

Aus dem Anatomischen Institut am Biederstein der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Manfred Gratzl

**GAMMA-AMINOBUTTERSÄURE (GABA) IN DER HYPOPHYSE
UND IN HYPOPHYSENADENOMEN DES MENSCHEN:
SYNTHESE, SPEICHERUNG UND REZEPTOREN**

Dissertation

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

vorgelegt von Katrin End
aus Freiburg

2008

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christine Spitzweg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Felix Beuschlein
Priv. Doz. Dr. med. Emes A. Auerswald
Prof. Dr. med. Rainer Rupprecht

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2008

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	1
<u>1 EINLEITUNG</u>	4
1.1 DIE HYPOPHYSE	4
1.1.1 MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE DER HYPOPHYSE	4
1.1.2 EXTRA- UND INTRAHYPOPHYSÄRE REGULATIONSEBENEN DER HYPOPHYSENFUNKTION	6
1.1.3 TUMOREN DER HYPOPHYSE	8
1.2 GAMMA-AMINO BUTTERSÄURE (GABA)	10
1.2.1 KOMPONENTEN DES GABAERGEN SYSTEMS – SYNTHESE, FREISETZUNG UND REZEPTOREN	10
1.2.2 GABA – NEUROTRANSMITTER UND PARAKRINER/AUTOKRINER FAKTOR	12
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
<u>2 MATERIAL</u>	16
2.1 GEWEBE	16
2.2 OLIGONUKLEOTID-PRIMER	18
2.3 ANTIKÖRPER	20

2.4	LÖSUNGEN	21
2.5	HERSTELLEVERZEICHNIS	21
3	METHODEN	23
3.1	IMMUNHISTOCHEMIE	23
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.2.1	RNA-PRÄPARATION	24
3.2.2	REVERSE TRANSKRIPTION (RT)	25
3.2.3	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	26
3.2.4	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	28
3.2.5	SEQUENZIERUNG	29
3.3	LASERMIKRODISSEKTION	29
4	ERGEBNISSE	31
4.1	GABA-SYNTHESE UND GABA-SPEICHERUNG IN DER HUMANEN HYPOPHYSE	31
4.2	LOKALISATION DES GABA-SYNTHESEAPPARATES IN GH-ZELLEN DER HUMANEN HYPOPHYSE	32
4.3	GABA-SYNTHESE IN GH-ADENOMEN	34
4.4	GABA-SYNTHESE IN GEMISCHTZELLIGEN ADENOMEN, PROLAKTINOMEN, EINEM GONADOTROPEN ADENOM UND EINEM NULLZELL-ADENOM	36

4.5	EXPRESSION VON GABA-REZEPTORUNTEREINHEITEN IN HUMANEN HYPOPHYSEN UND HYPOPHYSENADENOMEN	38
5	<u>DISKUSSION</u>	44
5.1	DAS LOKALE GABA-ERGE SYSTEM - PARA- UND/ODER AUTOKRINE SIGNALWEGE IN DER HYPOPHYSE	44
5.2	GABAERGE REGULATION AUF VERSCHIEDENEN HIERARCHIEEBENEN DES SÄUGERORGANISMUS	46
5.3	HYPOPHYSENADENOME, DER VERLUST VON GAD 65 UND MÖGLICHE FOLGEN	48
5.4	GABA UND WEITERE KLINISCHE ASPEKTE	52
5.4.1	GAD-ANTIKÖRPER BEI ERKRANKUNGEN	52
5.4.2	GABA UND DIE PATHOGENESE DER ATEMWEGSOBSTRUKTION BEI ASTHMA BRONCHIALE	53
5.4.3	MEDIKAMENTE MIT WIRKUNG AM GABAERGEN SYSTEM	54
	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	56
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	58
	<u>ANHANG</u>	65
	LEBENS LAUF	65
	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	67

DANKSAGUNG

68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

-A-		DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ACTH	Adrenokortikotropin		
ADH	Antidiuretisches Hormon	DTT	Dithiothreitol
APS I	Autoimmunes polyendokrines Syndrom Typ I	dNTP	Desoxy-Nukleintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	-E-	
		EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure
-B-		-F-	
bp	Basenpaare	FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
-C-		-G-	
C	Celcius	g	Gramm
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	GABA	Gamma-aminobutyric acid (Gamma- Aminobuttersäure)
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)	GAD	Glutamatdecarboxylase
CRH	Corticotropin releasing hormone (Corticotropin- freisetzendes Hormon)	GH	Growth hormone (Wachstumshormon/ Somatotropin)
CTP	Cytidintriphosphat	GHRH	Growth hormone releasing hormone (Wachstumshormon- freisetzendes Hormon)
-D-		GnRH	Gonadotropin releasing hormone (Gonadotropin- freisetzendes Hormon)
DAB	Diaminobenzidin		
DEPC	Diethylpyrocarbonat		

GTP	Guanintriphosphat	mRNA	messenger ribonucleic acid
-H-		MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
h	hour/Stunde(n)	mV	Millivolt
HCl	Salzsäure		
-I-		-N-	
IHC	Immunhistochemie	nm	Nanometer
IU	International Unit(s) (Internationale Einheit der Enzymaktivität)	N.N.	nicht nachweisbar
-K-		-P-	
kDa	Kilodalton	PBS	Phosphat buffered saline
		PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
-L-		POMC	Proopiomelanocortin
LH	Luteinizing hormone (luteinisierendes Hormon)	PRL	Prolaktin
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone (Luteinisierendes Hormon-freisetzendes Hormon)	-R-	
LMD	Lasermikrodissektion	RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
LPH	Lipotropin	Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
-M-		RT	Reverse Transkription
M	Molar (mol/l)	-S-	
mg	Milligramm	sec	Sekunde(n)
min	Minute(n)	SPS	Stiff-person syndrome
ml	Milliliter	STH	Somatotropin
mm	Millimeter		
µm	Mikrometer		

-T-

TBE	Tris-Boratethylendiamin-tetraessigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRH	Thyreotropin releasing hormone (Thyreotropin-freisetzendes Hormon)
TSH	Thyreotropin-stimulierendes Hormon
TTP	Thymidintriphosphat

-V-

VGAT	Vesikulärer GABA-Transporter
VIAAT	Vesicular inhibitory aminoacid transporter (Vesikulärer inhibitorischer Aminosäuretransporter)

-Z-

ZNS	zentrales Nervensystem
-----	------------------------

1 EINLEITUNG

Die Hypophyse des Menschen ist ein lebensnotwendiges, zentrales Organ des menschlichen Hormonsystems. Sie ist übergeordnete Hormondrüse und gleichermaßen bedeutende, neuroendokrine Schnittstelle zwischen zentralem Nervensystem (ZNS) und peripherem Endokrinium. Somit fungiert sie als Endstrecke für zentrale neuronale Modulationen des endokrinen Systems und steuert eine Vielzahl homöostatischer Prozesse wie Wachstum, Metabolismus und Reproduktion.

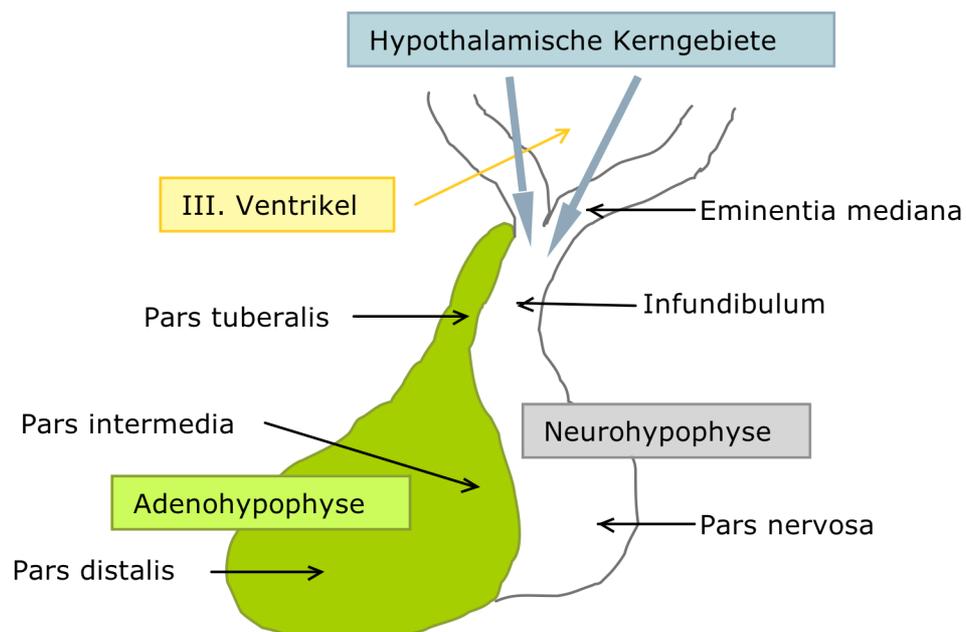
Jene zwei Eigenschaften spiegeln sich in ihrem Aufbau und in ihrer Eingliederung in die hierarchisch strukturierten Regelkreise des Hormonsystems wieder. Es bedarf einer einzigartigen anatomischen Beschaffenheit, damit wichtige morphologische und funktionelle Verbindungen zwischen nervösen und hormonellen Steuerungsmechanismen möglich sind. Zum Verständnis des Organs Hypophyse hat hierbei wesentlich das Prinzip der „Neurosekretion“ beigetragen, welches erstmalig von Ernst und Berta Scharrer beschrieben wurde [98].

1.1 DIE HYPOPHYSE

1.1.1 Morphologische und funktionelle Aspekte der Hypophyse

Die Hypophyse des Menschen besteht aus zwei eigenständigen Teilen (Abbildung 1): Adeno- und Neurohypophyse unterscheiden sich in ihrer embryologischen Herkunft sowie in morphologischen und funktionellen Aspekten [4].

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau der Hypophyse. Schematisch dargestellt ist die Hypophyse mit ihren zwei Anteilen Adeno- und Neurohypophyse. Es besteht eine morphologisch und funktionell enge Verbindung zum Hypothalamus.



Die **Adenohypophyse** lässt sich anatomisch in drei Teile gliedern (Abbildung 1): die *Pars distalis*, die *Pars intermedia*, welche beim Menschen nur noch rudimentär vorhanden ist, und die *Pars tuberalis*, welche die Fortsetzung der *Pars distalis* um den Hypophysenstiel bildet [7, 97]. Die Adenohypophyse ist durch ein Pfortadergefäßsystem funktionell mit dem Diencephalon verbunden und weist die typische Struktur eines endokrinen Drüsengewebes auf. Sie ist Bildungsort für die Gonadotropine (luteinisierendes Hormon LH/follikelstimulierendes Hormon FSH), Thyreotropin (TSH), Prolaktin (PRL), Somatotropin (STH/GH) und das Prohormon Pro-Opiomelanotropin (POMC), aus welchem durch Spaltung Adrenokortikotropin (ACTH), Lipotropin (LPH), Melanotropin (MSH) und Endorphin hervorgeht. Histologisch lassen sich fünf verschiedene endokrine Zellarten differenzieren. Ein weiterer, nicht-endokriner Zelltypus sind die Follikulären Sternzellen, die diffus verteilt in der Adenohypophyse vorkommen [116].

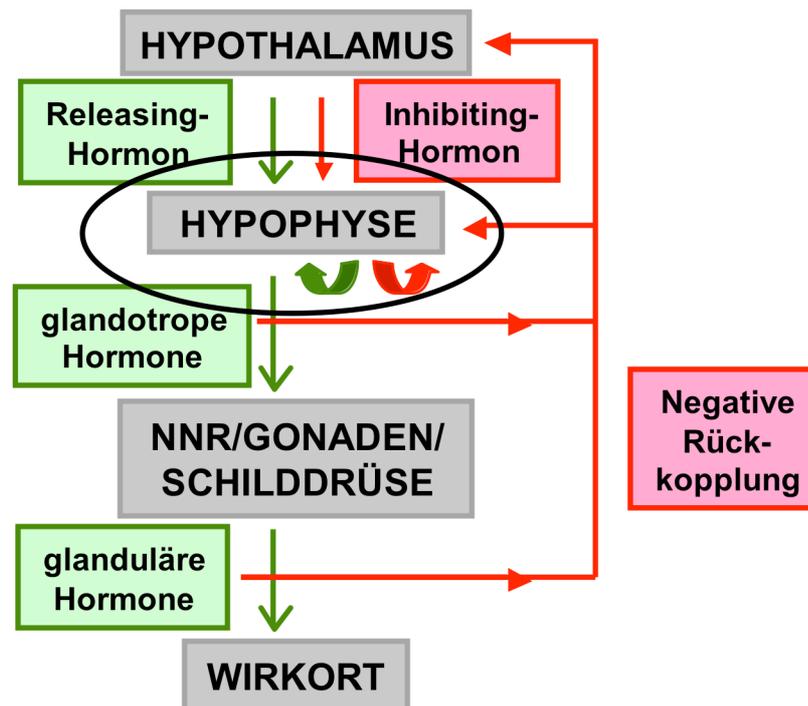
Die **Neurohypophyse** mit der *Pars nervosa*, dem *Infundibulum* und der *Eminentia mediana* besteht aus marklosen Nervenfasern neurosekretorischer Neurone, deren Perikaryen in Kerngebieten des Hypothalamus liegen. Es handelt sich somit nicht um eine hormonbildende Drüse wie die Adenohypophyse, die Neurohypophyse bildet vielmehr eine morphologische und funktionelle Einheit mit dem Hypothalamus. Für die im Hypothalamus gebildeten Effektorhormone Oxytozin und Antidiuretisches Hormon (ADH) ist die Neurohypophyse Speicherungs- und Freisetzungsort [99].

1.1.2 Extra- und intrahypophysäre Regulationsebenen der Hypophysenfunktion

Die Hypophyse ist das wichtigste übergeordnete Steuerungs- und Regelzentrum des Hormonsystems. Als lebenswichtige Hormondrüse ist sie Entstehungsort glandotroper Hormone und Freisetzungsort hypothalamischer Hormone und vermittelt zwischen zentralem Nervensystem und peripherem Endokrinium. Sie stellt zusammen mit Hypothalamus und peripheren, endokrinen Drüsen durch Regelkreise aus Stimulierung/Inhibition und negativer Rückkopplung das lebensnotwendige Hormongleichgewicht ein (Abbildung 2). Die Kontrolle über Nebennieren, Gonaden und die Schilddrüse sowie über das Körperwachstum und die Milchsekretion ist nach klassischer Vorstellung hierarchisch-vertikal gegliedert [70].

Gemäß neuerer Untersuchungen jedoch bestehen auch eine Vielzahl an intrahypophysären Modulationswegen auf horizontaler Ebene [100]. Alle Anteile der Hypophyse werden vermutlich außerdem direkt von Nervenfasern aus verschiedenen Hirnregionen innerviert [57].

Abbildung 2: Kontrollwege zwischen Hypothalamus, Adenohypophyse und den Erfolgsorganen bzw. -zellen. Dargestellt sind die zahlreichen Regelkreise aus Stimulierung/Inhibition und aus negativen Rückkopplungsmechanismen zwischen den hierarchisch gegliederten Ebenen sowie einer vertikalen Kontrollebene in der Hypophyse selbst.



Das Hypothalamus-Hypophysen-System

Im *hypothalamo-adenohypophysären System* erreichen Steuerungshormone des Hypothalamus (CRH, GnRH, TRH) die Adenohypophyse über das hypophysäre Pfortadersystem auf humoralem Weg. Die Hypophyse ihrerseits reagiert darauf mit der Bildung glandotroper Steuerungshormone (ACTH, LH/FSH, TSH) und hypophysärer Effektorhormone (STH, PRL, MSH, LPH). Glanduläre Hormone wirken inhibitorisch auf die Freisetzung der Steuerungshormone des Hypothalamus und auf die Freisetzung der glandotropen Hormone der Adenohypophyse. Diese sogenannte negative Rückkopplung erlaubt eine Feineinstellung des Hormongleichgewichts im Körper (Abbildung 2).

Neurosekretorische Neurone, deren Perikaryen in Kerngebieten des Hypothalamus (v.a. *Nuclei supraoptici* und *paraventriculares, Pars magnocellularis*) liegen, bilden die Effektorhormone Oxytozin und Antidiuretisches Hormon. Über das *hypothalamo-neurohypophysäre System* gelangen diese entlang des axoplasmatischen Flusses der Nervenfasern zur Hypophyse, werden dort zunächst gespeichert und bei Bedarf durch Exozytose in die Nähe von neurohypophysären Kapillaren freigesetzt, über die sie dann durch den systemischen Blutkreislauf zu den entsprechenden Zielzellen gelangen.

Intrahypophysäre Kontrolle

Neben den weitgehend bekannten vertikalen Kontrollmechanismen, die sich vom Hypothalamus über die Hypophyse zum jeweiligen Zielorgan erstrecken, mehrten sich in jüngerer Zeit Hinweise für horizontale Modulationswege, welche sich auf intrahypophysärer Ebene abspielen. Ein breites Spektrum an Signalmolekülen und Faktoren beeinflussen Zell-Zell-Interaktionen und tragen somit zur autokrinen/parakrinen Regulation bei [100, 101]. Dazu zählen Peptid-Wachstumsfaktoren, Zytokine, vasogene Substanzen und Neuropeptide [91]. Ein gut belegtes Beispiel ist das Activin-Inhibin-Follistatin-System, welches maßgeblich an der Kontrolle der FSH-/GH-/ACTH-Synthese und -Sekretion beteiligt ist [19]. Ein anderes System intrahypophysärer Kommunikation agiert auf Ebene der folliculären Sternzellen, über deren Netzwerk Informationen ausgetauscht werden können [39]. Diese Erkenntnisse fügen der klassischen Vorstellung der streng vertikal-hierarchischen Kontrolle der Hypophyse eine neue Dimension hinzu, nämlich die der intrahypophysären Modulation, und verändern somit maßgeblich die Anschauungsweise der hypophysären Regulation.

1.1.3 Tumoren der Hypophyse

Tumoren der Adenohypophyse sind häufig. In unselektierten Autopsieserien lag die Inzidenz sogenannter Mikroadenome ohne klinische Relevanz bei bis zu 25%. Insgesamt machen sie 10 bis 15% aller intrakraniellen Tumoren aus. Hypophysenadenome sind gutartige, epitheliale Tumoren mit ausgesprochen großer biologischer Varianz [52, 63].

Funktionell erfolgt die Einteilung der Tumoren nach ihrer endokrinen Aktivität in Prolaktinome, GH-Adenome, ACTH-, TSH-, LH/FSH-, sowie gemischtzellige GH/PRL-produzierende Hypophysentumoren [20].

Tabelle 1: Klassifikation der Hypophysenadenome nach sekretorischer Aktivität
(modifiziert nach Blossey, 2006)

Hormon	Anteil
Prolaktin	25%
Growth Hormone	15%
GH/PRL	5%
ACTH	10%
TSH	< 1%
LH/FSH	< 1%
Summe	55%
Inaktiv	45%

Syndrome der hypophysären Hypersekretion äußern sich je nach endokriner Aktivität in einer Vielzahl klinischer Erscheinungsbilder – in der Hyperprolaktinämie mit ihren Folgen, in Riesenwuchs oder Akromegalie, in der Cushing-Krankheit. Häufig dominiert die Produktion eines Hormons, es kommen aber auch plurihormonale oder sekretorisch inaktive Adenome vor.

Prolaktinome zeichnen sich durch inadäquate Sekretion von PRL aus und zählen zu den am häufigsten vorkommenden Hypophysenadenomen. Die Größe kann von der eines Mikroadenoms bis hin zum großen extrasellären Makroadenom mit Zeichen lokaler Invasivität reichen. Das klinische Erscheinungsbild ist sehr variabel und außerdem geschlechtsspezifisch, eine Häufigkeitsverteilung zugunsten des weiblichen Geschlechts wird beschrieben. Therapeutisch können durch Dopamin-Rezeptoragonisten Tumorregression und normalisierte PRL-Spiegel erreicht werden oder sie werden durch neurochirurgische Intervention behandelt [76].

GH-Adenomen ist gemein, dass sie sich über die Hypersekretion von Somatotropin definieren, aber andererseits stark in ihrem biologischen, klinischen und prognostischen Verhalten variieren. Einige sind durch chirurgische Resektion heilbar, andere zeigen eine Progression trotz maximaler chirurgischer, pharmakologischer und radiologischer

Therapie. Wiederum andere sind gekennzeichnet durch Invasivität, Destruktivität oder rezidivierendes Verhalten [110].

Echte Hypophysenkarzinome, die sich durch den Nachweis von Metastasen definieren, sind dagegen äußerst selten [52].

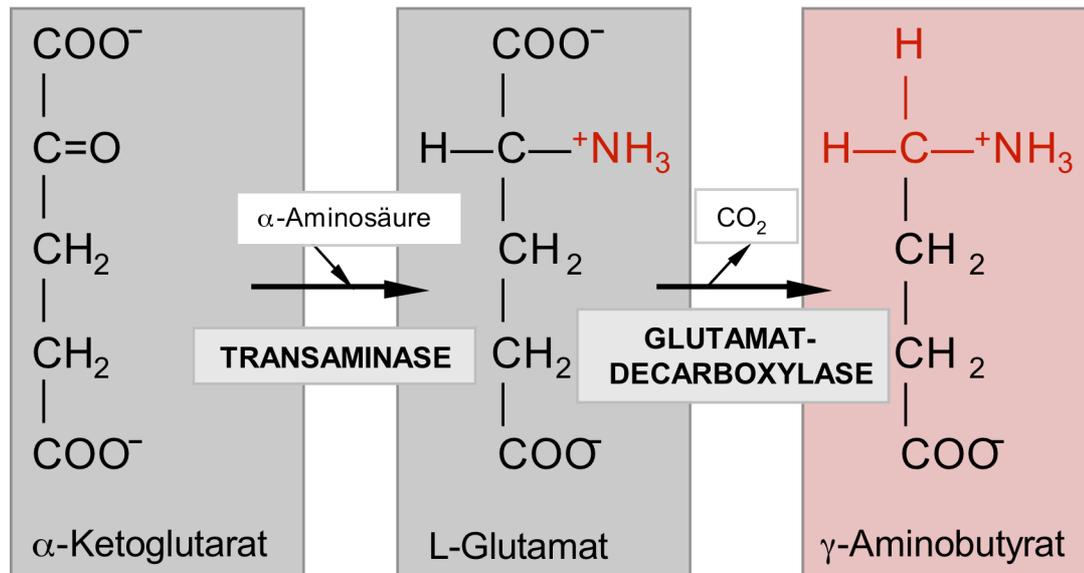
1.2 GAMMA-AMINOBUTTERSÄURE (GABA)

1950 erstmals im Gehirn von Säugetieren entdeckt wurde Gamma-Aminobuttersäure im folgenden als einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS identifiziert. Das Prinzip der Neurosekretion findet sich speziell am Beispiel der GABAergen Regulation der Hypophyse wieder. Gamma-Aminobuttersäure (GABA), von hypothalamischen Neuronen sezerniert, wirkt, indem es endokrine Zellen beeinflusst. Gegenstand jüngster Forschung ist eine bislang weitgehend unbekannte Wirkung von GABA, nämlich jene als lokales Signalmolekül. GABA wirkt auf diese Art in einer Vielzahl peripherer, endokriner Organe. Es wird lokal produziert und beeinflusst in para- und/oder autokriner Weise benachbarte Zellen. Dazu zählen endokrine Zellen des Pankreas, des Hodens, der Nebennierenrinde, und auch die Zellen der Hypophyse von Nagern.

1.2.1 Komponenten des GABAergen Systems – Synthese, Freisetzung und Rezeptoren

Die **Synthese** des Amins GABA erfolgt beim Menschen aus der nicht-essentiellen Aminosäure L-Glutamat (Abbildung 3). Dieser wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des ZNS wird durch Transaminierung aus α -Ketoglutarat gebildet. Durch pyridoxalabhängige Decarboxylierung (Abspaltung der α -Carboxylgruppe) entsteht im nächsten Schritt γ -Aminobutyrat – der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des ZNS. Katalysiert wird dieser Stoffwechselschritt durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) [85]. Die GAD-Aktivität ist der geschwindigkeitsbestimmende Stoffwechselschritt der GABA-Synthese, so dass GAD als Schlüsselenzym eines GABAergen Systems angesehen werden kann.

Abbildung 3: Synthese der Gamma-Aminobuttersäure. Aus Glutamat, welches aus α -Ketoglutarat gebildet wird, entsteht durch pyridoxalabhängige Decarboxylierung der Glutamatdecarboxylase (GAD) γ -Aminobuttersäure.



Zwei Isoformen der humanen Glutamatdecarboxylase wurden im ZNS entdeckt: Sie werden von zwei Genen kodiert und mit ihren annähernden Molekularmassen 65kDa und 67kDa beschrieben [28]. Obwohl diese zwei Isoformen im allgemeinen in GABAergen Zellen koexprimiert werden, sind sie regional und zellulär in ihrem Expressionslevel unterschiedlich reguliert.

Die **Speicherung** von GABA in Neuronen erfolgt mittels eines H^+ -Ionen gekoppelten Transportsystems, durch welches GABA in sekretorische Vesikel aufgenommen und bis zur Sekretion gespeichert wird. VIAAT/VGAT (vesicular inhibitory amino acid transporter /vesicular GABA transporter) als verantwortliches Transporterprotein speichert zugleich den ebenfalls inhibitorisch wirkenden Neurotransmitter Glycin [45]. Nicht vesikuläre GABA-Sekretion erfolgt durch den membrangebundenen GABA-Transporter (GAT 1-4) [104]. Dieser funktioniert bidirektional und dient zugleich durch GABA-Wiederaufnahme in Nervenendigungen der **Inaktivierung** von GABA. Ein weiterer Inaktivierungsweg ist

der enzymatische Abbau, durch welchen GABA durch Transaminierung und Dehydrierung zu Succinat abgebaut wird. Diese Stoffwechselschritte sind Teil des γ -Aminobutyratwegs, einem Nebenweg des Zitratzyklus. Sie werden auch als *GABA-Shunt* bezeichnet, da dies eine Umgehung der intramitochondrialen α -Ketoglutaratdehydrogenase-Reaktion darstellt [13].

Die **Rezeptoren** GABA-A und GABA-C gehören zur Großfamilie der Neurotransmitter-regulierten Ionenkanäle. Es handelt sich um membranassoziierte Glykoproteine, die durch extrazelluläre Liganden (hier GABA) aktiviert werden [21]. Die gemeinsame Grundstruktur dieser Rezeptoren basiert auf der Zusammensetzung aus fünf Proteinuntereinheiten, die einen Chloridkanal bilden. Eine Aktivierung führt typischerweise zur Hyperpolarisation der Zellmembran und bedingt somit die inhibitorische Wirkung. Der GABA-A Rezeptor setzt sich aus α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, π - und θ -Untereinheiten zusammen, die spezifische Bindungsstellen für GABA, Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden und Ethanol besitzen [66]. Funktionelle Rezeptoren enthalten immer mindestens eine α -, eine β - sowie mindestens eine Untereinheit eines weiteren Typs (γ -, δ -, ϵ -, π - oder θ -Untereinheit). GABA-C-Rezeptoren sind homo- oder heteromer aus ρ -Untereinheiten aufgebaut [37]. Die Bezeichnung des GABA-C-Rezeptors, welche sich auf Bicucullin- und Baclofen-insensitive Chlorid-Kanäle bezieht, wird bisher kontrovers diskutiert. Es könnte sich schlicht um eine Untergruppe der GABA-A-Rezeptorfamilie handeln [14, 21].

GABA-B-Rezeptoren sind ebenso wie GABA-A- und GABA-C-Rezeptoren membranständig, werden aber der Klasse der G-Protein gekoppelten Hormonrezeptoren zugerechnet [23, 24]. Funktionelle GABA-B-Rezeptoren sind Heterodimere aus zwei Untereinheiten R1 und R2, wobei die R1-Untereinheit eine spezifische Bindungsstelle für GABA und die R2-Untereinheit eine solche für das G-Protein besitzt. GABA-B-Rezeptoren sind über inhibitorische G-Proteine (G_i) an Ionenkanäle und Second-messenger Systeme gekoppelt, worüber sie eine Vielzahl an zellulären Funktionen beeinflussen.

1.2.2 GABA – Neurotransmitter und parakriner/autokriner Faktor

Bekannt ist GABA seit Jahrzehnten als der dominierende, inhibitorisch wirkende **Neurotransmitter** im Zentralnervensystem des Säugers [10, 64]. Es wird in einer großen, heterogenen Population GABAerger Neurone produziert und spielt eine

wichtige Rolle in einer Vielzahl von Verhaltensfunktionen, wie beispielsweise in der Kontrolle der motorischen Aktivität, im zirkadianen Rhythmus und im emotionalen Verhalten. Es ist außerdem in strukturelle und funktionelle Organisations- und Reorganisationsprozesse des ZNS während der Entwicklung, in der synaptischen Plastizität und der Pathogenese von Epilepsien involviert. Im speziellen während der Entwicklung des ZNS kontrolliert GABA die Zellproliferation, Neuroblastenmigration und die Reifung der Dendriten. GABA scheint noch vor Formierung von neuronalen Synapsen anfangs als parakriner Faktor zu agieren, bevor es als Neurotransmitter zunächst exzitatorisch wirkt [16, 85, 87, 92, 106].

GABA als **neuroendokriner Faktor** gelangt im hypothalamo-hypophysären System gemäß dem Prinzip der Neurosekretion auf neuronalem Weg über direkte Innervation oder indirekt auf humoralem Weg über das hypophysäre Portalsystem in die Hypophyse. Diese Untersuchungen wurden bisher vornehmlich an Nagern durchgeführt. Daten und Studienergebnisse zum Menschen sind nur begrenzt verfügbar. Die Arzneimittelwirkungen und Krankheitssymptome geben dennoch indirekt Aufschluß über diese Regulationsebene beim Menschen.

In neueren Untersuchungen wird GABA zunehmend als **lokales Signalmolekül** in peripheren Organen und Geweben entdeckt. Dazu zählen die Hypophyse, das Pankreas, die Nebennieren, der Uterus, die Ovarien, die Plazenta und der Hoden [34, 43, 44, 46-48, 69, 73]. GABA-produzierende Zellen in diesen Organen sind klar gekennzeichnet durch die Expression GABA-synthetisierender Enzyme (GAD) und durch den vesikulären GABA-Transporter, wohingegen Zielzellen GABA-A- und -C-Rezeptoren und/oder GABA-B-Rezeptoren exprimieren. Dieses periphere System scheint in Säugerorganismen konserviert zu sein, wie jüngere Arbeiten zeigen konnten. GABA, das von nicht-neuronalen Zellen synthetisiert und freigesetzt wird, steuert auf lokaler Ebene endokrine Funktionen benachbarter Zellen. Somit gewinnt eine weitere Wirkdimension der GABAergen Regulation an Bedeutung: GABA dient der para- oder autokrinen Informationsübermittlung zwischen endokrinen Zellen. Ein bekanntes, etabliertes Beispiel sind die Beta-Zellen der Pankreas-Inseln [40, 90]. Auch innerhalb der Hypophyse wurde unlängst eine solche Ebene lokaler GABAerger Regulation in Ratten und Rhesusaffen beschrieben [69]. GH-Zellen der Adenohypophyse und POMC-Zellen des Intermediärlappens stellen eine intrahypophysäre (auto-/parakrine) GABA-Quelle dar. Andere, im Hinblick auf GABA weniger genau untersuchte Organe des Menschen sind die Steroid-produzierenden Zellen der Nebennierenrinde und die

Leydig-Zellen des testikulären Interstitiums [34, 46, 47]. In einer neuesten Untersuchung wurde gezeigt, dass ein lokaler GABA-Signalweg im Respirationsepithel existiert und mit schwerem Asthma bronchiale über die Stimulation der Schleimsekretion assoziiert ist [32, 115].

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Seit langem sind eine Vielzahl an Regulationswegen entlang der hypothalamo-hypophysären Achse bekannt. Sie dienen der Aufrechterhaltung des Hormongleichgewichts und sind an der Kontrolle des hypophysären Zellwachstums und der Differenzierung beteiligt. Zum Verständnis dieser hochgradig komplexen Vorgänge gewinnen in letzter Zeit zunehmend para- und autokrine Signalwege auf intrahypophysärer Ebene an Bedeutung.

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist einer dieser Regulationsfaktoren entlang der hypothalamo-hypophysären Achse. Weiterhin wurde GABA in jüngster Zeit zunehmend als para-/autokrines Signalmolekül in mehreren peripheren, endokrinen Geweben erkannt. Eine erst kürzlich bei Nagern und Primaten entdeckte Quelle für GABA liegt in der Hypophyse selbst, nämlich in den GH-Zellen.

Ein solches intrahypophysäres GABA-System war beim Menschen bislang unbekannt. In der vorliegenden Arbeit waren daher entscheidende Zielsetzungen:

- die Untersuchung der Expression erforderlicher Komponenten für ein funktionsfähiges GABA-System in der menschlichen Hypophyse (GAD 65 und 67, VGAT und GABA-Rezeptoren),
- die zelluläre Lokalisation der GABA-Synthese,
- die ergänzende Untersuchung der Bestandteile des GABAergen Systems in Hypophysenadenomen und insbesondere in GH-Adenomen und damit
- die Identifikation möglicher Unterschiede zu tumorös veränderten Hypophysen.

2 MATERIAL

2.1 GEWEBE

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Hypophysen und Hypophysentumoren entstammen Gewebearchiven des Anatomischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München, des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Basel (Schweiz) und der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Eine Zusammenfassung aller untersuchten, humanen Gewebeproben, ihrer Herkunft und der jeweils verwendeten Methoden ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der Gewebeproben der humanen Hypophysen und Hypophysenadenome, die für Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), Immunhistochemie (IHC) und Lasermikrodissektion (LMD) mit anschließender RT-PCR verwendet wurden.

Gewebe		Geschlecht	Alter	Methode	Herkunft
Humane Hypophysen					
Hypophyse 1	gefroren	weiblich	>40	RT-PCR	München
Hypophyse 2		männlich	84		
Hypophyse 3		weiblich	56		
Hypophyse 4		männlich	45		
Hypophyse 5		männlich	94		
Hypophyse 6		weiblich	57		
Hypophyse 7	in Paraffin eingebettet	weiblich	86	RT-PCR IHC	Basel
Hypophyse 8		männlich	85	RT-PCR	
				IHC	
Hypophyse 9		weiblich	87	RT-PCR IHC LMD	
	RT-PCR				
Hypophyse 10		männlich	74	RT-PCR	

				IHC	
GH-Adenome					
Tumor 2	gefroren	männlich	51	RT-PCR	Hamburg
Tumor 3		männlich	31		
Tumor 4		männlich	33		
Tumor 7		weiblich	44		
Tumor 8		männlich	18		
Tumor 12		männlich	38		
Tumor 15		männlich	39		
Tumor 19		weiblich	46		
Tumor 20	in Paraffin eingebettet	männlich	53	RT-PCR	Basel
Tumor 21		männlich	48	IHC	
Tumor 22		unbekannt	unbekannt	IHC	München
Gemischtzellige STH-PRL-Adenome					
Tumor 1	gefroren	weiblich	74	RT-PCR	Hamburg
Tumor 5		männlich	46		
Tumor 9		männlich	37		
Tumor 10		weiblich	24		
Tumor 11		männlich	40		
Tumor 14		weiblich	36		
Tumor 16		weiblich	42		
Tumor 17		männlich	48		
Tumor 18		weiblich	39		
Gonadotropes Adenom					
Tumor 6	gefroren	weiblich	41	RT-PCR	Hamburg
Nullzell-Adenom					
Tumor 13	gefroren	weiblich	81	RT-PCR	Hamburg
Prolaktinome					
Tumor 23	in Paraffin eingebettet	unbekannt	unbekannt	RT-PCR	München
Tumor 24		männlich	68	IHC	Basel

Menschliche Hypophysen (Tabelle 2, Hypophysen 1-6) wurden im Zuge von Obduktionen entnommen, eingefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Sie wurden dann für RNA (Ribonukleinsäure)-Extraktion und RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion) verwendet.

Die untersuchten menschlichen GH-Adenome, die gemischtzelligen GH/PRL-Adenome, das gonadotrope Adenom und das Nullzell-Adenom (Tabelle 2, Tumoren 1-19) stammten allesamt von Patienten, die sich einer neurochirurgischen Behandlung unterziehen mußten. Nach transnasaler Resektion wurden die Gewebeproben eingefroren und bei -80°C gelagert bis RNA extrahiert und RT-PCRs durchgeführt wurden. Alle Patienten erklärten sich schriftlich einverstanden, dass Gewebe und Daten für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden können.

Außerdem wurden humane Hypophysen und Hypophysentumoren untersucht (Tabelle 2, Hypophysen 7-10, Tumoren 20-24), welche in Bouins Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet weiteren Untersuchungen wie LMD (Lasermikrodissektion), RT-PCR und IHC (Immunhistochemie) zur Verfügung standen.

Die wissenschaftliche Untersuchung aller aufgeführten menschlichen Hypophysen und Tumoren wurde durch die jeweiligen Ethikkommissionen der Universitäten Basel, Hamburg und München begutachtet und genehmigt.

2.2 OLIGONUKLEOTID-PRIMER

Genspezifische Oligonukleotid-Primer wurden anhand publizierter Sequenzen der GenBank entworfen und von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, so dass Exon-Intron-Grenzen eingeschlossen wurden (Tabelle 3). Dies läßt die Identifizierung einer möglichen DNA-Kontamination anhand der abweichenden Größen der entstehenden Reaktionsprodukte zu.

Die Primer für GABA-Rezeptoren wurden so ausgewählt, dass sie typische Untereinheiten des GABA-A-Rezeptors ($\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheit), des GABA-B-Rezeptors (R1- und R2-Untereinheit) und des GABA-C-Rezeptors ($\rho 2$ -Untereinheit) identifizieren [71].

Tabelle 3: Aufführung der Oligonukleotid-Primer mit GenBank-Zugangsnummer und Größe des erwarteten PCR-Fragments (bp)

Zielgen	Primer Sequenz	Länge (bp)	Position	Genbank-Zugangsnummer
GAD 65	5'-ATG CCT CCT ACC TCT TTC AG-3' 5'-CAC CAT CTC ATA TCC TTC TC-3'	218	1406-1425 1623-1604	NM_000818
GAD 67	5'-ACT GGC TGA ATA CCT CTA TG-3' 5'-CCC AGT CTT TCT ATC TCC TC-3'	318	2005-2024 2322-2303	NM_000817
	5'-GGT ATA TTC CAC AAA GCC TC-3' 5'-ACC ATG GTC GTA CCT GAC TC-3'	115	2097-2116 2211-2192	
VGAT	5'-ACG ACC TCG ACT TTG AGC AC-3' 5'-ATG AGG ATC TTG CCG GTG TA-3'	358	382-401 739-720	NM_080552
	5'-CCG TGT CCA ACA AGT CCC AG-3' 5'-TCG CCG TCT TCA TTC TCC TC-3'	490	307-326 796-775	
	5'-GCA GAT GGA CAT CCT GAA AG-3' 5'-CGG CGA AGA TGA TGA GAA AC-3'	293	437-456 729-708	
GABA-A- β 3	5'-GCT TCG TCT TTG TGT TCC TG-3' 5'-TCG AGG CAT GCT CTG TTT CC-3'	290	1077-1096 1366-1347	NM_000814
GABA-A- γ 2	5'-CAG CGA TGG ATC TCT TTG-3' 5'-GTC CAT TTT GGC AAT GCG-3'	329	1224-1241 1552-1535	NM_000816
GABA-B-R1	5'-CTG GCC TAT GAT GCT ATC-3' 5'-CGG AAT GTC TTG ATG ACC-3'	351	1639-1656 1989-1972	NM_001470
GABA-B-R2	5'-CAT CAT CTT CTG CAG CAC-3' 5'-TCA GTG AAG TTT CCC AGG-3'	354	2312-2329 2665-2648	AF_095784
GABA-C- ρ 2	5'-TGG AAG CTA CAG TGA GTC TG-3' 5'-CAA TGG CAT GGG TAT TCT GG-3'	191	1214-1233 1404-1385	XM_004253

Die GenBank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide) diente als Datenbank für DNA-Sequenzen. Basierend darauf wurden die Primer mit folgenden Software-Anwendungen erstellt: Primerselect™, EditSeq™ und MegAlign™ (GATC Biotech AG).

2.3 ANTIKÖRPER

Die in Tabelle 4 aufgeführten spezifischen Primär- und Sekundärantikörper wurden zur immunhistochemischen Anfärbung von Paraffinschnitten verwendet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper mit der jeweils verwendeten Verdünnung für immunhistochemische Untersuchungen und Lasermikrodissektion (LMD)

Erkanntes Antigen	Isotyp und Spezies des Antikörpers	Verwendete Verdünnung	Herkunft
Growth Hormone	Polyklonales Kaninchen-IgG	1:100	Signet Pathologies Systems
GAD ¹	Polyklonales Kaninchen-IgG	1:300	DPC Biermann
VGAT ²	Polyklonales Kaninchen-IgG	1:2000	Bruno Gasnier, Ph.D., Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris/Frankreich
GA- α 1	Polyklonales Kaninchen-IgG	1:100	Alomone Labs
GA- β 2/3	Polyklonales Maus-IgG	1:200	Upstate biotechnology
GB-R2	Polyklonales Kaninchen-IgG	1:1000	Graham Disney, Ph.D., Cellular Sciences Division, GlaxoWellcome, Stevenage/Großbritannien
Kaninchen-IgG	Polyklonales Ziegen-Antiserum, biotinyliert	1:500	Dianova
Maus-IgG	Polyklonales Ziegen-Antiserum, biotinyliert	1:500	

¹ erkennt beide Isoformen 65 und 67

² auch VIAAT (Vesicular inhibitory aminoacid transporter) genannt

2.4 LÖSUNGEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen sind wie folgt zusammengesetzt. H₂O wurde zweifach destilliert verwendet. Die Prozentangaben entsprechen Gewichtsprozent.

Citratpuffer

Stammlösung A: 12,01g=0,1mol Zitronensäure ad 1000ml Aqua bidest.

Stammlösung B: 29,41g=0,1mol Na-3-citrat ad 1000ml Aqua bidest.

DAB (Diaminobenzidin)-Stammlösung: 0,05g DAB ad 10ml Tris/HCl-Puffer

DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H₂O: 500µl DEPC in 1l H₂O über Nacht rühren lassen

Desoxynukleotid (dNTP)-Mix (2mM/10mM): 2mM/10mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H₂O-DEPC

DNA-Auftragspuffer (6x): 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 40% Saccharose

Elektrophoresepuffer (10x, 1l): 30,28g Tris (Trishydroxymethylaminomethan); 144,12g Glycin; 10g SDS: pH 8,3

PBS (Phosphate buffered saline) (10mM, 1l): 0,386g NaH₂PO₄ x H₂O; 1,282g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 8,776g NaCl: pH 7,4

TBE-Puffer (Trisboratethylendiamintetraessigsäure) (5x, 1l): 4g Tris; 27,5g Borsäure; 20ml 0,5M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure): pH 8,0

Tris/HCl-Puffer (50mmol): 6,06g Tris; 38,9ml HCl: pH 7,6

2.5 HERSTELLEVERZEICHNIS

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

AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland

Alomone labs, Jerusalem, Israel

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf, Deutschland

Cambrex Bioscience, Rockland, USA

DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland

DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
Genra Systems, Minneapolis, USA
Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland
IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Leica GmbH, Bensheim, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MJ Research, Watertown, USA
MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, USA
P.A.L.M. GmbH, Bernried, Deutschland
Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
QIAGEN AG, Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Signet Pathologies Systems Inc., Dedham, USA
Upstate biotechnology, Lake Placid, USA
Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zeiss Jena GmbH, München, Deutschland

3 METHODEN

3.1 IMMUNHISTOCHEMIE

Von Paraffinblöcken humaner Hypophysen, von GH-Adenomen und von Prolaktinomen wurden mit dem Mikrotom SM 2000 R (Leica) 5µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Objektträger gezogen (Tabelle 2, Hypophysen 7-10, GH-Adenome 20-22, Prolaktinome 23 und 24). Diese wurden bei 37°C über 24h getrocknet, bevor sie zur immunhistochemischen Untersuchung nach der Avidin-Biotin-Peroxidase Methode [26, 41] zur Verfügung standen.

Dazu wurden Paraffinschnitte dieser Gewebe zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert:

- Xylol 2x 5min
- 100% Isopropanol 2x 3min
- 90% Isopropanol 2x 3min
- 80% Isopropanol 2x 3min
- 70% Isopropanol 1x 3min
- Bewegen in lauwarmen H₂O für 5min.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Für die Waschschrte, welche zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten durchgeführt wurden, fand PBS 10mM Verwendung. Zunächst wurden die Schnitte mit H₂O₂ 0,06% (in PBS 10mM) und Methanol 1% (in PBS 10mM) für 20min inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren, welche eine unspezifische Färbung verursachen können. Zur Demaskierung fixierungsbedingter Epitopveränderungen wurden die Schnitte in Citratpuffer 10mM (9ml Stammlösung A, 41ml Stammlösung B, 450ml Aqua bidest.) in einem Mikrowellengerät 15min lang auf 100°C erhitzt und anschließend 20min bei Raumtemperatur abgekühlt [33]. Es folgte ein Permeabilisierungsschritt mit Saponin 0,5% (in PBS 10mM). Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen im Gewebe über einen Dauer von 30min mit 5%-igem Normalserum der Spezies des 2. Antikörpers blockiert. Die Inkubation des 1. Antikörpers in 5%-igem Normalserum erfolgte über Nacht bei 4°C. Bei allen immunhistochemischen Experimenten wurden jeweils Negativkontrollen durchgeführt, bei denen entweder PBS 10mM, Kaninchen-Normalserum oder ein unspezifisches Kaninchen-IgG-Gemisch eingesetzt wurde. Der 2. Antikörper in 5%-igem Normalserum wurde anschließend auf alle Proben gegeben (auch auf die Kontrolle) und für 2h belassen. Die eigentliche Immunfärbung wurde mit

der Avidin-Biotin-Komplex-Methode erreicht (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories). Zunächst erfolgte die Inkubation mit ABC-Lösung (1000µl PBS 10mM, 10µl A, 10µl B) für 2h bei Raumtemperatur, nachfolgend eine 2-minütige Behandlung mit Tris/HCl-Puffer sowie eine 10-minütige Inkubation mit DAB(Diaminobenzidin)-Lösung (2500ml Tris/HCl 50mmol, 250µl DAB-Stammlösung, 1µl H₂O₂ 30%). Durch die Peroxidasewirkung der an die Antikörper gebundenen Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplexe wird eine Braunfärbung des chromogenen Substrats DAB katalysiert. Die Reaktion wurde 1min lang in Aqua dest. gestoppt. Es folgte die Behandlung in einer aufsteigenden Xylol-Isopropanol-Reihe zur Entwässerung

- Isopropanol 70%: 10sec
- Isopropanol 80%: 2x 20sec
- Isopropanol 90%: 2x 20sec
- Isopropanol 100%: 2x 20sec
- Xylol: 2x 5min

und das Eindecken mit Entellan (Merck). Für Aufnahmen und Digitalisierung wurde ein Mikroskop (Axioplan, Zeiss) mit einer integrierten Digitalkamera (Fine Pix/s 2 pro, Fujifilm) verwendet. Diese Methode fand auch Anwendung, um die Kolo-kalisation von GH, GAD und VGAT in Konsekutivschnitten zu untersuchen und um GH-Zellen für die nachfolgende Lasermikrodissektion zu kennzeichnen.

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 RNA-Präparation

RNA wurde aus gefrorenen Hypophysen und Hypophysentumoren mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN) extrahiert. Dabei wurde gemäß den Herstellerangaben verfahren. Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis, alle Zentrifugationsschritte in der Mikrozentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) bei 4°C statt. Kleine Stücke von gefrorenem humanem Hypophysengewebe und Hypophysentumoren (Tabelle 2, Hypophysen 1-6, Tumoren 1-19) wurden mit einem Rotator-Stator Homogenisierer (Ultra-Turrax, IKA Labortechnik) in 600µl RNase-freiem, Guanidinisothiocyanat-haltigem Puffer (RLT-buffer, versetzt mit 1% β-Mercaptoethanol) homogenisiert. Die denaturierende Zusammensetzung des Puffers bewirkte eine Zerstörung der Zellmembran sowie eine Inaktivierung der im Gewebe enthaltenen RNasen. Mittels einer Silicagel-Membran der RNeasy-Säulen konnten RNA-Moleküle (>200bp) pH-abhängig gebunden werden.

Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die gereinigte RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Nach der Isolation konnte durch Extinktionsmessung bei $\lambda=260\text{nm}$ (A_{260}) photometrisch die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden.

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die so extrahierte RNA wurde entweder gleich weiterverarbeitet in einer RT-PCR oder bei -80°C aufbewahrt.

Zusätzlich dienten in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von humanen Hypophysen und Hypophysentumoren (Tabelle 2, Hypophysen 7-10, Tumoren 20-24) sowie immunhistochemisch markierte und durch Lasermikrodissektion isolierte GH-Zellen als RNA-Quelle. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (Verfahren s.o.) entparaffinisiert und gänzlich mit einem Skalpell vom jeweiligen Objektträger gekratzt. Die RNA-Extraktion aus abgekratztem Material und aus lasermikrodissezierten GH-Zellen wurde mit Hilfe des Purescript kit (Gentra Systems) gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden dabei lysiert, zunächst vorhandene DNA und Proteine präzipitiert und präzipitierte RNA in RNase-freiem Wasser resuspendiert (Endvolumen $5\mu\text{l}$). Alle Arbeitsschritte wurden wiederum auf Eis, alle Zentrifugationsschritte in der Mikrozentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) bei 4°C durchgeführt. Isolierte RNA wurde entweder bei -80°C aufbewahrt oder rasch weiterverwendet für eine folgende RT-PCR.

3.2.2 Reverse Transkription (RT)

Mittels Reverser Transkriptionen von zellulärer RNA mit anschließenden Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden Gensequenzen, welche für Komponenten des GABA-Systems kodieren, amplifiziert. Die Erststrangsynthese wurde mit Superscript II Reverser Transkriptase (Life Technologies), Zufallshexameren (MWG Biotech) und weiteren Reagenzien von Invitrogen ausgeführt. In Tabelle 5 ist der Reaktionsansatz für ein Endvolumen von $20\mu\text{l}$ aufgeführt. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis, alle Zentrifugationsschritte in der Mikrozentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) bei 4°C statt. Zunächst wurde die in RNase-freiem Wasser resuspendierte RNA ($1\mu\text{g}$) mit den Hexameren und H_2O -DEPC zur Denaturierung der RNA und Anlagerung der

Primer an die mRNA-Stränge für 10min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe für 1min auf Eis abgekühlt und der 1st strand buffer, DTT, dNTPs und RNasin hinzugefügt und bei 25°C für 10min inkubiert. SuperScript II wurde hinzugegeben, und es erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 52min, Denaturierung bei 70°C über 15min und Abkühlung auf 4°C. Die so gewonnene cDNA wurde entweder direkt zur Durchführung einer PCR verwendet oder bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption einer verdünnten Lösung bei 280nm gemessen.

$$C_{DNA} = A_{280} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Durchführung einer Reversen Transkription

Reagenzien	Volumen (μl)
RNA in DEPC-H ₂ O*	10,7μl
p(dN ₆)	0,8μl
5x 1 st strand buffer	4μl
0,1M DTT	2μl
dNTPs* (10mM)	1μl
RNasin (40U/μl)	0,5μl
SuperScript II (200U/μl)	1μl
Gesamtvolumen	20μl

*bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Teilen

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis bestimmter cDNA-Moleküle in humanen Hypophysen und Hypophysentumoren (eingefrorenes Gewebe und Paraffinsschnitte) sowie in GH-Zellen (aus Paraffinsschnitten durch LMD gewonnen) diente die Polymerasekettenreaktion (PCR) [79]. Mit dieser Methode konnten DNA-Sequenzen mittels spezifischer Primer

(GAD 65, GAD 67, VGAT und GABA-Rezeptoruntereinheiten) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* automatisiert amplifiziert werden [30, 95]. Dazu fand ein Reaktionsansatz wie in Tabelle 6 aufgeführt Anwendung. Alle Reagenzien wurden von Promega bezogen. Die PCR wurde mit dem automatisierten Thermocycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz zur Durchführung einer Polymerase Kettenreaktion

Reagenzien	Volumen (μl)
10x Taq-buffer	5 μl
MgCl ₂ (25mM)	3 μl
dNTPs* (2mM)	5 μl
H ₂ O-DEPC	33,5 μl
3'-Primer (50 μM)	1 μl
5'-Primer (50 μM)	1 μl
RT-PCR-Template	1 μl
Taq-Polymerase (20U/ μl)	0,5 μl
Gesamtvolumen	50 μl

*bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Teilen

In einen Mix aus dNTPs, dem Taq-buffer, MgCl₂ und DEPC-H₂O wurde der 3'- und 5'-Primer sowie die in der RT-PCR amplifizierte cDNA hinzugefügt. In jeder PCR-Serie wurde ein Kontrollansatz mituntersucht, wobei der Ersatz des RT-PCR-Templates durch die entsprechende Menge DEPC-H₂O erfolgte. Die Bedingungen für PCR-Amplifikationen aller Experimente bestanden aus einem 5min-Hot Start zur Denaturierung des Templates bei 94°C, nach welcher die Taq-Polymerase hinzugegeben wurde. Es folgten 35 Zyklen, die jeweils aus einer Dissoziationsphase der doppelsträngigen cDNA-Moleküle (94°C für 30sec), einer Primer-Annealingphase an den Sense- und Antisense-Strang (55°C für 60sec) und einer Elongationsphase zur Resynthese des komplementären DNA-Strangs (70°C für 30sec) bestanden. Abschließend fand eine Extensionsphase für 10min bei 72°C statt, bevor die Ansätze

bis zur Aufbewahrung bei -20°C oder direkten elektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gekühlt wurden. Die verwendeten genspezifischen Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Für die cDNA-Amplifikation von GAD 67, was aus Material entparaffinierter Gewebsschnitte und lasermikrodissezierter GH-Zellen gewonnen wurde, wurde zur Erhöhung der Sensitivität methodisch eine „nested-PCR“ gewählt. Eine erste PCR (PCR I) wurde durchgeführt. Zur Elimination von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen wurde das Produkt aus PCR I mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt und in ein Endvolumen von $10\mu\text{l}$ konzentriert. Dies erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern und Säulen, an deren Silicagel-Membran über diverse Wasch- und Zentrifugationsschritte DNA-Fragmente $>70\text{bp}$ salz- und pH-Wert-abhängig gebunden und gereinigt werden. $5\mu\text{l}$ des purifizierten Produktes wurden sodann als Template für eine zweite PCR (PCR II) eingesetzt, entsprechend verringerte sich die Menge an $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ auf $29,5\mu\text{l}$. Die Grenzen des nun eingesetzten „nested-Primer“-Paares lagen innerhalb der in der ersten PCR amplifizierten Sequenz.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Visualisierung der in der PCR amplifizierten Gen-Fragmente erfolgte über elektrophoretische Auftrennung und Detektion der fluoreszierenden DNA-Banden. Dazu wurde zu $10\mu\text{l}$ PCR-Ansatz $3\mu\text{l}$ DNA-Auftragspuffer hinzugefügt und auf ein 2%-iges Agarosegel (SeaKem LE, Cambrex Bioscience) aufgetragen. Das Agarosegel wurde mit 1x TBE-Puffer unter Zugabe des Farbstoffes Ethidiumbromid ($5\mu\text{g/ml}$) hergestellt. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Kammer (Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories GmbH) bei 100V für 35min durchgeführt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TBE-Puffer. Die durch UV-Licht erreichte orangefarbene Fluoreszenz ($\lambda_{\text{em}}=590\text{nm}$) der mit Ethidiumbromid angereicherten DNA-Banden wurden auf einem UV-Leuchttisch ($\lambda_{\text{exc}}=302\text{nm}$) visualisiert und mit einer Kamera (ST50, Sony) digitalisiert. Die Bestimmung der Fragmente erfolgte durch Größenvergleich mit einem 100bp DNA-Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™ 100bp DNA ladder, Fermentas).

3.2.5 Sequenzierung

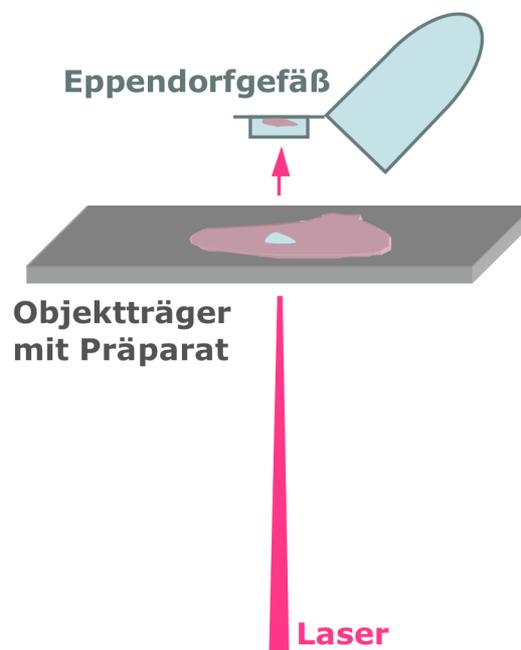
Die Verifikation der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels Sequenzierung. Zur Elimination von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Alternativ erfolgte die Aufreinigung ausgeschnittener DNA-Banden aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Beide Verfahren richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern und Säulen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend von einem kommerziellen Dienst (AGOWA) mit den jeweiligen PCR-Primern direkt sequenziert. Ihre Übereinstimmung wurde mit der jeweiligen Sequenz der GenBank (National Center of Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health) durch MegAlign™ (GATC Biotech AG) oder der BLAST-Software (basic local alignment search tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) [3] überprüft.

3.3 LASERMIKRODISSEKTION

Für die selektive Isolierung von RNA aus GH-Zellen wurde die Methode der Lasermikrodissektion (LMD) gewählt [42, 43, 49]. Nach reverser Transkription schlossen sich dann spezifische PCR-Untersuchungen an. Dazu wurden 1,35µm dünne Polyethylen-Naphthalen-Membranen (P.A.L.M. GmbH) mittels 100%-igem Isopropanol faltenfrei auf einen Objektträger gezogen und mit Nagellack an den Rändern fixiert. Die Objektträger wurden getrocknet und es folgte eine 30-minütige Bestrahlung der Objektträger mit UV-Licht. Von in Paraffin eingebetteten humanen Hypophysen wurden 5 bis 10µm dünne Gewebeschnitte angefertigt und anschließend auf die Polyethylen-Naphthalen-Membran der vorbereiteten Objektträger gezogen. Alternativ wurden PALM MembraneSlides (P.A.L.M. GmbH) verwendet. Es folgte die Entparaffinisierung und Immunfärbung mit GH-Antiserum nach oben beschriebenem Verfahren (s. 3.1 Immunhistochemie, allerdings keine Mikrowellenbehandlung und keine entwässernde alkoholische Reihe am Schluß). Für die anschließende „non-contact“ Lasermikrodissektion fand die PALM® Robot-MicroBeam Technology (P.A.L.M. GmbH) Anwendung, eine Verbindung der Technik der Laser Microbeam Microdissection (LMM) mit der des Laser Pressure Catapulting (LPC). Der Laserstrahl des Stickstofflasers ist auf einen Durchmesser von unter 1µm beschränkt und führt zu keiner Hitzeeinwirkung auf das benachbarte Gewebe. Somit konnten immunhistochemisch angefärbte GH-

Zellen einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 9) präzise unter mikroskopischer Kontrolle ausgeschnitten werden. Mittels Energieerhöhung des Lasers um 40% und eines defokussierten Laserimpulses konnte die ausgeschnittene GH-Zellgruppe dann direkt in den Deckel eines Eppendorfgefäßes katapultiert werden (Abbildung 4). Zur Kontrolle der Spezifität wurden in den gleichen Gewebeschnitten GH-Zellen gezielt durch Laserschüsse zerstört, mit benachbarten, ungefärbten Zellen herausgeschnitten und in den Deckel eines Eppendorfgefäßes katapultiert. Diese Proben dienen als Negativkontrollen. Alle gesammelten Zellproben wurden in 50 µl RNA/ater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) bei -80°C aufbewahrt bis RNA-Extraktion, reverse Transkription und nested-PCR durchgeführt wurden.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lasermikrodissektion. Immunhistochemisch angefärbte Zellen werden mit einem Stickstofflaser ausgeschnitten und in einen darüber befestigten Deckel eines Eppendorfgefäßes katapultiert.

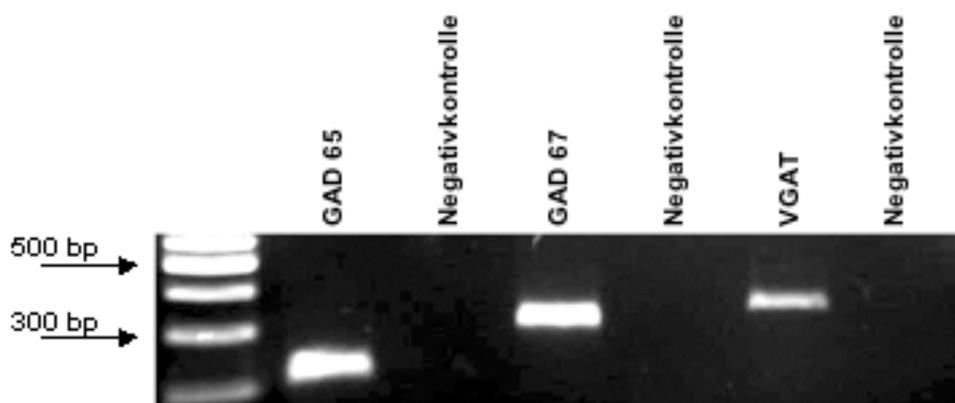


4 ERGEBNISSE

4.1 GABA-SYNTHESE UND GABA-SPEICHERUNG IN DER HUMANEN HYPOPHYSE

Um die für die GABA-Synthese und GABA-Speicherung notwendigen Bestandteile in der menschlichen Hypophyse zu untersuchen, wurden RT-PCRs mit Gewebeproben aus sechs humanen Hypophysen durchgeführt (Tabelle 2, Hypophysen 1-6). In allen konnte der Nachweis von GAD 65, GAD 67 und des vesikulären GABA-Transporters geführt werden. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse beispielhaft an einer Hypophyse dargestellt.

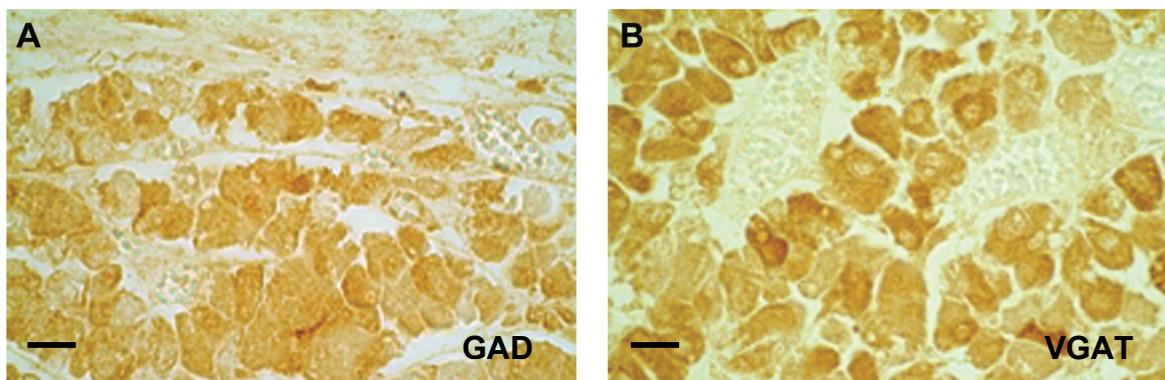
Abbildung 5: RT-PCR-Untersuchung von Komponenten des GABA-Syntheseapparates in einer humanen Hypophyse. Die Ergebnisse belegen die Existenz des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD mit den beiden Isoformen 65 und 67 und des vesikulären GABA-Transporters VGAT beispielhaft in einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 3). Die Kontrollen (Ersatz des Templates durch DEPC-H₂O) blieben negativ.



Zur weiteren Abklärung dieser Ergebnisse wurden zusätzlich zwei weitere humane Hypophysen untersucht (Tabelle 2, Hypophysen 7 und 9). Dazu wurden entparaffinierte Schnitte von ihren jeweiligen Objektträgern gekratzt und für weitere RNA-Extraktion und RT-PCR genutzt. Diese Untersuchungen verdeutlichen ebenfalls die Existenz von GAD 67.

Um diese Resultate auf Proteinebene zu bestätigen, kamen Antiseren und der immunhistochemische Nachweis gegen GAD und VGAT an entparaffinisierten Hypophysenschnitten zur Anwendung (Tabelle 2, Hypophysen 7-10). Das Antiserum gegen GAD erkennt beide Isoformen (65 und 67) des GABA-produzierenden Enzyms, und lässt somit keine weitere Unterscheidung zwischen der Expression der zwei Isoformen zu. Diese immunhistochemischen Untersuchungen zeigten GAD und VGAT über den ganzen Vorderlappen verteilt in Zellen der vier untersuchten humanen Adenohypophysen. Alle Kontrollen (Kontrollfärbung mit PBS anstelle des primären spezifischen Antikörpers) waren negativ. Abbildung 6 zeigt die immunhistochemische Anfärbung am Beispiel einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 10).

Abbildung 6: Immunhistochemische Untersuchungen von Komponenten der GABA-Synthese in einer humanen Hypophyse. Die histologischen Schnitte zeigen positive Färbungen für GAD (A) und VGAT (B) in einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 10). Balken = 10µm. Eine Kontrollfärbung ohne primären spezifischen Antikörper blieb negativ (nicht dargestellt).

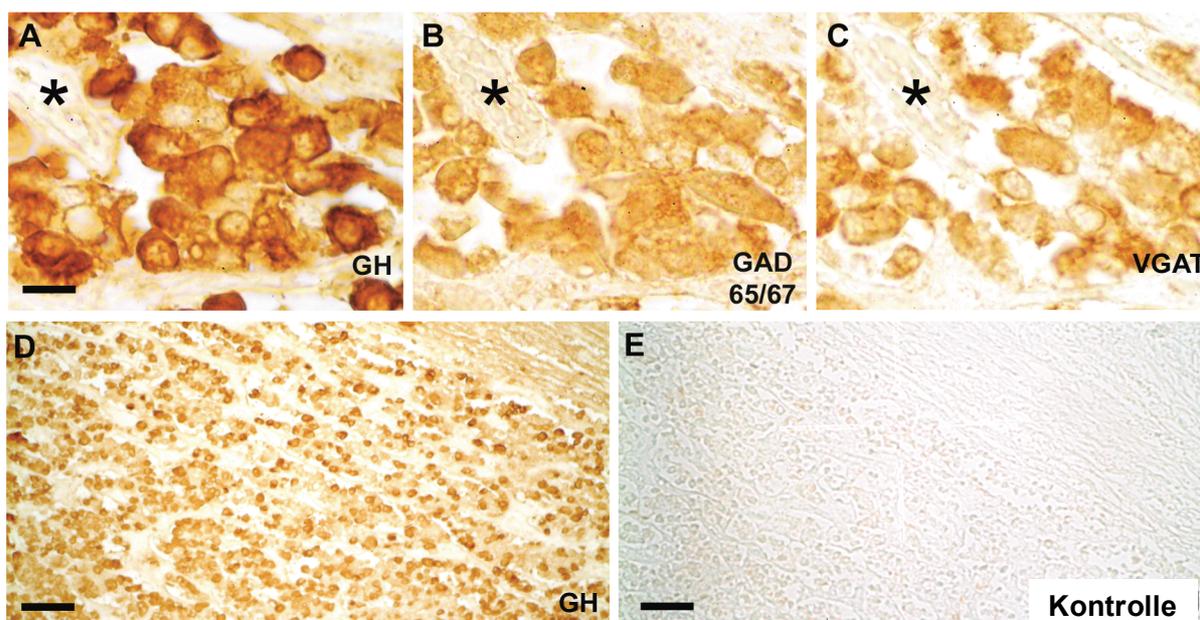


4.2 LOKALISATION DES GABA-SYNTHESEAPPARATES IN GH-ZELLEN DER HUMANEN HYPOPHYSE

Aufgrund der Ergebnisse in nicht-humanen Spezies (Ratte/Rhesusaffe) [69] lag die Vermutung nahe, dass GH-Zellen die Quelle für GABA auch in der menschlichen Hypophyse sein könnten. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde deshalb der Versuch unternommen, die zelluläre Kolokalisation von GAD und VGAT in GH-Zellen

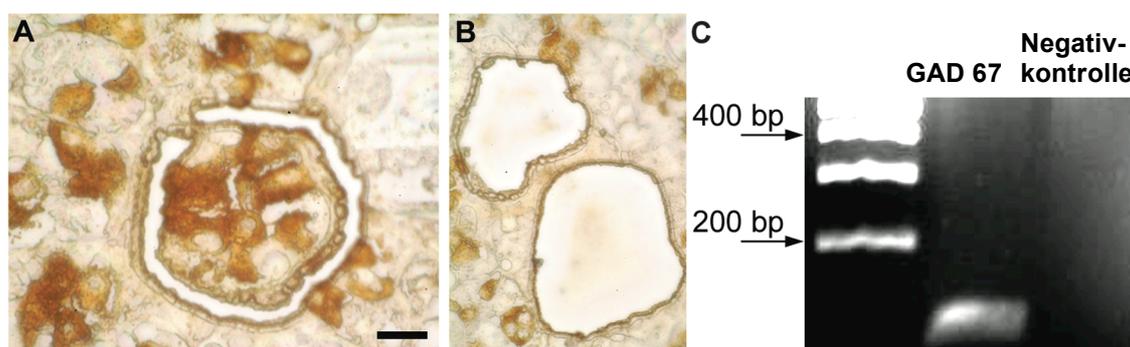
der Adenohypophyse zu demonstrieren. Konsekutivschnitte einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 8) wurden immunhistochemisch, in Sequenz für GH, GAD und VGAT angefärbt. Die Ergebnisse zeigen Zellgruppen endokriner Zellen, welche sich in allen drei angefärbten Gewebeschnitten entsprechen (Abbildung 7). Dies legt den Schluß nahe, dass GAD und VGAT in GH-Zellen präsent sind.

Abbildung 7: A-C. Zelluläre Kolokalisation von GH, GAD 65/67 und VGAT in konsekutiven histologischen Schnitten einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 8). Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte zeigen korrespondierende endokrine Zellgruppen, welche die Kolokalisation von GAD und VGAT in GH-Zellen indizieren. Balken = 10µm, * Markierung eines Blutgefäßes zu Orientierungszwecken. **D.** Übersicht immunhistochemisch angefärbter GH-Zellen. Balken = 40µm. **E.** Negativkontrolle, ohne primär spezifischen Antikörper. Balken = 80µm.



Um diese Resultate weiter abzuklären, wurde Immunhistochemie mit Lasermikrodissektion und sich daran anschließender RT-PCR kombiniert. Eine humane Hypophyse wurde mit Antiserum gegen GH immungefärbt (Tabelle 2, Hypophyse 9). GH-Zellen wurden mittels Lasermikrodissektion isoliert, RNA wurde extrahiert und eine nested-PCR durchgeführt. GAD 67-mRNA konnte somit in diesen GH-Zellen gezeigt und durch Sequenzierung verifiziert werden (Abbildung 8).

Abbildung 8: Identifikation von GAD 67 in GH-Zellen mittels Lasermikrodissektion in einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 9). **A.** Isolation einer GH-Zellgruppe mittels des Laserstrahls. Balken = 10µm. **B.** Zurückbleibendes Gewebe nach Katapultieren der ausgeschnittenen GH-Zellen. **C.** Ergebnisse der nachfolgenden RT-PCR Studie: Identifizierung des GABA-produzierenden Enzyms GAD 67 in GH-Zellen einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 9). Der Kontrollansatz (Ersatz des Templates durch DEPC-H₂O) blieb negativ.



4.3 GABA-SYNTHESE IN GH-ADENOMEN

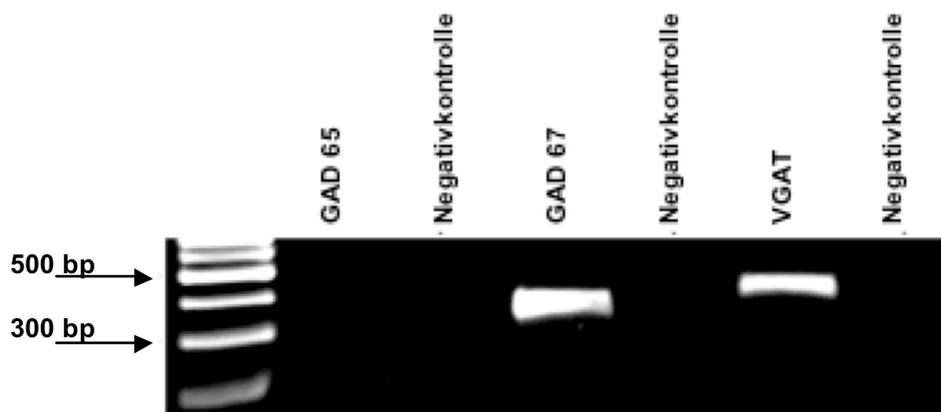
Nach dem Nachweis von Komponenten der GABA-Synthese und -Speicherung in humanen Hypophysen und der Lokalisation des GABA-produzierenden Enzyms GAD 67 in GH-Zellen, folgten Untersuchungen mit der Fragestellung, ob Adenome, die von GH-Zellen abstammen, ebenfalls GAD und VGAT exprimieren und somit die Voraussetzung zur GABA-Synthese besitzen (Tabelle 2, Tumoren 2-4, 7, 8, 12, 15, 19). Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen. Während die Präsenz von GAD 67 mRNA in allen acht GH-Adenomen demonstriert werden konnte, war die Identifizierung von GAD 65 ausschließlich in einer Probe (Tumor 8) möglich. VGAT war nur in der Hälfte der Tumoren nachweisbar (Tumoren 2, 4, 8, 15). Abbildung 9 stellt beispielhaft die Ergebnisse eines GH-Adenoms dar (Tabelle 2, Tumor 4).

Tabelle 7: Zusammenfassung von RT-PCR-Untersuchungen. Die Tabelle zeigt die Untersuchungsergebnisse von Komponenten der GABA-Synthese (GAD 65, GAD 67, VGAT) in GH-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 2-4, 7, 8, 12, 15, 19).

	Tumor 2	Tumor 3	Tumor 4	Tumor 7	Tumor 8	Tumor 12	Tumor 15	Tumor 19
GAD								
65	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	+	N.N.	N.N.	N.N.
67	+	+	+	+	+	+	+	+
VGAT								
	+	N.N.	+	N.N.	+	N.N.	+	N.N.

*N.N. = nicht nachweisbar

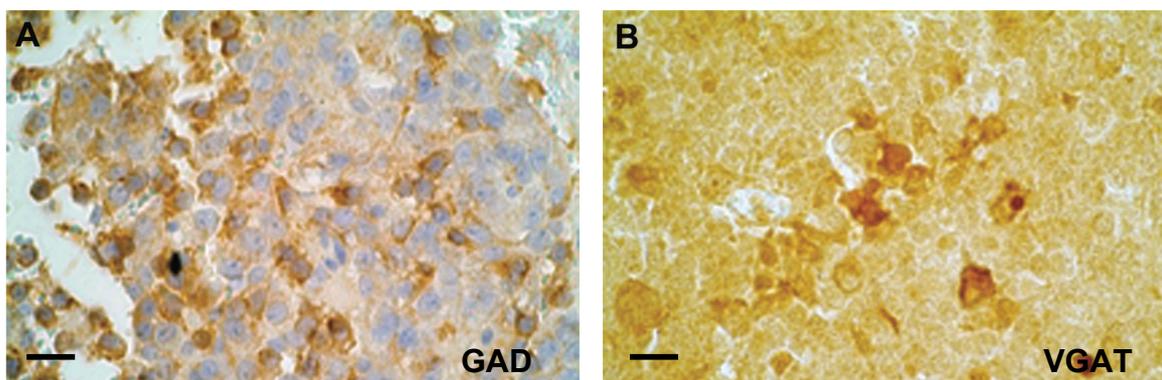
Abbildung 9: RT-PCR-Untersuchungen von Komponenten der GABA-Synthese in einem GH-Adenom. Die Isoform GAD 65 des GABA-synthetisierenden Enzyms fehlt, wohingegen die Isoform GAD 67 und der Vesikuläre GABA-Transporter (VGAT) in einem beispielhaft ausgewählten GH-Adenom vorhanden sind (Tabelle 2, Tumor 4). Kontrollen (Ersatz des Templates durch DEPC-H₂O) zeigen ein negatives Ergebnis.



Außerdem zeigte eine nested-PCR-Untersuchung eines Paraffinschnitts von einem GH-Adenom (Tabelle 2, Tumor 20), welcher für weitere RNA-Extraktion und RT-PCR-Untersuchungen vom Objektträger gekratzt wurde, ebenfalls die Existenz von GAD 67.

Immunhistochemisches Anfärben zweier GH-Adenome (Tabelle 2, Tumoren 21 und 22) für GAD und VGAT wies nach, dass GH-Adenome beide Proteine exprimieren (Abbildung 10). Kontrollfärbungen mit PBS anstelle des primären spezifischen Antikörpers blieben unauffällig.

Abbildung 10: Immunhistochemische Untersuchungen von Komponenten der GABA-Synthese in GH-Adenomen. Die histologischen Schnitte zeigen positive Färbungen für **A.** GAD in einem GH-Adenom (Tabelle 2, Tumor 22) und **B.** VGAT in einem GH-Adenom (Tabelle 2, Tumor 21). Balken = 10µm. Kontrollfärbungen ohne primären spezifischen Antikörper blieben ungefärbt (nicht dargestellt).



4.4 GABA-SYNTHESE IN GEMISCHTZELLIGEN ADENOMEN, PROLAKTINOMEN, EINEM GONADOTROPEN ADENOM UND EINEM NULLZELL-ADENOM

Die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen von Komponenten der GABA-Synthese und -Speicherung in gemischtzelligen GH/PRL-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16-18) sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. GAD 65 war wiederum nur in einer Minderheit, nämlich in zwei von neun gemischtzelligen Adenomen nachweisbar

(Tumoren 5 und 10). GAD 67 konnte hingegen in acht von neun dieser Tumoren (Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16, 18) detektiert werden. In Tumor 17 waren beide Isoformen (65 und 67) nicht exprimiert. Der GABA-Transporter VGAT konnte in sieben der neun Adenome demonstriert werden (Tumoren 9-11, 14, 16-18).

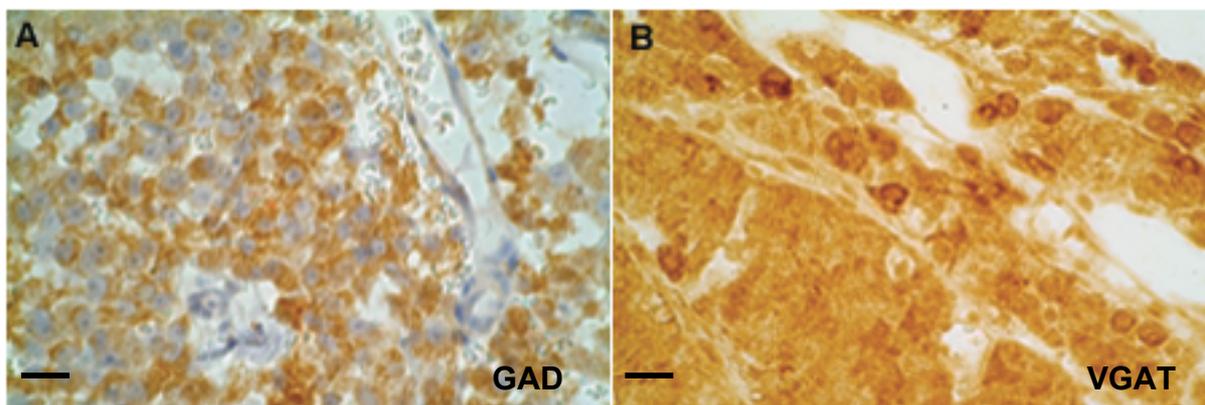
Tabelle 8: Zusammenfassung von RT-PCR-Untersuchungen. Die Tabelle zeigt die Untersuchungsergebnisse von Komponenten der GABA-Synthese (GAD 65, GAD 67, VGAT) in gemischtzelligen Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16-18).

	Tumor 1	Tumor 5	Tumor 9	Tumor 10	Tumor 11	Tumor 14	Tumor 16	Tumor 17	Tumor 18
GAD									
65	N.N.	+	N.N.	+	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.
67	+	+	+	+	+	+	+	N.N.	+
VGAT	N.N.	N.N.	+	+	+	+	+	+	+

*N.N. = nicht nachweisbar

Immunhistochemische Untersuchungen zweier Prolaktinome (Tabelle 2, Tumoren 23 und 24) erbrachten den Nachweis von GAD und VGAT auf Proteinebene in beiden Präparaten. Abbildung 11 zeigt positive Färbungen von GAD und VGAT in diesen Prolaktinomen. Kontrollfärbungen mit PBS anstelle des primären spezifischen Antikörpers zeigten keine Färbung.

Abbildung 11: Immunhistochemische Untersuchungen von Komponenten der GABA-Synthese in Prolaktinomen. Die histologischen Schnitte ergaben positive Färbungen für **A.** GAD in einem Prolaktinom (Tabelle 2, Tumor 23) und **B.** VGAT in einem Prolaktinom (Tabelle 2, Tumor 24). Balken = 10µm. Kontrollfärbungen ohne primären spezifischen Antikörper blieben ohne Anfärbung (nicht dargestellt).



Auch ein gonadotropes Adenom (Tabelle 2, Tumor 6) sowie ein Nullzell-Adenom (Tabelle 2, Tumor 13) wurden mittels RT-PCR untersucht. In beiden Tumoren war GAD 65 nicht nachweisbar. GAD 67 und VGAT hingegen konnten in beiden Tumoren demonstriert werden.

4.5 EXPRESSION VON GABA-REZEPTORUNTEREINHEITEN IN HUMANEN HYPOPHYSEN UND HYPOPHYSENADENOMEN

Für die Untersuchung der GABA-Rezeptoren wurden typische Untereinheiten des GABA-A-, GABA-B- und GABA-C-Rezeptors gewählt [71]. Um die Expression dieser Untereinheiten zu prüfen, wurden RT-PCR-Untersuchungen von sechs humanen Hypophysen (Tabelle 2, Hypophysen 1-6), acht GH-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 2-4, 7, 8, 12, 15, 19), neun gemischtzelligen GH/PRL-Adenomen, (Tabelle 2, Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16-18), einem gonadotropen Adenom (Tabelle 2, Tumor 6) und einem Nullzell-Adenom (Tabelle 2, Tumor 13) durchgeführt. Es wurden spezifische Primer (Tabelle 3) für jede der untersuchten Untereinheiten verwendet und anschließend mittels Sequenzierung geprüft.

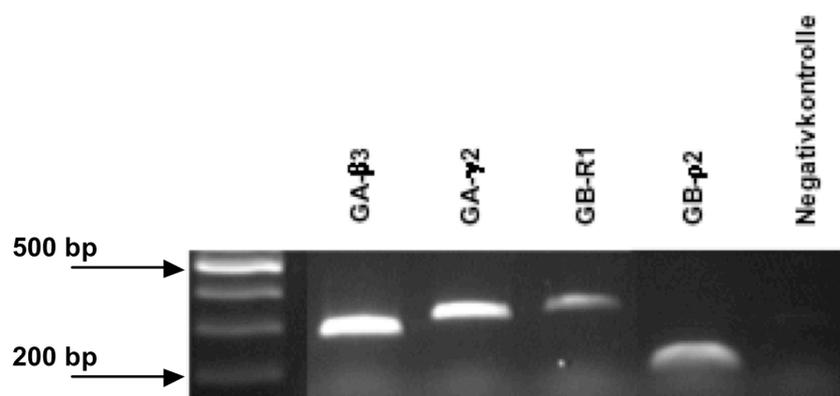
Die Ergebnisse (Tabelle 9) beweisen in allen Gewebeproben der humanen Hypophysen die mRNA-Expression der $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, die R1-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors und die $\rho 2$ -Untereinheit des GABA-C-Rezeptors. Die R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors konnte in nur einer humanen Hypophyse (Hypophyse 5) demonstriert werden. In Abbildung 12 ist die Expression verschiedener Untereinheiten beispielhaft an einer Hypophyse dargestellt (Tabelle 2, Hypophyse 1).

Tabelle 9: Zusammenfassung von RT-PCR-Untersuchungen. Die Tabelle zeigt den Nachweis mehrerer Untereinheiten der drei GABA-Rezeptoren A, B und C in humanen Hypophysen (Tabelle 2, Hypophysen 1-6).

		Hypophyse 1	Hypophyse 2	Hypophyse 3	Hypophyse 4	Hypophyse 5	Hypophyse 6
GABA-A	$\beta 3$	+	+	+	+	+	+
	$\gamma 2$	+	+	+	+	+	+
GABA-B	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	N.N.*	N.N.	N.N.	N.N.	+	N.N.
GABA-C	$\rho 2$	+	+	+	+	+	+

*N.N. = nicht nachweisbar

Abbildung 12: RT-PCR-Untersuchung verschiedener Rezeptoruntereinheiten in einer humanen Hypophyse. Das Ergebnis zeigt die Existenz der $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, der R1-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors und der $\rho 2$ -Untereinheit des GABA-C-Rezeptors in einer Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 1). Kontrollansätze zu jeder Untereinheit (Ersatz des Templates durch DEPC- H_2O) blieben negativ.



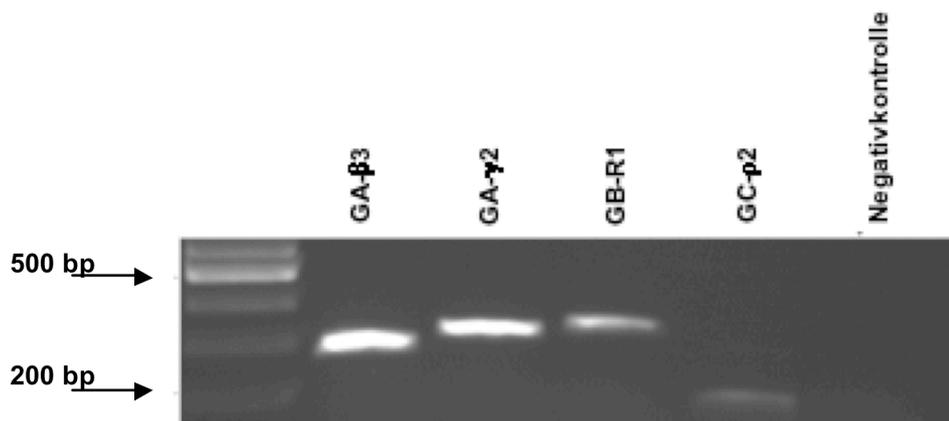
Die in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse zeigen die Expression der β 3- und γ 2-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, die R1-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors und die ρ 2-Untereinheit des GABA-C-Rezeptors in allen untersuchten GH-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 2-4, 7, 8, 12, 15, 19). Die R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors konnte in der Hälfte der GH-Adenome demonstriert werden (Tumoren 2-4, 7). Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Expression verschiedener GABA-Rezeptoruntereinheiten in einem GH-Adenom (Tabelle 2, Tumor 4).

Tabelle 10: Zusammenfassung von RT-PCR-Untersuchungen. Die Tabelle zeigt den Nachweis mehrerer Untereinheiten der drei GABA-Rezeptoren A, B und C in GH-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 2-4, 7, 8, 12, 15, 19).

	Tumor 2	Tumor 3	Tumor 4	Tumor 7	Tumor 8	Tumor 12	Tumor 15	Tumor 19
GABA-A								
β 3	+	+	+	+	+	+	+	+
γ 2	+	+	+	+	+	+	+	+
GABA-B								
R1	+	+	+	+	+	+	+	+
R2	+	+	+	+	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.
GABA-C								
ρ 2	+	+	+	+	+	+	+	+

*N.N. = nicht nachweisbar

Abbildung 13: RT-PCR-Untersuchungen von Rezeptoruntereinheiten des GABA-A-, -B- und -C-Rezeptors in einem GH-Adenom. Das Ergebnis zeigt die Existenz der β 3- und γ 2-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, der R1- und R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors und der ρ 2-Untereinheit des GABA-C-Rezeptors beispielhaft in diesem GH-Adenom (Tabelle 2, Tumor 4). Kontrollansätze (Ersatz des Templates durch DEPC-H₂O) blieben negativ.



Der Nachweis der β 3- und γ 2-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors und der ρ 2-Untereinheit des GABA-C-Rezeptors gelang wiederum in allen untersuchten gemischtzelligen GH/PRL-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16-18 und Tabelle 11). Die R1-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors wurde in allen bis auf ein Adenom (Tumor 17) exprimiert, die R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors konnte nur in einem gemischtzelligen GH/PRL-Adenom demonstriert werden (Tumor 5).

Tabelle 11: Zusammenfassung von RT-PCR-Untersuchungen. Die Tabelle zeigt den Nachweis mehrerer Untereinheiten der drei GABA-Rezeptoren A, B und C in gemischtzelligen Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 1, 5, 9-11, 14, 16, 17, 18).

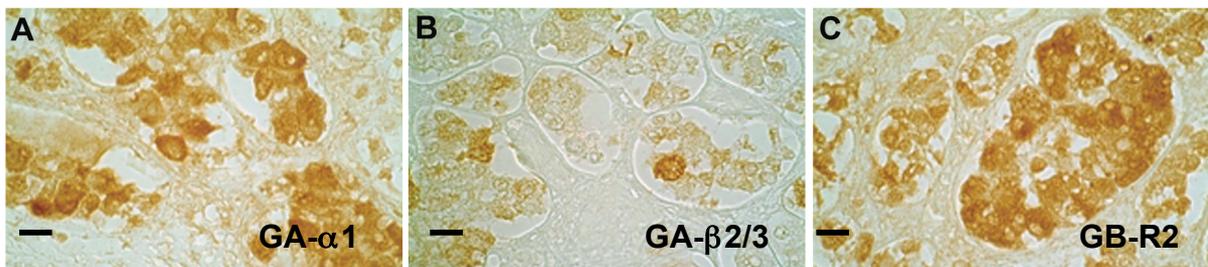
	Tumor 1	Tumor 5	Tumor 9	Tumor 10	Tumor 11	Tumor 14	Tumor 16	Tumor 17	Tumor 18
GABA-A									
β3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GABA-B									
R1	+	+	+	+	+	+	+	N.N.	+
R2	N.N.	+	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.
GABA-C									
ρ2	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*N.N. = nicht nachweisbar

Die mRNA-Expression der β3- und γ2-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, der R1-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors und der ρ2-Untereinheit des GABA-C-Rezeptors waren auch in dem untersuchten gonadotropen Adenom (Tabelle 2, Tumor 6) und Nullzell-Adenom (Tabelle 2, Tumor 13) nachweisbar. Die R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors wurde bei diesen beiden Tumoren hingegen nur im gonadotropen Adenom exprimiert (Tumor 6).

Auch auf Proteinebene gelang der Nachweis von GABA-Rezeptoruntereinheiten. In zwei humanen Hypophysen (Tabelle 2, Hypophyse 8 und 9), zwei GH-Adenomen (Tabelle 2, Tumoren 20 und 22) und zwei Prolaktinomen (Tabelle 2, Tumoren 23 und 24) stellten sich Zellen bei immunhistochemischer Anfärbung gegen die Untereinheiten GABA-A-α1, GABA-A-β2/3 und GABA-B-R2 positiv dar. Beispielhaft ist dies für eine humane Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 8) in Abbildung 14 dargestellt. Kontrollfärbungen mit PBS anstelle des primären spezifischen Antikörpers blieben negativ.

Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchungen von GABA-Rezeptoruntereinheiten in einer humanen Hypophyse. Die histologischen Schnitte zeigen eine positive Färbung für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA-A-Rezeptors (**A**), für die $\beta 2/3$ -Untereinheit des GABA-A-Rezeptors (**B**) und für die R2-Untereinheit des GABA-B-Rezeptors (**C**) in einer humanen Hypophyse (Tabelle 2, Hypophyse 8). Balken = 10 μ m. Kontrollfärbungen ohne primären spezifischen Antikörper blieben negativ (nicht dargestellt).



5 DISKUSSION

GABA, welches über Jahrzehnte als der inhibitorische Neurotransmitter des Zentralnervensystems von Säugern betrachtet wurde, wird in den letzten Jahren zunehmend als neuroendokriner Faktor und als lokal agierendes, para- und autokrin wirkendes Signalmolekül identifiziert. Als solches spielt es nicht nur eine maßgebliche Rolle in der Entwicklung des ZNS sondern auch in der Regulation einer Reihe peripherer endokriner und nicht-endokriner Gewebe. Darüber hinaus scheint es auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen und der Entstehung von Tumoren involviert zu sein. Ein solches GABAerges System der menschlichen Hypophyse und deren Tumoren wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden.

5.1 DAS LOKALE GABA-ERGE SYSTEM - PARA- UND/ODER AUTOKRINE SIGNALWEGE IN DER HYPOPHYSE

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Untersuchungen identifizieren zum ersten Mal humane hypophysäre GH-Zellen und humane GH-Adenome als Syntheseorte von GABA. Ferner wurden Komponenten der GABA-Synthese und -Speicherung (GAD und VGAT) sowie GABA-Rezeptoren (A, B und C) in der menschlichen Hypophyse und in unterschiedlichen Hypophysenadenomen nachgewiesen. Somit konnten in diesen Geweben jene Bestandteile, welche für ein funktionierendes GABA-System essentiell sind, sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene identifiziert werden. Die Resultate früherer Publikationen werden also bestätigt: nicht nur GH-Zellen der Hypophysen von Nagern und Primaten [43, 44, 69], sondern auch jene der menschlichen Hypophyse und GH-Adenome besitzen GABA-produzierende Enzyme. Somit sind diese humanen Zellen für die GABA-Synthese ausgestattet. Der Nachweis von VGAT weist darauf hin, dass gesundes und tumorös verändertes hypophysäres Gewebe in der Lage ist, synthetisiertes GABA in Vesikeln zu speichern. Der Nachweis verschiedener Untereinheiten der GABA-Rezeptoren impliziert, dass hypophysäre Zellen gleichzeitig auch Zielzellen einer GABAergen Wirkung sind. Dies erlaubt jedoch keine Rückschlüsse auf die Zellart, auf die Rezeptorkonfiguration aus Untereinheiten oder auf deren Funktion. Dennoch lassen die Daten auf GABA als lokal regulierendes Signalmolekül in der humanen Hypophyse und in humanen Hypophysenadenomen schließen.

In früheren Studien wurden in Hypophysen von Nagern und Rhesusaffen und in GH3-Zellen der Ratte GABA-Produktion, GABA-Speicherung und GABA-Rezeptoren nachgewiesen. Insbesondere kommen GAD 67, der vesikuläre GABA-Transporter und GABA in GH-Zellen und POMC-Zellen dieser Säuger vor. GABA-A- und GABA-B-Rezeptoruntereinheiten sind in allen endokrinen Zellen und GABA-C-Rezeptoruntereinheiten in TSH-Zellen der Adenohypophyse vorhanden [17, 18, 22, 69]. In GH-Zellen der Rattenhypophyse und in GH3-Zellen wurden ρ -Untereinheiten des GABA-C-Rezeptors gefunden, wo sie funktionsfähige Chloridkanäle bilden [44]. Ebenfalls in GH-produzierenden Zellen der Rattenhypophyse und in GH3-Zellen wurde gezeigt, dass GABA-B-Rezeptoren an der Synthese und Freisetzung von GH beteiligt sind [43]. Die Wirkung von GABA in der Hypophyse scheint jedoch nicht nur auf die autokrine Regulation der GH-Zellen beschränkt zu sein, sondern erstreckt sich auch auf die Beeinflussung anderer Hypophysenzellen in parakriner Weise. Untersuchungen an Tieren zeigten, dass GABA über GABA-A- und GABA-B-Rezeptoren einen modulierenden Einfluß auf die Freisetzung aller wichtigen Hypophysenhormone hat [5, 81]. Dazu zählen GABAerge Kontrollmechanismen der Sekretion von ACTH, GH, LH, PRL und TSH. Somit präsentiert sich GABA als ergänzender Regulator der Hypophysenfunktion von Nagern und impliziert eine bedeutende Rolle von GABA in der Regulation dieser übergeordneten endokrinen Drüse.

Eine andere hypophysäre Zellart, welche hinsichtlich eines lokalen Kommunikationssystems auf hypophysärer Ebene bereits gründlich untersucht wurde, ist die der follikulären Sternzellen. Sie stehen durch ihre langen Fortsätze untereinander, mit den endokrinen Zellen und mit den Kapillaren in Kontakt und bilden so ein dreidimensionales Netzwerk. Außerdem fungieren sie als Stützzellen, besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose, und man nimmt eine Funktion als pluripotente Stammzelle an, von welcher aus es zu einer Differenzierung in die einzelnen endokrinen Zellen kommt [54, 55]. Dieses Netzwerk könnte dazu beitragen, die sekretorische Aktivität hypophysärer Zellen über die Modulierung der elektrischen Übertragung und der interzellulären Kalzium-Signalwege zu synchronisieren [105]. Follikuläre Sternzellen sezernieren parakrine Faktoren, die lokal wirken und die endokrine Funktion der Hypophyse modulieren [2]. In diesem Zusammenhang und im Zusammenspiel anderer vertikaler Kommunikations- und Regulationswege ist die Rolle GABAerger Mechanismen noch weitgehend unerforscht.

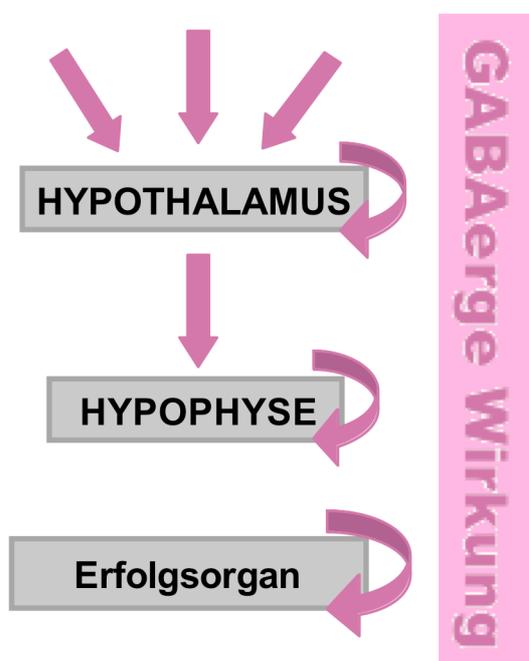
Ob und in welchem Ausmaß die Ergebnisse an Nagerhypophysen auch für die humane Hypophyse zutreffen, ist bisher nicht untersucht. Das Eingreifen von GABA in die menschliche Hypophysenfunktion ist aber indirekt und nur ungenau an der Wirkung GABA-modulierender Pharmaka erkennbar oder an Erkrankungen, die pathogenetisch mit dem GABA-Metabolismus verknüpft sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten allerdings durch das Vorhandensein von Komponenten der Synthese und Speicherung und von GABA-Rezeptoren auf die Existenz von GABAergen para-/autokrinen Signalwegen auch in der humanen Hypophyse hin. Es wurde nachgewiesen, dass insbesondere eine bestimmte Zellart, die GH-Zellen, für die GABA-Synthese verantwortlich sein könnte.

5.2 GABAERGE REGULATION AUF VERSCHIEDENEN HIERARCHIEEBENEN DES SÄUGERORGANISMUS

GABA, das vor mehr als 50 Jahren als inhibitorischer Neurotransmitter des Zentralnervensystems entdeckt wurde, hat seitdem einen enormen Wandel seiner Wirkdimensionen erfahren [10, 25, 64]. Zur Funktion der Informationsübermittlung über eine Synapse sind die Rolle als neuroendokriner Faktor und jüngst die eines lokal modulierenden Signalmoleküls hinzugekommen.

Diese Funktionsebenen sind im hypothalamo-hypophysären Organsystem von Nagern gut belegt [89, 96] (Abbildung 15). Hypothalamische Neurone verwenden GABA als Neurotransmitter zur synaptischen Informationsübermittlung, indem sie mit ihren Axonen direkt an hypophysären endokrinen Zellen, den POMC-Zellen, endigen [111]. Die Pars nervosa der Neurohypophyse wird ebenfalls durch GABAerge Neurone direkt innerviert [83]. Andererseits projizieren hypothalamische Neurone mit ihren Nervenfasern in den Perivaskulärraum des Infundibulums und der Eminentia mediana, wo sich auch das vorgeschaltete erste Kapillarnetz des hypophysären Portalsystems befindet. Von dort gelangt GABA als neuroendokriner Faktor indirekt mit dem Blutstrom in das zweite Kapillarkonvolut der Adenohypophyse, von wo es Einfluß auf endokrine Zellen nimmt [77, 89, 107]. Die Bedeutung dieser Regulation ist bei Nagern gut belegt. Im speziellen kontrolliert GABA dort die Sekretion der Hormone ACTH, GH, LH, PRL und TSH [1, 5, 36, 43, 44, 81, 114]. Die Rolle von GABA als lokaler parakriner/autokriner Faktor in Nagerhypophysen ist erst vor kurzem gezeigt worden und ist in 5.1 ausführlich beschrieben [43, 44, 69].

Abbildung 15: Schematische Übersicht der bisher identifizierten GABA-Regulationsebenen. GABA wirkt auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene sowie auf Ebene der Zielorgane/-zellen. Außerdem existieren neuronale und neuroendokrine GABAerge Verbindungswege zwischen Hypothalamus und Hypophyse.



Beim Menschen zeigen andere Publikationen, dass GABA, das von nicht-neuronalen Zellen synthetisiert wird, endokrine Funktionen auf lokaler Ebene in peripheren endokrinen Geweben und Organen steuert. Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit sprechen für ein solches lokales GABAerges Regulationssystem auch in der humanen Hypophyse. Ein eingehend untersuchtes und etabliertes Beispiel sind die endokrinen Zellen des Pankreas. In den Pankreasinseln kommt GABA in vergleichbaren Konzentrationen wie im Zentralnervensystem vor. Zusammen mit Insulin wird GABA von depolarisierten Beta-Zellen bei hypoglykämischer Stoffwechsellage über Ca^{2+} -abhängige Exozytose sezerniert. Dabei nimmt es über die Aktivierung von GABA-A-Rezeptoren Einfluß auf Alpha-Zellen, indem es die Glukagon-Sekretion inhibiert [40, 90] [35, 94]. Die Expression von funktionellen GABA-B-Rezeptoren in Beta-Zellen wurde ebenfalls beschrieben [27]. Die Aktivierung jener Rezeptoren steigert die Insulin- und Glukagon-Sekretion [86]. Beta-Zellen exprimieren ebenfalls GABA-A-

Rezeptoren, so dass ein parakriner sowie autokriner Wirkmechanismus von GABA wahrscheinlich ist.

Auch im Hoden und in der Nebennierenrinde wurde ein solches GABAerges System vor kurzem beschrieben. GABA reguliert als lokal agierender auto-/parakriner Faktor vermutlich die Leydig-Zell-Funktion im Hoden. Mehrere Untereinheiten des GABA-A- und GABA-B-Rezeptors sowie die Isoform GAD 67 konnten im Hoden des Menschen nachgewiesen werden. In TM3-Leydigzellen, einer murinen Leydig-Zelllinie, wurde gezeigt, dass GABA durch GABA-A-Rezeptoren die Proliferation dieser Zellen stimuliert. Gen Array, Western Blot und semiquantitative RT-PCR Experimente zeigten, dass GABA und der GABA-A-Rezeptor Agonist Isoguvacin den Transkriptionsfaktor *egr-1* in TM3-Zellen induzieren und eine Proliferationssteigerung zur Folge haben. Andererseits konnte jene durch den GABA-A-Antagonisten Bicucullin blockiert werden. Western Blot-Experimente lassen darauf schließen, dass GABA vermittelt über GABA-A-Rezeptoren die MAP-Kinasen ERK 1/2 in TM3 Zellen phosphoryliert und somit in einen enzymatisch aktiven Zustand überführt [34, 46, 47].

Ebenso wurde in der humanen Nebennierenrinde GAD 67 und VGAT sowie GABA-A- und GABA-B-Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen. In H295R-Zellen, einer humanen adrenokortikalen Tumorzelllinie, gelang es zu zeigen, dass der GABA-B-Rezeptor Agonist Baclofen zu einer Inhibition von T-Typ Calciumströmen führt. Somit interagiert GABA über GABA-B-Rezeptoren mit einem für die Steuerung der Steroid-Biosynthese bedeutenden Signalweg. Dies weist darauf hin, dass Steroidzellen der Nebennierenrinde GABA synthetisieren, speichern und eine para-/autokrine Wirkung entfalten [73].

GABA scheint als lokales Signalmolekül an der Kontrolle einer Reihe von Homöostaseprozessen des Säugerorganismus eine bedeutende Rolle zu spielen. Nicht nur im Zusammenhang mit der Regulation endokriner Vorgänge in unterschiedlichen Organen, sondern auch in der Entwicklung des Nervensystems und auch in der Kontrolle von Zellmigration und -proliferation konnte gezeigt werden, dass GABA regulatorische Wirkung entfaltet.

5.3 HYPOPHYSENADENOME, DER VERLUST VON GAD 65 UND MÖGLICHE FOLGEN

Die Mechanismen der Tumorgenese in endokrinem Gewebe unterscheiden sich beträchtlich von denjenigen in nicht-endokrinem Gewebe. Beispielsweise sind typische

Onkogene oder Tumorsuppressorgene (z.B. ras oder p53), welche in sonstigen Tumoren gewöhnlich vorkommen, in Hypophysentumoren sehr selten. Stattdessen scheinen die gleichen Hormone, welche die normale Hypophysenfunktion regulieren, und die gleichen Wachstumsfaktoren, welche in der normalen fetalen Hypophysenentwicklung eine Rolle spielen, in die Tumorgenese hypophysärer Tumoren involviert zu sein [116]. Die Genese hypophysärer Tumoren kann als Folge einer Fehlfunktion auf hypothalamischer Ebene verstanden werden, wenn trophische Faktoren übermäßig oder negative Regulatoren vermindert auf die Hypophyse einwirken. Jedoch könnte auf hypophysärer Ebene auch ein genetischer Defekt einer einzelnen Zelle primäres Ereignis sein und die Tumorentstehung initiieren. Dabei sind „Gain-of-function“-Defekte (z.B. Mutationen in der Alpha-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins in GH-Adenomen) oder „Loss-of-function“-Defekte (z.B. verminderte Somatostatin-Expression in GH-sezernierenden Tumoren) von großer Bedeutung [116]. Diese Annahme wird von jenen Untersuchungsergebnissen bestätigt, die aufzeigen, dass fast alle Hypophysentumoren monoklonalen Ursprungs sind. Zieht man schließlich in Betracht, dass die Tumorgenese ein Prozess ist, welcher auf dem Weg der Entstehung und des Fortschreitens mehrere Schritte der Transformation auf zellulärer und molekularer Ebene durchläuft, gewinnt außerdem eine Vielzahl an para- und autokrinen Faktoren und deren Dysregulation an Bedeutung [72, 88]. Nicht nur die Sekretion der hypophysären Hormone kann über para- und autokrine Faktoren beeinflusst werden, auch die Zellproliferation wird über zahlreiche Faktoren moduliert. Dazu zählen Hormone, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Interleukine und Angiotensine [88]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass exzessive GHRH-Stimulation eine Rolle in der Tumorgenese von GH-Adenomen spielt und mit einer schlechteren Prognose einhergeht [110]. Weitere Arbeiten legen dar, dass GH-Adenome nicht nur Ziel der GHRH-Wirkung sind, sondern dieses selbst sezernieren [61]. In Experimenten mit GH3-Zellen, einer Ratten-Adenomzelllinie, konnte gezeigt werden, dass diese funktionelle GABA-B- und GABA-C-Rezeptoren exprimieren und über erstere die GH-Sekretion kontrolliert werden kann [43, 44]. Dies bekräftigt die Vorstellung, dass auto- und parakrine Mechanismen und Störungen nicht unbedingt im Entstehungsprozess eines Tumors involviert sein müssen, sondern eine entscheidende Rolle in der Progression eines Tumors spielen könnten [91].

Ob auch GABA in die Hypophysenadenomen-Entstehung involviert ist, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Interessanterweise wurde GABA jedoch

vor kurzem im Zusammenhang mit der Tumorgenese verschiedener Tumorarten entdeckt. Tatsuta et al. war die erste Arbeitsgruppe, die eine mögliche Verbindung zwischen der Wirkung von GABA und der Tumorentstehung postulierte [108]. In folgenden Untersuchungen taucht GABA zum einen immer wieder als protektiver Faktor auf, der maligne Eigenschaften von Tumoren limitiert, und zum anderen als Faktor, dessen Verlust mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist. Tatsuta et al. beschreiben, dass der GABA-Agonist Baclofen über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren die Karzinogenese im Rattenkolon abschwächte [109]. Von anderen Gruppen wurde gezeigt, dass GABA in malignem Gewebe in höherer Konzentration vorkommt. Masurkiewicz et al. postulierten daraufhin, dass dies eine Art lokaler Anti-Tumor-Antwort bedeuten könnte [68, 82]. Ferner scheint GABA in die Begrenzung der Migration von Tumorzellen involviert zu sein. In SW 480-Kolonkarzinomzellen konnte GABA erfolgreich die Migrationsaktivität reduzieren [56, 84]. Auch im Organsystem der Leber konnte gezeigt werden, dass GABA Eigenschaften besitzt, die Zellintegrität zu bewahren. Eine anhaltende Erniedrigung oder ein Mangel an GABAerger Aktivität und eine daraus resultierende permanente Depolarisation der hepatischen Zellen wirkt an der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms mit [74, 75]. In einer weiteren, neueren Untersuchung zeigt sich, dass ein Verlust der GABAergen Wachstumsinhibition und -differenzierung in primitiven Neuroblasten ein fundamentales Ereignis in der Pathogenese des Neuroblastoms darstellen könnte [93]. All diese Untersuchungen zeigen eindrücklich, dass der Verlust von GABA oder GABAerger Aktivität in die komplexen Mechanismen der Tumorgenese involviert ist, indem GABA oder GABAerg wirkende Substanzen eine begrenzende Wirkung auf das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren haben.

Auch diese Arbeit zeigt deutliche Unterschiede zwischen nicht-pathologischen Hypophysen und Hypophysenadenomen in der Expression von Komponenten des GABAergen Systems auf. Es besteht eine bemerkenswerte Diskrepanz zwischen humanen Hypophysen, in denen GAD 65 und GAD 67 koexprimiert werden, und GH-Adenomen, in welchen die Isoform GAD 65 überwiegend fehlt. Auch in gemischtzelligen GH/PRL-Adenomen war in einem Großteil der Tumoren GAD 65 nicht nachweisbar. VGAT war im Unterschied zu nicht-pathologischen Hypophysen ebenfalls unvollständig in Adenomen exprimiert. Die Tatsache, dass GAD 65 in GH-Adenomen und einem Großteil der gemischtzelligen Adenome nicht exprimiert wird, kann als Teil der die

Tumorentstehung begleitenden Entdifferenzierung angesehen werden. Inwiefern dies einen „Loss-of-function“-Defekt darstellt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Das Vorliegen zweier unabhängig regulierter Gene und daraus folgend zweier Isoformen eines Enzyms, das den alleinigen Vorgang der GABA-Synthese katalysiert, ist ein bezeichnender und bis jetzt unverstandener Unterschied zu anderen Transmittern [102]. Die Hauptsequenz der beiden Isoformen weist zwischen C-Terminus und Mittelstück starke Ähnlichkeiten auf. Der C-Terminus enthält das katalytische Zentrum. Jedoch bestehen Unterschiede am N-Terminus, der die Löslichkeitseigenschaften, die Membranbindung und die Formierung von GAD 65-GAD 67 Heteromeren bestimmt [67]. Diese Unterschiede beeinflussen unter anderem auch die Distribution innerhalb der Neurone. GAD 65 ist membranständig an Vesikeln reversibel gebunden und an Nervenenden lokalisiert, während GAD 67 meist zytoplasmatisch und nicht-vesikulär gebunden in der gesamten Zelle vorkommt [31, 38]. Für die Regulation der Glutamatdecarboxylase spielt Pyridoxalphosphat eine bedeutende Rolle, über dessen Bindung GAD zu einem Holoenzym (mit gebundenem Kofaktor) aktiviert wird. GAD 65 kommt hauptsächlich in der Form des Apoenzyms (ohne gebundenen Kofaktor) in Zellen vor, während GAD 67 mehrheitlich als Holoenzym auftritt. Dabei ist in einer Nebenreaktion die Konversion von holoGAD 65 zu apoGAD 65 ca. 15-fach schneller als von holoGAD 67 zu apoGAD 67, was zu einer raschen Deaktivierung von GAD 65 führt. Umgekehrt läuft die Aktivierung von apoGAD 65 über Pyridoxalphosphat ca. 10-fach schneller ab [15]. Diese bisher gefundenen Unterschiede der beiden Isoformen legen den Schluß nahe, dass GAD 65 hauptsächlich in die vesikuläre Synthese und Freisetzung involviert und an der synaptischen Übertragung von GABA beteiligt ist, während GAD 67 eher für eine generell metabolische Aktivität verantwortlich ist. GAD 67 scheint für eine basale GABA-Produktion bestimmt zu sein, während GAD 65 als stark regulierte Isoform aktiviert wird, wenn GABA darüber hinaus benötigt wird.

Interessanterweise zeigte in Tierversuchen der Verlust von GAD 65 in Knock-out Mäusen keine Veränderung der holoGAD-Aktivität und des Basalspiegels von GABA, allerdings war das pyridoxalphosphat-abhängige apoEnzym-Reservoir reduziert und es kam zu pathologischen Veränderungen, zu denen eine Erhöhung an Krampfanfallsereignissen und eine erhöhte Mortalitätsrate zählen [8, 59, 106]. Außerdem zeigten diese Mäuse ein angstartiges Verhalten und eine Insensitivität gegenüber den Anxiolytika Diazepam und Phenobarbital [60]. Morphologische oder

funktionelle Alterationen der Hypophyse sind in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Der Zusammenhang zwischen dem Regulationsverlust durch den in dieser Arbeit identifizierten Verlust von GAD 65 in der Mehrheit der Adenome und der tumorösen Entartung von Geweben ist ungeklärt. Jedoch ist die Möglichkeit eines Regulationsverlusts der GABA-Synthese und einem damit einhergehenden „Loss-of-function“-Defekt als Teil der Tumorentwicklung in Anbetracht dieser Ergebnisse durchaus vorstellbar.

5.4 GABA UND WEITERE KLINISCHE ASPEKTE

5.4.1 GAD-Antikörper bei Erkrankungen

Die Existenz von GAD in der Hypophyse des Menschen könnte über eine Rolle bei der Tumorgenese von Hypophysenadenomen hinausgehen (s. Diskussion 5.3), da Autoimmunerkrankungen mit gegen GAD gerichteten Autoantikörpern assoziiert sind. Diabetes mellitus Typ I ist eine chronische Erkrankung, die mit der selektiven Autoimmunzerstörung der pankreatischen Insulin-produzierenden Beta-Zellen einhergeht. Patienten mit Diabetes mellitus Typ I weisen Autoantikörper gegen GAD auf, eine Tatsache, die in Zusammenhang mit der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ I gebracht wird [11]. GAD-Antikörper erscheinen bereits Jahre vor Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I und ihre Präsenz kann über Jahre im Krankheitsverlauf persistieren. Inwiefern Autoantikörper gegen GAD initiierend an der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I beteiligt sind, wird noch kontrovers diskutiert [12, 48, 58].

Autoantikörper gegen GAD 65 wurden auch in einer selteneren neurologischen Funktionsstörung, dem „Stiff-person Syndrom“ (SPS) entdeckt [103]. Muskelsteifheit und überlagernde schmerzhafte Spasmen sind charakteristisch für diese Erkrankung [80]. Die Linderung der Symptome durch Benzodiazepine wurde schon früh erkannt und spricht für die Beteiligung eines GABAergen inhibitorische Systems [53]. Studien zeigten, dass die Fehlfunktion inhibitorischer GABAerger Netzwerke eine bedeutende Rolle in der Manifestation von SPS spielt. Die Vermutung liegt nahe, dass GAD-Antikörper eine funktionelle Beeinträchtigung der GABA-Synthese verursachen [65]. 30 bis 40% der SPS-Patienten entwickeln einen Diabetes mellitus Typ I (bzw. andere Autoimmunerkrankungen), umgekehrt erkranken weniger als $1/10^4$ der Diabetes-Patienten an SPS. Im Gegensatz zum Diabetes mellitus Typ I erkennen Autoantikörper

von SPS-Patienten eine andere Kombination linearer und konformativer GAD-Epitope und kommen in einer vielfach höheren Konzentration in SPS-Patienten vor [29, 62].

Ein anderes Beispiel einer GAD 65-assoziierten Autoimmunerkrankung ist das autoimmune polyendokrine Syndrom Typ I (APS I) [112]. Außerdem ist in einer Reihe neurologischer Erkrankungen von GAD-Antikörpern berichtet worden [113]. Dazu zählen zerebelläre Ataxien, die meist mit einer polyglandulären Autoimmunstörung einhergehen, und arzneimittelresistente Epilepsien.

All diese Untersuchungen verdeutlichen zusammenfassend, dass die Autoimmunität gegen GAD 65 mit der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen zusammenhängt und unterstützen die Existenz eines gemeinsamen pathogenetischen Mechanismus. Die Frage, ob und wie das mit möglichen Veränderungen der Hypophyse verbunden ist, wurde durch diese Arbeit aufgeworfen und ist bislang unerforscht. Betrachtet man die bisherigen Untersuchungen der Krankheiten, die mit einem autoimmunen Verlust von GAD 65 einhergehen, des weiteren die Tiermodelle, in denen die GAD 65-Defizienz zu bedeutenden Erkrankungen bis hin zum Tod führen kann, und schließlich die Studienergebnisse derjenigen Tumoren, die mit einer Dysregulation des GABAergen Systems assoziiert sind, dann könnte der in diesem Projekt mehrheitlich gefundene Verlust von GAD 65 in Hypophysenadenomen ein bemerkenswertes Bindeglied darstellen. Ob und wie der Verlust von GAD 65 mit der Pathogenese der GH-Adenome und anderer Hypophysenadenome in Zusammenhang steht, erfordert deshalb weiterführende Untersuchungen.

5.4.2 GABA und die Pathogenese der Atemwegobstruktion bei Asthma bronchiale

Xiang et al. gelang es jüngst ein lokal agierendes GABAerges System im Zusammenhang mit der Pathogenese von Asthma bronchiale nachzuweisen. GAD und der GABA-A-Rezeptor konnten in humanen und murinen Zelllinien sowie in ganzen Mäuselungen nachgewiesen werden. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass das GABAerge System die Zellen des Schleimhautepithels in einem kontinuierlich depolarisierten Zustand halten. Die Aktivierung der GABA-A-Rezeptoren führt zu einer Proliferation der Epithelzellen sowie zu einer Stimulation der Schleimsekretion. GABA-Signalmoleküle werden nach Allergenprovokation hochreguliert. Demnach agiert GABA auf das Respirationsepithel als autokriner und

parakriner Faktor und stimuliert die Schleimsekretion durch Induktion der Becherzellmetaplasie. Beide Vorgänge sind Veränderungen, die in der Pathogenese des Asthma bronchiale eine maßgebliche Rolle spielen. GABA-A-Rezeptoren werden somit zum interessanten pharmakologischen Angriffspunkt, um die durch Schleim verursachte Atemwegsobstruktion zu vermindern [32, 115]. Dies unterstreicht das Konzept eines lokal agierenden GABAergen Signaltransduktionssystems in Säugerorganismen, welches außer im ZNS auch in peripheren endokrinen und nicht-endokrinen Geweben weit verbreitet zu existieren und darüber hinaus auch im Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen und mit der Entstehung von Tumoren in Erscheinung zu treten scheint.

5.4.3 Medikamente mit Wirkung am GABAergen System

Es gibt eine Vielzahl an Medikamenten im klinischen Gebrauch, welche die durch GABA vermittelte inhibitorische Wirkung verstärken. Sie wirken auf die synaptische Ausschüttung von GABA und dessen Wiederaufnahme oder auf die verschiedenen Komponenten des GABA-Rezeptorkomplexes. Zu altbewährten Arzneimitteln zählen Benzodiazepine, Valproat, Baclofen und Barbiturate, die seit langem in der klinischen Praxis eingesetzt werden. Vor allem die zur Arzneimittelgruppe der Benzodiazepine gehörigen Substanzen sind eine der am meisten verschriebenen Arzneimittelgruppen aufgrund ihres anxiolytischen, antikonvulsiven, muskelrelaxierenden und hypnotischen Effekts [78]. Erstmals wurde 1975 der Einfluß der Benzodiazepine auf den GABA-Metabolismus von Haefely et al. beschrieben [51]. Benzodiazepine erhöhen allosterisch die Öffnungsfrequenz der Chloridkanäle der GABA-Rezeptoren, was einen anxiolytischen und sedativen Effekt nach sich zieht. Bezeichnenderweise inhibieren sie die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [50], sie verstärken die GH-Sekretion und verändern die Sekretion von Gonadotropin und Prolaktin [6]. Vor kurzem gewann eine weitere Arzneimittelgruppe mit GABAerger Aktivität in der antiepileptischen Therapie an Bedeutung [9]. Dazu zählen Gabapentin, Vigabatrin, Tiagabin und andere. Sie scheinen auch in der Behandlung von affektiven Störungen sowie Angststörungen und Schmerzzuständen zu wirken. Propofol und Etomidat sind neben den Barbituraten weitere Anästhetika, die über GABA-A-Rezeptoren wirken. Weiterentwicklungen haben zu inversen Agonisten der Benzodiazepin-Bindungsstelle geführt, die anxiogene und konvulsive Wirkung besitzen. Alle Wirkmechanismen der

verschiedenen beschriebenen Substanzklassen können als Resultat des Eingreifens auf hypothalamischer oder zentralnervöser Ebene erklärt werden. Jedoch implizieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sie – zumindest teilweise – auch auf Prozesse auf hypophysärer Ebene zurückzuführen sein können. Folglich zeigt die Identifizierung von GABA-Rezeptoren in der Hypophyse des Menschen und in Hypophysenadenomen unvermutete Ziele für GABA-Rezeptormodulatoren.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Diese Arbeit zeigt, dass alle Voraussetzungen für ein GABAerges System in der humanen Hypophyse vorhanden sind. Die zwei Isoformen des GABA-produzierenden Enzyms GAD (65 und 67), der vesikulären GABA-Transporter und multiple Untereinheiten der GABA-A-/B-/C-Rezeptoren werden exprimiert. Dies konnte mittels RT-PCR-Untersuchungen gezeigt und durch immunhistochemische Anfärbung bestätigt werden. Die zelluläre Lokalisation der GABA-Synthese konnte mittels zellulärer Kolo-kalisation von immunreaktivem GAD und VGAT in GH-Zellen und mittels RT-PCR-Analyse von mikro-dissezierten, immungefärbten GH-Zellen nachgewiesen werden. GABA-Produktion und -Speicherung findet demnach in GH-Zellen statt. Die Identifizierung der humanen Hypophyse als Ort der GABA-Produktion, -Speicherung und -Wirkung, warf die Frage auf, inwiefern GH-Adenome, als Abkömmlinge der GABA-produzierenden GH-Zellen, und andere Hypophysenadenome die Komponenten eines GABAergen Systems ebenso exprimieren. Es folgten RT-PCR-Untersuchungen mit der Fragestellung, ob in hypophysären Adenomen das GABA-produzierende Enzym, der vesikuläre Transporter und Rezeptoruntereinheiten vorkommen. Mit Erfolg konnte nachgewiesen werden, dass humane hypophysäre GH-Adenome ebenso wie verschiedene andere Hypophysenadenome GABA-Rezeptoruntereinheiten exprimieren. Jedoch fehlt ihnen überwiegend das Isoenzym GAD 65. Auch der vesikuläre GABA Transporter scheint in nur einem Teil der tumorös veränderten Hypophysen vorhanden zu sein.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass GABA von GH-Zellen in der Hypophyse des Menschen und in humanen Hypophysenadenomen synthetisiert wird und als para- und/oder autokriner Regulationsfaktor agieren könnte. Zusammen mit anderen Untersuchungen unterstreicht dies das Konzept, dass sich in Säugetieren GABA als intrahypophysärer regulierender Faktor präsentiert und darüber hinaus, dass ein lokales GABAerges Signaltransduktionssystem in peripheren Organen weit verbreitet existiert.

Die Frage, ob und inwiefern Störungen des GABA-Metabolismus an der Tumorgenese hypophysärer Adenome beteiligt sind, wurde mit den Ergebnissen dieser Arbeit aufgeworfen und bedarf weiterer Abklärung. Der Verlust von GAD 65 scheint mit GH-

Adenomen assoziiert zu sein. Bisher ungeklärt ist auch ein möglicher Zusammenhang zwischen Erkrankungen, die mit der Bildung von Antikörpern gegen GAD assoziiert sind, und möglichen Auswirkungen auf die Hypophyse. Bis jetzt wurde angenommen, dass die Wirkung von GABA-Modulatoren ausschließlich auf Ebene des Hypothalamus und entlang der Hypothalamus-Hypophysen-Achse stattfindet. Diese Ergebnisse lassen ferner darauf schließen, dass sich Medikamente, die den GABA-Metabolismus modulieren, wahrscheinlich direkt auch auf die Hypophyse des Menschen auswirken.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Acs Z, Szabo B, Kapocs G and Makara G:** Gamma-aminobutyric acid stimulates pituitary growth hormone secretion in the neonatal rat. A superfusion study. *Endocrinology* (1987), 120:1790-1798.
- [2] **Allaerts W and Vankelecom H:** History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur J Endocrinol* (2005), 153:1-12.
- [3] **Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E and Lipman D:** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (1990), 215:403-410.
- [4] **Amar A and Weiss M:** Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am* (2003), 14:11-23.
- [5] **Anderson R and Mitchell R:** Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotrophic hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro. *J Endocrinol* (1986), 108:1-8.
- [6] **Arvat E, Giordano R, Grottoli S and Ghigo E:** Benzodiazepines and anterior pituitary function. *J Endocrinol Invest* (2002), 25:735-747.
- [7] **Asa S, Kovacs K and Bilbao J:** The pars tuberalis of the human pituitary. A histologic, immunohistochemical, ultrastructural and immunoelectron microscopic analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (1983), 399:49-59.
- [8] **Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji F, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T and Obata K:** Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun* (1996), 229:891-895.
- [9] **Ashton H and Young A:** GABA-ergic drugs: exit stage left, enter stage right. *J Psychopharmacol* (2004), 17:174-178.
- [10] **Awapara J, Landua A, Fuerst R and Seale B:** Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* (1950), 187:35-39.
- [11] **Baekkeskov S, Aanstoot H, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H and De Camilli P:** Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* (1990), 347:151-156.
- [12] **Baekkeskov S, Kanaani J, Jaume J and Kash S:** Does GAD have a unique role in triggering IDDM? *J Autoimmun* (2000), 15:279-289.
- [13] **Balazs R, Machiyama Y, Hammond B, Julian T and Richter D:** The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem J* (1970), 116:445-461.
- [14] **Barnard E, Skolnick P, Olsen R, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson A and Langer S:** International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* (1998), 50:291-313.
- [15] **Battaglioli G, Liu H and Martin D:** Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J Neurochem* (2003), 86:879-887.

-
- [16] **Behar T, Schaffner A, Colton C, Somogyi R, Olah Z, Lehel C and Barker J:** GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J Neurosci* (1994), 14:29-38.
- [17] **Berman J, Roberts J and Pritchett D:** Molecular and pharmacological characterization of GABAA receptors in the rat pituitary. *J Neurochem* (1994), 63:1948-1954.
- [18] **Bianchi M, Rey-Roldan E, Bettler B, Ristig D, Malitschek B, Libertun C and Lux-Lantos A:** Ontogenic expression of anterior pituitary GABA(B) receptor subunits. *Neuropharmacology* (2001), 40:185-192.
- [19] **Bilezikjian L, Blount A, Leal A, Donaldson C, Fischer W and Vale W:** Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* (2004), 225:29-36.
- [20] **Blossey H:** Endokrine und Stoffwechselerkrankungen. In: Berlit P (2006), *Klinische Neurologie*. 2. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer. 1225-1242.
- [21] **Bormann J:** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* (2000), 21:16-19.
- [22] **Boue-Grabot E, Taupignon A, Tramu G and Garret M:** Molecular and electrophysiological evidence for a GABA_C receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology* (2000), 141:1627-1632.
- [23] **Bowery N, Bettler B, Froestl W, Gallagher J, Marshall F, Raiteri M, Bonner T and Enna S:** International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *J Pharmacol Exp Ther* (2002), 54:247-264.
- [24] **Bowery N and Enna S:** γ -aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* (2000), 292:2-7.
- [25] **Bowery N and Smart T:** GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* (2006), 147:109-119.
- [26] **Bratthauer G:** The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol* (1999), 115:203-214.
- [27] **Brice N, Varadi A, Ashcroft S and Molnar E:** Metabotropic glutamate and GABA(B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2002), 45:242-252.
- [28] **Bu D, Erlander M, Hitz B, Tillakaratne N, Kaufman D, Wagner-McPherson C, Evans G and Tobin A:** 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* (1992), 89:2115-2119.
- [29] **Butler M, Solimena M, Dirx RJ, Hayday A and De Camilli P:** Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome. *J Exp Med* (1993), 178:1097-1206.
- [30] **Chien A, Edgar D and Trela J:** Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* (1976), 127:1550-1557.
- [31] **Christgau S, Aanstoot H, Schierbeck H, Begley K, Tullin S, Hejnaes K and Baekkeskov S:** Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH₂-terminal domain. *J Cell Biol* (1992), 118:309-320.
- [32] **Corry D and Kheradmand F:** A new link to airway obstruction in asthma. *Nature Medicine* (2007), 13:777-778.
-

-
- [33] **Cuevas E, Bateman A, Wilkins B, Johnson P, Williams J, Lee A, Jones D and Wright D:** Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol* (1994), 47:448-452.
- [34] **Doepner R, Geigerseder C, Frungieri M, Gonzalez-Calvar S, Calandra R, Raemsch R, Fohr K, Kunz L and Mayerhofer A:** Insights into GABA receptor signaling in TM3 Leydig cells. *Neuroendocrinology* (2005), 81:381-390.
- [35] **Dong H, Kumar M, Zhang Y, Gyulkhandanyan A, Xiang Y, Ye B, J P, Hyder A, Zhang N, Wheeler M, Lu W and Wang Q:** Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. *Diabetologia* (2006), 49:697-705.
- [36] **Elias A, Valenta L, Szekeres A and Grossman M:** Regulatory role of gamma-aminobutyric acid in pituitary hormone secretion. *Psychoneuroendocrinology* (1982), 7:15-30.
- [37] **Enz R:** GABA(C) receptors: a molecular view. *Biol Chem* (2001), 382:1111-1122.
- [38] **Esclapez M, Tillakaratne N, Kaufman D, Tobin A and Houser C:** Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* (1994), 14:1834-1855.
- [39] **Fauquier T, Lacampagne A, Travo P, Bauer K and Mollard P:** Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab* (2004), 13:304-309.
- [40] **Franklin I and Wollheim C:** GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signaling molecule. *J Gen Physiol* (2004), 123:185-190.
- [41] **Fritz S, Foehr J, Boddien S, Berg U, Brucker C and Mayerhofer A:** Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* (1999), 84:1744-1750.
- [42] **Frungieri M, Calandra R, Lustig L, Meineke V, Kohn F, Vogt H and Mayerhofer A:** Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril* (2002), 78:298-306.
- [43] **Gamel-Didelon K, Corsi C, Pepeu G, Jung H, Gratzl M and Mayerhofer A:** An autocrine role for pituitary GABA: Activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology* (2002), 76:170-177.
- [44] **Gamel-Didelon K, Kunz L, Foehr K, Gratzl M and Mayerhofer A:** Molecular and physiological evidence for functional GABA-C receptors in growth-hormone secreting cells. *J Biol Chem* (2003), 278:20192-20195.
- [45] **Gasnier B:** The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* (2000), 82:327-337.
- [46] **Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, Frungieri M, Gamel-Didelon K, Calandra R, Kohn F and Mayerhofer A:** Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* (2003), 77:314-323.
- [47] **Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, Krieger A and Mayerhofer A:** Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABAA receptors: A new role for testicular GABA. *Reprod Biol Endocrinol* (2004), 2:13.
- [48] **Gladkevich A, Korf J, Hakobyan V and Melkonyan K:** The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci* (2006), 124:1-8.
-

-
- [49] **Grosse J, Bulling A, Brucker C, Berg U, Amsterdam A, Mayerhofer A and Gratzl M:** Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. *Biol Reprod* (2000), 63:643-650.
- [50] **Grottoli S, Giordano R, Maccagno B, Pellegrino M, Ghigo E and Arvat E:** The stimulatory effect of canrenoate, a mineralocorticoid antagonist, on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis is abolished by alprazolam, a benzodiazepine, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* (2002), 87:4616-4620.
- [51] **Haefely W, Kulcsar A and Mohler H:** Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Psychopharmacol Bull* (1975), 114:58-59.
- [52] **Heitz P and Klöppel G:** Hypophyse. In: Böcker W, Denk H and Heitz P (2001), Pathologie. 2. Auflage. München Jena: Urban & Fischer. 373-378.
- [53] **Howard FJ:** A new and effective drug in the treatment of stiff-man syndrome: preliminary report. *Mayo Clin Proc* (1963), 38:203-212.
- [54] **Inoue K, Couch E, Takano K and Ogawa S:** The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* (1999), 63:205-218.
- [55] **Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M and Miyai S:** Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* (2002), 110:50-53.
- [56] **Joseph J, Niggemann B, Zaenker K and Entschladen F:** The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW 480 colon carcinoma cells. *Cancer Res* (2002), 62:6467-6469.
- [57] **Ju G:** Evidence for direct neural regulation of the mammalian anterior pituitary. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1999), 26:757-759.
- [58] **Jun H, Khil L and Yoon J:** Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci* (2002), 59:1892-1901.
- [59] **Kash S, Johnson R, Tecott L, Noebels J, Mayfield R, Hanahan D and Baekkeskov S:** Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94:14060-14065.
- [60] **Kash S, Tecott L, Hodge C and Baekkeskov S:** Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96:1698-1703.
- [61] **Kawamoto K, Uozumi T, Arita K, Takechi A and Kawamoto H:** Secretion of Growth Hormone (GH)-releasing hormone by GH-producing pituitary adenoma assessed by cell immunoblot analysis. *Endocr J* (1995), 42:89-93.
- [62] **Kim J, Namchuk M, Bugawan T, Fu Q, Jaffe M, Shi Y, Aanstoot H, Turck C, Erlich H, Lennon V and Baekkeskov S:** Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH₂-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* (1994), 180:595-606.
- [63] **Kovacs K, Horvath E and Vidal S:** Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol* (2001), 54:121-127.
- [64] **Krnjevic K and Schwartz S:** The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurons. *Exp Brain Res* (1967), 3:320-336.
-

-
- [65] **Levy L, Dalakas M and Floeter M:** The stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid. *Ann Intern Med* (1999), 131:522-530.
- [66] **Macdonald R and Olsen R:** GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* (1994), 17:569-602.
- [67] **Martin D, Liu H, Martin S and Wu S:** Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem Int* (2000), 37:111-119.
- [68] **Masurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J, Radzikowski C and Kleinrok Z:** GABA level and GAD activity in human and mouse normal and neoplastic mammary gland. *J Exp Clin Cancer Res* (1999), 18:147-153.
- [69] **Mayerhofer A, Hoehne-Zell B, Gamel-Didelon K, Jung H, Redecker P, Grube D, Urbanski H, Gasnier B, Fritschy J and Gratzl M:** Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *The FASEB Journal* (2001), 15:1089-1091.
- [70] **McCann S, Dhariwal P and Porter J:** Regulation of the adenohypophysis. *Annu Rev Physiol* (1968), 30:589-640.
- [71] **McKernan R and Whiting P:** Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* (1996), 19:139-143.
- [72] **Melmed S:** Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* (2003), 112:1603-1618.
- [73] **Metzeler K, Agoston A and Gratzl M:** An intrinsic GABAergic system in the adrenal cortex: Findings from human and rat adrenal glands and the NCL-H295R cell line. *Endocrinology* (2004), 145:2402-2411.
- [74] **Minuk G:** GABA and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* (2000), 207:105-108.
- [75] **Minuk G, Zhang M, Gong Y, Minuk L, Dienes H, Pettigrew N, Kew M, Lipschitz J and Sun D:** Decreased hepatocyte membrane potential differences and GABAA-beta3 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (2007), 45:735-745.
- [76] **Missale C, Fiorentini C, Finardi A and Spano P:** Growth factors in pituitary tumors. *Pituitary* (1999), 1:153-158.
- [77] **Mitchell R, Grieve G, Dow R and Fink G:** Endogenous GABA receptor ligands in hypophysial portal blood. *Neuroendocrinology* (1983), 37:169-176.
- [78] **Mohler H, Fritschy J and Rudolph U:** A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* (2002), 300:2-8.
- [79] **Mullis K:** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* (1990), 48:579-582.
- [80] **Murinson B:** Stiff-person syndrome. *Neurologist* (2004), 10:131-137.
- [81] **Nakayama Y, Hattori N, Otani H and Inagaki C:** Gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptor stimulation increases prolactin (PRL) secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Biochem Pharmacol* (2006), 71:1705-1710.
- [82] **Nicholson-Guthrie C, Guthrie G, Sutton G and Baenziger J:** Urine GABA levels in ovarian cancer patients: elevated GABA in malignancy. *Cancer Lett* (2001), 162:27-30.
- [83] **Oertel W, Mugnaini E, Tappaz M, Weise V, Dahl A, Schmechel D and Kopin I:** Central GABAergic innervation of neurointermediate pituitary lobe: biochemical and immunocytochemical study in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982), 79:675-679.
-

-
- [84] **Ortega A:** A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends Pharmacol Sci* (2003), 24:151-154.
- [85] **Owens D and Kriegstein A:** Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* (2002), 3:715-727.
- [86] **Passariello N, Giuliano D, Torella R, Sgambato S, Coppola L and Frascolla N:** A possible role of gamma-aminobutyric acid in the control of the endocrine pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* (1982), 54:1145-1149.
- [87] **Paulsen O and Moser E:** A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* (1998), 21:273-278.
- [88] **Pawlikowski M:** Endocrine/paracrine control of pituitary cell proliferation and its involvement in pituitary Tumorigenesis. *Pituitary* (1999), 1:251-256.
- [89] **Rabhi M, Onteniente B, Kah O, Geffard M and Calas A:** Immunocytochemical study of GABAergic innervation of the mouse pituitary by use of antibodies against gamma-aminobutyric acid (GABA). *Cell Tissue Res* (1987), 247:33-40.
- [90] **Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K and De Camilli P:** GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* (1991), 10:1275-1284
- [91] **Renner U, Pagotto U, Arzt E and Stalla G:** Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur J Endocrinol* (1996), 135:515-532.
- [92] **Represa A and Ben-Ari Y:** Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* (2005), 28:278-283.
- [93] **Roberts S, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley J, Hsieh Y, Turner M, Wang Z, Tian Q, Rodland M, Reynolds C, Seeger R and Nagalla S:** GABAergic system gene expression predicts outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* (2004), 22:4127-4134.
- [94] **Rorsman P, Berggren P, Bokvist K, Ericson H, Mohler H, Ostenson C and Smith P:** Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA-A-receptor chloride channels. *Nature* (1989), 341:233-236.
- [95] **Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K and Erlich H:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* (1988), 239:487-491.
- [96] **Sakaue M, Saito N, Taniguchi H, Baba M and Tanaka C:** Immunohistochemical localization of gamma-aminobutyric acid in the rat pituitary gland and related hypothalamic regions. *Brain Res* (1988), 446:343-353.
- [97] **Saland L:** The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. *Brain Res Bull* (2001), 54:587-593.
- [98] **Scharrer B:** Neurosecretion: Beginnings and New Directions in Neuropeptide Research. *Annu Rev* (1987), 10:1-17.
- [99] **Scheithauer B, Horvath E and Kovacs K:** Ultrastructure of the neurohypophysis. *Microsc Res Tech* (1992), 20:177-186.
- [100] **Schwartz J:** Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews* (2000), 21:488-513.
-

-
- [101] **Schwartz J:** Intrapituitary interactions: Another level of endocrine regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2001), 28:237-238.
- [102] **Soghomonian J and Martin D:** Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* (1998), 19:500-505.
- [103] **Solimena M, Folli F, Aparasi R, Pozza G and De Camilli P:** Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta-cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* (1990), 322:1555-1560.
- [104] **Soudijn W and van Wijngaarden I:** The GABA transporter and its inhibitors. *Cur Med Chem* (2000), 7:1063-1079.
- [105] **Stojilkovic S:** A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends Endocrinol Metab* (2001), 12:378-380.
- [106] **Stork O, Ji F, Kaneko K, Stork S, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S and Obata K:** Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res* (2000), 865:45-58.
- [107] **Tappaz M, Wassef M, Oertel W, Paut L and Pujol J:** Light- and electron-microscopic immunocytochemistry of glutamic acid decarboxylase (GAD) in the basal hypothalamus: morphological evidence for neuroendocrine gamma-aminobutyrate (GABA). *Neuroscience* (1983), 9:271-287.
- [108] **Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nykaizumi A, Ichii M and Taniguchi H:** Inhibition by gamma-aminobutyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* (1990), 50:4931-4934.
- [109] **Tatsuta M, Iishi H, Baba M and Taniguchi H:** Attenuation by the GABA receptor agonist baclofen of experimental carcinogenesis in rat colon by azoxymethane. *Oncology* (1992), 49:241-245.
- [110] **Thapar K, Kovacs K, Stefanescu L, Scheithauer B, Killinger D, Lloyd R, Smyth H, Barr A, Thorner M, Gaylinn B and Laws E:** Overexpression of the growth-hormone-releasing hormone gene in acromegaly-associated pituitary tumors. An event associated with neoplastic progression and aggressive behavior. *A J Pathol* (1997), 151:769-784.
- [111] **Tomiko S, Taraskevich P and Douglas W:** GABA acts directly on cells of pituitary pars intermedia to alter hormone output. *Nature* (1983), 301:706-707.
- [112] **Tuomi T, Bjorses P, Falorni A, Partanen J, Perheentupa J, Lernmark A and Miettinen A:** Antibodies to glutamic decarboxylase and insulin-dependent diabetes mellitus in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* (1996), 81:1488-1494.
- [113] **Vianello G, Tavolato B and Giometto B:** Glutamic acid decarboxylase antibodies in neurological disorders. *Neurol Sci* (2002), 23:145-151.
- [114] **Wiens S and Trudeau V:** Thyroid hormone and gamma-butyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* (2006), 144:332-344.
- [115] **Xiang Y, Wang S, Liu M, Hirota J, Li J, Ju W, Fan Y, Kelly M, Ye B, Orser B, Byrne P, Inman M, Yang X and Lu W:** A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine* (2007), 13:862-867.
- [116] **Yeung C, Chan C, Leung P and Cheng C:** Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* (2006), 38:1441-1449.
-

ANHANG

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Katrin Christine End
Geburtsdatum	5. März 1978
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Eltern	Dr. med. dent. Eugen End (Zahnarzt) Susanne End, geb. Bauer (Pharmazeutin)
Geschwister	Andrea End (Studentin der Rechtswissenschaft) Anne-Irene End (Studentin der Zahnmedizin)

Schulbildung

1984-1988	Grundschule St. Konrad, Ravensburg
1988-1989	Spohn-Gymnasium, Ravensburg
1989-1995	Kolleg St. Sebastian, Stegen
1995-1996	Central Bucks High School West, Doylestown, Pennsylvania, USA
Juni 1996	Graduation (Youth for Understanding Exchange Program)
1996-1998	Kolleg St. Sebastian, Stegen
Juni 1998	Abitur am Kolleg St. Sebastian, Stegen
	Preise für besondere Leistungen:
	Scheffel-Literatur-Preis (im Fach Deutsch)
	Preis des Provinzials (im Fach evangelische Religion)

Hochschulbildung

Oktober 1998	Beginn des Medizinstudiums an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
29. August 2000	Ärztliche Vorprüfung in Freiburg
Oktober 2000	Beginn des Klinischen Studienabschnitts an der Technischen Universität München/Klinikum Rechts der Isar
28. August 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
30. August 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
Oktober 2005	Beginn des Studienabschnitts "Praktisches Jahr" an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Dezember 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München Approbation zur Ärztin

Wissenschaftliche Ausbildung und Promotion

2001-2005 Promotion bei Herrn Prof. Mayerhofer am Anatomischen Institut am Biederstein der Ludwig-Maximilians-Universität, München und assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs 333 "Biologie menschlicher Erkrankungen," unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

2002-2003 Stipendium der Artan-Stiftung, München

März 2004 Ernst und Berta Scharrer-Preis 2004
der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), gestiftet von Lilly Deutschland GmbH
K. End: "Receptors and sites of synthesis/storage of gamma-aminobutyric acid (GABA) in human pituitary glands and in GH-adenomas"

Berufstätigkeit

seit Januar 2006 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden

EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

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

Originalarbeit

End K, Gamel-Didelon K, Jung H, Tolnay M, Luedecke D, Gratzl M and Mayerhofer A: Receptors and sites of synthesis/storage of gamma-aminobutyric acid in human pituitary glands and in GH-adenomas. *American Journal of Clinical Pathology* (2005), 124:1-9.

Kongressbeiträge

K. End, K. Gamel-Didelon, H. Jung, M. Tolnay, A. Mayerhofer, M. Gratzl: Gamma-aminobutyric acid (GABA): Intrapituitary synthesis and storage in normal and tumorous human pituitary glands. *Program & Abstracts ENEA* (2002),77: PA-80.

10th meeting of the European Neuroendocrine Association (ENEA),

6th Annual Meeting of the Neuroendocrinology Section of the German Society of Endocrinology (DGE), München

K. End, K. Gamel-Didelon, H. Jung, M. Tolnay, D. Lüdecke, A. Mayerhofer, M. Gratzl: Gamma-aminobutyric acid (GABA) in the human pituitary gland: synthesis and storage in GH-cells of non-tumorous pituitary glands and in GH-adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2003), 111:385, P3.

7th Annual Meeting of the Neuroendocrinology Section of the German Society of Endocrinology (DGE), Lübeck

DANKSAGUNG

Mein tiefer Dank gebührt meiner Mutter, ohne deren Unterstützung und Fürsorge meine Entwicklung und mein Fortkommen bis hin zu dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Von ganzem Herzen danke ich meinem Vater, der mir den Gedanken des „πάντα ρεΐ“ mit auf den Weg gab und mir die Freiheit zur Selbstbestimmung im Denken und Handeln vermittelte.

Meinem Großvater, Herrn Dr. Hellmut Bauer, der mich durch seine Erzählungen inspiriert hat, Ärztin zu werden, und mir die Berufung zum Arztsein mit auf den Weg gab, danke ich von Herzen. Bei Herrn Dr. Peter Hahl und Herrn Dr. Steffen Hahl, die mich in meiner Ausbildung und meinem Werdegang stets unterstützt haben, möchte ich mich ebenso herzlich bedanken.

Herrn Prof. Artur Mayerhofer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas. Durch seine hervorragende Betreuung und unermüdliche Unterstützung in Theorie und Praxis hatte ich die Möglichkeit, wertvolle Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens fundiert zu erlernen. Die stete Bereitschaft für kritische Gespräche und das richtige Maß an Freiräumen haben mich zu ersten wissenschaftlichen Erfolgen geführt. Herrn Prof. Manfred Gratzl gilt mein Dank für das Bereitstellen des Arbeitsplatzes sowie für zahlreiche Anregungen und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Viktor Meineke danke ich für den Zugang zu den Gerätschaften der Lasermikrodissektion, Herrn Dr. Markus Tolnay für die Überlassung humaner Paraffinpräparate, Herrn PD Dr. Dieter Lüdecke für die Übergabe des operativ reseziertes Tumormaterials und Herrn Ph.D. Bruno Gasnier für die Bereitstellung des VGAT-Antikörpers.

Bei Frau Dr. Martina Haasemann und Frau Dr. Karen Schmidt-Baese möchte ich mich für die engagierte Betreuung des Graduiertenkollegs 333 bedanken. Durch sie sind viele interessante Veranstaltungen, Diskussionen und Begegnungen möglich geworden.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Katja Gamel-Didelon, die mich mit viel Geduld und fachlicher Kompetenz an das Thema und die Methodik herangeführt hat.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Marlies Rauchfuss für die Hilfe in der Präparation der Gewebeschnitte für die Lasermikrodissektion, ebenso Andreas Mauermayer für seine Unterstützung in allen Computerfragen und Barbara Zschiesche für ihren technischen Beistand bei Mikroskopierarbeiten.

Für die gute Zusammenarbeit und eine ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich außerdem Dr. Ágnes Ágoston, Dr. Martin Albrecht, Dr. Andreas Bulling, Dr. Nicola Dimitrijevic, Dr. Richard Doepner, Dr. Angela Finzel, Dr. Mónica B. Frungieri, Dr. Christof Geigerseder, Dr. Pia Körner, Annette Krieger, Dr. Klaus Metzeler, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämsch, Dr. Axel W. Reinhardt, Dr. Johanna Richter, Gabriele Terfloth, Astrid Tiefenbacher und Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger.

Sehr herzlich danke ich Frau Dr. Stefanie Jellinghaus, Herrn Dr. Florian Eehalt und Frau Dr. Katja Brocke für die kritische Durchsicht und Diskussion dieser Arbeit, für die allzeit fachliche, freundschaftliche und persönliche Unterstützung.