und Aktivierung von T-Typ-Kanälen, durch ein G-Protein vermittelt werden [89]. Außerdem kann AT II durch Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase sowie von membranständigen Kaliumkanälen eine Depolarisation der Zellmembran und somit ebenfalls eine Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle bewirken [140].

An den geschilderten Wirkungen von AT II (Aktivierung der Phospholipase C sowie Beeinflussung von Ionenkanälen) sind unterschiedliche Typen von G-Proteinen beteiligt: ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein (G_i/G_o) koppelt den aktivierten AT II-Rezeptor an spannungsaktivierte Calciumkanäle sowohl vom T- als auch L-Typ [89]. Dagegen ist die Aktivierung der Phospholipase C nicht durch Pertussistoxin zu beeinflussen: sie wird vielmehr durch die G-Proteine G_q und G₁₁ vermittelt [140]. Der Einfluss von AT II auf die Funktion von Zona-glomerulosa-Zellen ist übrigens unabhängig vom second messenger cAMP. AT II vermag vielmehr, vermittelt durch die inhibitorische Wirkung von G_i auf die Adenylylzyklase, den durch ACTH hervorgerufenen zytoplasmatischen cAMP -Anstieg zu hemmen [44,140].

Abgesehen von den AT II-vermittelten Effekten üben Abweichungen der Kaliumhomöostase im Organismus einen direkten regulatorischen Effekt auf die Zellen der Zona glomerulosa aus: Bereits ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in der Größenordnung von 10⁻⁴ mol/l führt zu einer gesteigerten Aldosteronsekretion [140]. Bei erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen kommt es zu einer Membrandepolarisation und dadurch zum Calcium-Einstrom über spannungsabhängige T- und L-Typ - Calciumkanäle [27,120]. Kanäle vom „low

voltage activated“ (LVA) bzw. T-Typ reagieren aufgrund ihrer Aktivierung bei niedrigen Membranpotentialen besonders empfindlich auf Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration. Außerdem verursachen sie durch ihre langsame Deaktivierungskinetik einen relativ lange anhaltenden Calciumeinstrom. Somit können diese Kanäle in Zona-Glomerulosa-Zellen relativ geringfügige Änderungen des Membranpotentials in einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration umsetzen. Zahlreiche Studien zeigen in der Tat, dass LVA-Kanäle in Glomerulosazellen nicht nur elektrophysiologisch nachweisbar sind, sondern dass in K^+ -stimulierten Glomerulosazellen die Aktivität von T-Typ-Kanälen mit der Aldosteronsekretion korreliert [27,126,127].

In den vorangegangenen Abschnitten wurde deutlich, dass ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration das gemeinsame intrazelluläre Signal darstellt, wenn Zona-glomerulosa-Zellen durch AT II oder einen erhöhten extrazellulären Kaliumspiegel stimuliert werden. Über den Mechanismus der Koppelung dieses Calciumsignals mit der Aldosteron-Biosynthese existieren mehrere, sich vermutlich ergänzende Hypothesen. Erstens kommt es, vermittelt durch Calmodulin (CaM) und CaM-abhängige Proteinkinasen, zur verstärkten Expression von Aldosteron-Synthase. Allerdings lässt sich die AT II-bedingte Stimulation der Aldosteron-Synthase durch CaM-Inhibitoren nicht vollständig blockieren, so dass hier wohl noch weitere Signalwege beteiligt sind [120]. Weiterhin wird das StAR-Protein bei einem Anstieg des zyttoplasmatischen Calciumspiegels verstärkt exprimiert und durch Phosphorylierung aktiviert [25,140]. Eine neues und interessantes Konzept besagt außerdem, dass das zyttoplasmatische, K^+ - oder AT II- bedingte Calciumsignal in die mitochondriale Matrix übertragen wird [140]. Dort führt ein Anstieg der Calciumkonzentration zur verstärkten Bildung der Pyridinnukleotide NADH und NADPH [117,124]. Die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Schritte der Aldosteron-Biosynthese, die durch P450_{sc} und Aldosteronsynthase katalysiert werden, sind allesamt NADPH-abhängig, so dass der beschriebene Signalweg ebenfalls an der AT II- und K^+ -induzierten Aldosteronproduktion beteiligt sein könnte.

1.1.3.3 Weitere humorale, neuronale und parakrine Einflüsse auf die Funktion der Nebennierenrinde

Neben den beschriebenen klassischen Regelmechanismen wurde inzwischen eine Vielzahl weiterer Signalwege beschrieben, über die die adrenokortikale Funktion moduliert wird. Dazu gehören humorale Einflüsse, wie etwa durch im Plasma zirkulierendes Serotonin [123]. Außerdem wird die Nebennierenrinde durch Nervenfasern des Splanchnikussystems erreicht. Diese beeinflussen ebenfalls, vermittelt unter anderem durch Neuropeptide (vasoaktives intestinales Polypeptid u.a.), die Steroidproduktion.

Vor allem aber wurde eine Vielzahl parakriner Regelmechanismen beschrieben, die an der Steuerung der Nebennierenrinden-Funktion beteiligt sind: Katecholamine aus dem Nebennierenmark stimulieren die Steroidbiosynthese im Kortex, und Dopamin und Serotonin modulieren die Aldosteronproduktion [76,157]. In diesen funktionellen Interaktionen spiegelt sich auch der bereits beschriebene enge morphologische Kontakt zwischen Mark und Rinde wieder. Weiterhin wurden vielfältige Einflüsse von Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie eines lokalen, intraadrenalen Renin-Angiotensin-Systems auf die Funktion der Nebennierenrinde beschrieben [10,37,98]. Tabelle 1 fasst die Substanzen, für die experimentell eine Beeinflussung der Aldosteronsynthese nachgewiesen wurde, nochmals zusammen.

Tabelle 1: Beeinflussung der Aldosteronproduktion durch zirkulierende Hormone und para- bzw. autokrine Einflüsse. Die physiologisch bedeutsamsten Substanzen sind fett gedruckt (modifiziert nach Spat und Hunyady, 2004).

Stimuli der Aldosteronproduktion <i>in vitro</i>	Inhibitoren der Aldosteronproduktion <i>in vitro</i>
Angiotensin II	Atriales natriuretisches Peptid (ANP)
K⁺	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)
Adrenokortikotropes Hormon (ACTH)	Dopamin
Acetylcholin	NO
ATP	Platelet-derived growth factor (PDGF)
Bradykinin	Somatostatin
Cholecystokinin	Transforming growth factor β (TGF- β)
β -Endorphine	Ungesättigte Fettsäuren
Enkephaline	
Endothelin	
Epidermal growth factor (EGF)	
12-Hydroxyeicosatetraensäure	
Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH)	
Neuropeptid Y	
Neurotensin	
Noradrenalin	
Parathormon	
Prolaktin	
Prostaglandine	
Serotonin	
Substanz P	
Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)	
Vasopressin	

1.1.4 Neuroendokrine Eigenschaften in steroidproduzierenden Zellen

Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes gelten als klassisches Beispiel für neuroendokrine Zellen. Der Begriff der „neuroendokrinen“ Differenzierung ist dabei allerdings nicht eindeutig definiert und wird daher von verschiedenen Autoren in unterschiedlicher Weise

gebraucht [40]. Im allgemeinen werden mit diesem Begriff Zelltypen bezeichnet, die ihre Sekretionsprodukte in zytoplasmatischen Granula speichern und sie in einem der Exozytose von Transmittern aus Neuronen analogen Prozess freisetzen. Diese neuroendokrinen Zellen können makroskopisch definierte Organe bilden (z.B. den Hypophysenvorderlappen oder das Nebennierenmark), als Zellnester innerhalb eines Organs vorliegen (wie die Inselzellen des Pankreas oder die neuroepithelialen Körperchen in den Bronchien), oder aber als einzelne Zellen im Gewebe verstreut sein (z.B. endokrine Zellen in der gastrointestinalen Mukosa) [40].

Die Sekretionsprodukte peripherer neuroendokriner Zellen, biogene Amine, Peptidhormone und Neurotransmitter, kommen dabei in identischer oder eng verwandter Form auch in Neuronen des ZNS vor. PEARSE postulierte in seinem APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*)-Konzept 1969, dass all diese peripheren neuroendokrinen Zellen einem gemeinsamen Ursprung in der Neuralleiste haben [111]. Nachdem später aber deutlich wurde, dass viele neuroendokrine Zellen anderer embryologischer Herkunft sind, entstand das Konzept einer „neuroendokrinen Programmierung“. Diese drückt sich in der Expression bestimmter Proteine aus, die für Neurone und neuroendokrine Zellen typisch sind [112]. Zu den Markern, die mit einer neuroendokrinen Differenzierung assoziiert sind, gehören Proteine, die an der Exozytose von Transmittervesikeln beteiligt sind, wie zum Beispiel das mit der Membran synaptischer Vesikel assoziierte Protein Synaptobrevin (= vesicle-associated membrane protein, VAMP) sowie Plasmamembranproteine wie Syntaxin und das Synaptosomen-assoziierte Protein von 25 kD (SNAP-25). Dabei handelt es sich um Membranrezeptoren für NSF (N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor) und SNAPs (soluble NSF attachment proteins, nicht identisch mit SNAP-25). Deswegen werden Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 auch SNAP-Rezeptoren oder SNAREs genannt. Zusammengefasst als „SNARE-Komplex“ bezeichnet, vermitteln diese Proteine die entscheidenden Schritte bei der Bindung und Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran [51].

Als typisch für neuroendokrine Zellen gilt weiterhin auch die Expression von Synaptophysin (einem weiteren Membranprotein synaptischer Vesikel), von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAMs), von Neuronen-spezifischer Enolase (NSE; einer Isoform des an der Glykolyse beteiligten Enzyms Enolase) sowie des Polypeptides Chromogranin A, das unter anderem an der Bildung sekretorischer Granula beteiligt ist [40,69].

Erste Hinweise, dass steroidproduzierende Zellen der Nebennierenrinde ebenfalls „neuroendokrine“ Eigenschaften aufweisen, stammen aus Untersuchungen adrenokortikaler Neoplasien. Die meisten Nebennierenrinden-Karzinome exprimieren die neuroendokrinen Marker Synaptophysin und NSE, und in manchen Nebennierenrinden-Neoplasien kann auch Vimentin nachgewiesen werden [69,93,135]. Spätere Arbeiten zeigten dann, dass auch in der nicht pathologisch veränderten Rinde Merkmale neuroendokriner Differenzierung vorhanden sind: Synaptophysin, NSE und Vimentin werden in der Zona glomerulosa der normalen, adulten

humanen Nebenniere exprimiert [59]. Synaptobrevin 2 (VAMP-2), NSE und neurale Zelladhäsionsmoleküle können in steroidproduzierenden adrenokortikalen Zellen nachgewiesen werden. Die humane adrenokortikale Tumorzelllinie NCI-H295R exprimiert ebenfalls Synaptophysin [36,72,78,125]. Diese Befunde führten dazu, dass die früher geübte strenge Abgrenzung steroidproduzierender von neuroendokrinen Zellen abgemildert wurde. In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist die Entdeckung, dass umgekehrt auch im ZNS Steroide synthetisiert werden, die als Neurosteroid bezeichnet werden [92].

Aufgrund dieser Erkenntnisse ergab sich die Frage, ob die Elemente neuroendokriner Differenzierung in der Nebennierenrinde mit der lokalen Produktion und Sekretion neuroendokriner Transmittermoleküle einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurden nun speziell die Biosynthese, Freisetzung und lokale Wirkung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure im Kortex der Nebenniere untersucht.

I.2 GABA - Neurotransmitter und parakrines Signalmolekül in endokrinen Organen

γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde 1950 erstmals im Gehirn von Säugetieren identifiziert, und in den folgenden Jahren wurde deutlich, dass diese Substanz den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS darstellt [5,106]. Im folgenden sollen zunächst die biochemischen und physiologischen Grundlagen GABAerger Signalübertragung kurz umrissen werden. Anschließend werden neuere Befunde vorgestellt, nach denen GABA auch außerhalb des ZNS, und insbesondere in endokrinen Organen, auf para- und autokriner Ebene steuernde Wirkungen ausübt.

I.2.1 Physiologie GABAerger Signalübertragung

GABA entsteht im Körper vor allem durch Decarboxylierung der Aminosäure Glutaminsäure. Das dazu nötige Enzym, Glutamatdecarboxylase (GAD), existiert in zwei Varianten, die durch zwei unterschiedliche, homologe Gene codiert werden [14,39]. Nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht (in kD) wurden diese beiden Varianten GAD-65 und GAD-67 benannt. Die beiden Enzymvarianten weisen ein unterschiedliches Expressionsmuster sowohl im ZNS wie auch in peripheren Organen auf [84]. Alternative Synthesewege für GABA bestehen in der Desaminierung beziehungsweise Decarboxylierung von Putrescin, Spermin, Spermidin und Ornithin [145].

In GABAergen Neuronen wird das zytoplasmatisch synthetisierte GABA mittels eines H⁺-gekoppelten Transportsystems in sekretorische Vesikel aufgenommen. Das dafür verantwortliche Transporterprotein besitzt zugleich Affinität für Glycin und bewirkt so auch die vesikuläre Speicherung dieser ebenfalls als inhibitorischer Neurotransmitter wirkenden Aminosäure. Deswegen wird es als „vesikulärer Transporter inhibitorischer Aminosäuren“ (VIAAT) bezeichnet [47].

Seine regulatorischen Wirkungen entfaltet GABA über drei verschiedene Klassen von Rezeptoren, die als GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren bezeichnet werden. Während es sich bei den Typen GABA_A und GABA_C um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle handelt, sind die Mitglieder der GABA_B-Familie G-Protein-gekoppelte, metabotrope Rezeptoren.

Die eng miteinander verwandten GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind Chlorid-Ionenkanäle, deren Aktivierung in Neuronen zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt und so eine inhibitorische Wirkung bedingt. Beide Rezeptortypen sind Mitglieder einer „Superfamilie“, der auch der nikotinsche Acetylcholin-, der Glycin- und der 5HT₃-Rezeptor angehören. Sie alle weisen große strukturelle Ähnlichkeiten auf: Ihnen ist gemeinsam, dass der aktive Rezeptor aus jeweils 5 Untereinheiten mit je 4 Transmembrandomänen besteht. Derzeit sind mindestens 16 verschiedene Untereinheiten des humanen GABA_A-Rezeptors bekannt: $\alpha_1 - \alpha_6$, $\beta_1 - \beta_4$, $\gamma_1 - \gamma_4$, δ und ϵ . Da GABA_A-Rezeptoren Heteropentamere dieser Untereinheiten sind, existiert theoretisch eine sehr hohe Anzahl denkbarer Kombinationen. Tatsächlich jedoch enthalten die bislang beschriebenen funktionellen GABA_A-Rezeptoren immer mindestens je eine α - und β -Untereinheit sowie mindestens eine Untereinheit eines weiteren Typs (γ , δ oder ϵ) [21,152].

Die ρ -Untereinheiten ($\rho_1 - \rho_3$), aus denen GABA_C-Rezeptoren aufgebaut sind, weisen eine hohe Sequenzhomologie mit den verschiedenen GABA_A-Untereinheiten auf und wurden so nach ihrer Entdeckung zunächst ebenfalls in diese Gruppe eingeordnet. Später wurde aber deutlich, dass sich GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren biochemisch, pharmakologisch und physiologisch deutlich voneinander unterscheiden. GABA_C-Rezeptoren sind Homo- oder Heteropentamere aus einem oder mehreren verschieden ρ -Subtypen, und sie reagieren auf GABA-Konzentrationen, die um eine Größenordnung niedriger sind als diejenigen, die zur Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren nötig sind [106]. Ferner unterschieden sich diese beide Typen von GABA-Rezeptoren auch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber selektiven Agonisten und Antagonisten.

GABA_B-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen und weisen Homologie mit metabotropen Glutamatrezeptoren auf [106]. Funktionelle GABA_B-Rezeptoren sind Heterodimere aus zwei Untereinheiten, die als GABA_{B(1)} und GABA_{B(2)} bezeichnet werden [150]. Während die Ligandenbindung ausschließlich an der GABA_{B(1)}-Untereinheit stattfindet, führt die dabei eintretende Konformationsänderung zu einer

Aktivierung der GABA_{B(2)}-Untereinheit. Diese ist dann für die funktionelle Koppelung an das nachgeschaltete G-Protein verantwortlich. Außerdem ist die GABA_{B(2)}-Untereinheit für den Transport neu gebildeter Rezeptor-Heterodimere vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran essentiell [12].

Abbildung 5 zeigt schematisch die Komponenten GABAerger Signalübertragungssysteme am Beispiel einer Synapse, und in Tabelle 2 sind die pharmakologischen Eigenschaften der unterschiedlichen GABA-Rezeptoren zusammengefasst.

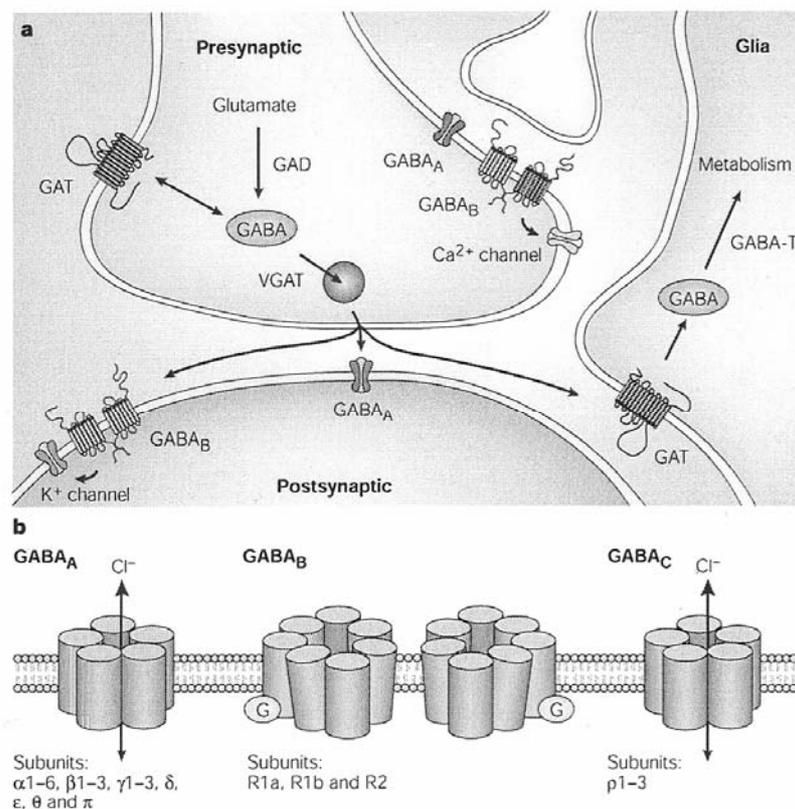


Abbildung 5: Überblick über das GABAerge System der Signalübertragung.

a: Metabolismus und Wirkungen von GABA am Beispiel einer Synapse im Zentralnervensystem. GAD = Glutamatdecarboxylase, VGAT = vesikulärer GABA-Transporter (Synonym VIAAT), GAT = zellmembranständiger GABA-Reuptake-Transporter, GABA-T = GABA - Transaminase. **b:** Übersicht über die 3 Typen von GABA-Rezeptoren. Aus Owens und Kriegstein, 2002; modifiziert, mit Genehmigung. ©2002 Nature Publishing Group.

Tabelle 2: Pharmakologische Eigenschaften der verschiedenen GABA-Rezeptoren

	GABA_A	GABA_B	GABA_C
Selektive Agonisten	Isoguvacin	Baclofen	CACA ¹
Selektive Antagonisten	Bicucullin	Phaclofen Saclofen	TPMPA ²
Besonderheiten	Modulation durch Benzodiazepine und Barbiturate		

¹CACA = cis-Aminocrotonsäure, ²TPMPA = (1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)-methylphosphinsäure

1.2.2 GABA als Botenstoff in peripheren endokrinen Organen

Neben seiner wichtigen Rolle im zentralen Nervensystem, wo GABA in etwa 20 - 30 % aller Synapsen vorkommt [152], wurden inzwischen auch zahlreiche periphere Gewebe beschrieben, in denen Elemente des im vorigen Abschnitt skizzierten GABAergen Systems vorkommen. MALLY und Mitarbeiter untersuchten mittels eines „RNAse protection assay“ die Expression von GAD in verschiedenen humanen Geweben und fanden das Enzym in der Variante GAD67 im adulten Pankreas, in der Niere und der Nebenniere [84]. In einer RT-PCR-basierten Studie konnten zahlreiche verschiedene Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors, in unterschiedlichen Kombinationen, in peripheren Organen der Ratte (Nebenniere, Ovar, Hoden, Placenta, Uterus, Dünndarm) nachgewiesen werden [1]. Ebenfalls mittels RT-PCR wurden GABA_B-Rezeptoren, speziell die Untereinheiten 1a und 1b, in allen untersuchten peripheren Geweben der Ratte (Herz, Milz, Lunge, Leber, Dün- und Dickdarm, Niere, Magen, Nebenniere, Hoden, Ovar und Harnblase) gefunden [18].

Vor allem in endokrinen Organen wurde inzwischen gezeigt, dass GABA auch in der Peripherie als Botenstoff dient und lokal regulatorische Wirkungen ausübt. Zu den in dieser Hinsicht am besten untersuchten Geweben zählen das endokrine Pankreas [13,23,52], die Adenohypophyse [45,46,90], sowie die männlichen Keimdrüsen [49].

1.2.3 GABA und die Nebenniere

Die Existenz von GABA in der Nebennierenrinde ist schon seit langem bekannt [143]. In der Ratten-Nebenniere konnte GABA in einer Konzentration von 29 ± 8 nmol pro Gramm Nassgewicht nachgewiesen werden, im Vergleich zu 2680 nmol/g im Rattenhirn. Nach Dissektion

der Nebennieren wurde in der isolierten Rinde ein GABA-Konzentration von 11,7 nmol/g gemessen und im Mark ein Gehalt von 20,6 nmol/g [17].

Weiterhin wurde mRNA für das Enzym Glutamatdecarboxylase (Isoform GAD-67) in adulten humanen Nebennieren nachgewiesen [84]. Auch GABA_A- und GABA_B-Rezeptor-Untereinheiten wurden in der Nebenniere gefunden [1,18]. Während diese Arbeiten nur die Nebenniere als Ganzes und nicht ihre funktionell verschiedenen Bestandteile, Rinde und Mark, einzeln betrachteten, fanden andere Arbeitsgruppen Belege für ein lokales GABAerges System im Nebennierenmark. Immunhistochemische Studien an isolierten bovinen chromaffinen Zellen in Kultur zeigten, dass eine Teilpopulation von 30 - 40% dieser Zellen GAD exprimiert [20,68]. In demselben Modellsystem konnte sowohl die Existenz von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren als auch deren Einfluss auf die Katecholaminsekretion demonstriert werden. Zusammengefasst scheint GABA einen modulierenden Einfluss auf die Hormonfreisetzung aus dem Nebennierenmark auszuüben, wobei GABA-Agonisten die basale Freisetzungsrates nicht-stimulierter Zellen fördern, wogegen sie auf die Hormonabgabe aus maximal stimulierten Zellen hemmend wirken [19,53,105].

Trotz der zahlreichen Studien an isolierten chromaffinen Zellen wurden diese Berichte bislang nicht an Gewebeschnitten intakter Nebennieren, zum Beispiel mit immunhistochemischen Methoden, bestätigt. Insbesondere zur Herkunft von GABA in der Nebenniere existieren daher unterschiedliche Theorien. Neben der angesprochenen Synthese in chromaffinen Zellen wurden in verschiedenen Spezies GABA-immunreaktive Nervenfasern im Nebennierenmark beobachtet [67,103]. Außerdem wurde auch ein alternativer Biosyntheseweg, die Synthese von GABA aus Putrescin mittels des Enzyms Diaminoxidase, als Quelle für GABA in der Nebenniere vorgeschlagen [17,104].

Der eingangs erwähnte Nachweis von GABA in der Nebennierenrinde lässt auf die Möglichkeit schließen, dass in der Rinde ebenfalls GABA synthetisiert wird. Zudem postulierten AKINCI UND SCHOFIELD aufgrund von Unterschieden zwischen dem in der gesamten Nebenniere und dem in isolierten Zellen des Markes identifizierbaren Spektrum von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, dass GABA-Rezeptoren auch in der Nebennierenrinde vorkommen könnten [1].

I.3 Zielsetzung

Die hauptsächlichen Regulationswege, die die Funktion der Nebennierenrinde kontrollieren, wie etwa die hypothalamisch-hypophysäre Achse und das Renin-Angiotensin-System, sind seit langem bekannt. Die Regulation der Steroidproduktion unterliegt daneben aber auch der Beeinflussung durch lokale Faktoren, die innerhalb der Nebennierenrinde und möglicherweise in den steroidproduzierenden Zellen selbst produziert werden [37]. Solche autokrinen oder parakrinen Regelmechanismen könnten nicht nur an der Feinsteuerung der Steroidproduktion beteiligt sein, sondern beispielsweise auch Zellwachstum und Differenzierung während der embryonalen Entwicklung oder in der adulten Nebenniere kontrollieren. Die neuroendokrine Differenzierung, die wiederholt in adrenokortikalen Zellen beschrieben wurde, deutet ebenfalls auf die Existenz solcher lokaler Steuerungssysteme hin. Eine der Transmittersubstanzen, deren Bedeutung als parakrines oder autokrines Effektormolekül in peripheren endokrinen Geweben in der letzten Zeit deutlich wurde, ist γ -Aminobuttersäure (GABA).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine mögliche Rolle von GABA als lokal gebildeter Botenstoff in der Nebennierenrinde untersucht werden. Wesentliche Zielsetzungen des Projekts waren dabei

- 1) die Identifizierung und Lokalisation von Proteinen, die an Produktion, Speicherung und Freisetzung von GABA beteiligt sind, in der Nebenniere des Menschen und der Ratte mittels immunologischer und molekularbiologischer Ansätze,
- 2) der Nachweis von GABA-Rezeptoren in den steroidproduzierenden Zellen der Nebennierenrinde,
- 3) die Untersuchung eines *in vitro*-Modellsystems, in Form einer geeigneten adrenokortikalen Zelllinie, in Hinblick auf die genannten Komponenten eines GABAergen Signalweges, sowie
- 4) der Versuch einer funktionellen Charakterisierung der Wirkungen von GABA auf Nebennierenrinden-Zellen anhand dieses Modellsystems.

II. MATERIAL

II.1 Humane Gewebeproben

Humane Nebennieren wurden einem Gewebe-Archiv des Instituts für Anatomie der LMU München entnommen. Die Gewebeproben von verstorbenen Erwachsenen waren nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert worden. Weiterhin wurden für diese Arbeit in BOUINS Lösung fixierte und in Paraffin eingebettete humane Nebennieren aus dem Archiv des Instituts für Anatomie verwendet.

II.2 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nebennieren von männlichen und weiblichen Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Sprague-Dawley untersucht. Die Tiere wurden an der Technischen Universität München unter Einhaltung der Richtlinien für Versuchstierzucht und -haltung des National Institute of Health aufgezogen [28]. Erwachsene, nichtträchtige Tiere wurden zunächst mit Diethylether narkotisiert und anästhesiert und anschließend durch Eröffnen der Halsgefäße getötet. Daraufhin wurde die Peritonealhöhle durch einen medianen Längsschnitt eröffnet, die beiden Nebennieren wurden rasch freipräpariert und entnommen. Die Organe wurden dann entweder unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA- oder Proteinextraktion bei -80°C gelagert oder aber in 4% Formaldehyd-Lösung oder Fixationslösung nach BOUIN eingebracht.

II.3 Zellkultur

Zellen der humanen Zelllinie NCI-H295R wurden über die American Tissue and Cell Collection (ATCC, Manassas, USA) bezogen. Diese Zelllinie wurde im Jahr 1980 aus einem Karzinom der Nebennierenrinde einer 48-jährigen afroamerikanischen Patientin etabliert [48]. Im Gegensatz zu anderen adrenokortikalen Zelllinien oder Primärkulturen von Nebennierenrindenzellen werden in NCI-H295-Zellen die nötigen Enzyme exprimiert, um alle drei Klassen von Steroiden zu synthetisieren, die auch in der intakten menschlichen Nebennierenrinde produziert werden (Mineralokortikoide, Glukokortikoide, und C19-Steroide).

Die ursprünglichen NCI-H295 Zellen wachsen in Suspension und haften an Kulturoberflächen nur lose an. Um experimentelle Untersuchungen zu erleichtern, wurde aus dieser originalen Zelllinie durch einen 3-monatigen Selektionsprozess die adhärent wachsende Linie NCI-H295R abgeleitet [119]. Auch in dieser Zelllinie sind die steroidogenen Fähigkeiten menschlicher

Nebennierenrindenzellen sowie die physiologischen Reaktionen auf Stimuli wie ACTH, AT II oder erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen erhalten. Während in der intakten Nebennierenrinde allerdings die Synthese von Aldosteron, Cortisol und Androgenen auf entsprechend differenzierte und spezialisierte Zellen in den verschiedenen histologischen Zonen räumlich aufgeteilt ist, vereint die NCI-H295R-Zelllinie in sich die steroidogene Potenz aller drei Zonen. NCI-H295R-Zellen können so als „pluripotentes“ Modellsystem zur Erforschung der Nebennierenfunktion dienen [119].

II.4 Antikörper

Im Laufe dieses Projektes wurden die in Tabelle 3 aufgeführten spezifischen Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 3: verwendete Antikörper

Erkanntes Antigen	Isotyp und Spezies des Antikörpers	Herkunft
Aldosteron-Synthase (Ratte)	Monoklonales Maus - IgG	Chemicon International, Inc. (Temecula, USA)
GAD (Mensch, Ratte) ¹	Kaninchen - IgG	
GABA _{B(2)} Rezeptor-Untereinheit (Mensch) ²	Kaninchen - IgG	Graham Disney, Ph.D. (Cellular Sciences Division, GlaxoWellcome, Stevenage, Großbritannien)
SNAP-25 (Ratte)	Monoklonales Maus - IgG	Sternberger Monoclonals, Inc. (Lutherville, USA)
Syntaxin (Ratte)	Monoklonales Maus - IgG	Sigma Immunochemicals (St. Louis, USA)
L-Typ Calciumkanal α_{1D} -Untereinheit (Mensch, Ratte)	Kaninchen - IgG	Alomone Labs (Jerusalem, Israel)
VAMP-2 (Ratte) ³	Monoklonales Maus - IgG	Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland)
VIAAT (Mensch, Ratte)	Kaninchen IgG	Bruno Gasnier, Ph.D. (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich)
Kaninchen-IgG	Ziegen - IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	
Kaninchen-IgG	Ziegen - IgG, gekoppelt mit FITC	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Kaninchen-IgG	Ziegen - IgG, biotinyliert	
Maus-IgG	Ziegen - IgG, biotinyliert	

¹ Dieses Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Dekapeptid gewonnen, dessen Sequenz dem C-Terminus von GAD-65 entstammt. Aufgrund des hohen Grades an Homologie zwischen den C-terminalen Anteilen von GAD-65 und GAD-67 bindet der Antikörper an beide GAD-Isoformen, sowohl des Menschen wie auch der Ratte.

² Das Antiserum ist gegen ein C-terminales Peptidfragment (15 Aminosäuren) der GABA_{B(2)}-Untereinheit des humanen GABA_B-Rezeptors gerichtet

³ Der Antikörper bindet VAMP-2 (= Synaptobrevin 2) und zeigt laut Hersteller keine Kreuzreaktivität mit den Isoformen VAMP-1 und Cellubrevin.

III. METHODEN

III.1 Zellbiologie

III.1.1 Zellkultur

NCI-H295R-Zellen wurden in einer Mischung aus Dulbecco's Modified Eagle Medium und Ham's F-12 Medium (DMEM / Ham's F-12, 1:1) kultiviert, die verschiedene Zusätze sowie 3% des synthetischen Serumersatzes „NU-Serum I“ (BD Biosciences, Bedford, USA) enthielt (siehe Tabelle 4). Das Medium wurde vor Gebrauch steril filtriert (Porengröße 0,2 µm).

Tabelle 4

Zusätze zum DMEM / Ham's F-12 Medium	Endkonzentration
Natriumselenit	5 ng/ml
Insulin	10 µg/ml
Transferrin	5,5 µg/ml
Ethanolamin	2 µg/ml
Albumin (human)	1 mg/ml
Linolensäure	9 µg/ml
HEPES ¹	15 mM
NU-Serum	3% v/v

¹ HEPES = 4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure

Die Zellen wurden in Kunststoff-Kulturschalen (Durchmesser 3,5 oder 7 cm; NUNC, Wiesbaden, und Sarstedt, Newton, USA) bei 37°C in einer Atmosphäre aus Luft und Kohlendioxid (95% / 5% v/v) kultiviert.

Sobald der Zellrasen annähernd Konfluenz erreichte, wurden das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 - 1,5 ml sterilem EDTA (0,25%) und Trypsin (0,1%) in PBS-Lösung (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) überschichtet. Nach etwa 5 Minuten wurden die Zellen durch vorsichtiges Schwenken von der Kulturschale abgelöst und die Zellsuspension in 3 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Suspension wurde während 3-4 Minuten bei 300 g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf 2 oder 3 frische Kulturschälchen verteilt.

III.1.2 Proliferations-Assay

Zur Messung des Einflusses von GABA-Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten auf die Proliferationsrate von NCI-H295R-Zellen wurde ein colorimetrisches Verfahren angewandt. Der „CellTiter 96“ Assay (Promega, Mannheim) beruht auf der reduzierenden Wirkung von NADH und NADPH, die wiederum durch Dehydrogenase-Enzyme in metabolisch aktiven Zellen synthetisiert werden. Unter Einwirkung von NADH bzw. NADPH wird Owen's Reagenz (Dimethylthiazolcarboxy-methoxyphenylsulfophenyltetrazolium = MTS) in ein Formazan-Ringsystem umgewandelt, das sich photometrisch nachweisen lässt (Absorptionsmaximum bei $\lambda = 490 \text{ nm}$). Die Menge an gebildetem Formazan korreliert mit dem NADH/NADPH-Gehalt und somit mit der Zellzahl in den einzelnen Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte [32].

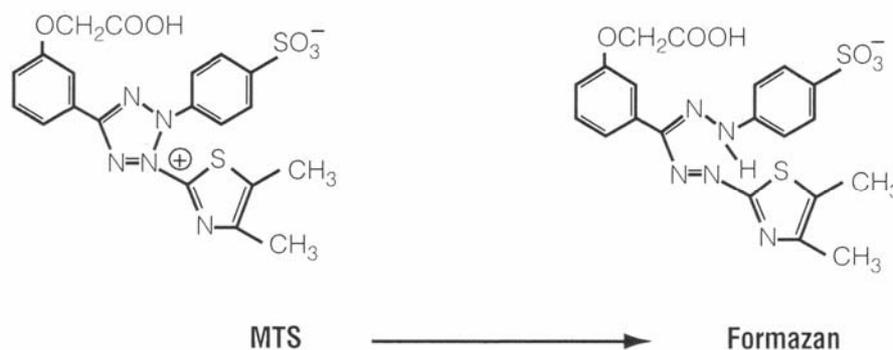


Abbildung 6: Chemisches Prinzip des „CellTiter 96“ Zellzahlassays. Die Umwandlung von MTS in die farbige Formazan-Verbindung erfolgt durch die Einwirkung von NADH oder NADPH aus lebendigen (metabolisch aktiven) Zellen.

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben durch Trypsinbehandlung suspendiert, abzentrifugiert, und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl in der Suspension bestimmt. Dann wurde diese auf eine Zelldichte von ca. 10^5 Zellen/ml verdünnt. In jede Vertiefung („well“) einer 96er Mikrotiterplatte wurden dann 100 μl Medium mit etwa 10^4 Zellen gegeben. Es folgten, jeweils bei 37°C im Brutschrank:

- 24 h Inkubation in serumhaltigem Medium, bis zur Adhärenz der Zellen am Boden der Mikrotiterplatte.
- 12 - 24 h Kultur in je 100 μl Medium ohne Serumzusatz, um die Zellzyklus-Phasen der einzelnen Zellen zu synchronisieren.
- 23 h Stimulation in serumhaltigem, frischem Kulturmedium, dem verschiedene Agonisten und Antagonisten für die einzelnen GABA-Rezeptor-Klassen zugesetzt waren (siehe Tabelle 5).
- anschließend Zugabe des Farbreagenz und Inkubation für weitere 60 Minuten.

Tabelle 5

Stimulationsbedingungen für den Proliferations-Assay	
Medium-Kontrolle	(nur serumhaltiges Medium)
NaOH-Kontrolle	Medium + 100 μ M NaOH ¹
GABA _A -Agonist	Medium + 100 μ M Isoguvacin
GABA _A -Antagonist	Medium + 100 μ M Bicucullin
GABA _B -Agonist	Medium + 100 μ M Baclofen ¹
GABA _B -Antagonisten	Medium + 100 μ M Phaclofen Medium + 100 μ M Saclofen ¹

¹ Baclofen- und Saclofen-Stammlösungen (50mM) wurden aus Löslichkeitsgründen in 50 mM NaOH angesetzt

Als GABA_B-Antagonist wurde zunächst Phaclofen, in späteren Versuchen dann jedoch das etwa 5 - 10-fach potentere Saclofen eingesetzt [11].

In jedem Einzelversuch wurden jeweils 16 - 24 wells identisch stimuliert, und jede Mikrotiterplatte enthielt Zellen, die nur mit Kulturmedium behandelt wurden (Medium-Kontrolle), um später eine Normierung der einzelnen Messwerte in Relation zu diesen Kontrollbedingungen zu ermöglichen. Insgesamt wurde die Proliferationsmessung viermal mit unabhängigen Zellchargen wiederholt. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen untersucht, deren Medium 100 μ M NaOH zugesetzt wurde, da die Stammlösungen der Stimulantien Baclofen und Saclofen ebenfalls eine entsprechende Menge Natronlauge enthielten. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde anhand des dem Medium zugesetzten pH-Indikatorfarbstoffes sowie stichprobenweise mittels Indikatorpapier und einer elektrochemischen pH-Elektrode kontrolliert. Zur Bestimmung des photometrischen Leerwertes dienten 12 - 16 wells je Platte, die mit 100 μ l zellfreiem Medium gefüllt wurden.

23h nach Zugabe des Stimulationsmediums wurde möglichst rasch in jedes well der Mikrotiterplatte 20 μ l des CellTiter - Reagenz zugegeben, um die Farbreaktion in Gang zu setzen. Etwa 1 Stunde später wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 490 nm in einem Photometer gemessen. Nach Abzug des Leerwertes wurde für jede untersuchte Mikrotiterplatte der Absorptions-Mittelwert der unbehandelten Zellen (Medium-Kontrolle) gebildet und alle Einzelmessungen relativ zu diesem Wert normiert. Die absoluten Absorptionswerte variierten zwischen den einzelnen Versuchstagen, unter anderem, weil nach Beginn der Inkubation mit Owen's Reagenz die Absorption über die Zeit stetig zunimmt. Schon geringe Abweichungen in der Zeitdauer zwischen Zugabe des Reagenz und photometrischer Messung führen so zu einer Änderung der absolut gemessenen Absorptionswerte. Durch die beschriebene Normierung werden die erhaltenen relativen Absorptionswerte (als Ausdruck für die relativen Zellzahlen) miteinander vergleichbar.

Mit der Software GraphPad Prism, Version 4 (GraphPad Software, San Diego, USA), wurden für die einzelnen Behandlungsgruppen Mittelwerte, Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle berechnet. Die Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen (Kontrollen) und den mit GABA-Agonisten oder -Antagonisten stimulierten Proben wurden mittels „one-way ANOVA“-Analyse auf statistische Signifikanz (definiert als $P < 0,05$) hin überprüft.

III.2 Immunzytochemie

H295R-Zellen wurden wie in Abschnitt III.1.1 beschrieben suspendiert und auf runde Deckgläschen ausgesät. 24 bis 48 Stunden später, nachdem die Zellen auf den Deckgläschen adhärent waren, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 4% Paraformaldehyd (pH=6,8) bei Raumtemperatur 30 Minuten lang fixiert und anschließend gespült. Für diesen und alle folgenden Waschschrte wurde KPBS-Puffer (3,6 mM KH_2PO_4 , 16,6 mM K_2HPO_4 , 154 mM NaCl, pH=7,4) verwendet. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren und um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen 15 min lang mit 2% Ziegen-Serum und 0,3% des nichtionischen Detergens Triton-X100 in KPBS überschichtet. Anschließend wurden die Zellen gründlich gespült und mit dem Primärantikörper, verdünnt in KPBS, über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum gründlich gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (gegen Kaninchen-IgG gerichtetes Ziegen-IgG, gekoppelt an FITC, 1:300 in KPBS) inkubiert. Nach abschließenden Waschschrten wurden die Deckgläschen mit dem wasserlöslichen Montagekitt „ProLong antifade“ (Molecular Probes, Eugene, USA) auf Objektträgern befestigt, und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) oder einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (TCS-SP2, Leica, Heidelberg) ausgewertet und photographisch dokumentiert.

III.3 Immunhistochemie

Paraffinschnitte von Nebennieren-Gewebe wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkohol-Reihe entparaffiniert (2 x Xylol, 2 x Ethanol 100%, Ethanol 96% / 80% / 70%; jeweils 3 min) und anschließend mit 30% H_2O_2 und 1% Methanol in PBS überschichtet. Während einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden dadurch endogene, im Gewebe vorhandene Peroxidasen blockiert, da diese sonst später zu einer unspezifischen Anfärbung des Schnittes führen können. Anschließend wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer (pH=6,0) im Mikrowellenofen für 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Dadurch wurden Epitope demaskiert, die durch die Formalin-Fixierung in ihren antigenen Eigenschaften verändert worden waren [30]. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden mit 5% Ziegen-Normalserum in PBS blockiert (30

min bei Raumtemperatur), und die Schnitte dann bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper, verdünnt in 2% Ziegen-Normalserum in PBS, inkubiert.

Im Falle des VIAAT-Antikörpers sowie der α_{1D} -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals wurden zusätzlich Adsorptionskontrollen durchgeführt: Der Erstantikörper wurde dafür 20 min vor Gebrauch mit dem antigenen Fusionspeptid (GST-VIAAT bzw. α_{1D} [859-875]; je 1 ng/ μ l) vorinkubiert [16]. Das selbe Peptid war bei der Antikörpergewinnung zur Immunisierung der Tiere verwendet worden.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper und gründlichem Waschen wurden die Schnitte dann mit dem passenden Biotin-gekoppelten IgG-Zweitantikörper überschichtet (anti-Kaninchen-IgG oder anti-Maus-IgG; jeweils gewonnen aus Ziegen, 1:500 in PBS mit 2% Ziegen-Normalserum). Die Immunfärbung wurde dann nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) sichtbar gemacht. Dabei wird zunächst ein makromolekularer Komplex aus jeweils mehreren Molekülen des Biotin-bindenden Proteins Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase gebildet. Dieser Komplex wiederum bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper, so dass mehrere Peroxidase-Moleküle an ein Immunglobulin gekoppelt werden. Nach Zugabe von Diaminobenzidin als chromogenes Substrat entsteht durch die Einwirkung der Peroxidase eine braune Färbung. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in PBS gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert, eingedeckt und mit einem Axioplan Mikroskop (Zeiss) untersucht.

III.4 Protein-Präparation, SDS-PAGE und Western Blot

H295R-Zellen wurden zunächst in der Kulturschale mit kaltem PBS gründlich gespült und anschließend durch Zugabe von Probenpuffer (Tabelle 6) direkt in der Kulturschale lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers abgelöst, die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mittels Ultraschall homogenisiert.

Gewebeproben aus humanen oder Ratten-Nebennieren wurden in dem selben Probenpuffer aufgenommen und zunächst manuell mit einem Pistill und anschließend mit einem Ultraschall-Homogenisationsgerät (Dr.Hielscher GmbH, Stahnsdorf) mechanisch aufgeschlossen. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurde die Suspension anschließend bei 15000 g und 4°C für 3 Minuten abzentrifugiert. In den so gewonnenen Proben wurde die Gesamt-Proteinkonzentration mit dem „D_c Protein-Assay“ (BioRad, Hercules, USA) bestimmt, der auf der colorimetrischen Methode von LOWRY basiert [81].

Nach Zugabe von 10% β -Mercaptoethanol und 1% Bromphenolblau zu den einzelnen Proben und 5-minütigem Erhitzen auf 95°C wurden zwischen 5 und 30 μ g Protein je Bahn auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt [71].

Tabelle 6: Puffer für Probenvorbereitung, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion

	Probenpuffer	PAGE-Elektrophoresepuffer	Transferpuffer	TBS-TWEEN
Saccharose	10% (w/v)			
SDS ¹	2% (w/v)	0,1% (w/v)		
Tris-Puffer	62,5 mM	25 mM	25 mM	50 mM
Glycin		192 mM	192 mM	
Methanol			20% (v/v)	
NaCl				138 mM
KCl				2,7 mM
TWEEN 20 ²				0,05%
pH	6,8	8,3	8,3	7,6

jeweils in bidest H₂O

¹ SDS = Natrium-Dodecylsulfat; ² TWEEN 20[®] (Polyethylenglykol-sorbitanmonolaurat, ein nichtionisches Detergens)

Das Elektrophoresegel bestand dabei aus dem eigentlichen Trenngel und einem vorgeschalteten Sammelgel, in dessen vorgeformte Taschen die Proben aufgetragen wurden. Der Übergang vom weniger stark vernetzten und saureren Sammelgel ins Trenngel führt zur Fokussierung der Proteinbanden (diskontinuierliche PAGE). Die Rezepturen für das Trenn- bzw. Sammelgel sind in Tabelle 7 wiedergegeben (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE nach LÄMMLI).

Tabelle 7: Elektrophoresegele für die SDS-PAGE

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid ¹	15%	4 %
SDS ²	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
Tris-Puffer	375 mM	125 mM
APS ³	0,075% (w/v)	0,075% (w/v)
TEMED ⁴	0,12%	0,12%
pH	8,8	6,8

jeweils in bidest H₂O

¹ Stammlösung: 29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O bidest, ² SDS = Natrium-Dodecylsulfat, ³ APS = Ammonium-Peroxydisulfat,

⁴ TEMED = N,N,N',N',Tetramethylenethylendiamin

Die Elektrophorese erfolgte in einem Tris-, SDS- und Glycin-haltigem Puffer (Tabelle 6) bei einer konstanten Spannung von 160 V und wurde beendet, sobald die vom Farbmarker

Bromphenolblau gebildete Lauffront den Rand des Elektrophoresegels erreichte. Die im Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach der „wet blotting“-Methode auf Nitrozellulose-Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen [146]. Der Transfer erfolgte bei 100 V angelegter Spannung über 60 min in einem mit Transferpuffer (Tabelle 6) befüllten, eisgekühlten Elektrophoresetank.

Um die freien Protein-Bindungsstellen der Membranen abzusättigen, wurden diese nun mit 5% (w/v) Magermilchpulver, gelöst in TBS-TWEEN (Tabelle 6) behandelt. Anschließend wurden sie mit einem anti-GAD Primärantikörper (1:1000) bei 4°C über Nacht inkubiert, gefolgt von einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Zweitantikörper (1:5000, 2 h bei Raumtemperatur). Alle Antikörperverdünnungen wurden in TBS-TWEEN mit 0,5% (w/v) Milchpulver angesetzt, als Waschlösung nach den Inkubationen diente TBS-TWEEN ohne Milchpulverzusatz.

Die immunreaktiven Banden auf den Membranen wurden dann mittels Chemilumineszenz auf hochempfindlichem Film detektiert (ECL - „enhanced chemiluminescence“ - Reagenz und „Hyperfilm ECL“-Filme, beides von Amersham Bioscience, Bucks, Großbritannien).

III.5 Molekularbiologie

III.5.1 RNA - Isolation

Aus frischen Gewebeproben humaner Nebennieren und solchen der Ratte sowie aus kultivierten NCI-H295R-Zellen wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (RNEasy, Qiagen, Hilden) benutzt.

Gewebeproben wurden unmittelbar nach ihrer Präparation oder nach Lagerung bei -80°C zunächst gewogen. Etwa 15 - 30 mg große Gewebestücke wurden in 600 µl RNase-freien, Guanidinisothiocyanat-haltigem Puffer aufgenommen und in einem mechanischen Homogenisator nach dem Rotor-Stator-Prinzip (Ultra-Turrax, IKA Labortechnik, Staufen) zerkleinert. Aufgrund der denaturierenden Eigenschaften des verwendeten Puffers wurden im Gewebe enthaltene RNAsen dabei inaktiviert. Zur RNA-Isolation aus NCI-H295R-Zellen wurden diese mit eiskaltem PBS mehrfach gespült und anschließend direkt im Kulturgefäß durch Zugabe von 350 - 600µl der oben erwähnten Pufferlösung lysiert.

Die so gewonnene Gewebe- oder Zellsuspension wurde dann zur weiteren Homogenisierung auf QIAshredder Homogenisations-Säulen aufgetragen und für 2 min bei 16000 g zentrifugiert (Gemäß der Anweisung des Herstellers fanden dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur statt, ansonsten wurden die Proben stets auf Eis gestellt). Die so erhaltene

Suspension wurde nach Zugabe von 70% Ethanol im Volumenverhältnis 1:1 auf eine RNeasy - Säule aufgetragen. Diese basiert auf einer Silica-Membran, an die RNA-Moleküle von über 200 Basenpaaren Länge nichtkovalent und pH-abhängig binden. Es folgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte, wobei der pH-Wert des mitgelieferten Waschpuffers sicherstellte, dass RNA-Moleküle an die Silica-Membran gebunden blieben, während Verunreinigungen entfernt wurden. Anschließend konnte die derart gereinigte RNA mittels RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert werden.

Nach der Isolation wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}) die RNA-Konzentration in einer verdünnten Probe bestimmt. Dazu wurde die folgende Näherungsformel verwendet:

$$\text{Formel 1} \quad c_{\text{RNA}} = 40 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Anhand der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm wurde auch die Reinheit der gewonnenen RNA beurteilt. Bei pH 7,5 hat reine RNA in Wasser ein Verhältnis A_{260} / A_{280} von etwa 2, ein niedrigerer Wert deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine hin [85]. Zudem wurde die Integrität der instabilen RNA-Moleküle durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Analog zur weiter unten beschriebenen DNA-Gelelektrophorese wurde 1 μl der gewonnenen RNA auf ein Ethidiumbromid- haltiges 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Wie in Abbildung 7 beispielhaft dargestellt, finden sich in einer nicht degradierten RNA-Probe zwei scharfe Banden, die die ribosomalen 18S- und 28S-RNA Moleküle repräsentieren. mRNA-Moleküle kommen aufgrund ihres breit gestreuten Molekulargewichts nicht als diskrete Banden zur Darstellung. „Verschmierte“ Banden zeigen dagegen einen teilweisen Abbau der in der Probe enthaltenen RNA an.

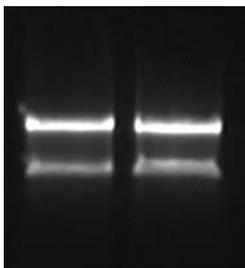


Abbildung 7: Beispiel für eine Agarose-Gelelektrophorese einer frisch präparierten RNA-Probe. Die scharfen Banden der 18S- und 28S-RNA-Moleküle zeigen, dass die RNA während des Isolationsvorgangs nicht abgebaut wurde

III.5.2 Reverse Transkription

Der Begriff „Reverse Transkription“ bezeichnet die Umschreibung von RNA in ein komplementäres cDNA-Molekül. Diese „Rückwärts-Übersetzung“, die eine Umkehrung des im „Dogma der Molekularbiologie“ festgelegten Informationsflusses $\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{Protein}$ darstellt, wird durch virale Enzyme bewerkstelligt. In dieser Arbeit wurde das Reverse Transkriptase -

Enzym aus Moloney's Murine Leukemia Virus (MMLV-RT) benutzt. Als Ausgangspunkt ihrer Arbeit benötigen RT-Enzyme ein kurzes, dem zu transkribierenden RNA-Strang komplementäres Stück DNA als Primer. Meist werden dafür Oligo-desoxythymidin 15-mer (oligo-dT₁₅) als Primer verwendet [82]. Diese binden an die poly-A-Sequenz am 3'-Ende von mRNA-Strängen und erlauben so die reverse Transkription intakter mRNA-Moleküle. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit für RNA-Proben gewählt, die aus frisch präparierten Rattenorganen oder kultivierten Zellen gewonnen wurden. Da die ebenfalls verwendeten humanen Gewebeproben nicht ausreichend schnell tiefgekühlt worden waren, wurde für die daraus gewonnene RNA ein anderer Ansatz verwendet: Um auch bereits teilweise abgebaute RNA-Moleküle in cDNA umschreiben zu können, wurden als Primer für die RT-Reaktion zufällig aus den Nukleotiden Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin zusammengesetzte Hexanukleotide verwendet. Diese Methode ist zwar bei intakten RNA-Molekülen weniger effektiv als die Verwendung von Oligo-dT₁₅, dafür können die Hexamere auch an RNA-Stränge binden, deren poly-A-Ende bereits durch RNAsen verdaut wurde.

Zur Durchführung der RT-Reaktion wurden Reagenzien und Puffer der Firmen Promega (Mannheim) und Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit 1 U RQ1 DNase-Enzym und einem RNase-Inhibitor (RNAsin, 8 U; beide von Promega) im mitgelieferten Reaktionspuffer für 20 min bei 37°C inkubiert (Ansatzvolumen 14 µl), um mögliche Kontaminationen durch genomische DNA zu beseitigen. Danach wurde der verwendete Primer (oligo-dT₁₅ oder Hexamere) zugegeben und der Reaktionsansatz für 15 min auf 70°C erhitzt, um die zugegebene DNase zu inaktivieren und zugleich die Anlagerung der Primer an die mRNA-Stränge zu ermöglichen. Anschließend wurden die weiteren Reagenzien hinzupipettiert, so dass der Reaktionsansatz für die eigentliche reverse Transkription folgende Komponenten in einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt [132]:

Tabelle 8

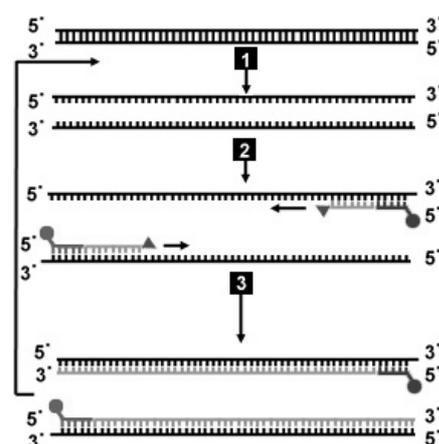
Reaktionsansatz für die reverse Transkription	
Stratagene 10x MMLV Puffer	10% v/v
RNA	50 ng/µl
Primer: oligo-dT ₁₅	25 ng/µl
oder alternativ: zufällige Hexamere	100 ng/µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 1,25 mM
MgCl ₂	3 mM
MMLV-RT	20 U
hochreines H ₂ O	ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert, danach für 5 min auf 90°C erhitzt, um das RT-Enzym zu inaktivieren, und die so gewonnene cDNA dann bei -20°C gelagert.

Zu Kontrollzwecken wurde stets auch ein Reaktionsansatz mitgeführt, dem keine RNA, sondern nur hochreines Wasser zugesetzt wurde. Diese Probe diente dann in der anschließenden PCR-Reaktion als Negativkontrolle, um eventuelle Kontaminationen der verwendeten Reagenzien erkennen zu können.

III.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum gezielten Nachweis bestimmter cDNA-Moleküle wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet [97,132]. Diese Methode erlaubt es, aus einem Gemisch an DNA-Molekülen spezifisch bestimmte Sequenzen zu amplifizieren. Der DNA-Mischung werden zwei DNA-Primer zugegeben, deren Sequenzen mit den Enden der gesuchten Gensequenz korrespondieren. Einer der etwa 20 bp langen Primer ist dabei komplementär zum „sense“-Strang der DNA, der andere zum „antisense“-Strang. Durch Hitzedenaturierung der DNA-Doppelstränge und anschließende Abkühlung können diese Primermoleküle sich an die entstehenden DNA-Einzelstränge anlagern. Anschließend dienen sie als Ausgangspunkt für die Re-Synthese des komplementären DNA-Stranges durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Wird dieser Vorgang zyklisch wiederholt, können die jeweils neu synthetisierten DNA-Stränge wiederum als Anlagerungsort für Primer und als Vorlage für die DNA-Synthese dienen, wodurch es im idealen Fall zu einer exponentiellen Vervielfältigung der von den beiden Primern flankierten DNA-Sequenz kommt (Abbildung 8).



Legende:

- ▶ = DNA - Polymerase
- = spezifische Primer / Oligonukleotide
- ||||| = DNA

Abbildung 8: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt 1: Dissoziation der doppelsträngigen cDNA-Moleküle bei hohen Temperaturen, z.B. 94°C

Schritt 2: Anlagerung der gegenläufigen, sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Primer an den sense- und antisense-Strang bei z.B. 54°C (abhängig von den verwendeten Primern).

Schritt 3: Resynthese des komplementären DNA-Stranges durch die thermostabile DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern (Elongationsschritt bei 72°C).

Diese Reaktionsfolge wird in einem automatisierten Thermocycler 35-40 mal durchlaufen, wobei es bei idealisierter Betrachtung jedes Mal zu einer Verdoppelung der von den Primern flankierten DNA-Sequenz und somit zum exponentiellen Anwachsen der Menge an PCR-Produkten kommt.

Durch Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, die die zur DNA-Denaturierung nötigen hohen Temperaturen kurzzeitig übersteht, konnte das Verfahren der PCR automatisiert werden [24,130].

Tabelle 9 zeigt den zur Durchführung der PCR-Reaktion verwendeten Reaktionsansatz [133]. In einem Thermocycler (PTC 200, MJ Research, Watertown, USA) durchlief der Ansatz 35 - 40 Reaktionszyklen, jeweils bestehend aus 30 s bei 94° C (Dissoziation der DNA-Doppelstränge), 60 s bei 55° C (Anlagerung der Primer-DNA) und 60 s bei 72° C (Elongationsschritt).

Tabelle 9

Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion	
10x <i>Taq</i> Puffer	5 µl (10% v/v)
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP-Mix (je 2 mM dATP / dCTP / dGTP / dTTP)	je 200 µM
3'- und 5'-Primer	je 1 µM
cDNA-Sample	1 - 5 µl
<i>Taq</i> DNA-abhängige DNA-Polymerase	2,5 U
hochreines H ₂ O	ad 50 µl

Die verwendeten genspezifischen Primer sind in Tabelle 10 aufgeführt. Sie wurden, mit Ausnahme des Primerpaares für VIAAT-cDNA der Ratte, so ausgewählt, dass die zu den beiden Primern komplementären Sequenzen der genomischen DNA in verschiedenen Exons des jeweiligen Gens liegen [15,23,33,87,129]. So war es möglich, eine Kontamination des Reaktionsansatzes mit genomischer DNA einfach anhand der abweichenden Größe der entstehenden Reaktionsprodukte von dem gesuchten cDNA-Signal zu unterscheiden.

In einigen Fällen wurde ein „nested PCR“ Ansatz angewandt: Das DNA-Produkt der ersten PCR-Reaktion wurde mittels des „MinElute“ Systems (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in einem Volumen von 10 µl konzentriert. Der MinElute-Kit basiert ähnlich wie das zur RNA-Isolation verwendete Produkt auf einer Silica-Säule, an die in diesem Fall bevorzugt DNA-Moleküle von über 70 bp Länge binden. Nachdem Verunreinigungen und kürzere DNA-Moleküle (z.B. überschüssige Primer) in mehreren Waschschritten entfernt wurden, kann die gereinigte Produkt-DNA in einem kleinen Volumen hochreinen Wassers eluiert werden. Typischerweise enthält das Eluat mehr als 90% der eingesetzten DNA. 1 µl des Eluates diente dann als Ausgangsmaterial für einen zweiten PCR-Ansatz, in dem ein weiteres, sogenanntes „nested“ Primerpaar verwendet wurde. Diese Primer liegen innerhalb des vom ersten Primerpaar begrenzten Sequenzabschnittes, so dass das Produkt der ersten PCR-Reaktion weiter amplifiziert werden konnte.

Tabelle 10: PCR - Primer

Zielsequenz / "GenBank®" Zugriffsnummer	Primer-Sequenz	Position	Länge (bp)
GAD-67 Mensch (NM_00017)	5'-ACTGGCTGAATACCTCTATG-3'	2005-2024	318
	5'-CCCAGTCTTTCTATCTCCTC-3'	2303-2322	
Ratte (M76177)	5'-GCTGGCTGAATACCTCTATG-3'	1636-1655	318
	5'-CCCAACCTCTCTATTTCCCTC-3'	1934-1953	
GAD-65 Mensch (NM_000818)	5'-ATGCCTCCTACCTCTTTTCAG-3'	1406-1425	218
	5'-CACCATCTCATATCCTTCTC-3'	1604-1623	
Mensch (nested)	5'-CTATGACACTGGAGACAAGG-3'	1449-1468	110
	5'-TATCAACATGCGCTTCAAAC-3'	1539-1558	
Ratte (M72422)	5'-GATATGGTTGGATTAGCAGC-3'	633-652	372
	5'-CATTTTCCCTCTCTCATCAC-3'	985-1004	
Ratte (nested)	5'-GGAATCTTTTCTCCTGGTGG-3'	783-802	128
	5'-TCTGACGTGAATGCGATGAG-3'	891-910	
VIAAT Mensch (NM_080552)	5'-CCGTGTCCAACAAGTCCCAG-3'	283-302	490
	5'-TCGCCGTCTTCATTCTCCTC-3'	753-772	
Mensch (nested)	5'-GCAGATGGACATCCTGAAAG-3'	413-432	293
	5'-CGGCGAAGATGATGAGAAAC-3'	686-705	
Ratte (NM_031782)	5'-CCTGTACGAGGAGAACGAAG-3'	593-612	300
	5'-AGCAGACTGAACTTGGACAC-3'	873-892	
GABA _{B(1)} Mensch (AJ012185)	5'-CTGGCCTATGATGCTATC-3'	1639-1656	(1a): 350
	5'-GGTCATCAAGACATTCCG-3'	1971-1988	
	5'-AACATGACATCCCAGGAATTTG-3'	1318-1339	(1a): 571
	5'-TCAGGTTGGGCTGTGAGTTC-3'	1869-1888	(1e): 421
GABA _{B(2)} Mensch (AF099033)	5'-CATCATCTTCTGCAGCAC-3'	2181-2198	279
	5'-TGGTGTGTCCTGCAGCTG-3'	2441-2460	

Für die Suche nach der GABA_{B(1)} Rezeptor-Untereinheit wurden Primer entwickelt, die zu beiden Seiten des Exons 10 an die cDNA binden. Daher sind sie geeignet, zwischen der GABA_{B(1e)}-Spleissvariante, der dieses Exon fehlt, und der normalen GABA_{B(1a)}-Untereinheit zu differenzieren [136]. Außerdem wurde ein alternatives Primerpaar entworfen, bei dem der 3'-Primer mit einer Sequenz innerhalb des Exons 10 korrespondiert. Daher erkennt diese Primerkombination nur GABA_{B(1a)}, nicht aber die verkürzte Form der Untereinheit.

Alle positiven RT-PCR-Experimente wurden mindestens einmal unter Verwendung einer unabhängig gewonnen RNA-Probe sowie frisch angesetzter Reagenzien reproduziert, um kontaminationsbedingt falsch-positive Befunde zu vermeiden. Außerdem wurden für jedes

verwendete Primerpaar und für jede untersuchte cDNA-Probe entsprechende Negativkontrollen mit untersucht. Dazu dienten RT-Reaktionsansätze, denen keine RNA als Ausgangsmaterial zugesetzt worden war (vgl. Abschnitt III.5.2).

III.5.4 Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung

Um die Produkte der einzelnen PCR-Reaktionen zu identifizieren, wurden sie mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 2% (w/v) Agarose (SeaKem LE, Cambrex Bioscience, Rockland, USA) in warmem TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH=8,0) gelöst. Für PCR-Reaktionen, bei denen das erwartete Amplifikationsprodukt kürzer als 200 bp war, wurde aufgrund der besseren Auftrennung ein 3%iges Agarosegel (MetaPhor Agarose, Cambrex Bioscience) verwendet. Nach Zugabe des Farbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zur Agaroselösung wurde diese zu einem horizontalen Elektrophorese-Gel gegossen. Nachdem die Agarose sich verfestigt hatte, wurden in die Probenfächer des Gels je etwa 10 µl der einzelnen PCR-Reaktionsprodukte, gemischt mit 2 µl Auftragspuffer (0,2 % Bromphenolblau, 250 mM EDTA, 20% Glycerin), pipettiert. Als Referenz wurde außerdem auf jedes Gel ein Gemisch aus DNA-Molekülen bekannter Länge (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. In einer mit TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer wurden die PCR-Produkte dann für etwa 40 Minuten bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt, anschließend wurden die Elektrophoresegele auf einem UV-Leuchttisch ($\lambda_{\text{exc}} = 302 \text{ nm}$) untersucht. Durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid zeigen sowohl Marker als auch PCR-Produkte unter UV-Beleuchtung eine orangefarbene Fluoreszenz ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$). Die Agarosegele wurden mit einer CCD-Kamera fotografiert und die Bilder anschließend digital weiterverarbeitet.

Bei jedem positiven PCR-Ergebnis wurde außerdem die Identität des Amplifikationsproduktes durch direkte Sequenzierung des restlichen PCR-Produktes bestätigt (durchgeführt durch AGOWA GmbH, Berlin). Zum Nachweis der GABA_{B(1)} - Splicevarianten 1a und 1e wurden die verschieden großen PCR-Produkte auf einem UV-Leuchttisch getrennt aus dem Ethidiumbromid-haltigen Gel ausgeschnitten, mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Ergebnisse aller Sequenzierungen wurden mittels der BLAST-Software (basic local alignment search tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) mit in der Nukleotid-Datenbank GenBank gespeicherten Sequenzen verglichen [2] (sowohl BLAST als auch GenBank werden zur Verfügung gestellt durch das National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

III.6 *In vitro*-Bestimmung der GAD-Aktivität

In dieser Arbeit wurde eine etwas abgewandelte Form der von MARTIN beschriebenen Methode eingesetzt, um die Aktivität des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD) in lysierten Proben aus Gewebe der Rattennebenniere und aus kultivierten NCI-H295R-Zellen quantitativ zu bestimmen [86]. Bei diesem Verfahren wird in einem *in vitro*-Ansatz die zu untersuchende Probe mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Glutamat inkubiert. In Gegenwart von GAD wird Glutamat unter Bildung von GABA und radioaktiv markiertem $^{14}\text{CO}_2$ decarboxyliert. Das entstehende Kohlendioxid wird durch Benzethoniumhydroxid absorbiert und die freigesetzte Aktivität gemessen, diese ist unter geeigneten Versuchsbedingungen proportional zur GAD-Aktivität in der Probe.

Dazu wurden Zell- oder Gewebeprouben in einem Homogenisationspuffer (60 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH=7,1, 0,5% Triton X-100[®], 1 mM 2-Aminoethyl-isothiuronium-bromid, 1 mM Phenylmethansulphonylfluorid) lysiert und abzentrifugiert. Im Überstand wurde jeweils die Gesamt-Proteinkonzentration bestimmt (vgl. Abschnitt III.4) und die einzelnen Überstände wurden so mit Homogenisationspuffer verdünnt, dass schließlich in allen Proben ähnliche Proteinkonzentrationen vorlagen. Die Proben wurden bis zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung bei -80°C gelagert. Die eigentliche Aktivitätsbestimmung erfolgte in 15 ml fassenden Kunststoff - Reaktionsröhren, durch deren Schraubdeckel eine Injektionskanüle gesteckt war. Auf die Kanülenspitze wurde wiederum ein mit Benzethoniumhydroxid getränktes Filterpapierscheibchen gesteckt. Das Volumen jedes Reaktionsansatzes betrug 60 μl , bestehend aus 20 μl der zu untersuchenden Probe und 40 μl eines Reaktionspuffers. Jeder Ansatz enthielt (Endkonzentrationen in 60 μl) 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,05 mM Pyridoxalphosphat, 9 mM L-Glutamat, 3,3 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -L-Glutamat, und 60 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH=7,1).

Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Reaktion gestoppt, indem 100 μl 10%ige Trichloressigsäure durch die Injektionskanüle zugegeben und somit die im Ansatz enthaltenen Proteine denaturiert wurden. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Aus den jetzt stark angesäuerten Reaktionsgemischen wurde währenddessen das durch GAD-Einwirkung gebildete CO_2 freigesetzt und anschließend an den Benzethoniumhydroxid-getränkten Filterscheibchen absorbiert. Diese Filterpapier-Scheibchen wurden sodann in Gefäße mit Szintillationsflüssigkeit überführt und die gebundene Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt (Tri-Carb 2100, Packard Instruments, Meriden, USA). Die erhaltenen Aktivitätswerte wurden durch den Proteingehalt der jeweiligen Probe dividiert und somit normiert.

Es wurden Proteinproben aus Nebennieren adulter Ratten (N = 6) und NCI-H295R-Zellen (N = 18) untersucht. Proteinpräparationen aus dem Kleinhirn adulter Ratten dienten als

Positivkontrollen (N = 6). Die Aktivität aller anderen Proben wurde in Prozent der Aktivität im Kleinhirn angegeben (jeweils normiert auf den Proteingehalt der einzelnen Proben). Als Negativkontrollen wurden Proteinpräparationen aus NCI-H295R-Zellen (N = 3), Ratten-Nebennieren (N = 3) und Ratten-Kleinhirn (N = 5) benutzt, die vor der Versuchsdurchführung für 10 min auf 95° C erhitzt wurden, um enthaltene Enzyme durch Denaturierung zu inaktivieren. Das Software-Paket GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) diente zur statistischen Auswertung der Ergebnisse. Dabei wurde die Aktivität in erhitzten und unbehandelten Proben der selben Herkunft mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests verglichen, um zu prüfen, ob das Erhitzen zu einer signifikanten Änderung der Freisetzung von radioaktivem CO₂ führte.

III.7 Bestimmung des cAMP-Gehalts in NCI-H295R-Zellen

NCI-H295R-Zellen wurden in 35mm - Kulturschälchen ausgesät und für etwa drei Tage kultiviert, bis sie annähernd Konfluenz erreichten. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit warmem PBS gespült. Anschließend wurde in jedes Schälchen 900 µl Stimulationsmedium (siehe Tabelle 11) pipettiert. Das darin enthaltene IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor zellulärer Phosphodiesterasen und blockiert den Abbau von intrazellulärem cAMP und cGMP. γ -Acetylen-GABA (= 4-Amino-5-hexinsäure) inhibiert GAD und blockiert so die endogene GABA-Produktion der NCI-H295R-Zellen [29,99].

Tabelle 11: Stimulationsmedium

Zusammensetzung (je Kulturschälchen)		
Normales NCI-H295R - Kulturmedium incl. 3% NU-Serum	765 µl	
γ -Acetylen-GABA (Stammlösung 10mM)	90 µl	(100 µM)
IBMX (Stammlösung 100 mM)	45 µl	(500 µM)
Gesamt:	900 µl	

¹IBMX = 3-Isobutyl-1-methylxanthin

Die Zellen wurden nun für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert und anschließend folgende Substanzen zugegeben:

Tabelle 12: Stimulationsbedingungen für den cAMP-Assay

Endkonzentration in 1 ml Zellkulturmedium
5 μ M Forskolin / 100 μ M NaOH
oder 5 μ M Forskolin / 100 μ M Baclofen / 100 μ M NaOH
oder 5 μ M Forskolin / 100 μ M Saclofen / 100 μ M NaOH
Forskolin- und Saclofen- Stammlösungen (50 mM) wurden aus Löslichkeitsgründen jeweils in 50 mM NaOH angesetzt.

Danach wurden die Zellen für weitere 15 oder 30 min inkubiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach gründlichem Absaugen wurden je Schälchen 300 μ l 0,1M HCl zugegeben und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur stengelassen. Die derart permeabilisierten Zellen wurden mit einem Kunststoffschaber von der Oberfläche gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und abzentrifugiert (10 min / 1200 g / 4°C). 200 μ l des Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt und entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

Zur Bestimmung des cAMP Gehalts der Proben wurde ein kommerzieller Immunoassay (ELISA) der Firma Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay, bei der mit dem Enzym Acetylcholinesterase (AChE, aus *Electrophorus electricus*) konjugierte cAMP-Tracermoleküle mit dem in der Probe vorhandenen cAMP um die Bindung an einen spezifischen cAMP-Antikörper (Spezies: Ratte) konkurrieren. Dieser wiederum wird durch einen gegen Ratten-IgG gerichteten monoklonalen Maus-Antikörper in einer 96-fach Mikrotiterplatte fixiert. Nachdem durch gründliches Waschen überschüssige Reagenzien entfernt wurden, wird das sogenannte „Ellman's Reagenz“ zugegeben. Unter AChE-Einwirkung wird das darin enthaltene Acetylthiocholin zu Thiocholin umgesetzt, das nichtenzymatisch mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) zu dem gelben Farbstoff 5-Thio-nitrobenzoesäure reagiert (Absorptionsmaximum $\lambda = 412$ nm). Bei photometrischer Auswertung gilt nun der Zusammenhang:

Formel 2: $A_{412} \sim \text{gebundener cAMP-Tracer} \sim 1 / \text{cAMP-Gehalt der Probe}$

Abbildung 9 zeigt schematisch das Prinzip des ELISA. Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für cAMP aus (relative Bindungsaffinitäten zu cAMP 100%, zu cGMP 3%, zu Dibutyryl-cAMP 0,8%, zu ATP, AMP und zu anderen Nukleotid-Derivaten <0,05% laut Herstellerangabe).

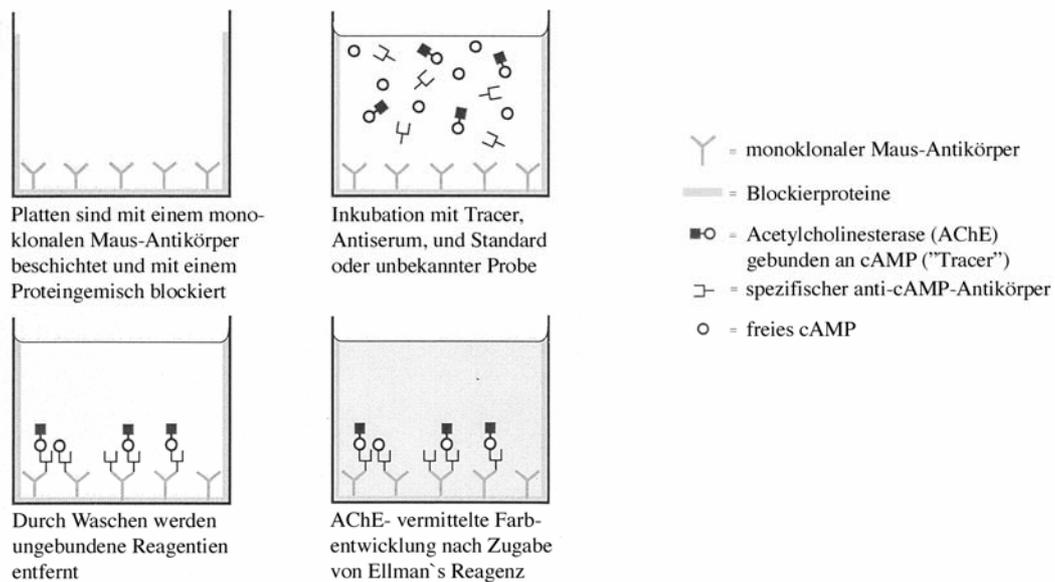


Abbildung 9: Prinzip des kompetitiven indirekten ELISA, der zur Messung der cAMP-Konzentration in NCI-H295R-Zellen verwendet wurde.

Abbildung © 2003, Cayman Chemical Co.

Zusammen mit den zu bestimmenden Proben (Doppelbestimmung) wurden bei jeder Versuchsdurchführung eine Standardkurve (8 bekannte cAMP-Konzentrationen, Bereich 2,3 - 300 pmol/ml, jeweils Doppelbestimmung) sowie je 3 Werte für die unspezifische Farbstoffbildung (ohne AChE-Zugabe) und für die maximale Farbstoffbildung (maximale Tracerbindung in Abwesenheit von unmarkiertem cAMP) bestimmt. Die erhaltenen Roh-Absorptionswerte wurden anhand des oben angegebenen Zusammenhanges, mit Hilfe eines vom Hersteller des ELISA zur Verfügung gestellten Computerprogrammes, in die entsprechenden cAMP-Konzentrationen umgerechnet. Aus den so erhaltenen cAMP - Konzentrationen wurden für jede Stimulationsgruppe Mittelwert und Standardfehler errechnet. Die Ergebnisse wurden mittels one-way-ANOVA auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hin überprüft (GraphPad Prism, Version 4, GraphPad Software, San Diego, USA).

IV. ERGEBNISSE

IV.1 Neuroendokrine Differenzierung in der Nebennierenrinde

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression der Proteine SNAP-25, VAMP-2 und Syntaxin, die eine zentrale Rolle bei der Exozytose spielen, in der Nebennierenrinde der Ratte untersucht. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks dienten dabei als Positivkontrolle. Ein Antikörper gegen SNAP-25 zeigte im Nebennierenmark eine kräftige Anfärbung, die den neuroendokrinen Charakter dieses Gewebes unterstreicht. In einzelnen Abschnitten der untersuchten Gewebeschnitte fand sich jedoch auch eine Immunfärbung in den steroidproduzierenden Rindenzellen, und zwar speziell in den äußersten Zelllagen, die der Zona glomerulosa entsprechen. Diese Anfärbung war jedoch wesentlich schwächer als die des Markes und konnte auch innerhalb eines Gewebeschnittes nicht in allen Abschnitten der Zona glomerulosa beobachtet werden (Abbildung 10 A,B). Zudem konnten im Bereich der Rinde, und hier vor allem in den äußeren Anteilen, Nervenfasern anhand ihrer SNAP-25-Immunreaktivität identifiziert werden. Dies deckt sich mit früheren Berichten über die Innervation der Nebennierenrinde [37,147,149].

Demgegenüber ergab ein Antiserum gegen VAMP-2 (Synaptobrevin 2) im Bereich der Zona glomerulosa stets eine deutliche Immunreaktion. In ihrer Intensität war diese mit der des Nebennierenmarkes, das auch hier eine interne Positivkontrolle bildet, vergleichbar (Abbildung 10 D). Ähnliche Ergebnisse, also eine Anfärbung des Markes und eine deutliche und durchgehende Reaktivität in der Zona glomerulosa, zeigte auch ein Antiserum gegen Syntaxin (Abbildung 10 C).

Bei allen immunhistochemischen Experimenten wurden jeweils Negativkontrollen durchgeführt, bei denen entweder kein Erstantikörper oder ein unspezifisches IgG-Gemisch eingesetzt wurde. In diesen Kontrollen zeigte sich keine Anfärbung.

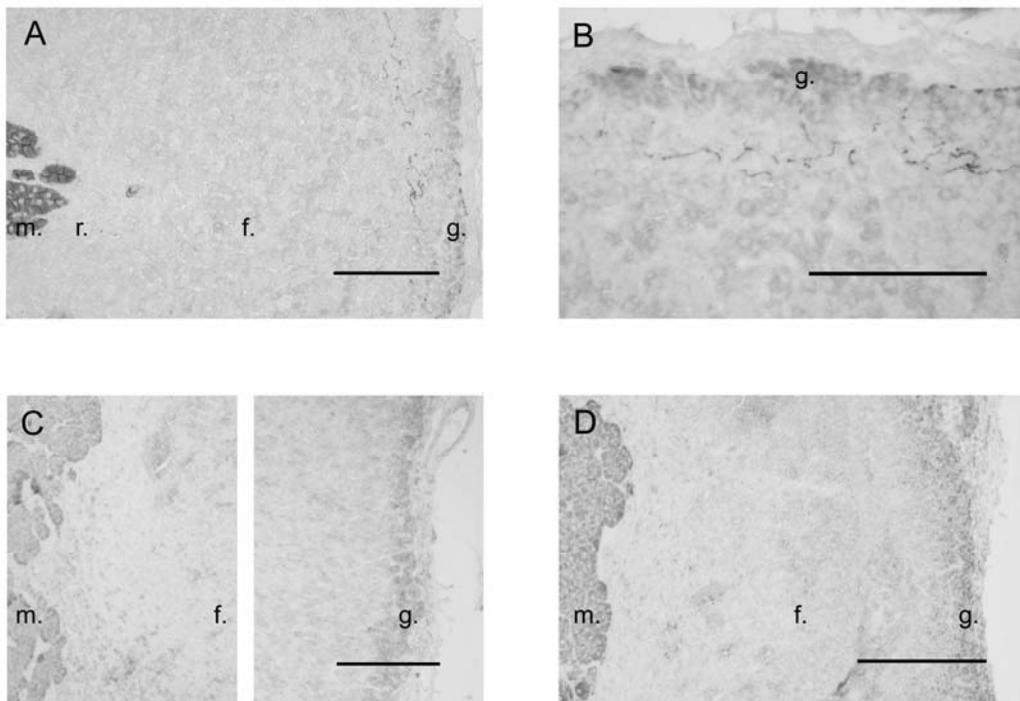


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis neuroendokriner Marker in der Nebenniere der Ratte.

A: Diese Färbung mit einem monoklonalen SNAP-25 Antikörper zeigt eine deutliche Immunreaktion im Mark. (g.: Zona glomerulosa, f.: Zona fasciculata, r.: Zona reticularis, m.: Medulla; Balken: 100 μ m) **B:** Bei stärkerer Vergrößerung werden in der Rinde SNAP-25 immunreaktive Nervenfasern erkennbar, die den Kortex durchziehen und im Bereich der Zona glomerulosa die höchste Dichte haben. Außerdem sind einige Zellen der Zona glomerulosa schwach angefärbt. (Balken: 50 μ m) **C:** Immunfärbung mit einem Antiserum gegen Syntaxin, **D:** Immunfärbung mit einem VAMP-2 - Antiserum. In beiden Fällen kommen, neben der Anfärbung der chromaffinen Zellen, auch immunreaktive Zellen in den äußeren Schichten des Kortex zur Darstellung. (Größenbalken in C und D: 200 μ m)

IV.2 GABA-Produktion und -Speicherung in der Nebennierenrinde

IV.2.1 Immunhistochemische Befunde

Die Enzyme für GABA-Biosynthese und GABA-Speicherung sind essentielle Voraussetzung für jegliche GABAerge Signalübertragung. Sie können somit als Marker für Gewebe dienen, in denen GABAerge Regulationssysteme vorkommen. Immunhistochemische Studien an Rattengeweben unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums zeigten, dass der vesikuläre

Transporter inhibitorischer Aminosäuren (VIAAT) in der Nebennierenrinde vorhanden ist (Abbildung 11). Analog zu den Befunden zur Expression neuroendokriner Marker war auch hier die Intensität der Immunfärbung in der Außenschicht des Kortex, also im Bereich der Zona glomerulosa, am deutlichsten. Die inneren kortikalen Zonen zeigten eine wesentlich schwächere Färbung, während das Nebennierenmark überhaupt keine Immunreaktivität zeigte (Abbildung 11 A,C).

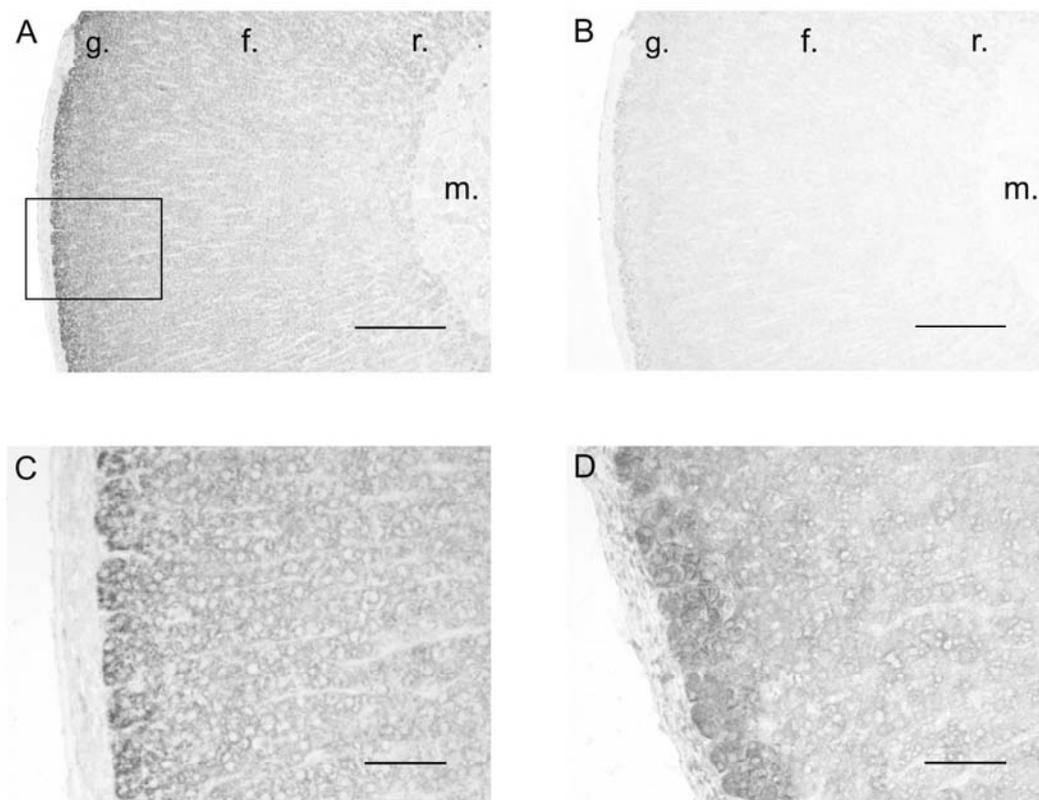


Abbildung 11: GAD und VIAAT in der Nebenniere der Ratte.

A: Ein polyklonales Antiserum zeigt die Anwesenheit von VIAAT in der Nebennierenrinde und besonders in deren äußeren Bereichen. Interessant ist zudem das Fehlen einer Anfärbung im Mark. g.: Zona glomerulosa, f.: Zona fasciculata, r.: Zona reticularis, m.: Medulla; Balken: 200 µm. **B:** Durch Präadsorption des Antiserums mit dem immunogenen Peptid kann die Immunfärbung deutlich abgeschwächt werden. Balken: 200 µm. **C:** Die Ausschnittsvergrößerung aus A zeigt deutlich die intensive Anfärbung der Zellen der Zona glomerulosa. Im Vergleich mit der Immunfärbung mit einem GAD-Antiserum (**D**) wird zudem die ähnliche zelluläre Verteilung der für GABA-Synthese und -Speicherung zuständigen Enzyme GAD und VIAAT deutlich. (Balken: jeweils 50 µm)

Zur Kontrolle der Spezifität der Immunfärbung wurden in diesem Fall Proben des verwendeten Antiserums vor Verwendung mit demjenigen VIAAT-homologen Peptid inkubiert, das auch als Immunogen bei der Antikörper-Gewinnung gedient hatte. Durch diese Präadsorption des Antiserums wurde die beobachtete Anfärbung der Zona glomerulosa praktisch vollständig eliminiert (Abbildung 11 B).

Um die Expression von GAD in der Nebenniere zu untersuchen, wurde ein polyklonales Antiserum benutzt, das mit beiden GAD-Isoformen reagiert. In Ratten-Nebennieren zeigte das dabei beobachtete Anfärbungsmuster eine große Ähnlichkeit mit der Verteilung der Transporterproteins VIAAT: es ergab sich wiederum eine bevorzugte Anfärbung der Zona glomerulosa (Abbildung 11 D). Diese Koexpression von GAD und VIAAT ist aus funktioneller Sicht plausibel, da beide Proteine komplementäre Funktionen (GABA-Synthese und GABA-Speicherung) erfüllen.

Auch an menschlichen Nebennieren wurde die Anwesenheit von VIAAT und GAD immunhistochemisch untersucht. Beide Antiseren ergaben auch in humanen Organen eine Anfärbung des Kortex (Abbildung 12). Allerdings differierte die räumliche Verteilung der Immunreaktivität im Vergleich zur Ratte. Im Gegensatz zur betonten Anfärbung des äußeren Kortex der Ratte zeigte sich im Menschen ein homogeneres Färbungsmuster über alle Zonen der Rinde hinweg. Die Präadsorptions-Kontrolle belegte auch hier die Spezifität der Immunreaktion des verwendeten VIAAT-Antiserums.

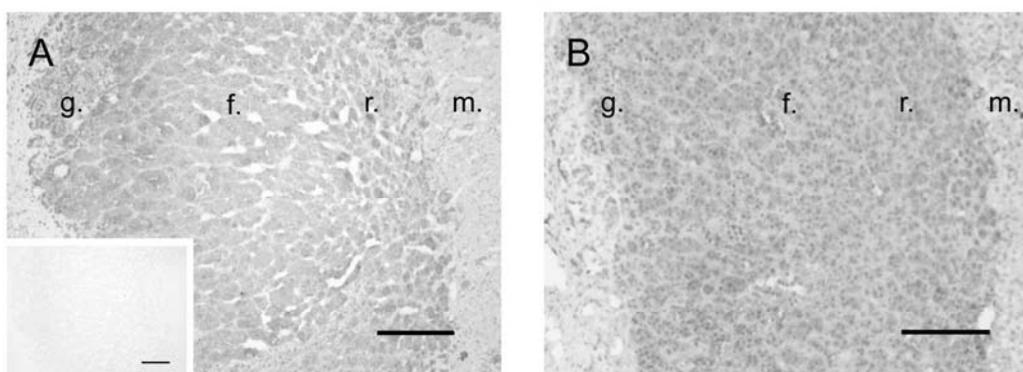


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von VIAAT (A) und GAD (B) in der Nebennierenrinde des Menschen.

Wiederum ähnelt sich die Verteilung der beiden Proteine, wenn auch die bevorzugte Lokalisation in der Zona glomerulosa nicht so deutlich ausgeprägt ist wie in der Ratte. Kleines Bild in A: Präadsorptionskontrolle unter Verwendung des immunogenen VIAAT-GST Fusionsproteines. (g.: Zona glomerulosa, f.: Zona fasciculata, r.: Zona reticularis, m.: Medulla; Balken: 200 µm)

Die Tatsache, dass die Immunreaktivität für GAD und VIAAT in der Ratte in den äußersten Zellschichten des Kortex konzentriert ist, legt die Vermutung nahe, dass diese Enzyme spezifisch in Zellen der mineralokortikoid-produzierenden Zona glomerulosa exprimiert werden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Serienschnitte von Nebennieren der Ratte mit Antikörpern gegen VIAAT, GAD und Aldosteron-Synthase gefärbt (Abbildung 13).

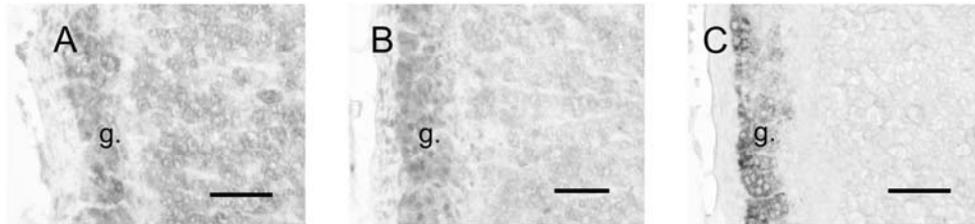


Abbildung 13: Kolokalisation von GABA-Synthese und -Speicherung in Aldosteron-produzierenden Zellen.

Serielle Schnitte aus einer Ratten-Nebenniere, immunhistochemisch angefärbt mit Antiseren gegen VIAAT (A), GAD (B) und einem monoklonalen Antikörper gegen Aldosteron-Synthase (C). (g.: Zona glomerulosa; Balken: 50 µm)

Die Qualität der VIAAT-Immunfärbungen bei der Untersuchung dieser konsekutiven Paraffinschnitte war nicht optimal, da das für die beiden anderen Antikörper geeignete Fixationsverfahren (4% Paraformaldehyd) mit dem VIAAT-Antikörper keine idealen Ergebnisse ermöglichte. Im Vergleich mit in BOUINS Fixationslösung konserviertem Rattengewebe ergibt das VIAAT-Antiserum hier eine etwas höhere Hintergrundfärbung. Dennoch zeigen derartige Serienschnitte, dass in der Ratte die Expression von VIAAT und GAD in der Tat in den Zellen der Zona glomerulosa konzentriert ist. Die Breite des deutlich angefärbten Zellsaumes entspricht den durch das Enzym Aldosteron-Synthase markierten Mineralokortikoid-produzierenden Zellen.

IV.2.2 Untersuchung mittels RT-PCR

Die immunhistochemisch erhobenen Befunde wurden auch auf der mRNA-Ebene überprüft. Mittels RT-PCR konnte die Expression von GAD-67 in der Nebenniere des Menschen und der Ratte bestätigt werden (Abbildung 14 A). Unter Einsatz eines „nested RT-PCR“-Verfahrens mit zwei hintereinander geschalteten PCR-Reaktionssequenzen konnte auch mRNA für GAD-65 in den Organen beider Spezies gefunden werden (Abbildung 14 B).

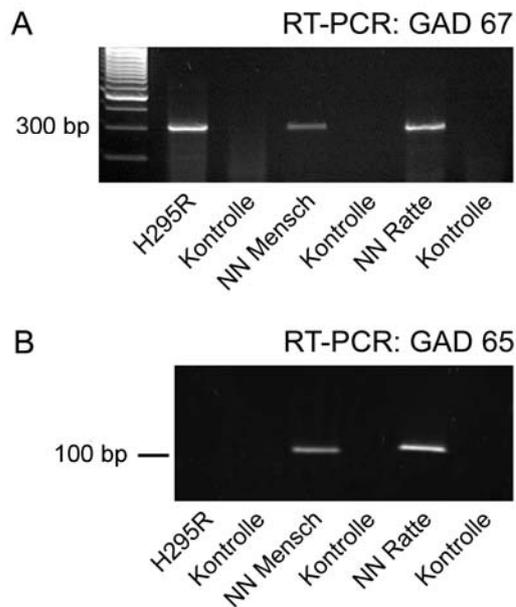


Abbildung 14: Im oberen Bildteil (**A**) ist erkennbar, dass GAD-67 mRNA in NCI-H295R-Zellen und Nebennieren des Menschen und der Ratte mittels RT-PCR nachgewiesen wurde. GAD-65 mRNA konnte dagegen nur unter Verwendung der „nested PCR“-Methodik in den Geweben von Mensch und Ratte detektiert werden (**B**). Ein Nachweis in NCI-H295R-Zellen gelang dagegen nicht. (Kontrollen: RT-Reaktionen ohne Zugabe von RNA)

VIAAT-mRNA war ebenfalls in der Nebenniere von Mensch und Ratte nachweisbar, wobei für die Untersuchung humanen Gewebes wiederum ein „nested PCR“-Ansatz verwendet wurde (Abbildung 15). Alle diese Ergebnisse wurden durch Sequenzierung der entsprechenden PCR-Produkte bestätigt.

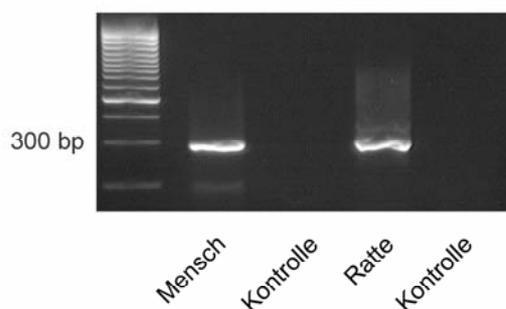


Abbildung 15: RT-PCR zum Nachweis von VIAAT mRNA in der Nebenniere des Menschen und der Ratte.

(Kontrollen: RT-Reaktionen ohne Zugabe von RNA)

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass in der Nebennierenrinde des Menschen und der Ratte die enzymatische Ausstattung zur Biosynthese und Speicherung von GABA, in Form der Enzyme GAD und VIAAT, vorhanden ist.

IV.3 GABA-Produktion in NCI-H295R-Zellen

Die menschliche Nebennierenrinden-Zelllinie NCI-H295R wurde auf die Anwesenheit von GAD und VIAAT untersucht. Das selbe GAD-Antiserum, das auch zur Anfärbung der Gewebeschnitte verwendet wurde, zeigte in Immunfluoreszenz-Versuchen eine starke zytoplasmatische Anfärbung von NCI-H295R-Zellen (Abbildung 16). Mit dem VIAAT-Antiserum ergab sich dagegen kein erkennbares Fluoreszenzsignal (ohne Abbildung).

Auch hier wurden, wie schon bei der Untersuchung der humanen und tierischen Gewebe, wiederum RT-PCR-Experimente zur Bestätigung der Immunfärbungen eingesetzt. Die mRNA für GAD-67 war auch in der untersuchten Zelllinie nachweisbar, dagegen konnte GAD-65 mRNA auch unter Verwendung eines „nested PCR“-Ansatzes in diesen Zellen nicht detektiert werden (Abbildung 14). Auch mRNA für den vesikulären Transporter VIAAT wurde in der NCI-H295R-Zelllinie nicht gefunden (nicht im Bild). Letzteres Ergebnis deckt sich mit dem negativen Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung.

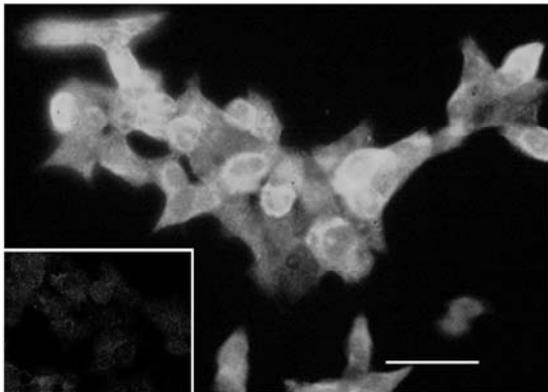


Abbildung 16: NCI-H295R-Zellen zeigen mit einem Antiserum gegen beide GAD-Isoformen eine deutliche, zytoplasmatisch lokalisierte Immunfluoreszenz.

Balken: 40 µm. Links unten wird eine Negativkontrolle gezeigt, bei der kein Erstantikörper eingesetzt wurde.

Um zu bestimmen, welche der beiden GAD-Isoformen GAD-65 und GAD-67 in der Nebennierenrinde die größere Bedeutung besitzt, wurden auch Western Blot - Experimente durchgeführt. Dazu wurde das selbe Antiserum verwendet, das auch für die Immunfärbungen zum Einsatz kam. Dieses Antiserum ergab auf Western Blots mit Proteinpräparationen aus Ratten-Nebennieren und aus NCI-H295R-Zellen jeweils eine immunreaktive Bande bei einem Molekulargewicht zwischen 60 und 70 kDa (Abbildung 17).

Als Positivkontrolle kam aus dem Ratten-Kleinhirn gewonnenes Protein zum Einsatz. In diesen Proben erkannte der verwendete Antikörper beide GAD-Isoformen, GAD-65 und GAD-67. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass die in der Nebenniere und der NCI-H295R-Zelllinie gefundene immunreaktive Bande, in Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen, der Variante GAD-67 entspricht. Ein deutliches GAD-65 entsprechendes Signal konnte in keiner der Proben aus der Nebenniere entdeckt werden.

Western blot: GAD 65 / GAD 67

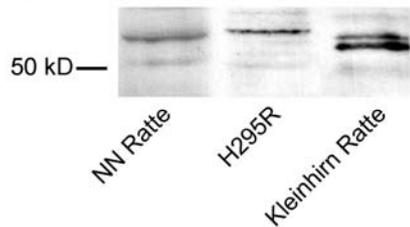


Abbildung 17: Western Blot zum Nachweis von GAD. GAD-67 konnte in Proben aus der Rattennebenniere sowie in NCI-H295R-Zellen nachgewiesen werden. Der Isoform GAD-65 entsprechende Banden wurden nicht beobachtet. Protein aus Kleinhirn der Ratte mit seiner bekannten Expression beider GAD-Isoformen diente als Positivkontrolle.

IV.4 *In vitro* -Bestimmung der GAD-Aktivität

Um weiter abzusichern, dass Nebennierenrindenzellen die Fähigkeit zur GABA-Biosynthese besitzen, wurde die katalytische Aktivität des Enzyms GAD in einem *in vitro* -Assay quantitativ nachgewiesen. Die Enzymaktivität im Rattenkleinhirn, bezogen auf die Masse an eingesetztem Gesamtprotein, diente dabei als Vergleichswert und wurde mit 100 % angesetzt. Lysate von NCI-H295R-Zellen zeigten $3,54 \pm 0,33$ % (Mittelwert \pm Standardfehler) der Aktivität, die im Cerebellum gefunden wurde. In Protein-Präparationen aus ganzen Ratten-Nebennieren betrug die GAD-Aktivität $3,10 \pm 1,39$ % im Vergleich zum Kleinhirn (Abbildung 18).

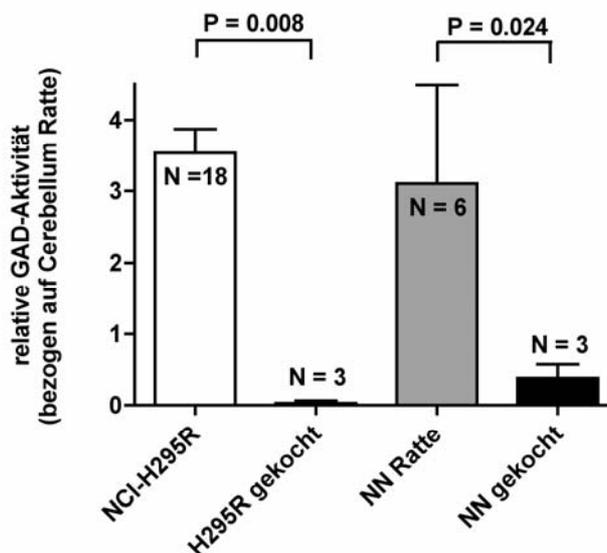


Abbildung 18: In Protein-Präparationen aus NCI-H295R-Zellen und Ratten-Nebennieren lässt sich die enzymatische Aktivität von GAD nachweisen.

Die Aktivität ist in Relation zum Proteingehalt der Proben und bezogen auf die Positivkontrolle Ratten-Kleinhirn angegeben. Durch Kochen der Proben wird diese Aktivität um fast 100 % vermindert (P-Werte berechnet mit dem doppelseitigen t-Test nach Student).

Wurden die verwendeten Proteinproben vor Versuchsbeginn durch Kochen denaturiert, so wurde dadurch die gefundene GAD-Aktivität praktisch komplett eliminiert: Derart vorbehandelte Proben aus NCI-H295R-Zellen zeigten nur noch $0,03 \pm 0,03$ % der Aktivität in unbehandeltem Cerebellum ($P = 0,008$ für den Unterschied zu nicht gekochten Proben). In Nebennieren-Proben betrug die Restaktivität $0,38 \pm 0,19$ % ($P = 0,024$), und in gekochten Kleinhirn-Proteinproben $0,08 \pm 0,02$ % ($P = 0,004$). Folglich ist ein temperatursensibler Bestandteil der Zell- und Gewebeextrakte an der beobachteten Decarboxylierungsreaktion beteiligt.

Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Beleg dar, dass Zellen in der Nebenniere und die menschliche Nebennierenrinden-Zelllinie NCI-H295R die nötige enzymatische Ausstattung besitzen, um Glutamat zu GABA zu decarboxylieren.

IV.5 GABA-Rezeptoren in der NCI-H295R-Zelllinie und der Nebenniere

IV.5.1 Expression von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in NCI-H295R-Zellen

Mittels RT-PCR wurde die Anwesenheit verschiedener GABA_A-Untereinheiten in NCI-H295R-Zellen untersucht. Diese Versuche ergaben, dass in dieser Zelllinie mRNA für die Untereinheiten α_2 , α_3 , β_2 , β_3 , γ_2 und ϵ vorhanden ist (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu konnte mRNA für die Untereinheiten α_1 und β_1 nicht nachgewiesen werden (nicht im Bild gezeigt).

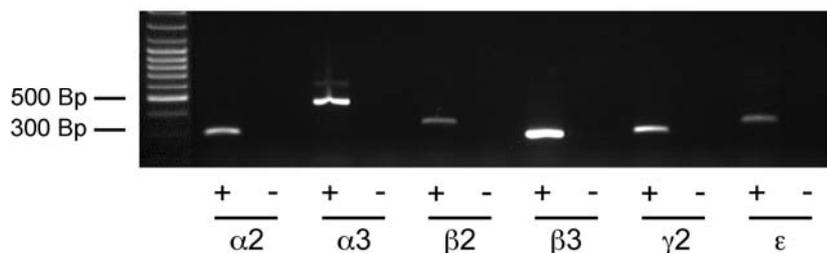


Abbildung 19: Nachweis verschiedener GABA_A-Untereinheiten in adrenokortikalen Zellen mittels RT-PCR.

+ kennzeichnet cDNA-Proben aus NCI-H295R-Zellen, - sind entsprechende Negativkontrollen, bei denen der RT-Reaktion keine RNA zugesetzt wurde.

IV.5.2 NCI-H295R-Zellen exprimieren $GABA_B$ -Rezeptoren und die verkürzte Untereinheit $GABA_{B(1e)}$.

Ebenso wurde mittels RT-PCR nach mRNA für die beiden Untereinheiten des $GABA_B$ -Rezeptors gesucht. Es zeigte sich, dass NCI-H295R-Zellen sowohl $GABA_{B(1)}$ als auch $GABA_{B(2)}$ exprimieren (Abbildung 20).

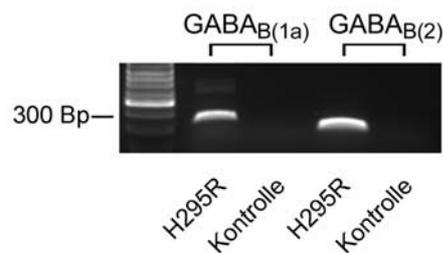


Abbildung 20: Die beiden Untereinheiten des $GABA_B$ -Rezeptors, $GABA_{B(1)}$ und $GABA_{B(2)}$, werden in NCI-H295R-Zellen exprimiert.

(RT-PCR, Kontrolle: RT-Reaktion ohne Einsatz von RNA)

Die $GABA_{B(1)}$ -Untereinheit existiert in mehreren Spleissvarianten, und eine davon, nämlich $GABA_{B(1e)}$, wurde bereits zuvor in der menschlichen Nebenniere nachgewiesen - allerdings ohne eine genauere Zuordnung zum Kortex oder zur Medulla [136]. Deswegen wurde in der Folge ein spezielles Primerpaar entwickelt, das in der Lage ist, zwischen der häufigsten und am besten charakterisierten Spleissvariante $GABA_{B(1a)}$ und der verkürzten Form $GABA_{B(1e)}$ zu differenzieren. Die beiden Primer binden zu beiden Seiten des in der Variante (1e) fehlenden Exons und ergeben so für $GABA_{B(1a)}$ bzw. $GABA_{B(1e)}$ Produkte unterschiedlicher Länge. Tatsächlich fanden sich in PCR-Versuchen mit cDNA aus NCI-H295R-Zellen zwei unterschiedliche Banden mit Längen von etwa 570 und 420 Basenpaaren (Abbildung 21).

Nachdem diese PCR-Produkte getrennt aus dem Elektrophoresegel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert wurden, zeigte sich, dass es sich in der Tat um die beiden Spleissvarianten (1a) und (1e) handelte. Ebenso konnten in cDNA-Proben aus Ratten-Nebennieren beide Spleissvarianten gleichzeitig nachgewiesen werden. Der Nachweis von $GABA_{B(1e)}$ in menschlichen Geweben bestätigt bereits früher publizierte Berichte [136]. Als Kontrolle wurde weiterhin eine Probe aus dem Ratten-Kleinhirn untersucht. Ebenfalls in Übereinstimmung mit früheren Befunden wird dort die $GABA_{B(1e)}$ -Untereinheit anscheinend nicht exprimiert, sondern lediglich $GABA_{B(1a)}$.

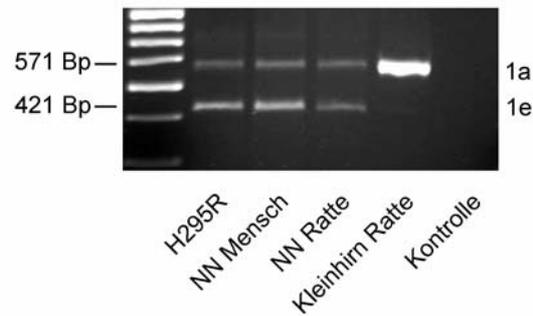


Abbildung 21: Expression der GABA_{B(1e)}-Spleissvariante in NCI-H295R-Zellen, menschlichen Nebennieren und solchen der Ratte.

Die obere der beiden Banden entspricht der cDNA-Sequenz von GABA_{B(1a)}, die untere der 150 bp kürzeren Variante GABA_{B(1e)}. Im Zentralnervensystem (Kleinhirn der Ratte) kann diese verkürzte cDNA nicht nachgewiesen werden. Die Identität der einzelnen Banden wurde durch getrennte Sequenzierung bestätigt.

Um die Existenz von GABA_B-Rezeptoren in Nebennierenrinden-Zellen auch auf Proteinebene zu zeigen, wurden NCI-H295R-Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Dabei wurde ein Antikörper gegen das N-terminale Ende der GABA_{B(2)}-Untereinheit verwendet. Vor allem auf Zellen, die sich mit anderen zu Häufen gruppiert hatten, konnte eine intensive Fluoreszenzanfärbung beobachtet werden (Abbildung 22). Dagegen blieben Kontrollen, bei denen statt des Primärantikörpers unspezifisches IgG zugegeben wurde, negativ.

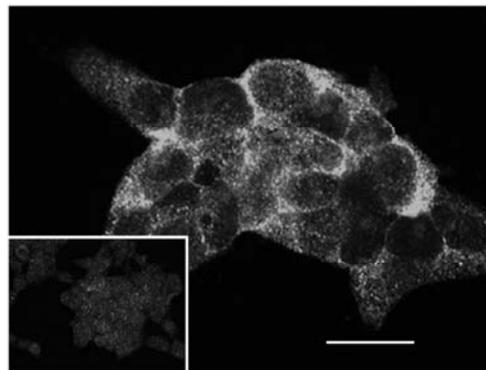


Abbildung 22: Nachweis von GABA_B-Rezeptoren in NCI-H295R-Zellen.

Dazu wurde ein Antiserum gegen die Untereinheit GABA_{B(2)} und ein FITC-markierter Sekundärantikörper eingesetzt. Ein zellmembranständiges Verteilungsmuster ist erkennbar. Kleines Bild links unten: Kontrolle unter Verwendung von IgG aus nicht immunisierten Kaninchen anstatt des spezifischen Primär-Antiserums. (Balken: 20 µm)

Zusammenfassend betrachtet, lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die humane Tumorzelllinie NCI-H295R die Rezeptor-Untereinheiten $GABA_{B(1a)}$, $GABA_{B(1e)}$, und $GABA_{B(2)}$ exprimiert. Damit ist die Bildung funktioneller $GABA_B$ -Rezeptoren in diesen Zellen möglich.

IV.5.3 $GABA_B$ Rezeptoren und spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle in der Nebennierenrinde

Aufgrund der geschilderten Resultate wurde nun unter Verwendung des polyklonalen Antiserums gegen die $GABA_{B(2)}$ -Rezeptor-Untereinheit versucht, die Existenz von $GABA_B$ -Rezeptoren auch in der nicht pathologisch veränderten Nebennierenrinde nachzuweisen und ihre Lokalisation genauer zu untersuchen (Abbildung 23).

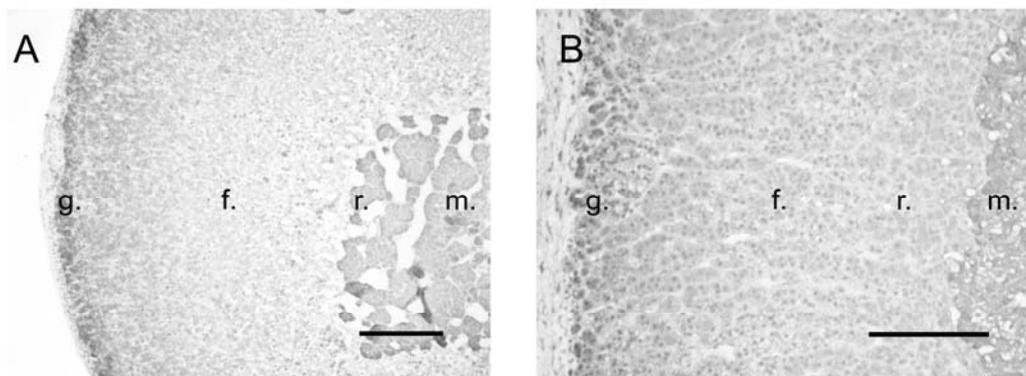


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von $GABA_{B(2)}$ in der Nebennierenrinde der Ratte (A) sowie des Menschen (B).

In beiden Spezies ist diese Rezeptor-Untereinheit offenbar auf chromaffinen Zellen im Nebennierenmark vorhanden. Auch adrenokortikale Zellen, vor allem im Bereich der Zona glomerulosa, zeigen Immunreaktivität. Beim Menschen scheint die Verteilung von $GABA_B$ -Rezeptoren innerhalb der Rinde homogener zu sein. Allerdings ergab das verwendete Antiserum bei menschlichen Geweben auch eine mäßig starke Anfärbung von Zellkernen, so dass eventuell ein Teil der beobachteten Färbung auf einer unspezifischen Antikörperbindung beruht. Kontrollexperimente unter Verwendung von IgG nicht-immunisierten Kaninchen zeigten jedoch keinerlei unspezifische Signale. (g.: Zona glomerulosa, f.: Zona fasciculata, r.: Zona reticularis, m.: Medulla; Balken: 200 µm)

Dabei zeigte sich im Nebennierenmark sowohl der Ratte als auch des Menschen eine kräftige Anfärbung. Dieser Befund deckt sich mit publizierten Berichten über $GABA_B$ -Rezeptoren in

chromaffinen Zellen [20]. Zudem zeigte sich auch in der Rinde Immunreaktivität für GABA_{B(2)}. In der Ratte war diese vor allem in den äußersten Zellschichten des Kortex konzentriert, es zeigte sich hier ein sehr ähnliches Bild wie bei den Immunfärbungen für GAD und VIAAT. Auch in der Zona fasciculata war eine Anfärbung zu beobachten, die in den inneren Schichten der Rinde aber zunehmend schwächer wurde. In menschlichen Nebennieren war die Immunreaktivität ebenfalls im Bereich der Zona glomerulosa am stärksten erkennbar, zeigte sich aber im gesamten Bereich des Kortex, mit einer insgesamt weniger deutlich abgegrenzten Verteilung als in der Ratte.

Einer der möglichen Effekte, die durch GABA_B-Rezeptoren vermittelt werden, ist die Beeinflussung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Sowohl publizierte elektrophysiologische Befunde als auch Untersuchungen auf mRNA-Ebene legen die Existenz von Calciumkanälen vom L-Typ, speziell der Untereinheit α_{1D} , in Zellen der Zona glomerulosa nahe [128,134]. Daher wurde ein spezifisches Antiserum gegen α_{1D} für immunhistochemische Färbungen von menschlichen und Ratten-Nebennieren eingesetzt.

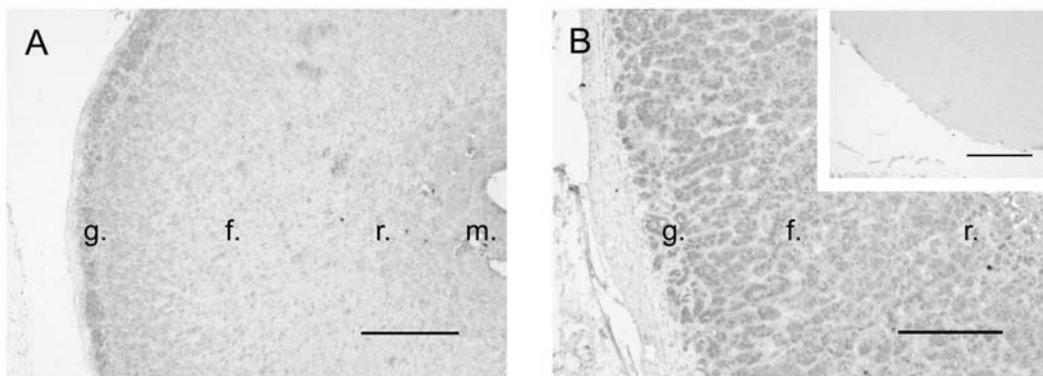


Abbildung 24: Expression der α_{1D} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals in der Nebenniere der Ratte (A) und des Menschen (B).

Die Lokalisation von α_{1D} in der Zona glomerulosa der Ratte ähnelt sehr stark der Verteilung von GAD, VIAAT und GABA_{B(2)}. Im Menschen zeigt sich auch hier eine gleichmäßigere Verteilung. Der Ausschnitt rechts oben im Bildteil B zeigt ein Kontrollexperiment (Zugabe des immunogenen Peptides zum Primärantikörper vor dessen Verwendung), das die Spezifität der Anfärbung unterstreicht. (g.: Zona glomerulosa, f.: Zona fasciculata, r.: Zona reticularis, m.: Medulla; Balken: 250 µm)

Die Ergebnisse (Abbildung 24) decken sich dabei mit dem für GABA_{B(2)} gefundenen Muster: Während in der Ratte vor allem die äußersten Zellschichten des Kortex eine deutliche Immunreaktivität aufweisen, zeigt sich im Menschen eine homogenere Verteilung im gesamten Kortex. In beiden Spezies war im Mark keine Anfärbung für α_{1D} zu beobachten. Zur Kontrolle der

Spezifität des eingesetzten Antiserums wurden, wie schon beim VIAAT-Antiserum, Präadsorptions-Kontrollen durchgeführt. Inkubation des verwendeten Antiserums mit einem Überschuss des immunogenen Peptides führte zu einer kompletten Aufhebung der Immunfärbung.

IV.6 Pharmakologische Beeinflussung von GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren hat keinen Effekt auf die Proliferation von NCI-H295R-Zellen

Zu den beschriebenen Funktionen von GABA im ZNS und in der Peripherie gehört die Beeinflussung der Zellproliferation [50,106]. Um einen derartigen Einfluss von GABA auf NCI-H295R-Zellen zu untersuchen, wurde deren Proliferation nach Stimulation mit GABA-Agonisten und -Antagonisten untersucht.

H295R-Zellen wurden dazu zunächst in serumfreiem Medium kultiviert, um die einzelnen Zellen in der selben Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. Danach wurden sie für 24 Stunden in serumhaltigem Medium in Gegenwart von Agonisten oder Antagonisten für GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren inkubiert. Mittels eines colorimetrischen Assays wurde anschließend die Zahl metabolisch aktiver Zellen in den einzelnen Stimulationsgruppen miteinander verglichen. Ziel war es, anhand der Unterschiede in den Zellzahlen nach 24-stündiger Stimulation einen Einfluss von GABA-Rezeptoren auf das Wachstumsverhalten von NCI-H295R-Zellen festzustellen.

Wie in Tabelle 13 und Abbildung 25 dargestellt, zeigten sich jedoch bei keiner der getesteten Substanzen (dem GABA_A-Agonisten Isoguvacin, dem GABA_A-Antagonisten (+)-Bicuculin, den GABA_B-Agonisten Baclofen sowie den beiden GABA_B-Antagonisten Phaclofen und Saclofen) signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Tabelle 13: Proliferation von NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss von GABA-Agonisten und -Antagonisten

	N	Relative Zellzahl nach 24 h (Mittelwert ± Standardfehler)
Kontrolle (Medium)	68	1,000 ± 0,023
Kontrolle (NaOH 100 µM)	24	1,068 ± 0,028
Isoguvacin 100 µM	66	1,003 ± 0,024
Bicuculin 100µM	68	1,043 ± 0,021
Baclofen 100µM	74	1,042 ± 0,022
Saclofen 100µM	42	0,943 ± 0,022
Phaclofen 100 µM	32	1,030 ± 0,036

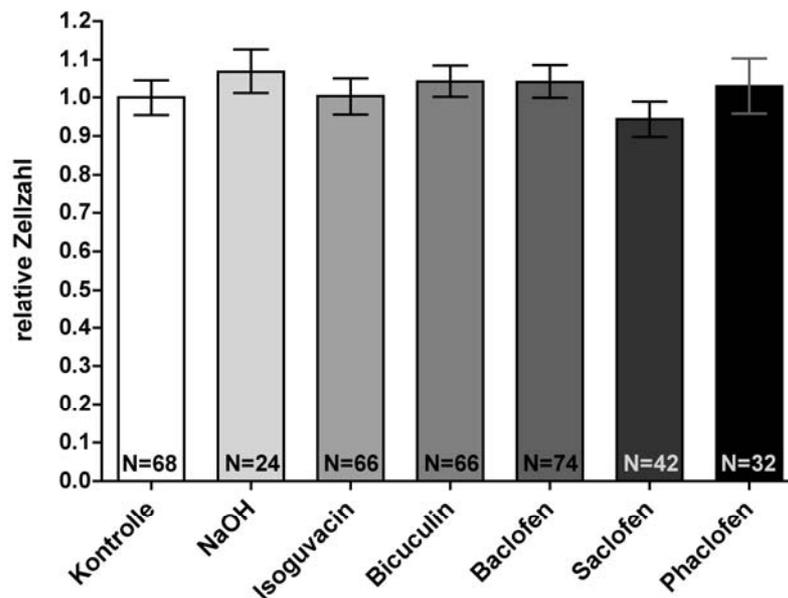


Abbildung 25: Proliferation von NCI-H295R-Zellen unter Einwirkung von GABA-Agonisten und -Antagonisten.

Das Diagramm zeigt die relative Zellzahl nach 24-stündiger Stimulation, bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe (Mittelwert und Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren statistisch (one-way ANOVA) auf dem 5% - Niveau nicht signifikant.

Die mit 100 μM NaOH behandelte Kontrollgruppe unterschied sich ebenfalls nicht von den ausschließlich mit Medium kultivierten Zellen, so dass NaOH in der zusammen mit den Stimulantien zugegebenen Konzentration keine toxischen oder sonstigen wachstumsmodulierenden Effekte ausübte.

IV.7 Stimulation von GABA_B-Rezeptoren und der second messenger cAMP in NCI-H295R-Zellen

Viele Effekte der Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren werden über den second messenger cAMP vermittelt. Daher wurde untersucht, inwieweit GABA_B-Stimulation die intrazellulären cAMP-Spiegel in NCI-H295R-Zellen zu beeinflussen vermag.

Zunächst wurde in Vorversuchen die Messgenauigkeit des zum Nachweis von cAMP verwendeten ELISA überprüft. Bei Verwendung einer Verdünnungsreihe, hergestellt aus einer cAMP-Standardlösung, zeigte sich eine sehr hohe Präzision über einen weiten

Konzentrationsbereich (3 pmol/ml bis 300 pmol/ml; 8 Proben mit bekannter cAMP-Konzentration, Abbildung 26).

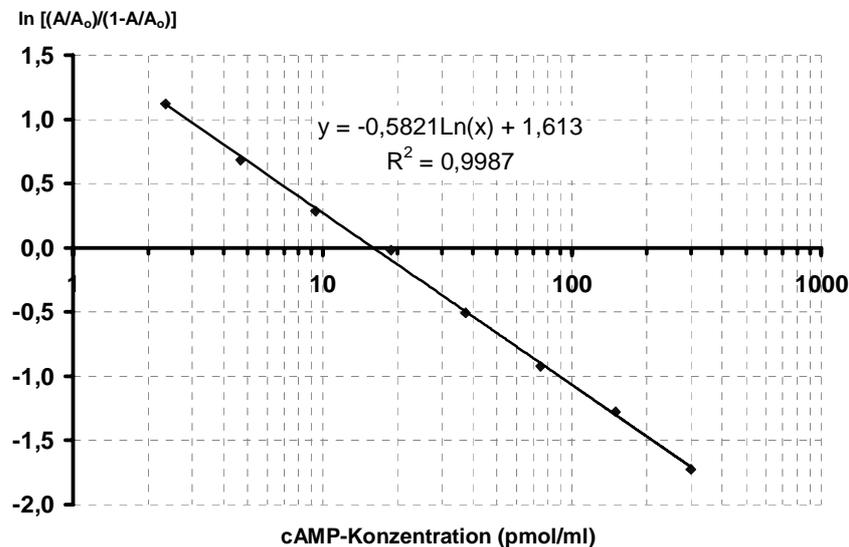


Abbildung 26: Repräsentative Eichgerade des verwendeten cAMP - ELISAs.

Gezeigt ist die aus den 8 Standardproben bestimmte Regressionsgerade. Der Regressionskoeffizient beträgt in diesem Beispiel 0,9987, was die exzellente Linearität des Assays im gezeigten Konzentrationsbereich (3 - 300 pmol/ml) verdeutlicht.

Um den Einfluss von GABA_B-Rezeptoren auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen zu untersuchen, wurden zunächst in weiteren Vorversuchen geeignete Versuchsbedingungen ermittelt. In Lysaten unstimulierter NCI-H295R-Zellen in Gegenwart des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (500 µM, vgl. Abschnitt III.7) liegt die cAMP-Konzentration bei etwa 30 pmol/ml. Durch zusätzliche Stimulation mit dem Adenylylzyklase-Aktivator Forskolin (5 µM) steigt die cAMP-Konzentration innerhalb von 15 bis 30 Minuten auf Werte um 100 pmol/ml an. Diese Konzentrationen liegen mitten im Messbereich des verwendeten cAMP-ELISA. Weiterhin ist aus Ratten-Neuronen bekannt, dass GABA_B-Rezeptoragonisten die cAMP-Akkumulation in Forskolin-stimulierten Zellen inhibieren, dagegen aber keinen Effekt auf den basalen intrazellulären cAMP-Spiegel zeigen [83]. Daher wurden die Experimente zur Bestimmung des GABA_B-Einflusses unter den zuletzt genannten Rahmenbedingungen durchgeführt.

NCI-H295R-Zellen, die alle der selben Zellpassage entstammten und in der Kulturschale annähernd Konfluenz erreicht hatten (etwa 48-72 h nach dem Splitten), wurden zunächst mit IBMX und dem GAD-Inhibitor γ-Acetylen-GABA präinkubiert, um die zellulären Phosphodiesterasen und die endogene GABA-Produktion auszuschalten. Anschließend wurden

sie für 15 bzw. 30 Minuten entweder nur mit Forskolin oder zusätzlich mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen oder dem Antagonisten Saclofen stimuliert. Danach wurden die Zellen aufgeschossen und die intrazelluläre cAMP-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 und Tabelle 14 wiedergegeben.

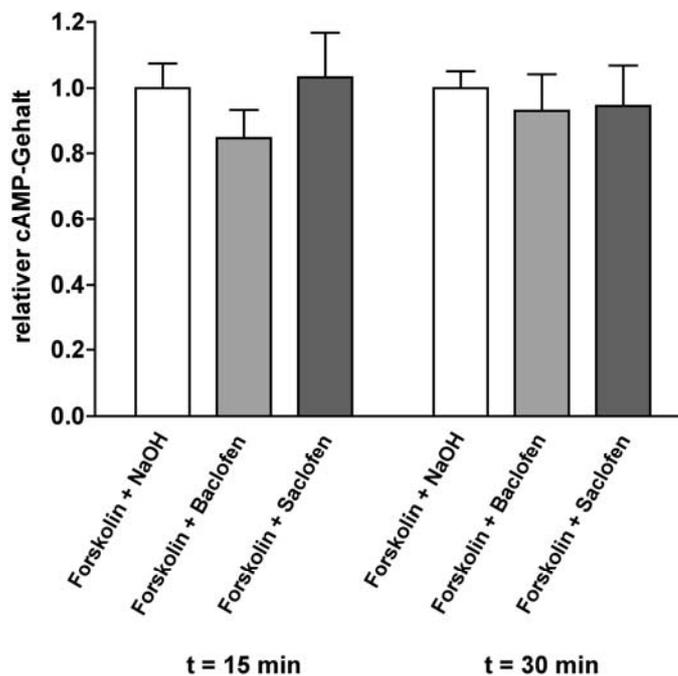


Abbildung 27: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss von Forskolin und GABA_B-Agonisten und -Antagonisten.

Die Werte jedes einzelnen Versuchstages wurden zunächst in Relation zu den nur mit Forskolin stimulierten Zellen (relativer Gehalt 1,00) normiert und anschließend Mittelwert und Standardfehler berechnet.

Zur statistischen Auswertung wurden die in den Zell-Lysaten gemessenen cAMP-Konzentrationen für jeden Versuchstag, also für jede verwendete Zellcharge getrennt, normiert. Als Referenz dienten dabei jeweils die nur mit Forskolin stimulierten Zellen. Deren durchschnittlicher cAMP-Gehalt wurde, für jeden Versuchstag einzeln, mit dem relativen Wert 1,00 versehen. Alle anderen Messungen des selben Versuchstages wurden dann auf diese Referenz bezogen. Aus den so gewonnenen Werten wurden wiederum Mittelwerte und Standardfehler errechnet. Dadurch verringert sich der Einfluss von Störfaktoren, die von Versuchstag zu Versuchstag variieren, wie etwa eine leicht unterschiedliche Dichte der Zellaussaat oder geringe Variationen in der Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums. Nach 15 Minuten Stimulationsdauer deutete sich ein hemmender Einfluss von Baclofen auf die

cAMP-Spiegel an, der aber keine statistische Signifikanz erreichte (ANOVA: $P = 0,35$; Tabelle 14, rechte Spalte und Abbildung 27). In Tabelle 14 sind zusätzlich die absolut gemessenen cAMP-Konzentrationen wiedergegeben (mittlere Spalte; Mittelwerte und Standardfehler, ohne Normierung).

Nach 30-minütiger Stimulation zeigten sich keine Unterschiede zwischen mit Baclofen stimulierten Zellen und jenen, die zusätzlich einem GABA_B-Agonisten oder -Antagonisten ausgesetzt waren.

Tabelle 14: Intrazellulärer cAMP- Gehalt in NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss von Forskolin und GABA_B-Agonisten und -Antagonisten.

	Stimulation	N	Absolute cAMP-Konzentration [pmol/ml] Mittelwert ± Standardfehler	Relative cAMP-Konzentration (normiert je Versuchstag) Mittelwert ± Standardfehler
t = 15 min	Forskolin 5 µM + NaOH 100 µM	11	113,8 ± 14,7	1,00 ± 0,08
	Forskolin 5 µM + Baclofen 100 µM ¹	11	95,06 ± 11,8	0,85 ± 0,08
	Forskolin 5 µM + Saclofen 100 µM ¹	9	113,7 ± 20,5	1,03 ± 0,13
t = 30 min	Forskolin 5 µM + NaOH 100 µM	4	136,9 ± 7,2	1,00 ± 0,05
	Forskolin 5 µM + Baclofen 100 µM ¹	5	125,1 ± 4,5	0,93 ± 0,11
	Forskolin 5 µM + Saclofen 100 µM ¹	5	128,5 ± 3,2	0,94 ± 0,13

¹Die Baclofen- und Saclofen-Stammlösungen (50 mM) wurden in 50 mM NaOH angesetzt

V. DISKUSSION

V.1 Neuroendokrine Eigenschaften von Zellen der Nebennierenrinde

Die zahlreichen Berichte über Merkmale neuroendokriner Differenzierung in der normalen und pathologisch veränderten Nebennierenrinde waren der Anlass, die Expression der neuroendokrinen Marker VAMP-2 und Syntaxin aus der Gruppe der SNAREs in diesem Organ zu untersuchen (vgl. Abschnitt I.1.5).

In der vorliegenden Arbeit wurde in immunhistochemischen Experimenten gezeigt, dass diese beiden neuroendokrinen Markerproteine in der Zona glomerulosa der Ratten-Nebenniere vorkommen. Bislang existieren in der Literatur keine Berichte zur Expression von Syntaxin in der Nebennierenrinde. Die Expression von VAMP in diesem Organ wurde bereits durch ROSSETTO und Mitarbeiter untersucht. Dabei wurde mittels in-situ-Hybridisierung die mRNA für VAMP-2 in der Nebennierenrinde der Ratte und insbesondere in der Zona glomerulosa nachgewiesen, während VAMP-1 vor allem im Mark vorkommt (Abbildung 28). In der selben Arbeit ergaben immunhistochemische Untersuchungen allerdings ein gegensätzliches Bild, denn VAMP-2 wurde hierbei vor allem im Mark, VAMP-1 in der Rinde gefunden [125].

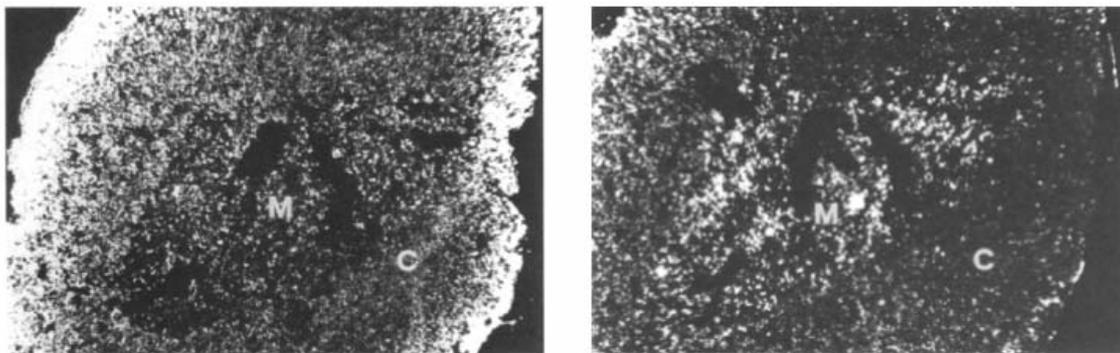


Abbildung 28: In-situ-Hybridisierung mit Ribonukleinsäure-Sonden für VAMP-2 (links) und VAMP-1 (rechts) mRNA.

Die autoradiographischen Abbildungen zeigen Gefrierschnitte von Rattennebenniere, die Verteilung von VAMP-2 ist analog zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten immunhistochemischen Befunden (vgl. Abbildung 10 D). C: Nebennierenrinde, M: Nebennierenmark. Aus Rossetto et al. 1996, mit Genehmigung. © 1996 The Rockefeller University Press.

Die Autoren führen als mögliche Gründe für diese Diskrepanz die unterschiedliche Stabilität von VAMP-1 und -2 auf der mRNA- und / oder Protein-Ebene oder posttranslationale

Regulationsmechanismen an. Interessanterweise decken sich die immunhistochemischen Befunde in der vorliegenden Arbeit (Abbildung 10) mit denen der in-situ-Hybridisierung von ROSSETTO und Mitarbeitern, und stehen so im Gegensatz zu deren immunhistochemischen Ergebnissen. Die Ursache dafür könnte in einer unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Antiseren für die zwei VAMP-Isoformen liegen, wobei der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper laut Herstellerangabe keine Kreuzreaktivität mit VAMP-1 aufweist.

Einige weitere Veröffentlichungen berichten über die Expression verschiedener anderer neuroendokriner Marker in der Nebennierenrinde: EHRHART-BORNSTEIN und HILBERS wiesen nach, dass das Neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM in der Zona glomerulosa und der NCI-H295R-Zelllinie vorkommt. Letztere enthält auch das Vesikel-assoziierte Protein Synaptophysin. LI und Mitarbeiter untersuchten immunhistochemisch die Expression von Synaptophysin und Neuronen-spezifischer Enolase (NSE) in der humanen Nebenniere [78]. NSE war dabei in allen untersuchten Nebennieren in der Zona glomerulosa nachweisbar. Dieses Ergebnis stützt die Theorie einer neuroendokrinen Differenzierung der Zellen in diesem Bereich des Kortex. Synaptophysin wurde in der selben Arbeit in 4 von 11 Nebennieren gefunden, und zwar vor allem in der Zona reticularis und am seltensten in der Zona glomerulosa. HAAK und FLEUREN wiesen dagegen mittels Immunhistochemie Synaptophysin, NSE und Vimentin in umschriebenen Arealen der Zona glomerulosa der normalen humanen Nebenniere nach [59]. Tabelle 15 fasst die publizierten Berichte über Merkmale neuroendokriner Differenzierung in der Nebennierenrinde und die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 15: Übersicht zur Expression etablierter neuroendokriner Marker in der Nebennierenrinde. ⊕: eigene Ergebnisse, ~: widersprüchliche Befunde

	Nebennierenrinde Ratte	Nebennierenrinde Mensch	humane Neoplasien	NCI-H295R- Zellen
VAMP	⊕, ~ ¹			
Synaptophysin		+ ^{2,4}	+ ²	+ ³
Vimentin		+ ⁴		
Syntaxin	⊕			
NCAM		+ ³		+ ³
NSE		+ ^{2,4}	+ ²	

¹ Rossetto et al., 1996; ² Li et al., 1998; ³ Ehrhart-Bornstein und Hilbers, 1998; ⁴ Haak und Fleuren, 1995

Das Synaptosomen-assoziierte Protein von 25 kDa (SNAP-25) gehört ebenfalls zur Gruppe der SNAREs. Zu den physiologischen Prozessen, an denen es beteiligt ist, gehört neben der regulierten Exozytose von Neurotransmittern und Hormonen wahrscheinlich auch die Erneuerung von Plasmamembran-Bestandteilen durch die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran [55].

SNAP-25 wurde bislang in Neuronen, aber auch in verschiedenen Zellen des peripheren neuroendokrinen Systems nachgewiesen.

Zahlreiche Arbeiten belegen die Bedeutung von SNAP-25 für die sekretorische Funktion chromaffiner Zellen des Nebennierenmarkes [62,65]. In keiner dieser Arbeiten wurde SNAP-25 in den Zellen der Nebennierenrinde beobachtet [54]. Jedoch lässt sich mittels SNAP-25-Immunfärbungen die Innervation des Kortex durch feine, unmyelinisierte Nervenfasern darstellen [62]. In der vorliegenden Arbeit wurde, unter Verwendung eines monoklonalen anti-SNAP-25 Antikörpers, ebenfalls eine sehr intensive Anfärbung des Nebennierenmarkes beobachtet. SNAP-25-immunreaktive Nervenfasern stellten sich insbesondere in den Außenbereichen des Kortex dar. Allerdings war in isolierten Arealen der Zona glomerulosa auch eine Anfärbung von adrenokortikalen Zellen zu beobachten. Diese war im Vergleich zu der kräftigen Immunreaktion im Mark jedoch sehr schwach ausgeprägt. Möglicherweise wird SNAP-25 also von Zellen der Zona glomerulosa unter bestimmten Bedingungen auf niedrigem Niveau exprimiert, alternativ könnte es sich auch um eine unspezifische Bindung des Antikörpers oder um eine Kreuzreaktion mit sequenzzhomologen Proteinen wie SNAP-23 handeln. SNAP-23 wird in nichtneuronalen Geweben ubiquitär exprimiert. Die Aminosäure-Sequenzen von SNAP-25 und SNAP-23 stimmen zu 59% überein, und SNAP-23 interagiert ebenfalls mit den anderen Proteinen des SNARE-Komplexes, VAMP und Syntaxin [121,156]. Dadurch kann es sich ähnlich wie SNAP-25 an konstitutiven oder regulierten Exozytosevorgängen beteiligen. In der Literatur wurde über den Nachweis von SNAP-23 in der Nebennierenrinde mittels Western Blot berichtet [54]. Jedoch existieren bislang keine immunhistochemischen oder *in-situ*-Hybridisierungs-Untersuchungen, die eine genauere Lokalisation dieses Proteins ermöglichen würden. Letztlich bedarf die Frage nach der Existenz und möglichen funktionellen Rolle von SNAP-23 oder SNAP-25 in adrenokortikalen Zellen noch weiterer Klärung.

Es existieren insgesamt also deutliche Hinweise, dass Zellen der Nebennierenrinde Proteine exprimieren, die als Marker für neuroendokrine Zellen gelten. Die meisten diesbezüglichen Berichte und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten insbesondere auf die Zona glomerulosa als Ort neuroendokriner Differenzierung hin. Allerdings wurden andererseits bestimmte Proteine, die klassischerweise in neuroendokrinen Zellen vorkommen, bislang nicht in der Nebennierenrinde gefunden - so etwa Chromogranin A [78]. Neurosekretorische Granula als elektronenmikroskopisch sichtbares, morphologisches Korrelat neuroendokriner Aktivität wurden in Zellen der Nebennierenrinde bislang ebenfalls nicht beschrieben, wohl aber in kortikalen Neoplasien [93]. Andererseits können solche Granula, vor allem wenn sie in relativ geringer Anzahl vorkommen, auch leicht übersehen oder fälschlich als Lysosomen eingeordnet werden [40]. Schließlich besteht in Hinblick auf die Freisetzung von Transmittersubstanzen auch die Möglichkeit, dass nicht an Vesikel und den spezialisierten Exozytoseapparat gebundene

Sekretionswege eine Rolle spielen. Beispielsweise kann der Transmitter GABA aus Neuronen durch Umkehrung der Transportrichtung des zellmembranständigen Transporterproteins GAT freigesetzt werden [106]. Ob vergleichbare Mechanismen auch in nichtneuronalen Geweben eine Rolle spielen, ist bislang aber nicht untersucht.

V.2 GABA-Synthese und -Speicherung in der Nebennierenrinde

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme Glutamatdecarboxylase (GAD) und der vesikuläre GABA-Transporter (VIAAT) als „Marker“ genutzt, um zu zeigen, dass Zellen der Nebennierenrinde GABA synthetisieren und speichern können. Die Existenz von GABA in nicht-neuronalen Geweben, darunter auch in der Nebenniere, ist schon seit langem bekannt [143]. Mittels Northern Blot konnten zwar zunächst weder GAD-65 noch GAD-67 in der Nebenniere nachgewiesen werden [144], mit empfindlicheren Verfahren (RNAse protection assay) wurde dann jedoch die Expression von GAD67 in diesem Organ gezeigt [84]. Wenn chromaffine Zellen vom Rind isoliert und kultiviert werden, so lässt sich in etwa 30 - 40% der Zellen immunhistochemisch GAD nachweisen [20,68]. Jedoch wurde die Lokalisation des GABA-produzierenden Enzymes im Nebennierenmark bislang nur aufgrund von Experimenten an isolierten, kultivierten Zellen postuliert, nicht aber (zum Beispiel immunhistochemisch oder mittels *in-situ*-Hybridisierung) an Gewebeschnitten bestätigt. Zwei Arbeiten berichten über den direkten immunologischen Nachweis von GABA in noradrenergen Zellen des Nebennierenmarkes und in Nervenfasern im Nebennierenmark der Maus [67,103].

Der Befund aus der vorliegenden Arbeit, dass GAD-67 die vorherrschende GAD-Isoform in der Nebenniere ist, deckt sich mit anderen publizierten Studien [84]. GAD-65 mRNA war in menschlichen und Ratten-Nebennieren mittels eines „nested-PCR“-Ansatzes nachweisbar, in Western Blots konnte GAD-65 dagegen im Rattengewebe nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten GAD-65-Expression in adrenokortikalen oder medullären Zellen auf sehr niedrigem Niveau widerspiegeln. Aufgrund der hohen Sensitivität der „nested-PCR“ könnten diese Befunde aber auch auf Verunreinigungen der RNA-Präparationen durch andere Zellarten, wie etwa Neurone, beruhen.

Außerdem existiert eine dritte Isoform der Glutamatdecarboxylase, GAD-25, die durch alternatives Spleissen von GAD-65 mRNA entsteht. Es ergibt sich ein 25 kD großes Protein ohne enzymatische Aktivität. Diese Spleissvariante wurde in der menschlichen Nebennierenrinde sowie im Hoden und in Pankreasinseln beschrieben [22]. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer binden jedoch nicht an die mRNA für GAD-25. Außerdem zeigen die Ergebnisse des Western Blots sowie die *in vitro*-Messung der GAD-Aktivität eindeutig, dass die aktive, ungekürzte Isoform GAD-67 in adrenokortikalen Zellen vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Nebenniere und in adrenokortikalen Zellen der Linie NCI-H295R eine im Vergleich zum Kleinhirn relativ geringe GAD-Aktivität gemessen. Andererseits bewegen sich die gefundenen Werte in der selben Größenordnung wie die GAD-Aktivitäten in anderen peripheren Organen, in denen lokale, parakrine, GABAerge Regulationssysteme bereits beschrieben wurden, so etwa in der Adenohypophyse und im Hoden [49,90]. CARON und Mitarbeiter nutzten ebenfalls einen *in vitro*-Assay unter Verwendung von radioaktiv markierter Glutaminsäure, um die GAD-Aktivität in der Rattennebeniere zu bestimmen. Dabei fanden sie in der Nebenniere eine GAD-Aktivität, die bei etwa 10% derjenigen im Rattenhirn lag, und somit in der selben Größenordnung wie die hier beschriebenen Ergebnisse [17]. Außerdem bestimmte diese Arbeitsgruppe den GABA-Gehalt in der Nebenniere mit 29 nmol/g Nassgewicht (Hirn 2680 nmol/g).

Eine weitere mögliche Quelle für GABA in der Nebenniere der Ratte wurde in zwei Arbeiten beschrieben: Die Biosynthese aus Putrescin (1,4-Diaminobutan). Über die Enzyme Diaminoxidase und Monoaminoxidase kann Putrescin zu GABA umgewandelt werden. Durch den Diaminoxidase-Inhibitor Aminoguanidinsulfat wurde die GABA-Produktion in Rattennebenieren *in vivo* und *in vitro* signifikant reduziert [17,104]. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Biosynthese aus Putrescin eine wesentliche Quelle von GABA in der Nebenniere darstellt. Allerdings wurde in diesen Arbeiten die Lokalisation von GABA bzw. der GABA-produzierenden Enzymsysteme innerhalb des komplexen Organs Nebenniere nicht näher untersucht. Daten zur Bedeutung des von Putrescin ausgehenden Biosynthesewegs in anderen Spezies sind bisher nicht verfügbar.

Die immunhistochemischen Befunde, die in dieser Arbeit dargestellt werden, zeigen augenscheinlich einen Unterschied in der Verteilung von GAD und VIAAT zwischen der Nebennierenrinde des Menschen und derjenigen der Ratte: während beide Enzyme in der Ratte vor allem in der Zona glomerulosa lokalisiert zu sein scheinen, konnten sie beim Menschen in allen Zonen des Kortex nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde ergaben sich hinsichtlich der Lokalisation von GABA_B-Rezeptoren. Diese Diskrepanz wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, könnte aber darauf hindeuten, dass auch die Funktion von GABA in den beiden Spezies nicht identisch ist.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen von Geweben verschiedener Spezies einschließlich des Menschen und einer humanen Zelllinie, dass adrenokortikale Zellen zur GABA-Produktion und -Speicherung im Stande sind.

V.3 Calciumkanäle vom L- und T-Typ in der Zona Glomerulosa

Wie in Abschnitt I.1.4.2 dargelegt, bildet bei der Regulation der Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die gemeinsame Endstrecke für die Wirkungen von AT II und erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Spannungsgesteuerten Calciumkanälen in der Zellmembran kommt hierbei eine zentrale Bedeutung zu.

Calciumkanäle sind Heteromultimere, und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften werden durch die porenbildende α_1 -Untereinheit bestimmt. Die ursprünglich elektrophysiologisch als T-Typ bzw. L-Typ charakterisierten Calciumkanäle können inzwischen auf genomischer Ebene weiter differenziert werden: Die α_1 -Untereinheiten vom Typ α_{1S} , α_{1C} und α_{1D} besitzen Eigenschaften, aufgrund derer sie elektrophysiologisch als L-Typ-Kanäle klassifiziert werden. L-Typ-Kanäle sowie α_{1C} - und α_{1D} -mRNA wurde in isolierten Glomerulosazellen und NCI-H295R-Zellen nachgewiesen [66,77,110]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse durch den immunhistochemischen Nachweis des α_{1D} -Kanals in menschlichen und Rattengeweben auf der Proteinebene bestätigt und erweitert werden. Interessant ist, dass - wie auch beim Nachweis von GAD, VIAAT und GABA_B-Rezeptoren - die zonale Spezifität der Expression in der humanen Nebenniere nicht so deutlich ausgeprägt ist wie in der Ratte.

Die drei Genprodukte α_{1G} , α_{1H} und α_{1I} bilden demgegenüber die Familie der T-Typ-Kanäle [113]. Der α_{1H} -Subtyp unterscheidet sich von den beiden anderen durch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Nickel (IC_{50} ~13 μ M gegenüber >200 μ M) [75]. Mittels in-situ-Hybridisierung an Ratten- und Rindernebnieren konnten SCHRIER und Mitarbeiter zeigen, dass der α_{1H} Calciumkanal den vorherrschenden T-Typ-Kanal in der Nebennierenrinde darstellt (Abbildung 29). Die Expression von α_{1H} war in beiden Spezies in der Zona glomerulosa besonders ausgeprägt, in Übereinstimmung mit der in der Einleitung dargestellten Bedeutung von T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen für die Steuerung der Aldosteronsekretion. An isolierten bovinen Glomerulosazellen konnten Calciumströme mit den typischen Eigenschaften der α_{1H} -Kanäle (hohe Nickelsensitivität) auch elektrophysiologisch nachgewiesen werden [134]. In humanen Glomerulosazellen in Primärkultur sind elektrophysiologisch ebenfalls T-Typ-Kanäle nachweisbar [110]. RT-PCR Experimente belegen die Expression von α_{1H} in der NCI-H295R-Zelllinie und deren Induktion durch Aldosteroneinwirkung [77]. Zumindest unter bestimmten Kulturbedingungen sind in diesen Zellen auch Kanäle vom Typ α_{1G} nachweisbar [128].

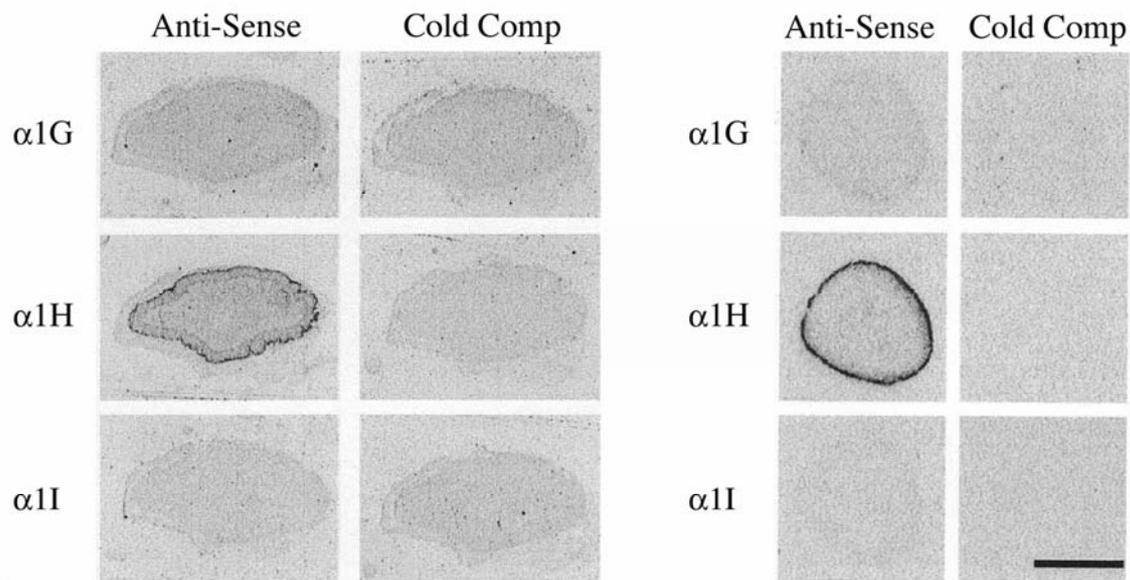


Abbildung 29: In-situ-Hybridisierung zum Nachweis verschiedener T-Typ-Calciumkanäle in der Nebenniere des Rindes (links) und der Ratte (rechts).

Anti-Sense: Autoradiographie nach Hybridisierung mit ^{32}P -markierten spezifischen antisense-RNA-Sonden, Cold Comp: in Gegenwart eines 1000-fachen Überschusses unmarkierter antisense-Sonden zum Ausschluss unspezifischer RNA-Bindung. Wiedergegeben aus Schrier, AD, et al., 2001, mit Genehmigung. ©2001 The American Physiological Society.

Die in Patch-Clamp Versuchen in NCI-H295R-Zellen identifizierte T-Typ-Kanäle (vgl. Abschnitt VII) zeigten ebenfalls die für den α_{1H} -Typ kennzeichnende hohe Nickelsensibilität. Somit konnten die von anderen Arbeitsgruppen vor allem in der Ratte und im Rind erhobenen Befunde nun auch an Zellen aus der humanen Nebennierenrinde nachvollzogen werden.

Neben den porenbildenden α_1 -Untereinheiten werden die elektrischen und pharmakologischen Eigenschaften spannungsgesteuerter Calciumkanäle durch die regulatorischen α_2 -, δ -, γ - und δ -Untereinheiten mitbestimmt. Die Expression und funktionelle Rolle dieser Untereinheiten in Zona-glomerulosa-Zellen sind jedoch bislang noch nicht näher untersucht worden [140].

V.4 GABA-Rezeptoren in der Nebennierenrinde

Der Befund, dass GABA in der Nebennierenrinde produziert und gespeichert werden kann, führt unmittelbar zu der Frage nach dessen Wirkungsort. Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen engen räumlichen Beziehung zwischen adrenokortikalen und medullären Zellen und des von der Rinde hin zum Mark gerichteten Blutflusses in der Nebenniere ist es denkbar, dass das im Kortex freigesetzte GABA seine Wirkung an chromaffinen Zellen entfaltet [8,9]. Mehrere Studien belegen, dass GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren auf katecholaminproduzierenden Zellen

vorkommen, und dass GABA die Hormonfreisetzung aus diesen Zellen moduliert. Daher könnten die hier dargestellten Ergebnisse auf einen GABAergen Signalweg hindeuten, in dem aus Zona glomerulosa - Zellen freigesetztes GABA die chromaffinen Zellen des Marks beeinflusst [19,20,105,107-109].

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde dann deutlich, dass auch adrenokortikale Zellen selbst Rezeptoren für GABA besitzen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer para- oder autokrinen Wirkung von GABA innerhalb der Nebennierenrinde. Die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha_1 - \alpha_3$, $\beta_1 - \beta_3$, γ_1 , γ_2 und ε wurden von einer anderen Arbeitsgruppe bereits in ganzen (aus Mark und Rinde bestehenden) Rattennebennieren nachgewiesen [1]. Nachdem in vorhergehenden Studien nur ein Teil dieser Untereinheiten im Nebennierenmark identifiziert worden war, folgerten die Autoren AKINCI und SCHOFIELD, dass möglicherweise auch in der Nebennierenrinde GABA_A-Rezeptoruntereinheiten vorhanden sind. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten RT-PCR-Ergebnisse bestätigen diese Hypothese: In NCI-H295R-Zellen konnte mRNA für mehrere Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors nachgewiesen werden, nämlich für α_2 , α_3 , β_2 , β_3 , γ_2 und ε . Diese Kombination von Untereinheiten wäre zur Bildung funktionaler, pentamerer GABA_A-Rezeptoren geeignet [139]. Andererseits ist bekannt, dass nicht alle Zelllinien, in denen mRNA für GABA_A-Untereinheiten nachweisbar ist, auch tatsächlich elektrophysiologisch nachweisbare Rezeptoren besitzen. Insbesondere sind oft auch in solchen Zelllinien keine GABA_A-typischen Chloridströme nachweisbar, deren Ursprungsgewebe funktionierende GABA_A-Rezeptoren exprimieren [60]. Folglich sind zur Klärung der Frage nach der Existenz von GABA_A-Rezeptoren auf adrenokortikalen Zellen Untersuchungen in Primärkulturen möglicherweise besser geeignet als solche an einer Tumorzelllinie.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die metabotropen GABA_B-Rezeptoren. Immunhistochemisch konnte die GABA_{B(2)}-Untereinheit in humanen und Ratten-Nebennierenrinden dargestellt werden. Auf der mRNA-Ebene wurden die Rezeptoruntereinheiten GABA_{B(1a)} und GABA_{B(1e)} in NCI-H295R-Zellen und auch in den Nebennieren der beiden untersuchten Spezies nachgewiesen. Ebenso wurde mittels RT-PCR die GABA_{B(2)}-Untereinheit in NCI-H295R-Zellen gefunden. Während die Existenz von Spleissvarianten der GABA_{B(2)}-Untereinheit noch diskutiert wird, sind von GABA_{B(1)} mindestens 7 solcher Varianten beschrieben [12,26,87]. Die GABA_{B(1e)}-Untereinheit, die in der vorliegenden Arbeit erstmals in NCI-H295R-Zellen und Ratten-Nebennieren identifiziert wurde, ist darunter besonders interessant. Ihrer mRNA fehlt das Exon 10, wodurch ein verfrühtes Stop-Codon entsteht. GABA_{B(1e)} kodiert so für ein verkürztes Protein, dem die Transmembran- und intrazelluläre Domäne fehlen. GABA_{B(1e)} wurde von den Erstbeschreibern in einer Vielzahl menschlicher Gewebe, einschließlich der Nebenniere, nachgewiesen, nicht hingegen im ZNS [136].

Die „klassischen“ GABA_B-Rezeptoren sind Heterodimere aus den Untereinheiten GABA_{B(1a)} und GABA_{B(2)} [70,150]. Ihre Aktivierung führt typischerweise, vermittelt durch G-Proteine, zu einer Hemmung der Adenylylzyklase, zur Öffnung von einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels, GIRKs), und zur Inhibition spannungsgesteuerter Calciumkanäle [12]. Im Gegensatz dazu konnte für Rezeptor-Heterodimere aus GABA_{B(1e)} und GABA_{B(2)}, die in HEK293-Zellen exprimiert wurden, keine Beeinflussung von GIRKs oder der Adenylylzyklase festgestellt werden. Außerdem bindet der GABA_B-Agonist CGP54626A nicht an GABA_{B(1e)} enthaltende Rezeptoren [136]. SCHWARZ und Mitarbeiter stellten deshalb die Hypothese auf, dass GABA_{B(1a)} und GABA_{B(1e)} miteinander um die Dimerisierung mit GABA_{B(2)} konkurrieren. Auf diese Weise könnte GABA_{B(1e)} ein regulatorisches Element bei der Bildung von funktionalen GABA_B-Rezeptoren darstellen. Ein möglicher Einfluss von GABA_{B(1e)} / GABA_{B(2)}-Dimeren auf Calcium-Ionenkanäle wurde allerdings bislang ebenso wenig untersucht wie die Bindung von GABA selbst oder anderer Agonisten und Antagonisten an diese Heterodimere. Die funktionelle Bedeutung der verkürzten GABA_{B(1e)}-Untereinheit im allgemeinen und ihre Rolle in der Nebennierenrinde sind daher noch unklar.

Zu erwähnen bleibt jedoch, dass NCI-H295R die erste nicht transfizierte Zelllinie ist, für die eine konstitutive Expression von GABA_{B(1e)} gezeigt werden konnte. Somit könnten diese Zellen auch ein hilfreiches Modell zur weiteren Erforschung dieser Untereinheit sein.

V.5 GABA-Rezeptoren und die Zellproliferation in der Nebennierenrinde

Erste Hinweise, dass GABA an der Steuerung von Vorgängen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt ist, stammen aus Untersuchungen am ZNS. Neben seiner klassischen Rolle als inhibitorischer Neurotransmitter spielt GABA eine wichtige Rolle während der Entwicklung des unreifen Nervensystems. Noch bevor im Laufe der Embryonalentwicklung die ersten inhibitorischen Synapsen entstehen, wirkt GABA als trophischer Faktor modulierend auf die Proliferation neurogener Progenitorzellen und ist an der Migration und der Ausreifung von Nervenzellen beteiligt [106,148]. Dabei scheinen GABA_A-Rezeptoren für die trophischen Wirkungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Allerdings wirken diese im unreifen Nervensystem, entgegen den Verhältnissen im adulten ZNS, aufgrund einer erhöhten intrazellulären Cl⁻-Konzentration depolarisierend und können so eine Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle auslösen [106].

Auch in nichtneuronalen Geweben wurde festgestellt, dass GABAerge Signalwege Einfluss auf das Wachstum bestimmter Zellarten nehmen können: So wird etwa die Proliferation der Zelllinie TM3, die von Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen im Hoden der Maus abstammt, durch

GABA und GABA_A-Agonisten gesteigert. TM3-Zellen wurden dabei als Modell für proliferierende Leydigzellen im unreifen Hoden angesehen [50].

Kenntnisse über das Proliferationsverhalten von adrenokortikalen Zellen sind wichtig für das Verständnis von Entwicklung, Differenzierung und Regeneration der Nebennierenrinde und der dynamischen Veränderungen, die dieses Organ unter wechselnder funktioneller Beanspruchung durchläuft [155]. Zu den Vorgängen, die experimentell bereits intensiver untersucht wurden, gehören die Regeneration der Nebennierenrinde nach chirurgischer Beschädigung (Enukleation der Nebennieren unter Belassung einer „Kapsel“ aus Zona-glomerulosa-Zellen), das kompensatorische Wachstum nach kontralateraler Adrenaektomie sowie die ACTH-stimulierte Zellproliferation in Kultur [7]. Aus solchen Experimenten entstanden unterschiedliche Auffassungen über den Lebenszyklus adrenokortikaler Zellen. Die „Migrationstheorie“ etwa besagt im Wesentlichen, dass in der Zona glomerulosa selbst oder im Übergangsbereich mit der Zona fasciculata ein Pool an proliferierenden kortikalen Stammzellen existiert. In diesem Zusammenhang ist es interessant, sich die zumindest in der Ratte auffällig ausgeprägte Lokalisation des GABAergen Systems in der Zona glomerulosa in Erinnerung zu rufen. Die hier gebildeten Zellen wandern dann in Richtung auf die Medulla durch die Zona fasciculata, um dann in der Zona reticularis nach apoptotischem Zelltod durch Aufnahme in ortsständige Makrophagen abgebaut zu werden [96]. Dagegen postuliert die „zonale Theorie“ eine unabhängige Regulation von Zellproliferation und Zelltod in den 3 verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Versuchen an steroidproduzierenden Leydig-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Einfluss von GABA auf das Wachstumsverhalten von NCI-H295R-Zellen nachgewiesen werden. Dieses negative Ergebnis schließt allerdings nicht aus, dass GABA *in vivo* während der Entwicklung der Nebenniere die Proliferation adrenokortikaler Zellen beeinflusst. Mehrere Faktoren verdienen hierbei Beachtung:

Zum einen wurden die Versuchsbedingungen, etwa die Stimulationszeit von 24 Stunden und die Konzentrationen der verwendeten Stimulantien, aufgrund der Ergebnisse der elektrophysiologischen Experimente (vgl. Abschnitt VII) und anhand von publizierten Befunden in anderen steroidproduzierenden Zellen gewählt [50]. Eventuell war das gewählte Versuchsprotokoll nicht geeignet, einen Unterschied in der Proliferation der untersuchten Zelllinie aufzudecken.

Außerdem entsprechen die Bedingungen eines Zellkultur - Experiments nicht denen im intakten Gewebe. Unter physiologischen Bedingungen wird die Proliferation adrenokortikaler Zellen durch mehrere verschiedene Einflussfaktoren reguliert. Das adrenokortikotrophe Hormon ACTH bewirkt *in vitro* bei pulsatischer Gabe eine Proliferation adrenokortikaler Zellen, während es bei Dauerstimulation zur Zellzyklus-Blockade und zu einer verringerten Proliferation führt [7,79]. *In vivo* führt die tägliche Gabe von ACTH bei Ratten zu einer gesteigerten Zellproliferation im subkapsulären Kortex [116]. Angiotensin II bewirkt über AT₁-Rezeptoren eine Hypertrophie und

Hyperplasie der Zona glomerulosa, während AT_2 -Rezeptoren antiproliferativ wirken [140]. $AT II$ stimuliert auch die Proliferation von kultivierten Zona-glomerulosa-Zellen der Ratte. Ein weiteres Peptid, das unter experimentellen Bedingungen auf das Wachstum adrenokortikaler Zellen Einfluss nimmt, ist fibroblast growth factor (FGF)-2 [7]. In den hier beschriebenen Experimenten wurden GABAerge Stimulantien nicht in Kombination mit bekannten adrenokortikalen Wachstumsfaktoren untersucht. Inwieweit GABA es vermag, in die Wirkung dieser Substanzen modulierend einzugreifen, bleibt also offen.

Außerdem wurde die NCI-H295R-Zelllinie aus einem malignen Neoplasma eines adulten Menschen abgeleitet und zeichnet sich durch autonomes Wachstum aus. Daher ist zu erwarten, dass die Zellzyklus-Regulation nicht der Situation in der gesunden adulten Nebennierenrinde oder gar derjenigen während der Embryonalentwicklung entspricht. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass NCI-H295R-Zellen und manche Nebennierenrinden-Karzinome den Transkriptionsfaktor cAMP - response element binding protein (CREB) nicht exprimieren, der normalerweise eine wichtige Rolle in der durch ACTH vermittelten Proliferation adrenokortikaler Zellen spielt. Dagegen weisen NCI-H295R-Zellen aber eine kompensatorische Überexpression des CRE-Modulators τ auf [56,115].

Zudem zeigt die untersuchte Zelllinie eine ausgeprägte Heterogenität, sowohl im Hinblick auf chromosomale Aberrationen als auch phänotypisch, wie etwa bezüglich der Expression von Calciumkanälen ([3], vgl. auch Abschnitt IV.8). Daher ist es denkbar, dass Subpopulationen der untersuchten Zelllinie durchaus in unterschiedlicher Weise auf GABAerge Einflüsse reagieren, während bei globaler Betrachtung dagegen kein Nettoeffekt feststellbar ist. Somit könnten die gegenüber der intakten Nebennierenrinde alterierten Regulationsmechanismen die NCI-H295R-Zelllinie zu einem wenig geeigneten Modellsystem für die Erforschung des Proliferationsverhaltens adrenokortikaler Zellen machen.

Um eine mögliche trophische Wirkung von GABA in der Nebennierenrinde aufklären zu können, ist demnach zunächst ein besseres Verständnis des normalen Lebenszyklus adrenokortikaler Zellen sowie die Charakterisierung geeigneter Modellsysteme für die einzelnen Zonen der Rinde notwendig.

V.6 GABA_B-Rezeptoren und ihre „second messenger“ in adrenokortikalen Zellen.

Die Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren führt, je nach untersuchtem Modellsystem, zur Beeinflussung einer Vielzahl verschiedener Effektormechanismen. Zu den am besten charakterisierten GABA_B-induzierten Wirkungen gehört die Inhibition des Enzyms Adenylzyklase und damit die Senkung des zytoplasmatischen cAMP-Gehalts, die Erhöhung der

Membranleitfähigkeit für K^+ sowie die Inhibition spannungsgesteuerter Calciumkanäle [12]. Alle diese Wirkungen werden durch an das Rezeptormolekül gekoppelte Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) vermittelt. Im folgenden sollen zunächst die experimentell gefundenen Auswirkungen von $GABA_B$ -Agonisten und -Antagonisten in adrenokortikalen Zellen diskutiert und anschließend daraus Schlussfolgerungen über die daran beteiligten G-Proteine abgeleitet werden.

V.6.1 $GABA_B$ -Rezeptoren und zytoplasmatisches cAMP in adrenokortikalen Zellen

Die Beeinflussung des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels gehört zu den am besten charakterisierten second-messenger-Wirkungen, die durch die Aktivierung von $GABA_B$ -Rezeptoren ausgelöst wird. In Versuchen an Hirnschnitten und an spinalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass $GABA_B$ -Agonisten eine Inhibition der durch Forskolin induzierten Adenylatzyklase-Aktivität bewirken [83,153].

In den hier präsentierten Experimenten führte der $GABA_B$ -Agonist Baclofen nach 15 Minuten Stimulation zu einer statistisch nicht signifikanten Inhibition der Adenylzyklase in Forskolin-stimulierten NCI-H295R-Zellen. Die beobachtete Reduktion auf etwa 80 - 85% des durch Forskolin allein induzierten cAMP-Gehalts ist dabei deutlich geringer als der in spinalen Neuronen beobachtete Effekt, wo GABA und Baclofen nach 10-minütiger Einwirkung zu einer 50- bis 60-prozentigen Verminderung des cAMP-Spiegels führen [83]. Nach 30 Minuten Stimulationsdauer war in den hier beschriebenen Versuchen kein Einfluss von Baclofen auf die cAMP-Konzentration mehr erkennbar.

Verschiedene Faktoren können für diesen scheinbaren Unterschied zwischen Neuronen und adrenokortikalen Zellen verantwortlich sein:

Der hemmende Effekt auf die Adenylzyklase ist keineswegs eine universelle Eigenschaft aller $GABA_B$ -Rezeptoren. Im olfaktorischen System der Ratte wurde beispielsweise beobachtet, dass die Aktivierung dieser Rezeptoren auch zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms und somit zu einer Akkumulation von zytoplasmatischem cAMP führen kann [102]. Die Mechanismen, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sind derzeit noch nicht aufgeklärt.

Außerdem besitzen NCI-H295R-Zellen die enzymatische Ausstattung (in Form von Glutamat-Decarboxylase), um selbst GABA zu synthetisieren. Somit könnte endogenes GABA die Ergebnisse in den nur mit Forskolin behandelten Zellen beeinflussen. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde einerseits 30 Minuten vor Beginn der eigentlichen Stimulation das Zellkulturmedium durch frisches ersetzt und andererseits dem Stimulationsmedium die Substanz γ -Acetylen-GABA zugesetzt. Diese sollte als Inhibitor der Glutamatdecarboxylase die endogene GABA-Synthese vermindern [45]. Allerdings blockiert γ -Acetylen-GABA keineswegs spezifisch

die GABA-Produktion, sondern vermag vielmehr auch die GABA-Metabolisierung durch das Enzym GABA-Transaminase (GABA-T) zu inhibieren [29]. In Mikroinjektions-Experimenten an Küken führte die Substanz daher sogar zu einem Anstieg der GABA-Konzentration in bestimmten cerebralen Arealen [99]. Über die Expression von GABA-T und den GABA-Abbau in NCI-H295R-Zellen liegen bislang keine experimentellen Befunde vor. Daher lässt sich der Einfluss von endogen gebildetem GABA auf die beschriebenen Versuche momentan schwer abschätzen. Die Tatsache, dass die Zugabe des GABA_B-Antagonisten Saclofen nicht zu einem cAMP-Anstieg gegenüber nur mit Forskolin stimulierten Zellen führte, spricht freilich dagegen, dass endogen gebildetes GABA eine nennenswerte GABA_B-vermittelte Adenylylzyklase-Inhibition bewirkt.

Eine in diesem Zusammenhang wichtige Frage ist, welche GABA-Konzentrationen von NCI-H295R-Zellen (und von anderen adrenokortikalen Zellen) in verschiedenen funktionellen Zuständen erzeugt werden können. Die Bestimmung der GABA-Konzentration im Kulturmedium und in den Zellen selbst, unter basalen Bedingungen und nach ACTH- oder AT II-Stimulation, etwa mittels HPLC, stellt daher eine lohnende Aufgabe dar.

Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass die verwendete Forskolin-Konzentration eventuell zu hoch gewählt war. Die in diesem Fall ausgelöste maximale Aktivierung der Adenylylzyklase wäre möglicherweise durch GABA_B-Rezeptoren nicht mehr beeinflussbar. Allerdings liegt die an Ratten-Hirnschnitten bestimmte EC₅₀ für Forskolin, also diejenige Konzentration, die zu einem halbmaximalem Effekt auf die Adenylylzyklase führt, bei etwa 20 – 30 µM [31] und damit deutlich über der in der vorliegenden Arbeit gewählten Konzentration von 5 µM. Außerdem konnte in Versuchen an Rückenmarks-Neuronen der Ratte die durch 10 µM Forskolin ausgelöste cAMP-Akkumulation mittels Baclofen (100 µM) inhibiert werden [83].

Schließlich hängt die Wirkung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors ganz entscheidend von der Zusammensetzung der heterotrimeren G-Proteine ab, an die er gekoppelt ist. Die Familie der rezeptorgekoppelten G-Proteine zeigt eine beachtliche molekulare Heterogenität, und je nach Art des mit ihm verbundenen G-Proteins vermag ein und derselbe Rezeptortyp unterschiedliche Sekundärwirkungen auslösen. Die möglichen Folgerungen, die sich diesbezüglich aus dem geringen bis fehlenden Effekt von GABA_B-Rezeptoren auf den cAMP-Gehalt in NCI-H295R-Zellen ableiten lassen, werden in später in Abschnitt V.6.3 dargestellt.

V.6.2 Elektrophysiologie

Zunächst sollen nun aber die elektrophysiologischen Studien diskutiert werden, mit denen der Einfluss von GABA_B-Rezeptoren auf Calciumkanäle in NCI-H295R-Zellen untersucht wurde. Diese Versuche und ihre Ergebnisse sind im Kapitel VII dargestellt.

Wie in Abschnitt I.1.4.2 dargelegt, spielt die zytoplasmatische Calciumkonzentration eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Aldosteronbiosynthese. Calciumströme durch spannungsgesteuerte Ionenkanäle vom "high voltage-activated" (HVA) und "low voltage-activated" (LVA)-Typ werden primär durch Veränderungen des Membranpotentials kontrolliert. Jedoch ist schon lange bekannt, dass auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren diese Kanäle beeinflussen können [43,88]. In Neuronen ist die Modulation von HVA-Kanälen vom N-, P/Q- und L-Typ durch GABA_B-Rezeptoren vielfach dokumentiert [35,58,94,138]. Mit Hinblick auf den Einfluss von GABA auf LVA-Calciumströme vom T-Typ sind die Ergebnisse dagegen teilweise widersprüchlich. Eine durch GABA_B-Agonisten ausgelöste Inhibition von T-Typ Strömen wurde unter anderem in sensorischen Neuronen der Ratte und in Spinalneuronen des Neunauges beobachtet [43,88,137]. Andere Studien konnten dagegen keinen solchen Effekt zeigen [58]. Diese Unterschiede könnten durch die genetische Heterogenität (α_{1G} , α_{1H} , α_{1I}) der elektrophysiologisch als „T-Typ“ zusammengefassten Kanäle bedingt sein - neben Unterschieden in der pharmakologischen Beeinflussbarkeit könnten sich diese Kanalvarianten auch in ihrer Regulation durch intrazelluläre Signalwege unterscheiden [114]. Eine neue Arbeit zeigt etwa, dass eine spezifische Interaktion zwischen der G-Protein-Untereinheit $\beta_2\gamma_2$ und dem α_{1H} T-Typ-Calciumkanal (nicht aber z.B. mit α_{1G}) eine spannungsunabhängige Inhibition des Calciumstroms bewirkt [154]. Wie in Abschnitt V.3 diskutiert, ist gerade der α_{1H} -Subtyp der vorherrschende T-Typ-Calciumkanal in der Zona glomerulosa. Auch in NCI-H295R-Zellen konnte der T-Typ-Calciumstrom aufgrund seiner besonders hohen Nickelsensibilität diesem Subtyp zugeordnet werden (vgl. Abschnitt VII.2).

Darüber hinaus zeigte sich bei den elektrophysiologischen Messungen eine deutliche Heterogenität der NCI-H295R-Zelllinie in Bezug auf die in einzelnen Zellen nachweisbaren Calciumkanäle. Nicht alle Kanaltypen können in jeder einzelnen Zelle gemessen werden, vielmehr scheint es verschiedene Zellpopulationen zu geben: Während jeweils eine Minderheit der Zellen ausschließlich L- oder T-Typ-Kanäle aufweist, lassen sich in den meisten Zellen beide Kanaltypen nachweisen, wobei der L-Typ hier dominiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit Befunden aus Primärkulturen humaner Zona-glomerulosa-Zellen [110].

Die Stimulation von NCI-H295R-Zellen mit Baclofen führte zu einer Inhibition von T-Typ-Calciumkanälen. Durch ihre Wirkung auf Calciumströme könnten GABA_B-Rezeptoren also an der Kontrolle der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Nebennierenrinden-Zellen beteiligt sein. Da die NCI-H295R-Zelllinie GABA_{B(1a)}- und GABA_{B(2)}-Rezeptor-Untereinheiten exprimiert, können GABA_{B(1a)} / GABA_{B(2)} - Heterodimere gebildet werden. Diese „klassischen“ GABA_B-Rezeptoren könnten für den beobachteten Effekt auf T-Typ-Kanäle verantwortlich sein. Andererseits ist ein potentieller Einfluss von GABA_{B(1e)} / GABA_{B(2)} - Dimeren auf Calciumkanäle noch nicht untersucht worden, und auf der Basis der hier dargestellten Ergebnisse kann ein solcher Einfluss auch nicht

ausgeschlossen werden. Letztlich ist die funktionelle Bedeutung der GABA_{B(1e)}-Untereinheit also nach wie vor unklar.

In diesem Zusammenhang sind neuere Arbeiten beachtenswert, die eine besondere Bedeutung des Calciumeinstroms über T-Typ-Kanäle in Bezug auf die Regulation der Aldosteronproduktion in Zellen der Zona glomerulosa nahe legen: Obwohl geringe Erhöhungen der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einem Calciumeinstrom durch L-Typ-Kanäle und einem deutlichen Anstieg des zytoplasmatischen Ca²⁺ führen, hat eine Inhibition der L-Typ-Kanäle wenig Einfluss auf die Steroidproduktion [127]. Andererseits führt die Aktivierung von T-Typ-Kanälen durch K⁺ nur zu geringen Veränderung des zytoplasmatischen Ca²⁺, jedoch führt die Blockade dieser LVA-Kanäle zu einer deutlichen Reduktion der Aldosteronproduktion [126]. Daher wurde ein Konzept vorgeschlagen, nach dem plasmamembranständige T-Typ-Kanäle in adrenokortikalen Zellen in engem Kontakt mit Teilen des endoplasmatischen Retikulums stehen. Dieses dient als „Pipeline“, die das von extrazellulär einströmende Calcium aufnimmt und in die steroidogenen Organellen, die Mitochondrien, weiterleitet (Abbildung 30).

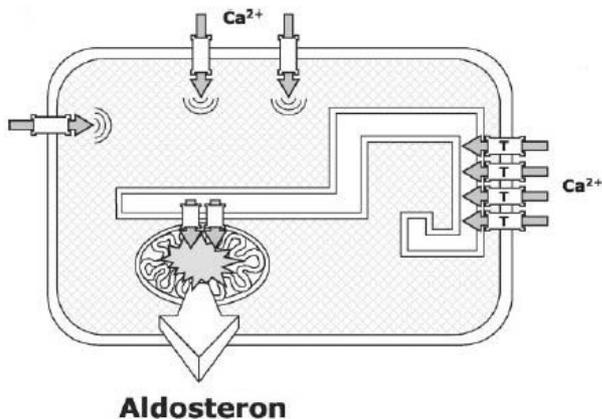


Abbildung 30: Ein Modell für die Rolle von T-Typ-Calciumkanälen in der Stimulation der Aldosteronproduktion.

Das endoplasmatische Retikulum dient als „Pipeline“, die das über T-Typ-Kanäle ausgelöste Calciumsignal an die Mitochondrien weiterleitet. Modifiziert aus Lalevée N. et al., 2003, mit Genehmigung. ©2003 The Endocrine Society.

Experimentelle Befunde unter Verwendung einer Substanz (Calyculin A), die durch Reorganisation des Zytoskeletts das endoplasmatische Retikulum von der Zellmembran entfernt, stützen diese Theorie: Calyculin A blockiert sowohl den K⁺-induzierten intramitochondrialen Calciumanstieg als auch die Steigerung der Aldosteronproduktion in adrenokortikalen Zellen, ohne die Aktivierung von T-Typ-Kanälen direkt zu beeinflussen [73]. Somit scheinen Calciumkanäle vom T-Typ eine zentrale Stellung in der Regulation der Mineralokortikoidsynthese einzunehmen. Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung einer GABA_B-vermittelten Beeinflussung dieser Kanäle.

V.6.3 Schlussfolgerungen: Die GABA_B-Signaltransduktion in NCI-H295R-Zellen

Die hier dargestellten Ergebnisse erlauben es im Zusammenspiel mit älteren Arbeiten, auch einige Schlüsse über die Signaltransduktion des GABA_B-Rezeptors in Nebennierenrindenzellen zu ziehen. Eine entscheidende Rolle kommt dabei den G-Proteinen zu, die direkt an das Rezeptordimer binden und so den ersten Schritt der weiteren Signalkaskade bilden. G-Proteine sind Trimere aus einer G α -Untereinheit sowie einer β - und einer γ -Untereinheit, die fest aneinander gebunden sind und eine funktionelle Einheit bilden (G $\beta\gamma$). In Säugern existiert eine große Vielfalt an G-Proteinen: So sind mehr als 20 α -Untereinheiten bekannt, die anhand ihrer Homologie in 4 Familien gruppiert werden. Außerdem existieren mindestens 5 verschiedene β - und 12 γ -Untereinheiten. Während zunächst die G α -Untereinheit als entscheidend für die Rezeptor-Effektor-Koppelung durch G-Proteine angesehen wurde, wurde die bedeutende Rolle von G $\beta\gamma$ in der Signaltransduktion erst später aufgedeckt. Insbesondere die Koppelung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle und spannungsgesteuerte Calciumkanäle ist eine Funktion der $\beta\gamma$ -Untereinheit [41,100]. Dabei ist die Spezifität der Interaktion zwischen Kanal und bestimmten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten offenbar hoch: für den in der Zona glomerulosa wichtigen α_{1H} T-Typ-Kanal wurde gezeigt, dass speziell Untereinheiten der Zusammensetzung $\beta_2\gamma_2$ eine Inhibition des Calciumstromes bewirken. Die β_2 -Untereinheit scheint dabei entscheidend für die direkte Interaktion mit dem Kanalmolekül zu sein. Interessanterweise ist β_2 die mit Abstand am höchsten exprimierte G β - Untereinheit in NCI-H295R-Zellen [154].

Die meisten Effekte von GABA_B-Rezeptoren werden durch G-Proteine vom Typ G_{i/o} vermittelt, die durch Pertussistoxin (PTX) inaktiviert werden können [12]. PTX, produziert von dem Bakterium *Bordetella pertussis*, katalysiert die ADP-Ribosylierung bestimmter G-Protein α -Untereinheiten an einer spezifischen Cystein-Seitenkette. Dies führt zu einer Entkoppelung von G-Protein und Rezeptor und dadurch zu einer Unterbrechung der Signaltransduktionskaskade [100]. Dabei werden sowohl die durch die α - als auch die durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelten Wirkungen gleichermaßen beeinflusst. Zu den PTX-sensiblen G-Protein-Untereinheiten gehören die meisten Mitglieder der beiden eng verwandten Familien G α_i und G α_o , dagegen werden G α_z (ein Mitglied der G $\alpha_{i/o}$ - Gruppe) sowie die Familien G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} und G α_s nicht blockiert [41]. Auch in den hier diskutierten Experimenten konnte der Effekt von Baclofen auf T-Typ-Calciumkanäle durch Pertussistoxin vollständig aufgehoben werden - ein Indiz dafür, dass G_{i/o}-Proteine an der Signaltransduktion von GABA_B-Rezeptoren in adrenokortikalen Zellen beteiligt sind. In der Tat konnten sowohl G α_i als auch G α_o mittels Immunoblot in bovinen adrenokortikalen Zellen nachgewiesen werden [89]. Das Fehlen eines signifikanten Einflusses von GABA_B-Agonisten auf die intrazellulären cAMP-Spiegel könnte in diesem Zusammenhang auf eine Rolle von G_o

hindeuten: Zu den bekannten Funktionen von G_i zählt die Inhibition zahlreicher Isoformen der Adenylylzyklase. Dagegen konnte für die G-Protein α -Untereinheit $G\alpha_o$ ein direkter Einfluss auf nachgeordnete Effektoren bislang nicht eindeutig gezeigt werden. Vielmehr scheinen die Wirkungen von G_o -Proteinen vor allem durch Ihre $\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelt zu werden [100]. Daher würden die hier beschriebenen Ergebnisse gut zu einer bevorzugten Koppelung von adrenokortikalen $GABA_B$ -Rezeptoren an G-Proteine aus der G_o -Familie passen, auch wenn diese Vermutung experimentell noch nicht belegt ist. Außerdem stellt sich natürlich die Frage, ob und inwieweit sich die Signaltransduktion in der Tumorzelllinie NCI-H295R von derjenigen in normalen Zellen der Nebennierenrinde unterscheidet.

VI. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch die Kombination verschiedener experimenteller Methoden konnten in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Elemente eines bislang unbekanntes GABAergen Steuerungssystems in der Nebennierenrinde nachgewiesen werden.

Neben Markern neuroendokriner Differenzierung wie Syntaxin und VAMP-2 konnten sowohl endogene GABA-Produktion als auch GABA-Rezeptoren in steroidproduzierenden Zellen der Nebenniere identifiziert werden. Die Schlüsselenzyme GAD und VIAAT, die für die Synthese und Speicherung von GABA verantwortlich sind, wurden mittels immunologischer und molekularbiologischer Verfahren in adrenokortikalen Zellen lokalisiert. Außerdem wurde die Aktivität von GAD in einem *in vitro*-Assay nachgewiesen. Daneben wurden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und GABA_B-Rezeptoren, darunter die Spleissvariante GABA_{B(1e)}, in der Nebennierenrinde vorgefunden. Diese Befunde wurden durch Untersuchung menschlicher und tierischer Gewebe sowie einer menschlichen Nebennierenrinden-Tumorzelllinie (NCI-H295R) gewonnen. Die ausgeprägten Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Modellsystemen unterstreichen dabei die Relevanz der Ergebnisse. Weitergehende Untersuchungen haben zudem ergeben, dass den GABA_B-Rezeptoren in der Nebennierenrinde funktionelle Signifikanz zukommt: durch die Modulation von T-Typ Calcium-Strömen interagieren sie mit einem wichtigen Signalweg, dessen Bedeutung für die Steuerung der Steroid-Biosynthese gut belegt ist. In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit auch bereits publizierte Erkenntnisse zur Expression von Calciumkanälen in der Zona glomerulosa bestätigt und durch die Untersuchung humanen Gewebes erweitert.

Die in der Ratte festgestellte Lokalisation des GABAergen Systems in der Zona glomerulosa, in Kombination mit dem beobachteten Einfluss von GABA_B-Rezeptoren auf Calciumkanäle, deckt sich unter funktionellen Gesichtspunkten gut mit der besonderen Bedeutung des Calcium-Signalwegs für die Regulation der Aldosteronproduktion. Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit weder ein deutlicher Einfluss von adrenokortikalen GABA_B-Rezeptoren auf die cAMP-Signaltransduktionskaskade, noch eine Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von NCI-H295R-Zellen durch GABAerge Stimulantien festgestellt werden.

Die Klärung der physiologischen Rolle von GABA im Kortex der Nebennieren bedarf noch weiterer Forschungsanstrengungen. Insbesondere ist die Frage, ob eine GABAerge Modulation des Calciumeinstroms durch T-Typ-Kanäle tatsächlich die Produktion von Steroidhormonen beeinflusst, noch unbeantwortet. Zudem existieren auffällige Unterschiede in der Verteilung von GAD, VIAAT und GABA_{B(2)} zwischen der Nebennierenrinde der Ratte, verglichen mit der des Menschen. Daher muss noch genauer untersucht werden, ob sich auch die funktionelle Bedeutung von GABA in diesen Spezies unterscheidet. *In vivo*-Experimente in Ratten, die

akutem Stress ausgesetzt wurden, zeigten aber, dass die Verabreichung von Baclofen die Kortikosteron-Konzentration im Blut beeinflusst [95] und unterstreichen somit eine mögliche Rolle von GABA in der Kontrolle der Nebennieren-Funktion.

Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass in der Nebennierenrinde ein bislang unbekanntes, lokales GABAerges Signaltransduktionssystem existiert. Dieser Befund sollte zusammen mit ähnlichen, gut dokumentierten Befunden aus anderen endokrin aktiven Geweben wie der Adenohypophyse, dem endokrinen Pankreas und dem Hoden betrachtet werden. In diesen breiteren Kontext gestellt, unterstützt die vorliegende Arbeit das Konzept, dass GABA nicht nur ein wichtiger Neurotransmitter im ZNS ist, sondern auch ein weit verbreitetes Signalmolekül in peripheren Organen darstellt.

VII. PERSPEKTIVE: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NCI-H295R-ZELLEN

Die im folgenden beschriebenen elektrophysiologischen Studien wurden von Frau Dr. Agnes Agoston am Anatomischen Institut der LMU München an vom Verfasser dieser Arbeit kultivierten NCI-H295R-Zellen durchgeführt. Da diese Versuche zur Diskussion der anderen in dieser Dissertation wiedergegebenen Ergebnisse wichtige Aspekte beitragen, werden sie hier zusammenfassend dargestellt.

VII.1 Methoden

Die Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumströme über die Zellmembran von NCI-H295R-Zellen erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration [131]. Mit dieser Methode ist es möglich, Ionenbewegungen durch intramembranäre Kanäle zu registrieren und deren Abhängigkeit von der Potentialdifferenz, die über der Zellmembran anliegt, sowie von den Konzentrationsgradienten der entsprechenden Ionen zu untersuchen.

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden bei Raumtemperatur (20 - 22°C) an auf Deckgläschen kultivierten, einzeln liegenden NCI-H295R-Zellen durchgeführt. Bei den Untersuchungen wurden Borosilikat-GLaspipetten (GB 150-8P, Science Products, Hofheim), sowie die in Tabelle 16 aufgeführten Lösungen verwendet (modifiziert nach [91]). Dabei diente das Bariumchlorid als Ladungsträger (anstatt Ca^{2+} , spannungsabhängige Calciumkanäle sind auch für Bariumionen permeabel), HEPES fungierte in beiden Lösungen als Puffer, CsCl und Tetraethylammonium blockierten Kaliumkanäle der Zellmembran und erlaubten es so, spannungsaktivierte Calciumströme isoliert zu messen. BAPTA diente als intrazellulärer Calcium-Chelator, um die durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen hervorgerufene Inaktivierung von Calciumkanälen zu vermeiden [64]. Die mit der intrazellulären Lösung gefüllten Patch-Pipetten hatten einen elektrischen Widerstand von 2,5 - 4 MΩ.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Bad- und Pipettenlösungen für Patch-Clamp-Studien an NCI-H295R-Zellen.

	Extrazelluläre Lösung	„Intrazelluläre“ Lösung in der Pipette
Tetraethylammonium-Chlorid	117 mM	20 mM
MgCl ₂	2 mM	2 mM
HEPES ¹	10 mM	10 mM
BaCl ₂	10 mM	
Sucrose	30 mM	
Glucose	5 mM	
CsCl		120 mM
CaCl ₂		1 mM
BAPTA ²		5 mM
Mg-ATP		4 mM
Na-GTP		0,2 mM
pH (eingestellt mit CsOH)	7,45	7,2

¹ HEPES = 4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure;

² BAPTA = 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure

Nachdem die Pipettenspitze mit einem Mikromanipulator dicht auf die Zelloberfläche aufgebracht war (sog. Gigaseal mit einem Leckwiderstand des Pipetten-Membran-Kontaktes von $> 10^9 \Omega$), wurde die Zellmembran durch kurzes Anlegen eines Unterdruckes perforiert und so die Ganzzell- oder „whole cell“-Konfiguration hergestellt. Diese erlaubt es, die Potentialdifferenz zwischen intra- und extrazellulär zu kontrollieren (sog. „voltage-clamp“) und in Abhängigkeit von dieser den über die Zellmembran fließenden Strom zu messen. Dazu wurde ein EPC-9 Verstärker mit der zugehörigen „Pulse 8“ Software (beide von Heka Electronics, Lamprecht) verwendet. Strommessungen erfolgten alle 50 μ s ($f = 20$ kHz), und die Messdaten wurden dann mit einem im Verstärker integrierten 5 kHz-Tiefpassfilter gefiltert.

Nach Erzeugung der Ganzzellkonfiguration wurde zunächst die elektrische Kapazität der Zellmembran (ein Maß für die Membranoberfläche und somit die Zellgröße) sowie der Membranwiderstand bei einem Ruhepotential von -80 oder -90 mV bestimmt. Anschließend wurde die spannungsabhängige Aktivierung von Calciumkanälen in der Zellmembran untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Zellmembran schrittweise depolarisiert: vom Ruhepotential ausgehend, wurde alle 4 Sekunden das Membranpotential für jeweils 200 ms auf einen mit jedem Zyklus um 10 mV höheren Wert angehoben, und anschließend wurde das Ruhepotential wieder hergestellt. Dieser Zyklus wiederholte sich, bis ein Membranpotential von +50 mV erreicht war („Stufen-Protokoll“). Die bei den einzelnen Membranpotentialstufen gemessenen Bariumströme wurden in einer Strom-Spannungs-Kurve graphisch wiedergegeben.

Zur genaueren Charakterisierung der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der für den Barium- bzw. Calciumeinstrom verantwortlichen Ionenkanäle wurden die gemessenen Ströme aus jedem Versuch zunächst relativ zum Maximalstrom normiert (I/I_{\max}) und die Einzelmessungen dann gemittelt. Anschließend wurde anhand der einzelnen Datenpunkte die Konstanten V_{50} und k einer modifizierten Boltzmann-Gleichung (Formel 3) so angepasst, dass diese die gemessene Potentialabhängigkeit des Calciumstromes möglichst gut wiedergab. Dies geschah mit Hilfe des Softwareprogramms Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Formel 3

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{50}}{k}}}$$

Abbildung 31 zeigt beispielhaft die einzelnen Datenpunkte aus der Bestimmung einer I-U-Kurve und die an diese Datenpunkte angepasste Boltzmann-Funktion.

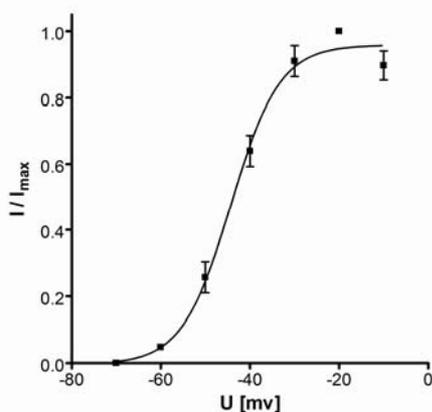


Abbildung 31: Beispiel für die I-U-Kurve eines T-Typ Calciumkanales.

An die einzelnen Datenpunkte wurde die in der Graphik dargestellte Boltzmann-Funktion angepasst.

Um den Einfluss von $GABA_B$ -Rezeptoren auf die verschiedenen Typen von Calciumkanälen in NCI-H295R-Zellen zu charakterisieren, wurden der extrazellulären Badlösung Baclofen (Stammlösung 50 mM, gelöst in 50 mM NaOH), Nifedipin (Stammlösung 10 mM in DMSO) sowie $NiSO_4$ (Stammlösung 100 mM in Wasser) in verschiedenen Konzentrationen mittels eines elektronisch gesteuerten Dosiersystems zugegeben. In einem Teil dieser Versuche wurde neben dem schon beschriebenen Stufenprotokoll auch ein sogenanntes „ramp“-Protokoll (Spannungsrampe) angewandt: Über einen Zeitraum von 2000 ms wurde das Membranpotential, vom Haltepotential bei -110 mV ausgehend, kontinuierlich bis auf +80 mV depolarisiert (Anstiegssteilheit 0,095 mV/ms). Währenddessen wurde kontinuierlich der durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen hervorgerufene Strom aufgezeichnet.

Außerdem wurde die Frage untersucht, inwieweit $G_{i/o}$ -Proteine als „second messenger“ an den beobachteten Effekten von $GABA_B$ -Rezeptoren auf transmembranöse Calciumströme beteiligt

sind. Dazu wurden NCI-H295R-Zellen mit warmem PBS gespült und dann über 12 Stunden in Medium kultiviert, dem Pertussistoxin (PTX) zugesetzt war (200 ng/ml, Stammlösung 100 µg/ml in sterilem Wasser). Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben für Patch-Clamp-Versuche verwendet.

VII.2 Ergebnisse: GABA_B-Rezeptor-Stimulation inhibiert Calciumströme in NCI-H295R-Zellen

Im Rahmen der elektrophysiologischen Versuchsreihe sollten die membranständigen Calciumkanäle in NCI-H295R-Zellen näher charakterisiert und deren mögliche Beeinflussung durch GABA_B-Rezeptoren untersucht werden.

Zunächst wurde die Strom-Spannungs-Kurve für Ca²⁺-Kanäle in NCI-H295R-Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass drei unterschiedliche Subpopulationen innerhalb dieser Zelllinie existieren, die sich anhand der Charakteristika der nachweisbaren Ca²⁺-Ströme unterscheiden lassen. 7 von insgesamt 47 untersuchten Zellen, im folgenden „Gruppe T-Zellen“ genannt, wiesen ausschließlich sogenannte „low voltage-activated“ (LVA) oder „T-Typ“ Calciumkanäle auf, die bei niedrigem Membranpotential aktiviert werden. In diesen Zellen wurde bei stufenweiser Depolarisation, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, der Ca²⁺-Strom bei einem Membranpotential von -50 mV messbar und erreichte sein Maximum bei -20 mV mit einer mittleren Stromdichte von $-7,6 \pm 1,2$ pA/pF (N = 8) (Abbildung 32 A, schwarze Kurve). Dieser Calcium-Influx war unempfindlich gegenüber dem L-Typ-Kanalblocker Nifedipin (4 µM), wurde jedoch durch 100 µM Nickelchlorid komplett blockiert. Dies entspricht den bekannten Charakteristika von T-Typ-Kanälen.

Dagegen zeigten 9 von 47 Zellen („Gruppe L“) ausschließlich bei hohem Membranpotential aktivierbare Ca²⁺-Kanäle vom „high voltage-activated“ (HVA)-Typ („L-Typ-Kanäle“). Hier lag das Schwellenpotential für den Calciumeinstrom bei -40 mV, und die maximale Leitfähigkeit wurde bei 0 bis +10mV Membranpotential erreicht. Die durchschnittliche Stromamplitude bei +10 mV betrug $-7,8 \pm 1,5$ pA/pF (N = 4) (Abbildung 32 B, schwarze Kurve).

In der Mehrheit der untersuchten Zellen (31 von 47, „Gruppe L/T“) waren vor allem L-Typ, aber gleichzeitig zu einem geringeren Ausmaß auch T-Typ-Kanäle vorhanden (Abbildung 32 C, schwarze Kurve). Die beiden Typen von Kanälen werden zwar bei unterschiedlichen Membranpotentialen aktiviert und sind dadurch unterscheidbar, die Spannungsbereiche, in denen die Kanäle geöffnet bleiben, überlappen jedoch. Dies wird beim Vergleich der Strom-Spannungs-Kurven der drei verschiedenen Zellgruppen deutlich.

Interessanterweise waren die in den drei Zellgruppen gemessenen mittleren Membrankapazitäten signifikant unterschiedlich (Gruppe L: $8,4 \pm 0,5$ pF; Gruppe L/T: $10,2 \pm 0,2$ pF; Gruppe T: $14,0 \pm 0,7$ pF). Dies deutet darauf hin, dass eine Korrelation zwischen der Zellgröße, oder genauer der Zellmembranoberfläche, und den auf der Zelle vorhandenen Calciumkanal-Typen besteht.

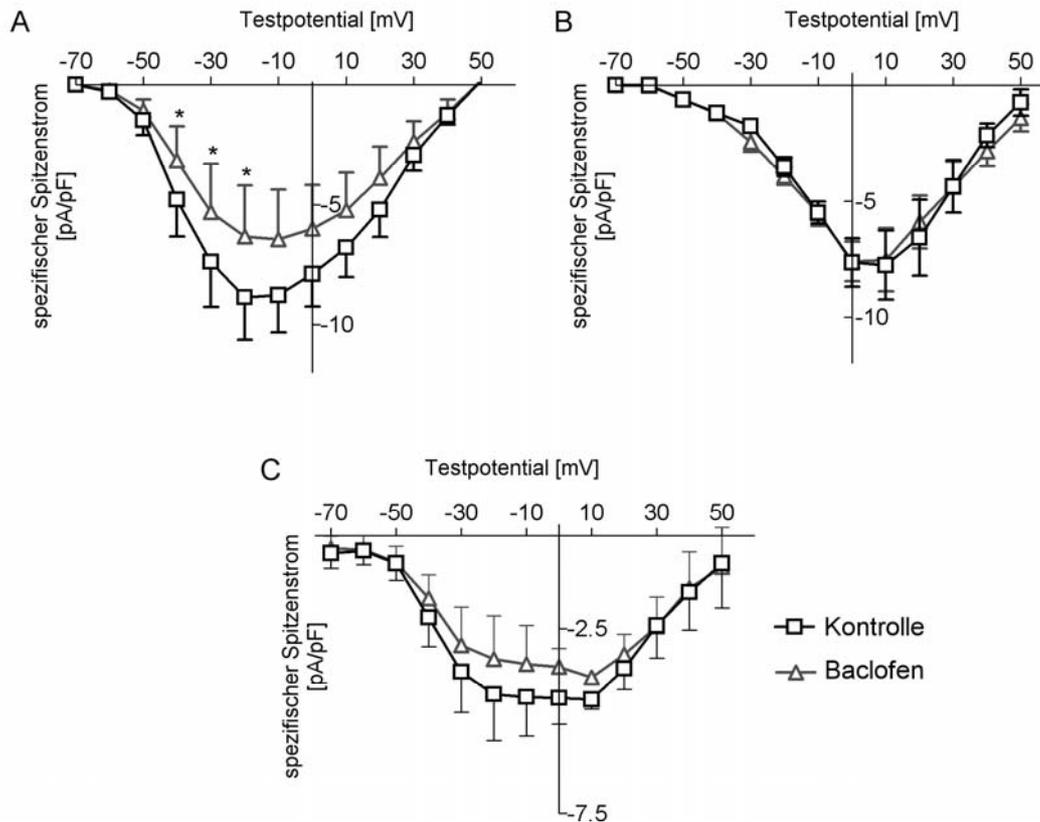


Abbildung 32: Spannungsaktivierte Calciumkanäle in NCI-H295R-Zellen und ihre Beeinflussung durch den GABA_B-Agonisten Baclofen.

In Patch-Clamp-Experimenten waren anhand des Expressionsmusters von Calciumkanälen drei verschiedene Gruppen (Subpopulationen) von Zellen unterscheidbar. Gezeigt wird der maximale Calciumeinstrom in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential. **A:** „Gruppe T-Zellen“ zeigten ausschließlich Calciumkanäle mit den Charakteristika des T-Typs. Gegenüber Kontrollen (□) ergab sich bei Stimulation mit 200 µM Baclofen (△) eine signifikante Inhibition des Calciumeinstromes. **B:** In „Gruppe L-Zellen“ waren nur Calciumkanäle vom L-Typ nachweisbar. Hier ergab sich unter Baclofen-Einwirkung keine signifikante Veränderung im Vergleich mit Kontrollen. **C:** In der Mehrheit der untersuchten Zellen wurden beide Varianten (T- und L-Typ) des Calciumkanales beobachtet. Hier bewirkte Baclofen eine Verringerung der Stromamplitude vor allem bei negativen Membranpotentialen (-30 bis 0 mV), also in einem Bereich, in dem bevorzugt T-Typ-Kanäle geöffnet sind.

Weiterhin wurde nun der Effekt einer Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren auf transmembranäre Calciumströme untersucht. Als selektiver GABA_B-Rezeptoragonist diente Baclofen in einer Konzentration von 200 µM. Zunächst wurden Gruppe L/T - Zellen untersucht, in denen beide Typen von Calciumkanälen messbar waren. Wie in dem Strom-Spannungs-Diagramm in Abbildung 32 C (rote Kurve) dargestellt ist, zeigte sich in Gegenwart von Baclofen eine Reduktion des Calciumstromes. Diese war bei negativeren Membranpotentialen stärker ausgeprägt als bei schwach positiven Potential: es zeigte sich eine Reduktion um $23,7 \pm 6,1$ % bei -20 mV ($P = 0,006$) und von $17,3 \pm 5,0$ % bei +10 mV ($P = 0,027$, $N = 6$). Aufgrund dieses Befundes wurde die Hypothese aufgestellt, dass Baclofen via GABA_B-Rezeptoren einen selektiven hemmenden Effekt auf die bei niedrigem Membranpotential aktiven T-Typ-Kanäle ausübt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die L-Typ-Kanäle vor und während der Baclofen-Stimulation mittels des selektiven L-Typ-Kanalblockers Nifedipin gehemmt. Dabei wurde ein sogenanntes Ramp-Protokoll angewendet, bei dem die Zellmembran, vom Haltepotential ausgehend, stufenlos bis auf +80 mV depolarisiert wurde. Abbildung 33 zeigt, dass Baclofen unter diesen Bedingungen zu einer Hemmung des Nifedipin-unempfindlichen Calciumeinstromes führte.

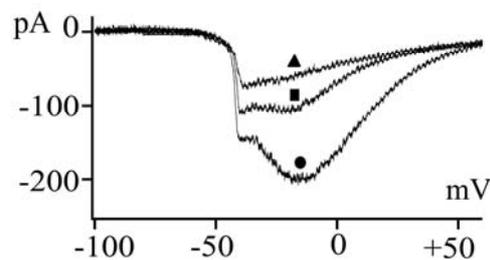


Abbildung 33: Aktivierung von Calciumkanälen in einem „voltage-ramp“ - Experiment an „Gruppe L/T“-Zellen.

Die Abbildung zeigt repräsentative Strom-Spannungs-Kurven unter Kontrollbedingungen (●), sowie in Anwesenheit von 4 µM Nifedipin (■) sowie 4 µM Nifedipin und 200 µM Baclofen (▲). Durch Nifedipin werden selektiv die Calciumkanäle vom L-Typ inhibiert. Der resultierende Calciumeinstrom durch T-Typ-Kanäle wird unter Einwirkung von Baclofen weiter reduziert.

Außerdem wurde der Einfluss von Baclofen in Gruppe L- und Gruppe T-Zellen untersucht, die jeweils nur einen der beiden Typen von Calciumkanälen exprimieren. In Gruppe T-Zellen wurde durch eine kurz dauernde (60 s) Stimulation mit 200 µM Baclofen die maximale Stromamplitude signifikant um $32,7 \pm 9,7$ % vermindert (bei -20 mV, $N = 4$, $P = 0,024$, Abbildung 32 A), während die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des Kanals sich nicht veränderten (in unstimulierten Zellen: halbmaximale Aktivierung bei $V_{1/2} = -44,0 \pm 1,7$ mV, Anstiegssteilheit $k = 5,4 \pm 0,5$ mV; Zeitkonstante der Aktivierung $\tau_{act.} = 2,1 \pm 0,5$ ms, Zeitkonstante der Inaktivierung

$\tau_{\text{inact.}} = 14,6 \pm 1,9$ ms; in Baclofen-stimulierten Zellen: $V_{1/2} = -42,2 \pm 0,9$ mV, $k = 6,3 \pm 0,6$ mV, $\tau_{\text{act.}} = 1,9 \pm 0,4$ ms, $\tau_{\text{inact.}} = 14,5 \pm 1,7$ ms).

Analog zu den Befunden in Zellen der Gruppe L/T konnte in Gruppe L-Zellen ebenfalls kein Einfluss von Baclofen auf Calciumkanäle vom L-Typ festgestellt werden (Abbildung 32 B). Der spezifische Calciumstrom durch L-Typ-Kanäle veränderte sich bei keinem der getesteten Potentiale signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen also, dass die Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren in NCI-H295R-Zellen ausschließlich auf Kanäle vom T-Typ einen Einfluss hat .

Wenn die untersuchten Zellen vor den elektrophysiologischen Messungen 12 Stunden lang mit Pertussistoxin präinkubiert wurden, hatte die nachfolgende Applikation von Baclofen keinen Einfluss auf die Amplitude des T-Typ Calciumeinstromes mehr: Bei -20 mV betrug der maximale Strom in Kontrollen $-3,6 \pm 0,3$ pA/pF und nach Baclofen-Stimulation $-3,6 \pm 0,3$ pA/pF (N = 5, P = 0,8). Ebenso gab es keine Veränderungen in den biophysikalischen Charakteristika der gemessenen Ströme (unstimulierte Zellen: $V_{1/2} = -43,5 \pm 1,7$ mV, $k = 6,2 \pm 0,5$ mV, $\tau_{\text{act.}} = 2,4 \pm 0,3$ ms, $\tau_{\text{inact.}} = 15,5 \pm 1,3$ ms; Baclofen-stimulierte Zellen: $V_{1/2} = -45,0 \pm 2,3$ mV, $k = 5,9 \pm 0,5$ mV, $\tau_{\text{act.}} = 2,1 \pm 0,2$ ms, $\tau_{\text{inact.}} = 15,4 \pm 1,7$ ms). Die Baclofen-Wirkung auf Calciumkanäle in NCI-H295R-Zellen kann also durch Pertussistoxin blockiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass an der Signaltransduktionskaskade ein PTX-sensibles G-Protein beteiligt ist.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Akinci, M.K. und Schofield, P.R. (1999): Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci.Res.* 35, 145-53.
- 2 Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215, 403-10.
- 3 American Tissue and Cell Collection. (2001): NCI-H295 cell line data sheet. Onlinezugriff am 25.01.2002 unter www.atcc.org.
- 4 Arnold, J. (1866): Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren. *Arch.Pathol.Anat.Physiol.Klin.Med.* 35, 64-107.
- 5 Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R. und Seale, B. (1950): Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J.Biol.Chem.* 187, 35-9.
- 6 Balla, T., Baukal, A.J., Eng, S. und Catt, K.J. (1991): Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol.Pharmacol.* 40, 401-6.
- 7 Bland, M.E., Desclozeaux, M. und Ingraham, H.A. (2003): Tissue Growth and Remodelling of the Embryonic and Adult Adrenal Gland. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 995, 59-72.
- 8 Blaschko, H., Sayers, G. und Smith, A.D.: Section 7: Endocrinology / Volume VI. Adrenal Gland. In: Pappenheimer, J.R., Forster, R.E. und Mommaerts, W.F.H.M. (Hrsg.), *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Washington, 1975.
- 9 Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., Usadel, H., Bockmann, M. und Scherbaum, W.A. (1991): Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 265, 1-9.
- 10 Bornstein, S.R. und Chrousos, G.P. (1999): Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 84, 1729-36.
- 11 Bowery, N.G. (1993): GABAB receptor pharmacology. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 33, 109-47.
- 12 Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., *et al.* (2002): International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-Aminobutyric Acid(B) Receptors: Structure and Function. *Pharmacol.Rev.* 54, 247-64.
- 13 Brice, N.L., Varadi, A., Ashcroft, S.J. und Molnar, E. (2002): Metabotropic glutamate and GABA(B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 45, 242-52.
- 14 Bu, D.F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J., Kaufman, D.L., *et al.* (1992): Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 2115-19.
- 15 Bu, D.F. und Tobin, A.J. (1994): The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD. *Genomics* 21, 222-28.

-
- 16 Burry, R.W. (2000): Specificity controls for immunocytochemical methods. *J.Histochem.Cytochem.* 48, 163-66.
 - 17 Caron, P.C., Cote, L.J. und Kremzner, L.T. (1988): Putrescine, a source of gamma-aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem.J.* 251, 559-62.
 - 18 Castelli, M.P., Ingianni, A., Stefanini, E. und Gessa, G.L. (1999): Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci.* 64, 1321-28.
 - 19 Castro, E., Oset-Gasque, M.J. und Gonzalez, M.P. (1989): GABAA and GABAB receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J.Neurosci.Res.* 23, 290-96.
 - 20 Castro, E., Gonzalez, M.P. und Oset-Gasque, M.J. (2003): Distribution of gamma-aminobutyric acid receptors in cultured adrenergic and noradrenergic bovine chromaffin cells. *J.Neurosci.Res.* 71, 375-82.
 - 21 Chebib, M. und Johnston, G.A. (1999): The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 26, 937-40.
 - 22 Chessler, S.D. und Lernmark, A. (2000): Alternative splicing of GAD67 results in the synthesis of a third form of glutamic-acid decarboxylase in human islets and other non-neural tissues. *J.Biol.Chem.* 275, 5188-92.
 - 23 Chessler, S.D., Simonson, W.T., Sweet, I.R. und Hammerle, L.P. (2002): Expression of the vesicular inhibitory amino acid transporter in pancreatic islet cells: distribution of the transporter within rat islets. *Diabetes* 51, 1763-71.
 - 24 Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J.Bacteriol.* 127, 1550-7.
 - 25 Christenson, L.K. und Strauss, J.F., III. (2001): Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch.Med.Res.* 32, 576-86.
 - 26 Clark, J.A., Mezey, E., Lam, A.S. und Bonner, T.I. (2000): Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res.* 860, 41-52.
 - 27 Cohen, C.J., McCarthy, R.T., Barrett, P.Q. und Rasmussen, H. (1988): Ca channels in adrenal glomerulosa cells: K⁺ and angiotensin II increase T-type Ca channel current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85, 2412-6.
 - 28 Commission on Life Sciences, Institute of Laboratory Animal Resources und National Research Council: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.
 - 29 Cubells, J.F., Blanchard, J.S., Smith, D.M. und Makman, M.H. (1986): In vivo action of enzyme-activated irreversible inhibitors of glutamic acid decarboxylase and gamma-aminobutyric acid transaminase in retina vs. brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 238, 508-14.
 - 30 Cuevas, E.C., Bateman, A.C., Wilkins, B.S., Johnson, P.A., Williams, J.H., *et al.* (1994): Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J.Clin.Pathol.* 47, 448-52.
 - 31 Daly, J.W., Padgett, W. und Seamon, K.B. (1982): Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. *J.Neurochem.* 38, 532-44.
-

-
- 32 Denizot, F. und Lang, R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-7.
- 33 Didelon, F., Mladinic', M., Cherubini, E. und Bradbury, A. (2000): Early expression of GABA(A) receptor delta subunit in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci.Res* 62, 638-43.
- 34 Durroux, T., Gallo-Payet, N. und Payet, M.D. (1988): Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J.Physiol.* 404, 713-29.
- 35 Easter, A. und Spruce, A.E. (2002): Recombinant GABA(B) receptors formed from GABA(B1) and GABA(B2) subunits selectively inhibit N-type Ca(2+) channels in NG108-15 cells. *Eur.J.Pharmacol.* 440, 17-25.
- 36 Ehrhart-Bornstein, M. und Hilbers, U. (1998): Neuroendocrine properties of adrenocortical cells. *Horm.Metab.Res.* 30, 436-39.
- 37 Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A. und Vinson, G.P. (1998): Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr.Rev.* 19, 101-43.
- 38 Erdmann, B., Gerst, H., Bulow, H., Lenz, D., Bahr, V., *et al.* (1995): Zone-specific localization of cytochrome P45011B1 in human adrenal tissue by PCR-derived riboprobes. *Histochem.Cell Biol.* 104, 301-07.
- 39 Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N. und Tobin, A.J. (1991): Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91-100.
- 40 Erlandson, R.A. und Nesland, J.M. (1994): Tumors of the endocrine/neuroendocrine system: an overview. *Ultrastruct.Pathol.* 18, 149-70.
- 41 Fields, T.A. und Casey, P.J. (1997): Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem.J.* 321, 561-71.
- 42 Flint, J.M. (1900): The blood vessels, angiogenesis, organogenesis, reticulum, and histology of the adrenal. *Johns Hopkins Hosp.Rep.*, 153-229.
- 43 Formenti, A. und Sansone, V. (1991): Inhibitory action of acetylcholine, baclofen and GTP-gamma-S on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Neurosci.Lett.* 131, 267-72.
- 44 Foster, R.H., MacFarlane, C.H. und Bustamante, M.O. (1997): Recent progress in understanding aldosterone secretion. *Gen.Pharmacol.* 28, 647-51.
- 45 Gamel-Didelon, K., Corsi, C., Pepeu, G., Jung, H., Gratzl, M., *et al.* (2002): An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology* 76, 170-77.
- 46 Gamel-Didelon, K., Kunz, L., Fohr, K.J., Gratzl, M. und Mayerhofer, A. (2003): Molecular and physiological evidence for functional GABA-C receptors in growth hormone secreting cells. *J.Biol.Chem.* 378, 20192-95.
- 47 Gasnier, B. (2000): The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82, 327-37.
- 48 Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H., Chen, T.R., Triche, T.J., *et al.* (1990): Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 50, 5488-96.
-

-
- 49 Geigerseder, C., Doepner, R., Thalhammer, A., Frungieri, M.B., Gamel-Didelon, K., *et al.* (2003): Evidence for a GABAergic System in Rodent and Human Testis: Local GABA Production and GABA Receptors. *Neuroendocrinology* 77, 314-23.
- 50 Geigerseder, C., Doepner, R.F., Thalhammer, A., Krieger, A. und Mayerhofer, A. (2004): Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABA(A) receptors: a new role for testicular GABA. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 2, 13.
- 51 Gerst, J.E. (1999): SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol.Life Sci.* 55, 707-34.
- 52 Gilon, P., Bertrand, G., Loubatieres-Mariani, M.M., Remacle, C. und Henquin, J.C. (1991): The influence of gamma-aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129, 2521-29.
- 53 Gonzalez, M.P., Oset-Gasque, M.J., Castro, E., Bugada, J., Arce, C., *et al.* (1992): Mechanism through which GABAA receptor modulates catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 47, 487-94.
- 54 Grant, N.J., Hepp, R., Krause, W., Aunis, D., Oehme, P., *et al.* (1999): Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J.Neurochem.* 72, 363-72.
- 55 Grosse, G., Grosse, J., Tapp, R., Kuchinke, J., Gorsleben, M., *et al.* (1999): SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J.Neurosci.Res.* 56, 539-46.
- 56 Groussin, L., Massias, J.F., Bertagna, X. und Bertherat, J. (2000): Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 85, 345-54.
- 57 Guillemette, G., Balla, T., Baukal, A.J., Spat, A. und Catt, K.J. (1987): Intracellular receptors for inositol 1,4,5-trisphosphate in angiotensin II target tissues. *J.Biol.Chem.* 262, 1010-5.
- 58 Guyon, A. und Leresche, N. (1995): Modulation by different GABAB receptor types of voltage-activated calcium currents in rat thalamocortical neurones. *J.Physiol.* 485, 29-42.
- 59 Haak, H.R. und Fleuren, G.J. (1995): Neuroendocrine differentiation of adrenocortical tumors. *Cancer* 75, 860-64.
- 60 Hales, T.G. und Tyndale, R.F. (1994): Few cell lines with GABAA mRNAs have functional receptors. *J.Neurosci.* 14, 5429-36.
- 61 Haynes, R.C., Jr., Koritz, S.B. und Peron, F.G. (1959): Influence of adenosine 3',5'-monophosphate on corticoid production by rat adrenal glands. *J.Biol.Chem.* 234, 1421-3.
- 62 Hepp, R., Grant, N.J., Aunis, D. und Langley, K. (2000): SNAP-25 regulation during adrenal gland development: comparison with differentiation markers and other SNAREs. *J.Comp.Neurol.* 421, 533-42.
- 63 Hierholzer, K. und Buehler, H.: Metabolism of Cortical Steroids and Their General Mode of Action. In: Greger, R. und Windhorst, U. (Hrsg.), *Comprehensive Human Physiology*, Band 1. Springer, Berlin, 1996.
- 64 Hille, B.: Ion channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, 2001.
- 65 Hohne-Zell, B. und Gratzl, M. (1996): Adrenal chromaffin cells contain functionally different SNAP-25 monomers and SNAP-25/syntaxin heterodimers. *FEBS Lett.* 394, 109-16.
-

-
- 66 Horvath, A., Szabadkai, G., Varnai, P., Aranyi, T., Wollheim, C.B., *et al.* (1998): Voltage dependent calcium channels in adrenal glomerulosa cells and in insulin producing cells. *Cell Calcium* 23, 33-42.
- 67 Iwasa, K., Oomori, Y. und Tanaka, H. (1999): Colocalization of gamma-aminobutyric acid immunoreactivity and acetylcholinesterase activity in nerve fibers of the mouse adrenal gland. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 631-5.
- 68 Kataoka, Y., Gutman, Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., *et al.* (1984): Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3218-22.
- 69 Komminoth, P., Roth, J., Schroder, S., Saremaslani, P. und Heitz, P.U. (1995): Overlapping expression of immunohistochemical markers and synaptophysin mRNA in pheochromocytomas and adrenocortical carcinomas. Implications for the differential diagnosis of adrenal gland tumors. *Lab Invest.* 72, 424-31.
- 70 Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., *et al.* (1999): Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283, 74-7.
- 71 Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-85.
- 72 Lahr, G., Mayerhofer, A., Bucher, S., Barthels, D., Wille, W., *et al.* (1993): Neural cell adhesion molecules in rat endocrine tissues and tumor cells: distribution and molecular analysis. *Endocrinology* 132, 1207-17.
- 73 Lalevee, N., Resin, V., Arnaudeau, S., Demaurex, N. und Rossier, M.F. (2003): Intracellular transport of calcium from plasma membrane to mitochondria in adrenal H295R cells: implication for steroidogenesis. *Endocrinology* 144, 4575-85.
- 74 Le Douarin, N.M. (1980): The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286, 663-9.
- 75 Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. und Perez-Reyes, E. (1999): Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys. J.* 77, 3034-42.
- 76 Lefebvre, H., Compagnon, P., Contesse, V., Delarue, C., Thuillez, C., *et al.* (2001): Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5001-07.
- 77 Lesouhaitier, O., Chiappe, A. und Rossier, M.F. (2001): Aldosterone increases T-type calcium currents in human adrenocarcinoma (H295R) cells by inducing channel expression. *Endocrinology* 142, 4320-30.
- 78 Li, Q., Johansson, H., Kjellman, M. und Grimelius, L. (1998): Neuroendocrine differentiation and nerves in human adrenal cortex and cortical lesions. *APMIS* 106, 807-17.
- 79 Lotfi, C.F., Todorovic, Z., Armelin, H.A. und Schimmer, B.P. (1997): Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29886-91.
- 80 Lotshaw, D.P. (2001): Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Mol. Cell Endocrinol.* 175, 157-71.
- 81 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.
-

-
- 82 Ma, Y.J., Costa, M.E. und Ojeda, S.R. (1994): Developmental expression of the genes encoding transforming growth factor alpha and its receptor in the hypothalamus of female rhesus macaques. *Neuroendocrinology* 60, 346-59.
- 83 Malcangio, M. und Bowery, N.G. (1993): GABAB receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in rat spinal cord. *Neurosci.Lett.* 158, 189-92.
- 84 Mally, M.I., Cirulli, V., Otonkoski, T., Soto, G. und Hayek, A. (1996): Ontogeny and tissue distribution of human GAD expression. *Diabetes* 45, 496-501.
- 85 Manchester, K.L. (1995): Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques* 19, 208-10.
- 86 Martin, D.L.: Brain Glutamate Decarboxylase. In: Boulton, A.A., Baker, G.B. und Yu, P.H. (Hrsg.), *Neurotransmitter enzymes*, S. 361-88. Humana Press, Clifton, 1986.
- 87 Martin, S.C., Russek, S.J. und Farb, D.H. (2001): Human GABA(B)R genomic structure: evidence for splice variants in GABA(B)R1 but not GABA(B)R2. *Gene* 278, 63-79.
- 88 Matsushima, T., Tegner, J., Hill, R.H. und Grillner, S. (1993): GABAB receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons. *J.Neurophysiol.* 70, 2606-19.
- 89 Maturana, A.D., Casal, A.J., Demarex, N., Vallotton, M.B., Capponi, A.M., *et al.* (1999): Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *J.Biol.Chem.* 274, 19943-8.
- 90 Mayerhofer, A., Hohne-Zell, B., Gamel-Didelon, K., Jung, H., Redecker, P., *et al.* (2001): Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *FASEB J.* 15, 1089-91.
- 91 McCarthy, R.T., Isales, C. und Rasmussen, H. (1993): T-type calcium channels in adrenal glomerulosa cells: GTP-dependent modulation by angiotensin II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 3260-4.
- 92 Mellon, S.H., Griffin, L.D. und Compagnone, N.A. (2001): Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 37, 3-12.
- 93 Miettinen, M. (1992): Neuroendocrine differentiation in adrenocortical carcinoma. New immunohistochemical findings supported by electron microscopy. *Lab.Invest.* 66, 169-74.
- 94 Mintz, I.M. und Bean, B.P. (1993): GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10, 889-98.
- 95 Mishunina, T.M. und Kononenko, V.Y. (2002): Specific GABA binding in the adrenals and blood corticosteroid levels in stress in intact rats and rats with changes in the functional activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal system. *Neurosci.Behav.Physiol.* 32, 109-12.
- 96 Mitani, F., Mukai, K., Miyamoto, H., Suematsu, M. und Ishimura, Y. (1999): Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology* 140, 3342-53.
- 97 Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-50.
- 98 Mulrow, P.J. (1998): Renin-angiotensin system in the adrenal. *Horm.Metab.Res.* 30, 346-49.
-

-
- 99 Nistico, G., Di Giorgio, R.M., De Luca, G., Di Perri, R. und Macaione, S. (1980): Effects of intraventricular gamma-acetylenic-GABA on GABA concentrations, GABA-T and GAD in several areas of the chick brain. *Monogr. Neural Sci.* 5, 34-9.
- 100 Offermanns, S. (2003): G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83, 101-30.
- 101 Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F. und Ishimura, Y. (1992): Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 130, 2971-7.
- 102 Olianias, M.C. und Onali, P. (1999): GABAB receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase activity in membranes of rat olfactory bulb. *Br. J. Pharmacol.* 126, 657-64.
- 103 Oomori, Y., Iuchi, H., Nakaya, K., Tanaka, H., Ishikawa, K., *et al.* (1993): Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. *Histochemistry* 100, 203-13.
- 104 Oon, B.B., Scraggs, P.R. und Gillham, B. (1989): Formation of releasable gamma-aminobutyrate from putrescine by rat adrenal slices in vitro. *J. Endocrinol.* 123, 227-32.
- 105 Oset-Gasque, M.J., Parramon, M. und Gonzalez, M.P. (1993): GABAB receptors modulate catecholamine secretion in chromaffin cells by a mechanism involving cyclic AMP formation. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1586-92.
- 106 Owens, D.F. und Kriegstein, A.R. (2002): Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715-27.
- 107 Parramon, M., Oset-Gasque, M.J., Gonzalez, M.P. und Stephenson, F.A. (1994): Identification of GABAA receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* 168, 243-46.
- 108 Parramon, M., Gonzalez, M.P., Herrero, M.T. und Oset-Gasque, M.J. (1995): GABAB receptors increase intracellular calcium concentrations in chromaffin cells through two different pathways: their role in catecholamine secretion. *J. Neurosci. Res.* 41, 65-72.
- 109 Parramon, M., Gonzalez, M.P. und Oset-Gasque, M.J. (1995): Pharmacological modulation of adrenal medullary GABAA receptor: consistent with its subunit composition. *Br. J. Pharmacol.* 116, 1875-81.
- 110 Payet, M.D., Durroux, T., Bilodeau, L., Guillon, G. und Gallo-Payet, N. (1994): Characterization of K⁺ and Ca²⁺ ionic currents in glomerulosa cells from human adrenal glands. *Endocrinology* 134, 2589-98.
- 111 Pearse, A.G. (1969): The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 303-13.
- 112 Pearse, A.G. (1977): The diffuse neuroendocrine system and the apud concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Med. Biol.* 55, 115-25.
- 113 Perez-Reyes, E. (1999): Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 660-9.
- 114 Perez-Reyes, E. (2003): Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83, 117-61.
-

-
- 115 Peri, A., Luciani, P., Conforti, B., Baglioni-Peri, S., Cioppi, F., *et al.* (2001): Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86, 5443-49.
- 116 Pignatelli, D., Ferreira, J., Vendeira, P., Magalhaes, M.C. und Vinson, G.P. (2002): Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the adrenal cortex. *Endocr.Res.* 28, 683-91.
- 117 Pralong, W.F., Hunyady, L., Varnai, P., Wollheim, C.B. und Spat, A. (1992): Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 132-6.
- 118 Rainey, W.E., Bird, I.M., Sawetawan, C., Hanley, N.A., McCarthy, J.L., *et al.* (1993): Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 77, 731-37.
- 119 Rainey, W.E., Bird, I.M. und Mason, J.I. (1994): The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol.Cell Endocrinol.* 100, 45-50.
- 120 Rainey, W.E. (1999): Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. *Mol.Cell Endocrinol.* 151, 151-60.
- 121 Ravichandran, V., Chawla, A. und Roche, P.A. (1996): Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J.Biol.Chem.* 271, 13300-3.
- 122 Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., *et al.* (1998): Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *J.Endocrinol.* 156, 415-23.
- 123 Rocco, S., Ambroz, C. und Aguilera, G. (1990): Interaction between serotonin and other regulators of aldosterone secretion in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 127, 3103-10.
- 124 Rohacs, T., Nagy, G. und Spat, A. (1997): Cytoplasmic Ca²⁺ signalling and reduction of mitochondrial pyridine nucleotides in adrenal glomerulosa cells in response to K⁺, angiotensin II and vasopressin. *Biochem.J.* 322 (Pt 3), 785-92.
- 125 Rossetto, O., Gorza, L., Schiavo, G., Schiavo, N., Scheller, R.H., *et al.* (1996): VAMP/synaptobrevin isoforms 1 and 2 are widely and differentially expressed in nonneuronal tissues. *J.Cell Biol.* 132, 167-79.
- 126 Rossier, M.F., Python, C.P., Capponi, A.M., Schlegel, W., Kwan, C.Y., *et al.* (1993): Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 132, 1035-43.
- 127 Rossier, M.F., Burnay, M.M., Vallotton, M.B. und Capponi, A.M. (1996): Distinct functions of T- and L-type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137, 4817-26.
- 128 Rossier, M.F., Lesouhaitier, O., Perrier, E., Bockhorn, L., Chiappe, A., *et al.* (2003): Aldosterone regulation of T-type calcium channels. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 85, 383-88.
- 129 Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J.P., *et al.* (1997): Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417, 177-83.
-

-
- 130 Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., *et al.* (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- 131 Sakman, B. und Neher, E. (Hrsg.): *Single-channel recording*. Plenum Press, New York, 1995.
- 132 Sambrook, J. und Russel, D.W.: Amplification of cDNA generated by Reverse Transcription of mRNA. In: Sambrook, J. und Russel, D.W. (Hrsg.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Band 2, S. 8.46-8.53. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- 133 Sambrook, J. und Russel, D.W.: The Basic Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J. und Russel, D.W. (Hrsg.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Band 2, S. 8.18-8.24. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- 134 Schrier, A.D., Wang, H., Talley, E.M., Perez-Reyes, E. und Barrett, P.Q. (2001): alpha1H T-type Ca²⁺ channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 280, C265-C72.
- 135 Schroder, S., Padberg, B.C., Achilles, E., Holl, K., Dralle, H., *et al.* (1992): Immunocytochemistry in adrenocortical tumours: a clinicomorphological study of 72 neoplasms. *Virchows Arch.A.Pathol.Anat.Histopathol.* 420, 65-70.
- 136 Schwarz, D.A., Barry, G., Eliasof, S.D., Petroski, R.E., Conlon, P.J., *et al.* (2000): Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J.Biol.Chem.* 275, 32174-81.
- 137 Scott, R.H., Wootton, J.F. und Dolphin, A.C. (1990): Modulation of neuronal T-type calcium channel currents by photoactivation of intracellular guanosine 5'-O(3-thio) triphosphate. *Neuroscience* 38, 285-94.
- 138 Shen, W. und Slaughter, M.M. (1999): Metabotropic GABA receptors facilitate L-type and inhibit N-type calcium channels in single salamander retinal neurons. *J.Physiol.* 516, 711-18.
- 139 Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., *et al.* (1999): Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem.Int.* 34, 379-85.
- 140 Spat, A. und Hunyady, L. (2004): Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol.Rev.* 84, 489-539.
- 141 Stocco, D.M. (2001): StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu.Rev.Physiol.* 63:193-213., 193-213.
- 142 Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und Schulz, I. (1983): Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, 67-9.
- 143 Tanaka, C. (1985): gamma-Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci.* 37, 2221-35.
- 144 Tillakaratne, N.J., Erlander, M.G., Collard, M.W., Greif, K.F. und Tobin, A.J. (1992): Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J.Neurochem.* 58, 618-27.
- 145 Tillakaratne, N.J., Medina-Kauwe, L. und Gibson, K.M. (1995): gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp.Biochem.Physiol.A.Physiol.* 112, 247-63.
-

-
- 146 Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76, 4350-4.
- 147 Unsicker, K. (1971): On the innervation of the rat and pig adrenal cortex. *Z.Zellforsch.* 116, 151-56.
- 148 Varju, P., Katarova, Z., Madarasz, E. und Szabo, G. (2001): GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res.* 305, 239-46.
- 149 Vinson, G.P., Hinson, J.P. und Tóth, I.E. (1994): The Neuroendocrinology of the Adrenal Cortex. *J.Neuronendocrinol.* 6, 235-46.
- 150 White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., *et al.* (1998): Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679-82.
- 151 Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B. und de Gasparo, M. (1989): Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 163, 284-91.
- 152 Whiting, P.J., Bonnert, T.P., McKernan, R.M., Farrar, S., Le Bourdelles, B., *et al.* (1999): Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868:645-53., 645-53.
- 153 Wojcik, W.J. und Neff, N.H. (1984): gamma-Aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol.Pharmacol.* 25, 24-28.
- 154 Wolfe, J.T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J.C. und Barrett, P.Q. (2003): T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* 424, 209-13.
- 155 Wolkersdorfer, G.W. und Bornstein, S.R. (1998): Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem.Pharmacol.* 56, 163-71.
- 156 Wong, P.P., Daneman, N., Volchuk, A., Lassam, N., Wilson, M.C., *et al.* (1997): Tissue distribution of SNAP-23 and its subcellular localization in 3T3-L1 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 230, 64-8.
- 157 Wu, K.D., Chen, Y.M., Chu, T.S., Chueh, S.C., Wu, M.H., *et al.* (2001): Expression and localization of human dopamine D2 and D4 receptor mRNA in the adrenal gland, aldosterone-producing adenoma, and pheochromocytoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86, 4460-67.
- 158 Xia, Y. und Wikberg, J.E. (1996): Localization of ACTH receptor mRNA by in situ hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 286, 63-8.
-

IX. LEBENSLAUF

Klaus Hans Metzeler

geboren am 17. August 1978 in Memmingen

Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG UND STUDIUM:

1984-1988	Grundschule Memmingerberg
1988-1997	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
Juni 1997	Abitur
August 1997 - August 1998	Zivildienst beim Bayerischen Roten Kreuz, Kreisverband Unterallgäu, Memmingen
Oktober 1998	Prüfung zum Rettungssanitäter mit Abschlussnote „sehr gut“
November 1998 - April 2005	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
August 2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Note „sehr gut“
August 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
Februar 2002	erfolgreiche Teilnahme an der “United States Medical Licensing Examination” (USMLE) Step I
März 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
April 2004 - März 2005	Praktisches Jahr 1. Terial: Innere Medizin (New York Presbyterian Hospital und Hospital for Special Surgery, Cornell University, New York, USA) 2. Terial: Anästhesiologie und operative Intensivmedizin (Klinikum Rechts der Isar der TUM, München) 3. Terial: Allgemein- und Viszeralchirurgie (Kantonsspital Luzern, Schweiz)
April 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ Studienabschluss mit Gesamtnote 1,00
26. April 2005	Approbation zum Arzt
Juli 2005	Erfolgreiche Teilnahme an der “United States Medical Licensing Examination” (USMLE) Step II CS & Step II CK
27. September 2005	ECFMG Certification (US-amerikanisches Staatsexamen)

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT:

ab 1. August 2005	Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Klinikum der Universität München - Großhadern
-------------------	---

X. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Im Zusammenhang mit der Ausarbeitung dieser Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Originalarbeit:

Metzeler K., Agoston A., Gratzl M. (2004):

An Intrinsic γ -Aminobutyric Acid (GABA)ergic System in the Adrenal Cortex: Findings from Human and Rat Adrenal Glands and the NCI-H295R Cell Line.

Endocrinology 145:2402-2411.

Kongressbeiträge:

Metzeler K., Agoston A., Krieger A., Geigerseder C., Gratzl M. (2003):

Neuroendocrine properties of human adrenocortical cells: GABA synthesis and functional GABA_B receptors in the NCI-H295R cell line.

Jahrestagung der Sektion Neuroendokrinologie der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck 2003. Abstract veröffentlicht in: Exp Clin Endocrinol Diabetes 111:404

Geigerseder C., Doepner R.F.G., Thalhammer A., Frungieri M.B., Gonzales-Calvar S., Metzeler K., Calandra R.S., Mayerhofer A. (2003):

Evidence for a peripheral GABAergic system in the testis: Initiation of Leydig cell proliferation via GABA_A receptors.

Jahrestagung der Sektion Neuroendokrinologie der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck 2003. Abstract veröffentlicht in: Exp Clin Endocrinol Diabetes 111:404

Metzeler K., Gianfriddo M., Gamel-Didelon K., Pepeu G., Gratzl M. (2002): GABA-A receptors and GABA synthesis in a human adrenocortical tumor cell line.

10. Jahrestagung der European Neuroendocrine Association, München 2002

XI. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Liebe nicht nur diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Professor Dr. Manfred Gratzl danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete Unterstützung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Durch das Gleichgewicht zwischen hilfreichen Vorschlägen, interessierten Diskussionen und dem richtigen Maß an Freiräumen war die Anfertigung dieser Dissertation für mich eine lehrreiche und spannende Erfahrung.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Martina Haasemann und Frau Dr. Karen Schmid-Bäse. Das von ihnen mit großem Engagement betreute Graduiertenkolleg 333 hat meine eigene Tätigkeit durch viele interessante Veranstaltungen, Begegnungen und Diskussionen bereichert.

Frau Dr. Agnes Agoston hat durch ihre elektrophysiologischen Untersuchungen, aber auch durch viele weitere Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herr Professor Dr. Artur Mayerhofer sowie meine Kollegen Dr. Katia Didelon-Gamel und Dr. Christof Geigerseder haben mich durch zahlreiche Ratschläge und hilfreiche Diskussionen stets unterstützt. Pia Körner und Dr. Lars Kunz danke ich darüber hinaus auch für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik.

Annette Krieger, Andreas Mauermayer, Romi Rämsch, Marlies Rauchfuß, Andrea Talhammer, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher und Barbara Zschesche haben mir mit ihrer Unterstützung und ihren kompetenten Rat den Laboralltag erleichtert.

Neben den schon genannten Mitarbeitern des Anatomischen Institutes danke ich auch Dr. Martin Albrecht, Thomas Braun, Dr. Nicola Dimitrijevic, Richard Doepner, Kathrin End, Dr. Angelika Finzel, Dr. Stefanie Fritz, Dr. Monica Frungieri, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Sebastian Reindl, Dr. Axel W. Reinhardt, Johanna Richter, Matthias Traut und Herrn Professor Dr. Laurenz J. Wurzinger für die stets angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre im Anatomischen Institut.