

Aus der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl IV am Biederstein  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Manfred Gratzl

# **Analyse von Sauerstoffsensor- Zellen im Glomusorgan**

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

vorgelegt von Sebastian Reindl  
aus Dachau

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: .....Prof. Dr. Manfred Gratzl  
Mitberichterstatter: .....Prof. Dr. Claudia Veigel  
.....Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch  
Dekan: .....Prof. Dr. Dr. Maximilian Reiser  
FACR, FRCR  
Tag der mündlichen Prüfung: .....22.04.2010

**Für meine Eltern  
und meinen Großvater**

## **Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Chemozeption von O <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub> im menschlichen Körper .....	8
1.2	Chemoreflexbahn des Glomus caroticum.....	9
1.2.1	Glomus caroticum.....	9
1.2.2	Ganglion petrosum und Nucleus tractus solitarii.....	13
1.3	Neurotransmitter und Rezeptoren .....	15
1.3.1	Überblick der Transmitter im Glomus caroticum .....	15
1.3.2	Acetylcholin.....	17
1.3.3	Nukleotide.....	18
1.3.4	Biogene Amine .....	19
1.3.5	Histamin als neuer Transmitter.....	21
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
2.1	Versuchstiere .....	25
2.2	Gewinnung und Aufbereitung von Gewebeproben.....	25
2.3	Humane Proben des Glomus caroticum.....	26
2.4	Antikörper und verwendete Lösungen.....	27
2.5	Herstellerverzeichnis .....	29
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.1	Präparationsmethodik .....	30
3.1.1	Glomus caroticum und Ganglion petrosum.....	30
3.1.2	Medulla oblongata .....	31
3.2	Retrograde Fluoreszenzmarkierung .....	31
3.3	Immunhistochemie und Immunogoldfärbung an EM-Schnitten .....	32
3.4	mRNA-Amplifikation mit RT-PCR.....	34
3.4.1	RNA-Extraktion .....	34
3.4.2	Reverse Transkription.....	34
3.4.3	Primerdesign und Primer .....	35
3.4.4	PCR .....	36
3.4.5	Gelelektrophorese .....	37
3.4.6	Datenbank und Sequenzierung .....	37

3.5	Amperometrie an Dünnschnitten des Glomus caroticum.....	38
3.5.1	Zellkultur mit PC12 – Zellen.....	38
3.5.2	Prinzip der Amperometrie und Signalaufzeichnung .....	38
3.5.3	Herstellung von Carbonfaser-Elektroden .....	40
3.5.4	Herstellung von Dünnschnitten des Glomus caroticum.....	41
3.5.5	Komponenten, Setup und Messungsablauf .....	42
3.5.6	Auswertung und Analyse der Daten .....	43
3.6	Fluoreszenzmessungen an Lebendschnitten des Glomusorgans .....	44
3.7	Wirkung von Histamin-Agonisten und Antagonisten.....	45
3.7.1	Herz-Hirnstamm-Präparation .....	45
3.7.2	Stimulation isolierter Glomera.....	46
3.7.3	Mikroinjektion in den Nucleus tractus solitarii .....	46
4	Ergebnisse .....	48
4.1	Histaminerge Charakteristika der Chemoreflexbahn .....	48
4.1.1	Glomus caroticum.....	49
4.1.2	Ganglion petrosum .....	52
4.1.3	Nucleus tractus solitarii.....	53
4.2	Wirkung von Histaminika auf die Aktivität des N. phrenicus .....	55
4.2.1	H1R- und H3R-Agonisten am perfundierten Glomusorgan .....	55
4.2.2	H1R- und H3R-Antagonisten bei Mikroinjektion in den NTS .....	56
4.3	Transmitter-Freisetzung durch Sensorzellen in Lebendschnitten.....	58
4.3.1	Vorversuche zum Überleben von Glomus-Dünnschnitten .....	58
4.3.2	Sekretion von Katecholaminen bei Hypoxie.....	59
4.3.3	Wirkung von (Anti-) Histaminika auf die Katecholamin-Sekretion .....	60
4.4	Biogene Amine im Glomus caroticum des Menschen .....	63
4.4.1	Altersbezogene Veränderungen im menschlichen Glomusorgan .....	63
4.4.2	Dopaminerge Charakteristika im menschlichen Glomusorgan .....	64
4.4.3	Histaminerge Charakteristika im menschlichen Glomusorgan.....	66
5	Diskussion .....	69
5.1	Der Neurotransmitter-„Cocktail“ des Glomus caroticum .....	69
5.1.1	Die Vielfalt der Neurotransmitter.....	69
5.1.2	Histamin in der Signaltransduktion der O <sub>2</sub> -Chemozeption.....	70
5.2	Signalübertragung im Glomus caroticum des Menschen .....	72

5.2.1	Neurotransmitter im humanen Glomusorgan .....	72
5.2.2	Ontogenetische Entwicklung.....	73
5.3	Medizinisches Interesse .....	75
5.3.1	Interaktionsort für Pharmakawirkungen und -nebenwirkungen .....	75
5.3.2	Mögliche Rolle bei SIDS .....	76
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	78
7	Literaturverzeichnis .....	80
8	Lebenslauf.....	86
9	Eigene Veröffentlichungen.....	88
10	Danksagung .....	89

## Abkürzungen

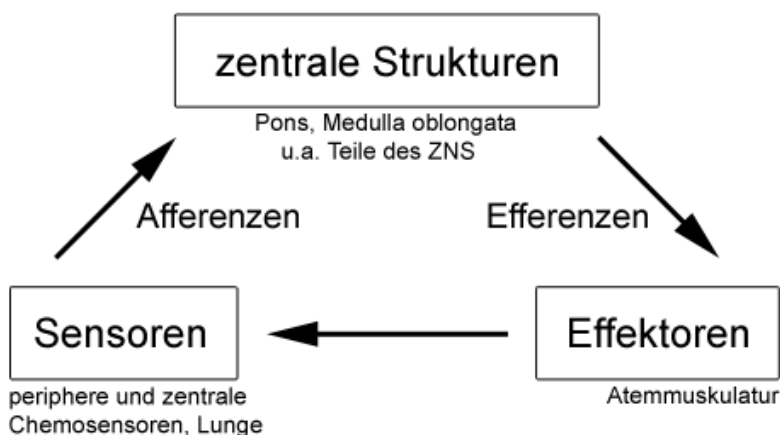
5-HT	Serotonin
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
bp	Basenpaare (base pairs)
D1R, D2R	Dopamin-1-Rezeptor, Dopamin-2-Rezeptor
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid), komplementäre (complementary) DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FB	Fast Blue
FCS, HS	fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum), Pferdeserum (Horse Serum)
H1R-H4R	Histamin-1-Rezeptor bis Histamin-4-Rezeptor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HDC	Histidin-Decarboxylase
HIS	Histamin
I	elektrischer Strom [A]
KG	Körpergewicht [kg]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
M	molar [mol/l]
mRNA	messenger RNA
p	Wahrscheinlichkeit für einen irrtümlich gefundenen Unterschied zweier Beobachtungsgruppen für die vorliegende Stichprobe
pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck, Sauerstoff-Partialdruck
PBS, TBS	Phosphate Buffered Saline, Tris Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
R.T.	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SNAP25	Synaptosom-assoziiertes Protein (25 kDa)
TBE	Tris / Borat / EDTA
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VMAT 1 / 2	Vesikulärer Monoamintransporter 1 / 2

Anatomische Strukturen werden gemäß gebräuchlicher Schemata abgekürzt.

# 1 Einführung

## 1.1 Chemozeption von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> im menschlichen Körper

Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ist für alle Tiere und den Menschen unentbehrlich. Zur Versorgung von Zellen und Organen ist eine konstante O<sub>2</sub>-Zufuhr erforderlich, die durch einen basalen Atemantrieb erreicht wird. Dieser wird innerhalb des zentralen Rhythmusgebers in der Medulla oblongata gesteuert. Zudem muss eine schnelle und zuverlässige Anpassung der Sauerstoffaufnahme und auch der Kohlendioxidabgabe (CO<sub>2</sub>) über die Lungenalveolen an physische, psychische oder auch pathologische Belastungen erfolgen, die mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch einhergehen. Demzufolge ist es für den Organismus unerlässlich, einerseits geeignete Sensoren auszubilden, die den aktuellen Blutgehalt (Partialdruck p) der Atemgase O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> messen, andererseits die Informationen sinnvoll zu verarbeiten sowie gegebenenfalls die Atmung zu stimulieren (im Falle von Hypoxie bzw. Hyperkapnie) oder zu drosseln (Hyperoxie bzw. Hypokapnie). Diese Adaption geschieht über Chemosensoren. Während die Messung von CO<sub>2</sub> vornehmlich in zentralen Strukturen – insbesondere der ventrolateralen Medulla oblongata über den pH des Liquors erfolgt (Feldmann et al. 2003), geschieht die O<sub>2</sub>-Perzeption hauptsächlich in peripheren Organen und der Lunge selbst. ☞ Abbildung 1.1 zeigt das Zusammenspiel von peripheren und zentralen Komponenten über Integrationsstellen im ZNS zu den Effektoren, also der Atemmuskulatur. Deren Feedback zu den Sensoren schließt den Regelkreis. Einer der wichtigsten peripheren Chemosensoren für O<sub>2</sub> ist das **Glomus caroticum (Glomusorgan)**. Weitere Sauerstoffsensoren sind die sog. *Glomera aortica*, die man in der Wand des Aortenbogens und dessen proximalen Abgängen findet, sowie die neuroepithelialen Körperchen der Lunge (auch *Glomera pulmonalia*).



**Abbildung 1.1: Regelkreis der Atmungskontrolle.** Die Informationen der peripheren und zentralen Sensoren werden Kontrollmechanismen im ZNS zugeführt, die die Aktivität der Atemmuskulatur regulieren. Über deren negatives Feedback wird die Erregung der Sensoren gehemmt. (mod. nach Caruana-Montaldo et al., 2000)

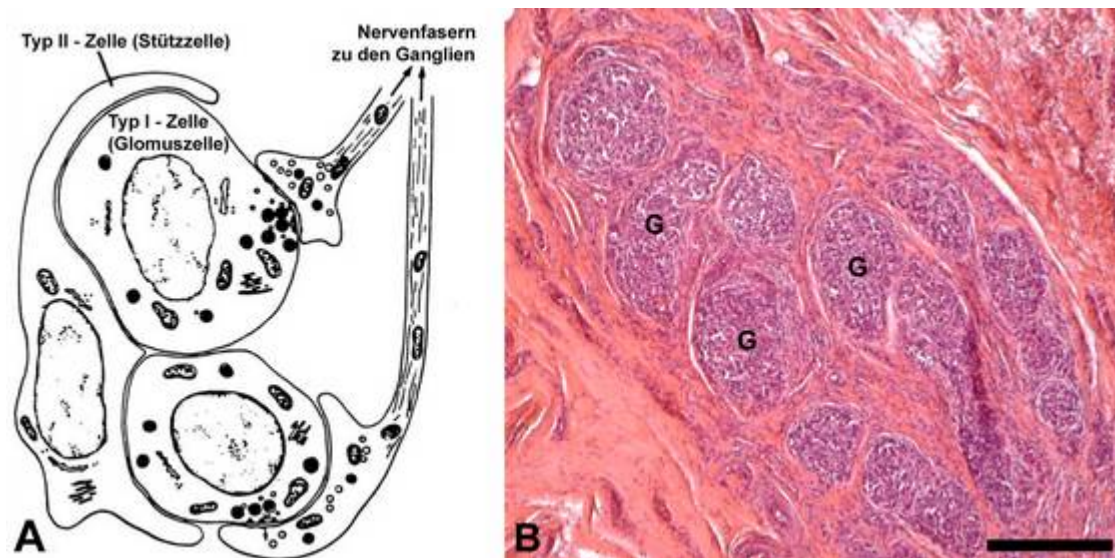


## 1.2 Chemoreflexbahn des Glomus caroticum


### 1.2.1 Glomus caroticum

#### 1.2.1.1 Anatomie und Histologie

Das **Glomus caroticum** des Menschen ist ein paariges, oval geformtes Organ von ca. 2 bis 3 mm Längendurchmesser (bei Nagern ca. 300 – 600  $\mu\text{m}$ ), welches sich bilateral an der Bifurkation der A. carotis communis in die Aa. carotis interna et externa befindet. Um seine Funktion als  $\text{O}_2$ -Sensor erfüllen zu können, verfügt es über eine ausgeprägte Blutversorgung: über verschiedene Zweige der externen Carotisarterie fließt Blut zum Glomusorgan und wird über zahlreiche Anastomosen und Kapillaren allen Sensorzellen zugeführt, so dass die durchschnittliche Blutperfusion von etwa  $1 \text{ ml} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  sogar die des Gehirns um ein 20-faches übersteigt (Jones, 2003).



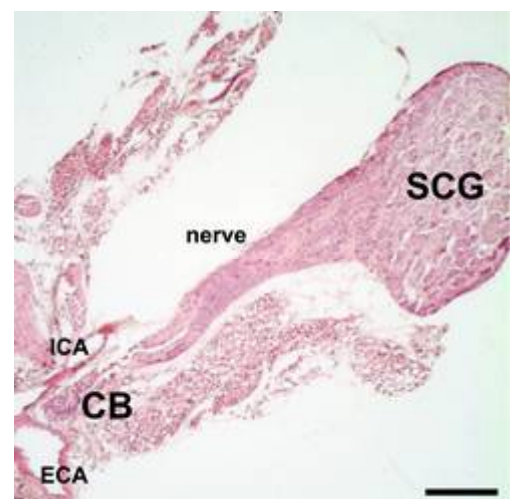
**Abbildung 1.2: Histologie des Glomusorgans.** Das Glomusorgan beherbergt zwei Arten von Zellen (A, mod. nach Caruana-Montaldo et al., 2000): Typ I-Zellen (Glomus- oder Sensorzellen), die eigentlichen Chemosensoren darstellen und Typ II-Zellen, Glia-ähnliche Stützzellen. B: normale Histologie des Glomusorgans eines menschlichen Kindes (vier Monate) mit den typischen glomoiden Zellaggregaten (Glomerula, G). (HE-Färbung, Skalierung = 200  $\mu\text{m}$ )

Das Glomusorgan selbst besteht aus zwei Arten von Zellen (Gonzales et al., 1994, siehe auch  Abbildung 1.2 A): erstens den **Typ I-Zellen**, auch **Sensor-** oder **Glomuszellen** genannt, die die eigentlichen Chemosensoren darstellen und auf geeignete Stimuli hin die vesikulär gespeicherten Neurotransmitter und -modulatoren ausschütten. Die

fusiformen **Typ II-Zellen** hingegen fungieren als Glia-ähnliche Stützzellen, vermutlich auch als neurotrophe Stammzellen (vgl. Pardal et al., 2007). Zwar besitzen sie keine chemosensorische Aktivität, jedoch kann eine gewisse Rolle in der Signaltransduktion nicht ausgeschlossen werden: wie Xu et al. (2003) berichten, führt die Applikation von ATP zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, eine anschließende Exozytose konnte jedoch nicht detektiert werden. Beide Zellarten kommen in den für das Organ typischen und namensgebenden Zellaggregaten vor, die Glomerula genannt werden (siehe ☞ Abbildung 1.2 B). Die Glomuszellen werden als sekundäre Sinneszellen durch Nervenendigungen sensorischer Neurone des **Ganglion petrosum** (anatomisch Ggl. inferius n. glossopharyngei) innerviert. Aufgabe dieser pseudo-unipolaren Neurone ist die Weiterleitung chemosensorischer Informationen (u. a.  $\text{O}_2$ -Partialdruck,  $\text{pO}_2$ ) über den IX. Hirnnerven zu dessen Kerngebiet in der Medulla oblongata.

Weitere sensorische Fasern kommen vom **Ganglion nodosum** (anatomisch Ggl. inferius n. vagi; vgl. Ichikawa, 2002). Zusätzlich ziehen sympathische Fasern des **Ganglion cervicale superius** des Grenzstranges (SCG, siehe ☞ Abbildung 1.3 und Lazarov et al., 2009) sowie parasympathische Fasern des **Ganglion caroticum** versorgt (Verna, 1979) zum Glomusorgan. Sympathische und parasympathische Fasern innervieren neben den chemosensorischen Zellen auch die Blutgefäße des Glomus caroticum und sind essentiell an der Regulation des Blutflusses innerhalb des Organs beteiligt (O'Regan, 1981). Satoda et al. (1995) beleuchten in einer detaillierten Labeling-Studie die Ursprünge und Endigungen neuronaler Fasern des Carotis sinus-Nervs bei Affen. Folgende ☞ Abbildung 1.3 zeigt exemplarisch die Innervation des Glomus caroticum durch das Ggl. cervicale sup. in der Maus (Präparation eines Balb-cJ-Stammes):

**Abbildung 1.3: Innervation des Glomus caroticum durch das Ggl. cervicale sup.** Übersichtsaufnahme einer HE-Färbung des Glomus caroticum (Carotid Body, CB) einer Balb-cJ-Maus mit umliegendem Gewebe. Vom benachbarten Ggl. cervicale sup. (SCG) aus ziehen deutlich sichtbare Nervenfasern (nerve) zum CB, das zwischen der externen (ECA) und internen (ICA) A. carotis lokalisiert liegt. (HE-Färbung, Skalierung = 100  $\mu\text{m}$ )



### 1.2.1.2 Physiologie

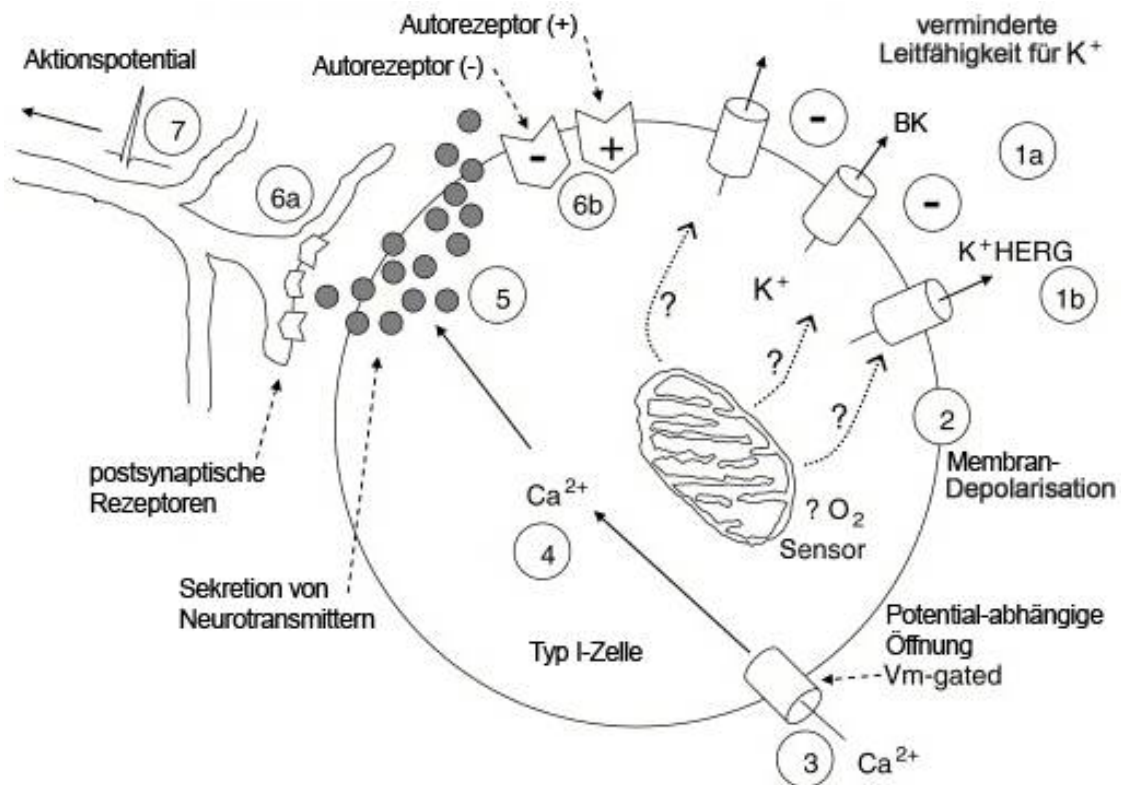
Die genauen Mechanismen der  $O_2$ -Messung in den Glomuszellen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, werden derzeit jedoch intensiv beforscht. Gängigen Theorien zufolge gibt es mehrere mögliche Mediatoren der  $O_2$ -Perzeption (siehe Lopez-Barneo et al., 2001; Lopez-Barneo, 2003 und dortige Literaturangaben). Sie seien hier kurz vorgestellt:

Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH)-Oxidase.  $O_2$  wandelt sich im Gewebe selbstständig in reaktive Sauerstoffspezies ( $O_2^-$ ), die durch eine Oxidase zu  $H_2O_2$  reduziert werden. Dies wiederum kann Ionenkanäle und andere Moleküle oxidieren. Mitochondrien. In den „Sauerstoffreaktoren“ der Zelle führt die Abwesenheit von  $O_2$  zu einer Aktivitätsabnahme der Cytochrom C-Oxidase im Komplex IV. Die Folge ist eine Depolarisation, ein konsekutiver  $Ca^{2+}$ -Anstieg sowie die Transmitter-Freisetzung. Stickoxid (NO). Auch NO wird als Mediator der Sauerstoff-Sensorik diskutiert: das ubiquitär vorkommende Gas bindet an den mitochondrialen Komplex IV und verändert so die Affinität von Cytochrom C zu  $O_2$ . Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF). Für die Langzeiteffekte chronisch hypoxischer Zustände schließlich zeichnen HIF verantwortlich, die die Expression einer großen Bandbreite  $O_2$ -sensitiver Gene regulieren. Eine jüngere Studie von Lahiri et al. (2007) konnte zeigen, dass durch Applikation von Kohlenstoffmonoxid (CO) sowohl die chemosensorische Entladung der Sensorzellen als auch – mit einer Latenzzeit von mehreren Minuten – HIF1 $\alpha$  stimuliert werden kann. Dies legt eine Rolle von HIF zumindest in der Langzeitwirkung hypoxischer Zustände nahe.

Während in der Literatur Uneinigkeit über den genauen Mechanismus der  $O_2$ -Perzeption herrscht, wird in gängigen Theorien membranständigen Ionenkanälen eine zentrale Rolle in der weiteren Verarbeitung des hypoxischen Signals zugesprochen. Entsprechend depolarisieren die Sensorzellen bei niedrigem  $pO_2$  (hypoxischer Stimulus) durch den Schluss von (möglicherweise  $O_2$ -sensitiven)  $K^+$ -Kanälen: die Leitfähigkeit der Plasmamembran für  $K^+$  nimmt in Folge ab. Über die Öffnung spannungsgesteuerter  $Ca^{2+}$ -Kanäle führt dies zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, was schließlich die Exozytose der in den Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter triggert (Iturriaga and Alcayaga, 2004). Diese binden an die jeweiligen Rezeptoren der synaptisch verknüpften Dendriten des afferenten Neurons. Es entstehen Aktionspotentiale an den Nervenfasern, die sich entlang des

Faserverlaufs in Richtung ZNS fortsetzen. Dendritische Nervenfaserbündel verlaufen über den N. sinus carotici, einem Zweig des N. glossopharyngeus, zum Ganglion petrosum und wie schließlich zu dessen Kerngebiet im Hirnstamm.

Zusätzlich besetzen die exozytierten Neurotransmitter und -modulatoren membranständige Autorezeptoren der Glomuszellen selbst und modulieren auf diese Weise die Hypoxieantwort weiter. Die folgende Abbildung 1.4 zeichnet schematisch die diskutierten Theorien zur O<sub>2</sub>-Perzeption und dessen konsekutiver Signalübertragung an entsprechende Nervenfasern auf:



**Abbildung 1.4: Theorie zur intrazellulären und synaptischen Signaltransduktion der Hypoxieantwort.** Ausgehend von einem (möglicherweise intrazellulär in den Mitochondrien lokalisierten) O<sub>2</sub>-Sensor kommt es zur Reduktion der K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit (1a und b). Eine Depolarisation der Plasmamembran ist die Folge (2), was wiederum die Öffnung spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bedingt (3): der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel steigt (4). Nach der Exozytose vesikulär gespeicherter Neurotransmitter (5) binden diese sowohl an postsynaptische Rezeptoren sensorischer Neurone des Ganglion petrosum (6a) als auch an inhibitorische und stimulierende Autorezeptoren der Sensorzellen selbst (6b). Via Aktionspotentialen (7) wird die Information an höhere Strukturen des ZNS weiter geleitet. (mod. nach Carrol and Kim, 2005)

Die gesamte Verschaltung dient als afferenter Arm von Chemoreflexen, die hauptsächlich die Atmung und kardiozirkulatorische Funktionen regulieren. Neben O<sub>2</sub> wird für das Glomus caroticum auch eine Rolle in der Sensorik des pCO<sub>2</sub>, des Blut-pHs und der Blutglukose diskutiert (Lahiri und Forster, 2003; Pardal und Lopez-Barneo, 2002).

### 1.2.2 Ganglion petrosum und Nucleus tractus solitarii

Unmittelbar nach dem Austritt des IX. Hirnnervs aus der Schädelhöhle, kaudal des Foramen jugulare, liegt das **Ganglion petrosum**. Das Ganglion selbst besteht aus den Perikarya u. a. sensorischer Nervenzellen, Nervenfasern und Gliazellen. Neben anderen Aufgaben (siehe folgende Auflistung) ist es eine erste Integrationsstelle für chemosensorische Informationen der Sensorzellen des Glomusorgans und leitet deren Signale in Form von Aktionspotentialen zu höheren Hirnstammzentren weiter. Andere Versorgungsaufgaben des IX. Hirnnervs umfassen:

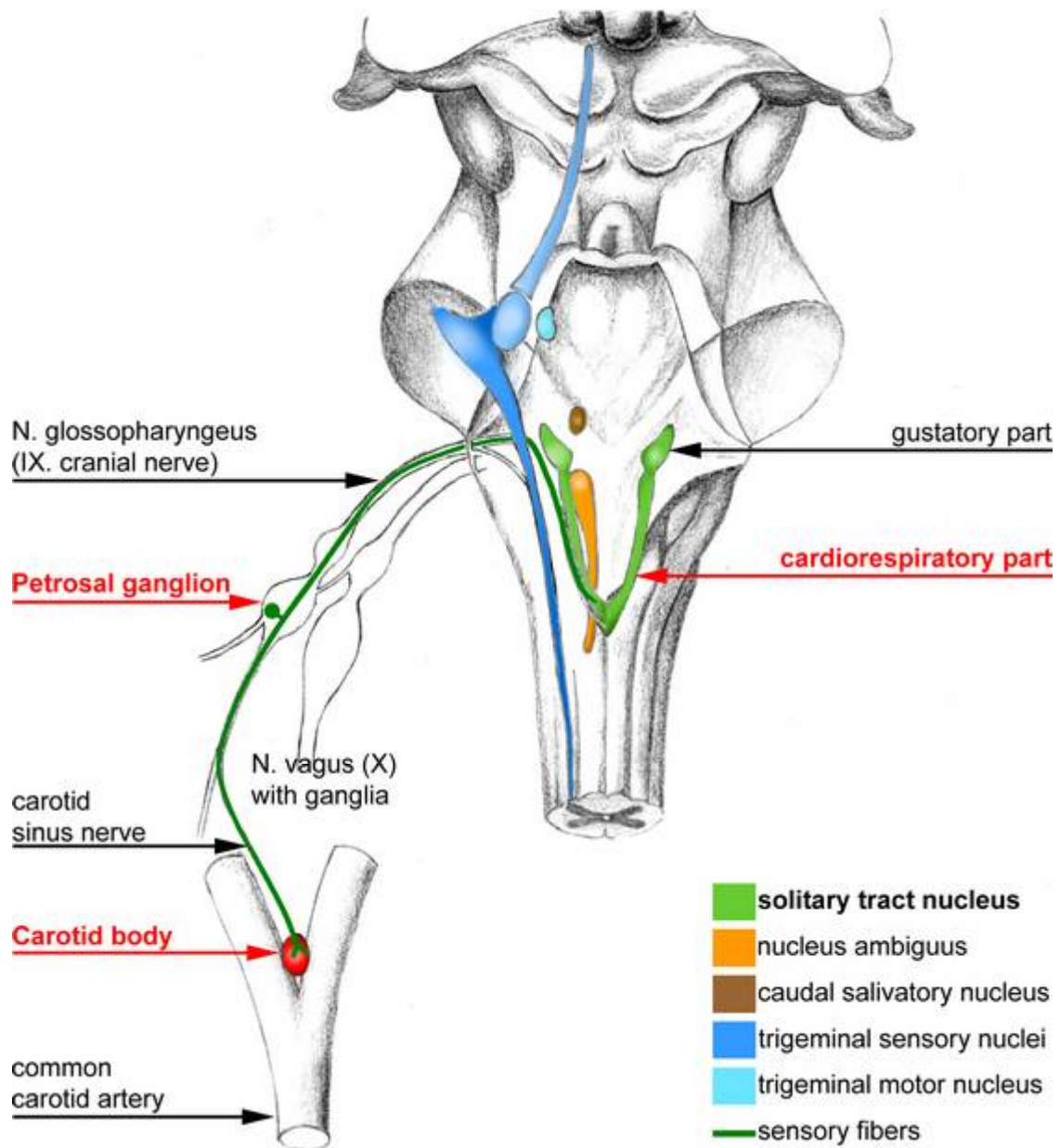
- Schleimhautsensibilität im Bereich des Ohrs, des Rachens und der Zunge
- motorische Fasern für den M. stylopharyngeus
- Pressorezeptoren des Sinus caroticus
- Geschmacksfasern der Wallpapillen
- sekretorische Fasern der Ohr- und Zungenspeicheldrüsen

Das Kerngebiet des N. glossopharyngeus liegt im Bereich des kaudalen Hirnstamms, der **Medulla oblongata**, und umfasst die folgenden Kerne:

- |                                     |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| ① Nucleus ambiguus (kranialer Teil) | motorisch                            |
| ② Nucleus tractus solitarii         | sensorisch (Chemo-/Pressorezeptoren) |
| ③ Nucleus salivatorius inferior     | sekretorisch (Speicheldrüsen)        |

☞ Abbildung 1.5 zeigt den Verlauf sensorischer Fasern aus dem Glomus caroticum über den N. sinus carotici und N. glossopharyngeus zum Ggl. Petrosum sowie die zugehörigen Kerngebiete. Die zentralen Axone der pseudounipolaren Ganglienzellen ziehen im Nerv Richtung kranial und gelangen im Kleinhirnbrückenwinkel in den Hirnstamm. Die Fasern enden vorwiegend im ipsilateralen kardiorespiratorischen Teil des Ncl. tractus solitarii im kaudalen Hirnstamm (kommissuraler Subnucleus), der in engem Zusammenhang zum zentralen Rhythmusgenerator der Atmung steht (Sapru, 1996; Song and Poon, 2004).





**Abbildung 1.5:** Verlauf der sensorischen Fasern des Glomusorgans und Kerngebiet des *N. glossopharyngeus*. Periphere Dendriten sensorischer Ganglienzellen ziehen im *N. sinus carotici*, einem Zweig des *N. glossopharyngeus* zu den Perikarya im Ganglion petrosum. Deren zentrale Axone verlaufen weiter im *N. glossopharyngeus* und enden nach ihrem Eintritt in den Hirnstamm vornehmlich im ipsilateralen kardiorespiratorischen Teil des *Nucleus tractus solitarii*. Von dort aus findet die weitere Verschaltung zu den respiratorischen Neuronen statt. Zur Orientierung wurden zusätzlich die sensiblen und motorischen Kerne des *N. trigeminus* eingezeichnet.

### 1.3 Neurotransmitter und Rezeptoren

Innerhalb einer elektrisch erregbaren Zelle werden Informationen durch Aktionspotentiale weiter geleitet. Diese elektrischen Signale können jedoch nicht ohne weiteres auf andere Zellen übertragen werden. Eine Möglichkeit ist die Ausbildung **chemischer Synapsen**. Trifft ein Aktionspotential an der präsynaptischen Membran ein, führt die Potentialumkehr zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ , was die Exozytose von vesikulär gespeicherten (Neuro-) Transmittern auslöst. Diese diffundieren durch den sog. synaptischen Spalt und binden an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran.

(Neuro-) Transmitter sind also Überträgerstoffe, die ubiquitär im Organismus aller Tiere vorkommen, und deren Aufgabe es ist, Informationen von einer Zelle zur nächsten zu transportieren. Die Interaktion kann dabei zwischen verschiedensten Arten von Zellen, z. B. von Neuron auf Neuron, von Neuron auf Muskelzellen, aber auch – wie z. B. im Glomus caroticum – von Sensorzelle auf Neuron stattfinden. Der Transmitter muss entweder von der Zelle selbst synthetisiert werden, oder vom extrazellulären Raum (z. B. aus dem Blut oder durch axonalen Transport anderer Nervenzellen) aufgenommen und anschließend in Vesikeln gespeichert werden, um ihn dann bei Bedarf wieder freisetzen zu können.

#### 1.3.1 Überblick der Transmitter im Glomus caroticum

Um die gemessenen Informationen an Nervenzellen weitergeben zu können, benutzen die Sensorzellen des Glomusorgans als sekundäre Sinneszellen eine ganze Reihe unterschiedlicher Transmitter, Co-Transmitter und Neuromodulatoren. Diese binden an Rezeptoren der sie innervierenden Nervenzellen und zum Teil auch an Autorezeptoren der Sensorzellen selbst. Diese chemisch heterogenen Substanzen übersetzen die Signale zum Partialdruck der Atemgase im Blut in elektrische Potentiale, die entlang der Nervenzellfortsätze zu höheren Zentren weitergeleitet werden (siehe dazu auch Iturriaga und Alcayaga, 2004).

☰ Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten bisher identifizierten Überträgerstoffe der Sensorzellen des Glomus caroticum:

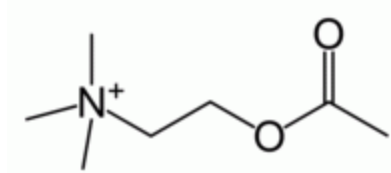
Transmitter	Abk.	Rezeptorsubtyp	Antwort
Acetylcholin	ACh	mAChR	inhibitorisch
		nAChR	exzitatorisch
<i>biogene Amine</i>			
Adrenalin	A	$\alpha_{2a}R$	exzitatorisch
Dopamin	DA	D <sub>2</sub> R	inhibitorisch
Serotonin	5-HT	5-HT <sub>5a</sub> R	exzitatorisch
<i>Nukleotide</i>			
Adenosin-5'-Triphosphat	ATP	P <sub>2</sub> X <sub>2</sub> / P <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	exzitatorisch
<i>Peptide</i>			
Enkephalin	Enk	$\delta$ -opiod-R	inhibitorisch
Neuropeptid Y	NPY	Y1R / Y2R	
Substanz P	SP	NK1R	exzitatorisch
Vasoaktives Intestinales Polypeptid	VIP	-	-
<i>andere</i>			
Stickoxid	NO	-	-

**Tabelle 1.1: Übersicht der wichtigsten Neurotransmitter und Rezeptoren im Glomus caroticum.** Abkürzungen: mAChR = muskarinerges Acetylcholinrezeptor, nAChR = nikotinerges Acetylcholinrezeptor,  $\alpha_{2a}R$  =  $\alpha_{2a}$ -Adrenozeptor (Almaraz et., 1997), D<sub>2</sub>R = Dopamin-2-Rezeptor, 5-HT<sub>5a</sub>R = 5-Hydroxytryptamin-5a-Rezeptor, P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> / P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> = Purinozeptoren 2 / 3,  $\delta$ -opiod-R =  $\delta$ -Opioid-Rezeptor, Y1R / Y2R = Neuropeptid Y-Rezeptor 1 / 2, NK1R = Neurokinin-1-Rezeptor. Weitere Literaturangaben siehe Text.

Im Folgenden sollen die Transmitter-Systeme des Acetylcholin, der biogenen Amine und der Nukleotide detaillierter beschrieben und der aktuelle Stand der Forschung kurz vorgestellt werden. In dieser Beschreibung bleiben **peptiderge** (Gauda und Gerfen, 1996) und **andere Systeme** unberücksichtigt, es sei an dieser Stelle lediglich auf die Quellenangaben verwiesen. Die im Folgenden gezeigten Strukturformeln der Transmitter und Neuromodulatoren entstammen frei zugänglichen Seiten des Internet-Lexikons [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org).



### 1.3.2 Acetylcholin

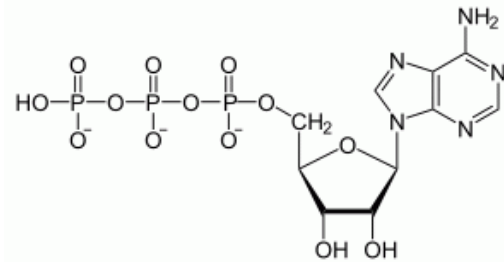


**Acetylcholin** (ACh), chemisch (2-Acetoxy-ethyl)-trimethylammonium, ist der Essigsäureester des Cholins. Es wird durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert und durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VAChT)

in Vesikeln gespeichert. Der Abbau erfolgt über die spezifische Acetylcholinesterase oder die unspezifische Cholinesterase. Zwei Arten von Acetylcholinrezeptoren (AChR) sind bekannt, nikotinerge (nAChR, 2 Subtypen) und muskarinerge (mAChR, 5 Subtypen).

Die Freisetzung von ACh aus dissoziierten Glomuszellen in Co-Kultur mit Neuronen des Ganglion petrosum konnte mittels Patch-Clamp-Studien gezeigt werden: pharmakologische Blockade von nAChR mit 2  $\mu$ M Mecamylamin verhinderte vollständig die Hypoxie-induzierte Depolarisation der Glomuszell-Plasmamembran (Nurse und Zhang, 1999). In weiteren Studien an Katzen nahm die neuronale Aktivität des Carotis Sinus Nervs nach Blockade der muskarinergen Rezeptoren durch Atropin ab (Fitzgerald et al., 1997). Obwohl ACh als wichtiger Transmitter identifiziert wurde, zu dessen Freisetzung es sowohl durch Hypoxie als auch durch Hyperkapnie kommt, konnte das synthetisierende Enzym und das Enzym zum vesikulären Transport in bisherigen Versuchen nicht nachgewiesen werden (Schütz et al., 2001; Gauda, 2002). Möglicherweise dienen autonome Mikroganglienzellen als Syntheseort für ACh, das über cholinerge Nervenendigungen zu den Glomuszellen transportiert und in Vesikeln gespeichert wird. Derartige Zellen lassen sich in der Peripherie des Glomusorgans nachweisen (siehe Gauda et al. 2004).

### 1.3.3 Nukleotide



Bei den **Nukleotiden** kommt vor allem dem Adenosin-5'-Triphosphat (**ATP**) besondere Bedeutung zu. Neben seiner Funktion als unverzichtbarer Energiebaustein jeder Säugerzelle spielt ATP auch als Co-Transmitter im

Nervensystem eine wichtige Rolle. Seine physiologischen Effekte werden durch sog. P<sub>2</sub>-Purinozeptoren mediiert.

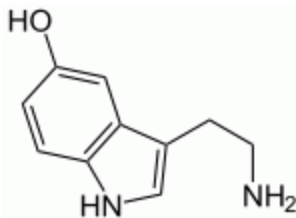
Auch im Glomusorgan wird ATP zu den wichtigsten bisher identifizierten Transmittern gerechnet. Dort dient es, wie für das periphere Nervensystem (PNS) typisch, als Co-Transmitter des ACh, und wird zusammen mit diesem auf das Signal Hypoxie bzw. Hyperkapnie hin freigesetzt (Buttigieg und Nurse, 2004; Zhang et al., 2000; Zapata, 2007). In RT-PCR-Versuchen konnten die beiden Rezeptor-Subtypen P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> und P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> in chemosensorischen Fasern der Ganglienzellen identifiziert werden, die exzitatorische Potentiale evokieren und somit zur hypoxischen Signaltransmission beitragen. (Prasad et al., 2001). Mittels Ca<sup>2+</sup>-Imaging konnte jedoch auch ein gegenteiliger Effekt gezeigt werden: ATP verhinderte den intrazellulären Anstieg von Ca<sup>2+</sup> in den Typ I- (Sensor-) Zellen auf Hypoxie, was auf das Vorhandensein von P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Autorezeptoren zurückgeführt wird (Xu et al., 2005). Somit ist ATP zum einen an der Signalübertragung an sensorische Fasern von Ganglion petrosum-Neuronen beteiligt, zum anderen inhibiert es die Glomuszellen selbst durch negatives Feedback.

Letztlich scheint ATP auch eine Rolle in Bezug zu Typ II-Zellen zu spielen, in denen es die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigert (Xu et al., 2003). Weitere Aufklärung über die Bedeutung dieser Tatsache bleibt abzuwarten.

### 1.3.4 Biogene Amine

Während die Rolle des Dopamin (DA) als einer der Haupttransmitter im Glomus caroticum gesichert scheint, ist die Rolle des Serotonin (5-HT) noch umstritten: zwar konnte die Freisetzung aus den Sensorzellen bei Hypoxie gezeigt werden, doch ist seine Synthese und Speicherung noch ungewiss.

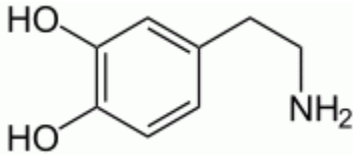
#### 1.3.4.1 Serotonin



**Serotonin**, chemisch 5-Hydroxytryptamin und Vorläufer des Melatonin, ist – wie Dopamin – ein biogenes Amin, das als Mediator und Neurotransmitter wirkt. Die Biosynthese aus L-Tryptophan erfolgt durch die Tryptophanhydroxylase (TryH) mittels Hydroxylierung und anschließende Decarboxylierung. Die Wirkungen des 5-HT werden durch Serotonin-Rezeptoren vermittelt, deren Art und Wirkungsmechanismen sehr vielfältig sind: Derzeit lassen sich mindestens 14 verschiedene 5-HT-Rezeptoren unterscheiden, die in 7 Familien zusammengefasst werden: 5-HT<sub>1</sub> bis 5-HT<sub>7</sub>. Molekularbiologisch stellt der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor einen Ionenkanal dar, während es sich bei den übrigen um G-Proteingekoppelte Rezeptoren handelt.

Wie beim ACh, ist die Rolle des 5-HT im Glomus caroticum noch nicht endgültig geklärt. Zwar konnte die 5-HT-Freisetzung und seine Wirkung auf die spontane Spike-Aktivität der sensorischen Antwort *in vitro* gezeigt werden (Zhang und Nurse, 2000), allerdings scheint Hypoxie – bei anderen Transmitter-Systemen ein wichtiges Release-Signal – keinen Einfluss auf die Sekretion von 5-HT auszuüben (Jacono et al., 2005). Auch das entscheidende Enzym der 5-HT-Synthese, TryH, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Dennoch exprimieren die Sensorzellen des Glomusorgans, die Neurone des Ggl. petrosum und des Ggl. cervicale sup. sowohl 5-HT<sub>2</sub>- als auch 5-HT<sub>5a</sub>-Rezeptoren (Wang et al., 2000; Zhang et al., 2003). Eine wichtige Funktion üben 5-HT-Rezeptoren auch im Zusammenhang mit der Atmungsregulation im Hirnstamm aus: Richter et al. (2003) beschrieben verschiedene Möglichkeiten, auf Ebene dieser Rezeptoren pathologische Zustände der zentralen Ventilationsregulation (z. B. zentrale Apnoe oder Tachypnoe) zu beeinflussen.

### 1.3.4.2 Dopamin



**Dopamin**, chemisch 4-(2-Aminoethyl)brenzkatechin oder 3-Hydroxytyramin, ist ein Katecholamin und biosynthetische Vorstufe von Noradrenalin, Adrenalin und den Melaninen. Die

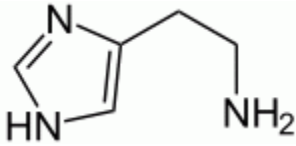
Synthese erfolgt mittels Hydroxylierung von p-Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) durch die Tyrosinhydroxylase (TH), die Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Cofaktor benötigt. DOPA wird im Anschluß zu Dopamin decarboxyliert. Die Dopamin-Rezeptoren werden in zwei Gruppen eingeteilt, die beide an G-Proteine gekoppelt sind. Die sog. D1-Gruppe (D1- und D5-Rezeptoren) hemmt über inhibitorische G<sub>i</sub>-Proteine die Adenylatcyclase, so dass die intrazelluläre Konzentration von cyclischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) sinkt, und erhöht zudem die Offenwahrscheinlichkeit von K<sup>+</sup>-Kanälen. Umgekehrt steigern Rezeptoren der D2-Gruppe (D2R bis D4R) die Aktivität der Adenylatcyclase und erhöhen somit den cAMP-Spiegel.

Der gesamte Synthese- und Speicherapparat für Dopamin konnte immunhistochemisch sowie molekularbiologisch in den Glomuszellen von Nagern nachgewiesen werden (Paulding et al., 2002; Koerner et al., 2004). So exprimieren die Zellen neben den Synthesenzymen auch die Enzyme zur Speicherung in Vesikeln, nämlich die Vesikulären Monoaminotransporter (VMAT) 1 und 2. Im Vergleich zu VMAT 1 besitzt VMAT 2 eine höhere Affinität zu Histamin (Erickson et al., 1995, Merickel und Edwards, 1995), was eine Expression vor allem in histaminergen Zellen bedingt (Prinz et al., 2003).

Hypoxie und Hyperkapnie sind auch im Fall von DA für die Freisetzung des biogenen Amins ausschlaggebend (Gauda, 2002). Dieses bindet an inhibitorische Dopamin-D2-Autorezeptoren der Glomuszellen und postsynaptische D2R sensorischer Neurone des Ganglion petrosum. Im Gegenzug konnte die Präsenz (exzitatorischer) D1-Rezeptoren in den Sensorzellen des Glomusorgans bislang nicht nachgewiesen werden: entsprechend zählt Dopamin in der Literatur zwar zu den primären Transmittern in der hypoxischen Signalantwort, zeichnet jedoch für eine inhibitorische Rolle in der Signalantwort der Sensorzellen verantwortlich.

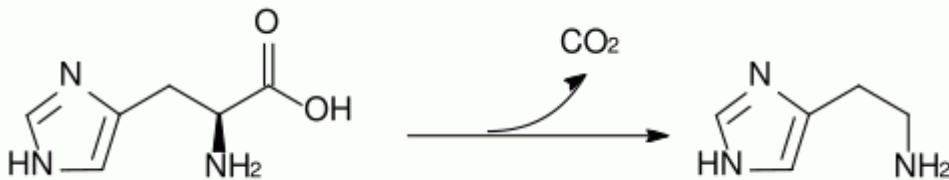
### 1.3.5 Histamin als neuer Transmitter

#### 1.3.5.1 Histamin als Neurotransmitter und Gewebshormon




**Histamin** (chemisch 2-(4-Imidazolyl)-ethylamin), ein weiterer Vertreter in der Gruppe der biogenen Amine, wirkt im menschlichen und tierischen Organismus als Neurotransmitter und Gewebshormon. Eine zentrale Rolle spielt die Substanz bekanntlich bei (pathologischen) Reaktionen im Rahmen der Immunreaktion (z. B. Allergien, Asthma bronchiale) sowie im Gastrointestinaltrakt bei der Regulation der Magensäureproduktion und der gastralen Motilität. Die Aktivierung von H1-Rezeptoren führt im Bereich kleinerer Blutgefäße und Arteriolelen zur Vasodilatation (Erythem). Im ZNS gilt eine Beteiligung am Brechreflex (Area postrema, H1R) sowie an der Justierung des Vigilanz-Status als gesichert. Hinzu kommen Einflüsse auf noradrenerge, serotonerge, cholinerge, dopaminerge und glutaminerge Neuronen über präsynaptische (vor allem H3-) Rezeptoren in ZNS und PNS.

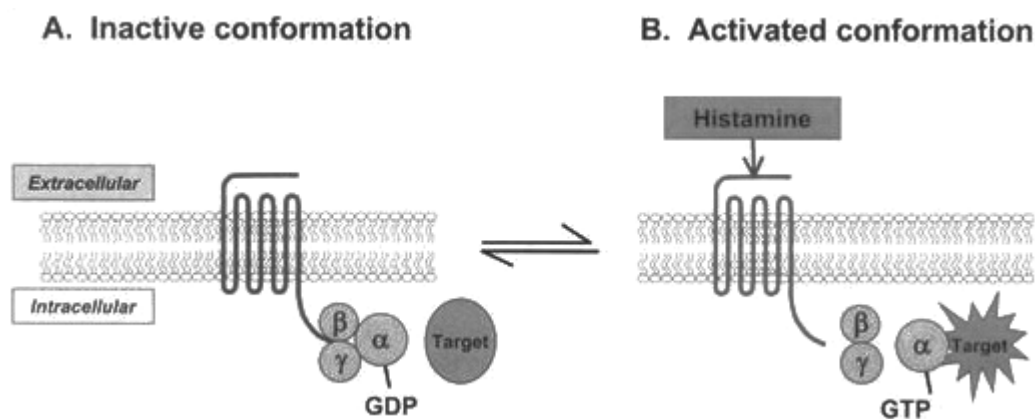
Auch im Glomus caroticum zählt Histamin zu den jüngst entdeckten Neurotransmittern (Koerner et al., 2004), dessen Funktion in der chemosensorischen Signalübertragung bislang unbekannt war. Es wird durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylierung der Aminosäure Histidin durch die **Histidindecaboxylase** (HDC) synthetisiert:



#### 1.3.5.2 Histamin-Rezeptoren und Subtypen

Vier Subtypen von **Histamin-Rezeptoren** wurden bislang identifiziert (Hough, 2001), **H1R** bis **H4R**. Alle Typen sind an G-Proteine gekoppelt, die die jeweilige Wirkung über spezifische Signalkaskaden ins Zellinnere weiterleiten. Während H1- und H2-Rezeptoren via Phospholipase C ( $G_{q/11}$ :  $IP_3$ - [Insositol-1,4,5-Triphosphat] und DAG-Kaskade) respektive Adenylatcyclase ( $G_s$ : cAMP-Kaskade) eine exzitatorische Wirkung hervorrufen, bedingen die Subtypen H3R und H4R eine inhibitorische Reaktion über  $G_{i/o}$ -Proteine (Schwartz et al., 1991; Arrang et al., 1983, 1985).

Die folgende  Abbildung 1.6 verdeutlicht Struktur und Wirkungsmechanismen der G-Protein-gekoppelten Histamin-Rezeptoren:



**Abbildung 1.6: Struktur und grundsätzlicher Wirkungsmechanismus der Histamin-Rezeptoren.** Bei allen vier bislang bekannten Subtypen der HIS-Rezeptoren handelt es sich um membranständige Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Die intrazelluläre Komponente ist an ein heterotrimeres G-Protein (Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ ) gekoppelt, das die Signale ins Zellinnere übermittelt. Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines geeigneten Liganden löst sodann den Austausch von GDP durch GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins aus. In Folge können je nach Art des Liganden (exzitatorisch versus inhibitorisch) die  $\alpha$ - oder die  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren, die bei  $G_s$ -Proteine beispielsweise die Aktivität der Adenylatcyclase, oder im Falle von  $G_{q/11}$ -Proteinen die Phospholipase C aktivieren

Obwohl der zuletzt entdeckte Histamin-H4-Rezeptor große Ähnlichkeit mit dem H3R besitzt und ebenfalls über  $G_{i/o}$ -Proteine wirkt, besitzt er doch eine deutlich verschiedene Pharmakologie und Gewebespezifität (Nguyen et al., 2001).

### 1.3.5.3 Histamin in der Atmungsregulation

Die histaminerge Modulation des respiratorischen Netzwerks von Mäusen konnte durch Dutschmann et al. (2003) nachgewiesen werden: an einer Herz-Hirnstamm-Präparation erhöhte Histamin die neuronale Aktivität des *N. phrenicus* nach systemischer Applikation über die Aorta descendens. Diese Antwort konnte ebenso für die H1- und H3-Rezeptor-Agonisten *HTMT* und *Imetit* beobachtet werden, nicht jedoch durch den H2-Agonisten *Dimaprit*. Signifikant senkte jedoch nur der H1-Antagonist *Pyrilamin* die respiratorische Antwort, während H2- und H3-Antagonisten keinen Effekt hervorriefen. Zudem zeigt sich auch eine Rolle von Histamin in der hypoxischen Atemantwort, was eine eventuelle Beteiligung arterieller Chemorezeptoren an diesem Weg der Signaltransduktion impliziert. Unsere

Arbeitsgruppe (Koerner et al., 2004) konnte daraufhin Produktion, Speicherung und die Freisetzung von Histamin durch Hypoxie im Glomus caroticum der Ratte zeigen. Durch RT-PCR-Versuche konnte zudem bereits die Präsenz der Histamin-Rezeptoren H1R bis und mit H3R auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Über die genaue Lokalisation, sowie über die Funktion des biogenen Amins und seiner Rezeptoren herrschte bislang jedoch Unklarheit. Interessanterweise konnte jüngst die Beteiligung von Histamin-H1-Rezeptoren in der Atmungsregulation genauer determiniert werden: bei H1R-Knockout-Mäusen verminderte sich die thermische Steigerung der Atmung während Hypoxie (Ishiguro et al., 2006; Iwase et al., 2007).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Charakterisierung arterieller Chemorezeptoren ist sowohl aus physiologischer als auch pathologischer Sicht von großer Bedeutung. Ein detailliertes Verständnis der Mechanismen der Signalübermittlung im Glomus caroticum, dem wichtigsten der peripheren O<sub>2</sub>-Sensoren, könnte pathologische Zusammenhänge aufklären und neue Strategien in Diagnostik und Therapie hypoxischer Zustände ermöglichen. Die deutlichen Hinweise auf die Beteiligung des Histamins in der Atemregulation (Dutschmann et al., 2003; Iwase et al., 2007) und der sensorischen Antwort des Glomusorgans machen eine weitergehende und genauere Untersuchung seiner Rolle unabdingbar. Synthese, Speicherung und Freisetzung in Sensorzellen durch Hypoxie konnte bereits gezeigt werden (Koerner et al., 2004). Dennoch ist unbekannt, welche Rezeptoren an der Signaltransmission beteiligt sind, von welchen Zellen diese Rezeptoren exprimiert werden und inwieweit Histamin auch als Transmitter in Hirnstamm und respiratorischen Zentren fungieren könnte. Weiterhin liegen bislang nur rudimentäre Kenntnisse zu dopaminergen und histaminergen Merkmalen im Glomusorgan des Menschen vor. Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb:

- I. Charakterisierung von Histamin-Rezeptoren im Glomus caroticum von Nagern; Identifizierung chemosensorischer Neurone des Ggl. petrosum und des Ncl. tractus solitarii sowie deren Verteilung im Gewebe
- II. pharmakologische Charakterisierung der Wirkung von Histamin-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten im Glomus caroticum und Ncl. tractus solitarii auf atmungsphysiologische Parameter (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie in Göttingen)
- III. Etablierung der Amperometrie-Methodik; Darstellung lebender Glomus caroticum-Dünnschnitte und Untersuchung histaminergener Modulation der Hypoxie-Antwort anhand der Katecholamin-Sekretion
- IV. immunhistochemische Untersuchung dopaminergener und histaminergener Charakteristika im Glomus caroticum des Menschen im Hinblick auf die beim Nager gewonnenen Erkenntnisse



## 2 Material

### 2.1 Versuchstiere

Für die Studien an Nagern wurden Glomera carotica von Ratten beiderlei Geschlechts des Stammes Sprague-Dawley entnommen, deren Alter bei etwa sechs Wochen lag. Durchwegs jüngere Tiere von maximal 20 Tagen fanden für elektrophysiologische Untersuchung an Dünnschnitten des Glomusorgans mittels Amperometrie Verwendung. Die Versuchstiere wurden unter Beachtung der Tierhaltungsrichtlinien des National Institute of Health (NIH, Commission on Life Sciences, 1996) an der Technischen Universität München aufgezogen und entweder durch Äthernarkose oder intraperitoneale Injektion von 20 µl/kg KG *Avertin* bzw. 50 µl/kg KG *Chloralhydrat* anästhesiert. Die Tötung erfolgte schmerzfrei durch Eröffnung der Halsgefäße im Rahmen der Probengewinnung.

Die Versuchstiere für Studien mit retrograder Markierung, ebenfalls Ratten des Stammes Sprague-Dawley (n = 6) im Alter von ca. sechs Wochen, wurden im Department für Anatomie der Thrakischen Universität in Stara Zagora, Bulgarien, in Übereinstimmung mit den dortigen ethischen Codes zur Tierhaltung aufgezogen und zur Materialentnahme getötet.



### 2.2 Gewinnung und Aufbereitung von Gewebeproben

In Abhängigkeit der geplanten Versuchsmethodik erfolgte die Anästhesie der Versuchstiere mit unterschiedlichen Mitteln. Für *immunhistochemische Untersuchungen* wurde die Narkose der ca. sechs Wochen alten Ratten mit Diethyläther durchgeführt. Es folgte die Eröffnung des Brustkorbs und die anschließende transkardiale Perfusion mit folgenden Lösungen:

- 100 ml heparinisiertes (1 U / ml) 0.01 M PBS (pH 7.4)
- 500 ml 4 %iger PFA in PBS

Für *amperometrische Untersuchungen* und die *Gewinnung von zellulärer RNA* im Rahmen von RT-PCR-Versuchen erfolgte keine Perfusion: die gewünschten Strukturen der Versuchstiere wurden unmittelbar nach intraperitonealer Anästhesie mit *Avertin* bzw. *Chloralhydrat* entnommen und entsprechend weiter verarbeitet.

## 2.3 Humane Proben des Glomus caroticum

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München wurden Glomera carotica von menschlichen Leichnamen im Alter von vier Monaten bis 76 Jahren gewonnen. Der Todeszeitpunkt lag dabei maximal 48 h vor der Probenentnahme (siehe  Tabelle 2.1). Unmittelbar nach Entnahme wurden die Proben für zwei h in 4 %igem PFA (in 0,1 M PBS, pH 7,4) bei R.T. überführt, im Anschluss erfolgte die Postfixierung im gleichen Fixans für 24 h bei +4° C. War eine sofortige Überführung nicht möglich, wurden die Biopsate im Anschluss an die Sektion zunächst tiefgefroren und für maximal vier Tage bei -20° C gelagert. Im Folgenden wurden die Gewebeproben in PBS gewaschen und in Parafin eingebettet, sodass ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt werden konnten. Für die Gewinnung und Bereitstellung der Proben danke ich Herrn Prof. Dr. Eisenmenger und Herrn Fischer vom Institut für Rechtsmedizin ganz herzlich.  Tabelle 2.1 gibt einen Überblick zu den entnommenen Proben inklusive Geschlecht, Alter, Todesursache und dem Zeitraum bis zur Fixation des Gewebes.

Biopsat	Geschlecht	Alter	Todesursache	$\Delta t$
1	weiblich	04 Monate	Pneumonie	~ 16
2	männlich	10 Monate	Pneumonie	~ 16
3	männlich	16 Monate	Pneumonie	~ 16
4	männlich	20 Jahre	Polytrauma	~ 8
5	männlich	26 Jahre	Polytrauma	~ 12
6	männlich	29 Jahre	Polytrauma	~ 8
6	weiblich	44 Jahre	Suizid	~ 24
7	männlich	52 Jahre	Suizid	~ 12
8	männlich	76 Jahre	Herzversagen	~ 48

**Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten humanen Proben des Glomus caroticum.** Die Gewebeproben wurden durch Herrn Florian Fischer im Institut für Rechtsmedizin entnommen, und entsprechend den Angaben im Text weiter verarbeitet.  $\Delta t$  = Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Probenentnahme in h.

## 2.4 Antikörper und verwendete Lösungen

Zielprotein/-molekül	Abk.	Verd.	Bezugsquelle	Ursprung
<i>primäre Antikörper</i>				
Dopamin (polyclonal)	DA	1:10000	Abcam Ltd	Maus
Dopamin-D2-Rezeptor (polyclonal)	D2R	1:5000	BIOTREND Chemikalien	Kaninchen
Histamin (polyclonal)	HIS	1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Kaninchen
Histamin-H1-Rezeptor (polyclonal)	H1R	1:500	Acris Antibodies GmbH	Kaninchen
Histamin-H1-Rezeptor (human, polyclonal)	hH1R	1:500	Progen Biotechnik GmbH	Kaninchen
Histamin-H2-Rezeptor (polyclonal)	H2R	1:500	Alpha Diagnostic	Kaninchen
Histamin-H3-Rezeptor (polyclonal)	H3R	1:750	Abcam Ltd	Kaninchen
Histamin-H4-Rezeptor (polyclonal)	H4R	1:200	Abcam Ltd	Kaninchen
Histidin-Decarboxylase (polyclonal)	HDC	1:4000	Progen Biotechnik GmbH	Kaninchen
Synaptosomal attachment protein of 25 kDa (monoclonal)	SNAP25	1:500	SMI	Maus
Tyrosin-Hydroxylase (monoclonal)	TH	1:40	LOXO GmbH	Maus
Vesicular monoamino transporter 1 (polyclonal)	VMAT1	1:2000	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	Kaninchen
Vesicular monoamino transporter 2 (polyclonal)	VMAT2	1:2000	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	Kaninchen
<i>sekundäre Antikörper</i>				
goat anti mouse	g $\alpha$ ms	1:500	Dianova GmbH	Ziege
goat anti rabbit	g $\alpha$ rb	1:500	Dianova GmbH	Ziege

**Tabelle 2.2:** Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper. Sekundäre Antikörper sind jeweils Biotin konjugierte Ziegen-IgG.

Lösung	Menge	Inhalt
Avertin	100 ml	1,2 g Tribromethanol, 2,5 ml tertiärer Amylalkohol, in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4
Blockierlösung A		50 mM Glycin in PBS
Blockierlösung B		5% BSA-C und 1% Normalserum (Spezies des 2. AK)
BSA-Puffer		0,1% BSA-C (Aurion) in PBS (pH 7,4)
Chloralhydrat	10 ml	7 g Chloralhydrat in 0,9 %igem NaCl, entspr. 70 mg/ml
Extrazellulärlösung	1 l	6,84 g NaCl, 0,335 g KCl, 1,932 g NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 0,203 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 0,369 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,9 g Glucose, 1,71 g Sucrose; in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4
Extrazellulärlösung (mit 40 mM K <sup>+</sup> )	1 l	4,2 g NaCl, 1,445 g KCl, 0,966 g NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 0,095 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 0,368 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,9 g Glucose, 1,71 g Sucrose, in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4
Fixierlösung		2% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4)
PBS (10 ml)	1 l	0,386 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 1,023 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 8,776 g NaCl; in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4
PFA (4%)	100 ml	4 g Paraformaldehyd, 1 ml 1 M NaOH, 0,57 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,93 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, in H <sub>2</sub> O bidest.; pH 6,8
Perfusionsmedium	1 l	6,84 g NaCl, 1,932 g NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 0,368 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 10,203 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 1,125 g KCl, 1.25% ficoll, pH 7,4
TBE-Puffer (5x)	1 l	4 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
Tyrode-Lösung (Ca <sup>2+</sup> -haltig)	1 l	8,65 g NaCl, 0,15 g KCl, 0,285 g MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,369 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 2,38 g HEPES, 1,8 Glucose, in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4
Tyrode-Lösung (Ca <sup>2+</sup> -frei)	1 l	8,65 g NaCl, 0,15 g KCl, 0,285 g MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O, 2,38 g HEPES, 1,8 Glucose, in H <sub>2</sub> O bidest., pH 7,4

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Lösungen

## 2.5 Herstellerverzeichnis

Abcam Ltd, Cambridge, UK  
Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, D  
AGOWA, Berlin, D  
Alpha diagnostics, San Antonio, USA  
American Can Company, Greenwich, USA  
Amersham Life Science, Braunschweig, D  
AutoMate Scientific Inc, San Francisco, USA  
Beckman Coulter, München, D  
Biochrom, Berlin, D  
BIORAD, München, D  
BioLabs, Schwalbach, D  
Biosciences, St Louis, USA  
BIOTREND, Köln, D  
BioWhittaker Molecular Appl., Walkersville, USA  
Biozym Diagnostic, Oldendorf, D  
Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, D  
Dianova, Hamburg, D  
DNASTAR Inc., Madison, USA  
Dow Corning, Midland, USA  
Eppendorf–Netheler–Hinz, Köln, D  
Euro-diagnostics, Arnheim, Holland  
GraphPad Software Inc., San Diego, USA  
Hamilton Company, Reno, Nevada, USA  
HEKA Electronics, Lambrecht, D  
Heraeus Instruments, München, D  
IGN, Eschwege, D  
Instrutech, Great Neck, USA  
Invitrogen, Karlsruhe, D  
Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA  
Leica, Bensheim, D  
Linde AG, Höllriegelskreuth, D  
LOXO, Dossenheim, D  
Merck, Darmstadt, D  
MJ Research, Watertown, USA  
MWG Biotech, Ebersberg, D  
NEN Life Science Products Inc., Boston, USA  
Novocastra Lab Ltd, Newcastle, UK  
NUNC, Wiesbaden, D  
PAA Laboratories, Pasching, AUT  
P.A.L.M., Bernried, D  
PeQLAB, Erlangen, D  
Pharmazia Biotech, Freiburg, D  
Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA  
Pierce / Perbio Science, Bonn, D  
Portex Limited, Hythe, UK  
Progen Biotechnik, Heidelberg, D  
Promega, Mannheim, D  
Qiagen, Hilden, D  
Roche Diagnostics, Mannheim, D  
Schleicher & Schuell, Dassel, D  
Science Products, Hofheim, D  
Sigma-Aldrich, München, D  
Sternberger monoclonals Inc., Lutherville, USA  
Techlab, Erkerode, D  
Uniphase, San Jose, CA  
Vector Laboratories, Burlingame, USA  
Wallac / Perkin Elmer, Boston, USA  
World Precision Instruments, Sarasota, USA  
Zeiss, Göttingen, D

## 3 Methoden

### 3.1 Präparationsmethodik

#### 3.1.1 Glomus caroticum und Ganglion petrosum

Im Anschluss an die Perfusion wurde die Halsregion mit einem Skalpell eröffnet und die sichtbaren Speicheldrüsen entfernt. Nach Spaltung der Halsfaszien und stumpfer Präparation der Halsmuskulatur konnte die A. carotis communis im Verlauf bis zur Bifurkation beidseits dargestellt werden. Anschließend wurde jeweils die A. carotis communis abgeklemmt, die gesamte *Carotis-Bifurkation* auf beiden Seiten mit Hilfe einer Iridotomie-Schere reseziert und das Gewebe sofort in gekühlten 4 %igen PFA überführt. Es folgte eine Fixation in der gleichen Lösung für min. 24 h bei +4 °C.

Da für elektrophysiologische Versuche sowie mRNA-Gewinnung *isolierte* Glomera carotica notwendig waren, diente eisgekühlte Ca<sup>2+</sup>-freie Tyrode-Lösung als Medium zur temporären Aufbewahrung während der weiteren Verarbeitung. Die folgenden Schritte wurden unter vergrößerter Darstellung mit einem Binokular durchgeführt: Zur Isolation wurden die entnommenen Bifurkationen in einer mit Sylgard beschichteten Petrischale mit Hilfe feiner Nadeln fixiert, das Glomusorgan in situ identifiziert und mit Hilfe feiner chirurgischer Instrumente von umliegenden Strukturen separiert. Das dann von Bindegewebe befreite Glomus wurde nun den nachfolgenden Experimenten entsprechend aufbereitet.

Die Präparation des *Ganglion inf. n. glossopharyngei (Ggl. petrosum)* erfolgte im gleichen Arbeitsschritt wie die Gewinnung der Glomera carotica. Nach Freilegen der Aufzweigung der Halsschlagader wurde zur Identifizierung des Ggl. petrosum der N. vagus (X) in seinem Verlauf vom Halsbereich bis zum Austritt aus der Schädelbasis dargestellt. Da sowohl der gesuchte N. glossopharyngeus (IX) wie auch der X den Schädel durch das Foramen jugulare verlassen, konnte auf diese Weise auch der IX identifiziert und mit feinen Pinzetten stumpf vom umgebenden Gewebe gelöst werden. Das Ganglion petrosum ist direkt nach dem Austritt des Nerven aus der Schädelbasis lokalisiert, so dass zur Entnahme der IX proximal unmittelbar an der Schädelbasis und distal des Ganglions vorsichtig durchtrennt wurde.

Für immunhistochemische Studien wurde das so gewonnene Gewebe wie oben beschrieben fixiert, bevor die Einbettung in Paraffin erfolgte. Zur Aufbereitung von mRNA wurden die Ganglien in RNAlater (Quiagen) stabilisiert.

### 3.1.2 Medulla oblongata

Zur Entnahme des Hirnstammes wurde nach transkardialer Perfusion mit einer Knochenschere der Schädel und der Wirbelkanal eröffnet. Nach Durchtrennung der Hirnnerven wurden das gesamte Gehirn und ein Teil des Rückenmarks entnommen, bevor vorsichtig die Medulla oblongata vom übrigen Gewebe separiert wurde. Auch diese Proben wurden für immunhistochemische Studien in 4 %igem PFA für min. 24 h bei 4°C fixiert, bevor es in Paraffin eingebettet wurde. Zur Identifikation der Strukturen des Hirnstammes, besonders die gesuchten Kerngebiete des N. glossopharyngeus, diente der Atlas von Paxinos und Watson (1998).

### 3.2 Retrograde Fluoreszenzmarkierung

Zur Identifizierung von Perikarya von Neuronen des Ganglion petrosum, die die Chemorezeptorzellen des Glomus caroticum innervieren, wurden *neuronale Labeling-Studien* mit dem retrograd wandernden Fluoreszenz-Tracer *Fast Blue* (FB) durchgeführt.

Drei erwachsene Ratten im Alter von 6-8 Wochen wurden an der Thrakischen Universität, Department Anatomie, 6000 Stara Zagora (Bulgarien), in Übereinstimmung mit den dortigen ethischen Richtlinien zur Aufzucht und Behandlung von Tieren chirurgischen Methoden unterzogen. Die Freilegung der Carotis-Bifurkation erfolgte in tiefer Narkose mit Diethyläther, bevor mittels einer Mikroinjektionsspritze (Hamilton) eine 2 %ige wässrige Lösung des Tracers FB (10 µl) langsam in das jeweilige Glomusorgan injiziert werden konnte. Um ein Entweichen des Fluoreszenzfarbstoffs von der Injektionsstelle zu verhindern, wurde ein Plastikfilm um das Glomus caroticum platziert, welcher in den Tieren belassen wurde. Nach einer Überlebenszeit von sieben Tagen wurden die Tiere erneut anästhesiert und – wie in [Kapitel 2.2](#) erläutert – perfundiert. Es folgte die schnelle Entnahme der Ganglien sowie eine Fixation für 1 h bei 4°C. Von dem fixierten Gewebe wurden in einem Cryostat Serienschnitte von 12 µm Dicke hergestellt und auf unbeschichtete Objektträger gebracht. Nach dem Trocknen bei R.T. wurden die Objektträger mit Vectashield (Vector Laboratories) eingedeckt.

Die angefertigten Schnitte wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss) im abgedunkelten Raum betrachtet und fotografiert (Anregungswellenlänge  $\lambda_A = 365$  nm, Emissionswellenlänge  $\lambda_E = 420$  nm). Die angegebene Wellenlänge löst die bläuliche Färbung der mit FB markierten neuronalen Zellkörper aus

### 3.3 Immunhistochemie und Immunogoldfärbung an EM-Schnitten

Nach Einbettung des fixierten Gewebes in Paraffin wurden Schnitte von 1 bis 5 µm Dicke auf Objektträger aufgezogen und für 2 h bei 37° C getrocknet. Es folgte eine immunhistochemische Färbung nach einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode in folgenden Schritten:

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe
  - Xylol 5 min (4x)
  - Isopropanol 100% 4 min (2x)
  - Isopropanol 90% 3 min (2x)
  - Isopropanol 80% 3 min (2x)
  - Isopropanol 70% 3 min (1x)
- 1 x 5 min waschen in H<sub>2</sub>O, 3 x 5 min waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit 0,1 % Methanol in 25 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min
- 3 x 5 min waschen in PBS-Puffer
- Demaskierung der Antigene in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (800 W 10 - 15 min)
- Demaskierung der Antigene in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (400 W 15 min)
- nach Abkühlen der Schnitte 3 x 5 min waschen in PBS-Puffer
- Blockieren mit 5% Normalserum (NS) der Spezies des Zweit-Antikörpers in PBS für 30 min bei R.T.
- Blockade von endogenem Biotin mit Avidin Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories), 30 min bei R.T.
- Inkubation mit Erst-Antikörper (AK, Verdünnung in NS gemäß Tab. 2.2) über Nacht bei 4° C
- 3 x 5 min waschen in PBS
- Inkubation mit Zweit-Antikörper (Verdünnung in NS gemäß Tab. 2.2) für 2 h bei R.T.
- 3 x 5 min waschen in PBS
- Inkubation mit Avidin-biotin complex method kit (Vector Laboratories) für 1 - 2 Stunden bei R.T.
- 2 x 5 min waschen in PBS, 5 min waschen mit 50mM Tris-HCl (pH 7,6)
- Tris-HCl mit DAB (Diaminobenzidin) als Chromogen in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für max. 10 min bei R.T.
- 10 min waschen in Tris HCl
- 3 x 5 min waschen in PBS
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Eukitt

Fakultativ erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (15 s) und anschließendem Bläuen unter fließendem Wasser (5 min). Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurde je Präparat eine Negativkontrolle durchgeführt. Dafür wurde unter sonst gleichen Bedingungen der Erst-AK durch PBS bzw. NS ersetzt wurde, sodass sich keine Immunreaktivität zeigte. Zur Spezifität der verwendeten AK siehe auch Lazarov und Gratzl (2006).



Zur Bestimmung der Lokalisation von Histamin-Rezeptor-Proteinen auf subzellulärer (elektronenmikroskopischer) Ebene wurden Immunogoldfärbungen an Ultradünnschnitten des Glomus caroticum durchgeführt. Dazu wurden Glomera wie oben beschrieben entnommen und nach Fixierung in K4M (Lowicryl, Leica) eingebettet. Als Fixans diente eine eisgekühlte Lösung von 0,5 % Glutaraldehyd und 2 % PFA. Die angefertigten Schnitte wurden anschließend auf Formvar-beschichteten Nickel Single-Slot Grids aufgefangen. Zur Durchführung der einzelnen immunhistochemischen Schritte wurden die jeweiligen Lösungen tropfenweise auf ein Blatt Parafilm pipettiert, so dass die Grids mit den Schnitten auf die Oberfläche der jeweiligen Tropfen transferiert werden konnten. Folgende Lösungen fanden Verwendung:

- BSA-Puffer: 0,1 % BSA-C (Aurion) in PBS (pH 7,4)
- Blockierlösung A: 50 mM Glycin in PBS
- Blockierlösung B: 5 % BSA-C und 1 % Normalserum (Spezies des Zweit-Antikörpers)
- Fixierlösung: 2 % Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4)

Die eigentliche Markierung der Zielproteine erfolgte dann in folgenden Schritten:

- Inaktivierung unspezifischer Alkoholgruppen mit Blockierlösung A für 15 min
- Blockieren mit Blockierlösung B
- 3 x 5 min waschen in BSA-Puffer
- Inkubation mit Erst-Antikörper über Nacht bei 4° C
- 6 x 5 min waschen in BSA-Puffer
- Immunogold-Inkubation mit EM-Konjugat (1:20 in BSA-Puffer) für 2 - 4 h
- 6 x 5 min waschen in BSA-Puffer
- 3 x 5 min waschen in PBS
- Nachfixierung mit Fixierlösung für 5 - 10 min
- 5 x 2 min waschen in H<sub>2</sub>O bidest.

Eine Gegenfärbung der markierten Gewebsschnitte erfolgte im Anschluss mit Uranylacetat und Bleicitrat, bevor die Präparate mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM10, Zeiss) untersucht, mit einer Digitalkamera photographiert und archiviert wurden. Für diese Aufnahmen danke ich herzlich Frau Gabriele Terfloth vom Anatomischen Institut der LMU München.

### 3.4 mRNA-Amplifikation mit RT-PCR

#### 3.4.1 RNA-Extraktion

Im Anschluss an die Entnahme des Glomusorgans wurde das in flüssigem Stickstoff gefrorene Gewebe unter Zuhilfenahme eines Mörtels zerkleinert, bevor es gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers (RNEasy Mini Kit, Quiagen) in 500 µl RLT-Puffer (Guanidin-isothiocyanat-Basis, versetzt mit 1% β-Mercaptoethanol) aufgenommen wurde. Nach der so durchgeführten Zelllyse erfolgte die Zentrifugation der Probe in den Herstellerpuffern (RW1 und RPE / 70% Ethanol) bei +4° C. Die schließlich gewonnene **RNA** wurde in RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80°C bis zur Reversen Transkription (RT) gelagert. Um die Qualität der leicht degradierenden RNA zu prüfen, wurde zusätzlich eine Gelelektrophorese mit einem 2%igen Agarosegel durchgeführt (siehe dazu [Kapitel 3.4.5](#)), wobei pro Spur 1 µl der gewonnenen RNA aufgetragen wurde. Die Visualisierung erfolgte mittels *Ethidiumbromid* (1 mg/ml).

#### 3.4.2 Reverse Transkription

Reagenz	Volumen
RNA in DEPC-H <sub>2</sub> O	11,8 µl
RQ1 RNase free DNase (1 IU/µl)	1 µl
10x First Strand Buffer	2 µl
RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 IU/µl)	0,2 µl
EDTA (84 mM)	1 µl
Oligo dT15 (85 µM)	1 µl
dNTPs (25 mM)	1 µl
MMLV-RT (20 IU/µl)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (180 mM)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

**Tabelle 3.1:** Reaktionsansatz einer Reversen Transkription

Um gewonnene RNA in cDNA zu transkribieren, fand das Enzym MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega) Verwendung. Für den DNase-Verdau wurde eine Menge von 200 ng RNA mit dem entsprechenden Volumen RNase-freiem Wasser auf 11,8 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von RQ1 RNase, 10x First Strand Buffer und RNase Block Ribonuclease Inhibitor wurde schließlich der eigentliche Verdau

durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei 37° C. Durch anschließende Zugabe von Oligo dT15 in EDTA und Erhitzung der Lösung für 15 min auf 70° C wurde die Weiterführung der Reaktion erreicht, woraufhin die Kühlung des Reaktionsansatzes auf +4° C erfolgte. Nach weiterem Hinzufügen von 10x First Strand Buffer, dNTPs, der MMLV-RT und MgCl<sub>2</sub> erfolgte letztlich die eigentliche RT für 60 min bei 37° C, bevor bei 90° C denaturiert und anschließend wieder auf +4° C abgekühlt wurde. ☒ Tabelle 3.1 zeigt den vollständigen Reaktionsansatz einer **Reversen Transkription**. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20° C eingefroren oder direkt als Template für eine folgende PCR verwendet.

### 3.4.3 Primerdesign und Primer

Für die Untersuchung der cDNA von Glomera und Ganglien der Ratte auf spezifische Gensequenzen des Histamin-Synthese-Enzyms HDC sowie der Histamin-Rezeptoren H1R bis H4R wurden anhand publizierter Sequenzen der Genbank spezifische intronspannende **Primer** erstellt. ☒ Tabelle 3.2 gibt einen Überblick der verwendeten Primer.

Gen	Sequenz (5'-3')	Nummer	Position	BP
HDC sense	5'-CAT GAA TAC CAA GCT AGA GG-3'	M29591	97-116	294
HDC antisense	5'-CAA GCA GTT GAT GGC ATC AG-3'		390-371	
HDC nested anti	5'-GAT GAT TTG CTC AAT GTC CC-3'		279-260	183
H1R sense	5'-CCT CTA CCT TCG AAG ACA AG-3'	NM017018	20-39	405
H1R antisense	5'-GTC TTG GTT CGG TAC CTC AG-3'		425-406	
H1R nested anti	5'-TGA CAA CTG CCC CTA CAA TC-3'		241-222	221
H2R sense	5'-ATG GCA TTG AAA GTC ACC-3'	MN012965	43-60	377
H2R antisense	5'-GAC CAA AGA GAT GGC AAC-3'		420-403	
H2R nested anti	5'-TGG TAA ATG GCA GAG AAG-3'		236-219	193
H3R sense	5'-CAG CGT TAC CTT CTT CAA CC-3'	MN053506	636-655	511
H3R antisense	5'-CAG CTC GGA TGA TCA TTA GG-3'		1147-1128	
H3R nested anti	5'-GAT GCT GAA GAT GCT GAT GG-3'		995-976	359
H4R sense	5'-TAA CGA TAG GCA ATG CTG TG-3'	MN131909	121-140	390
H4R antisense	5'-TCT TCC AAG AAT CCG AAG CC-3'		510-491	
H4R nested anti	5'-ACT GTA GAC GGA TGC TGT GC-3'		347-328	227

**Tabelle 3.2:** Übersicht zu Sequenzen der verwendeten PCR-Primer und nested PCR-Primer mit Angabe von Zielgen, Sequenz in 5'-3'-Richtung, zugehöriger Zugriffsnummer der Datenbank, Position des Fragments im Gen und Fragmentgröße. BP gibt die Größe des Fragments in Basenpaaren (base pairs, bp) an. (H1R bis H3R vgl. Koerner et al., 2004).

## 3.4.4 PCR

Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
10x Taq-Buffer	5 $\mu$ l	10x Taq-Buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l
dNTPs (2 mM)	5 $\mu$ l	dNTPs (2 mM)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	33 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	29 $\mu$ l
Primer 5', Primer 3'	je 1 $\mu$ l	Primer 5', Primer 3' (nested)	je 1 $\mu$ l
Probe (200 ng cDNA) in H <sub>2</sub> O	1,5 $\mu$ l	Probe aus voriger PCR	5 $\mu$ l
Taq-Polymerase (20 IU/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	Taq-Polymerase (20 IU/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

**Tabelle 3.3:** Reaktionsansatz einer PCR (links) bzw. nested PCR (rechts)

Grundlage der **Polymerase-Kettenreaktion** (PCR) bildete ein Mix aus 5  $\mu$ l 10x Taq-Puffer, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ l dNTPs und 33  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (sog. MIX46) je Reaktionsansatz (siehe Tabelle 3.3 links). Diesem Mix wurde jeweils 1  $\mu$ l Primer 3' (50  $\mu$ M) bzw. Primer 5' (50  $\mu$ M) und 200 ng cDNA (eluiert in 1,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) als Template hinzugegeben. Bei schwacher Reaktion wurde die Menge des Templates auf 5  $\mu$ l erhöht und das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O im Reaktionsansatz reduziert, um das Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l zu erhalten (sog. MIX42). Der eigentliche PCR-Vorgang erfolgte schließlich mittels eines Thermocyclers (PTC-200, MJ Research) anhand 35 Zyklen folgender Reaktionsschritte:

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

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben auf konstante +4° C abgekühlt und entweder sofort elektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20° C gelagert. Bei der Amplifikation der H3R- und H4R-cDNA wurde zusätzlich jeweils eine zweite, sog. nested PCR durchgeführt, die die Sensitivität der Methode erhöht. Zu diesem Zweck wurden 5  $\mu$ l des Reaktionsproduktes der ersten PCR mithilfe des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen gereinigt, bevor es anschließend als Template der zweiten PCR diente (siehe Tabelle 3.3 rechts).

### 3.4.5 Gelelektrophorese

Die **elektrophoretische Auftrennung** der durch PCR amplifizierten Genprodukte erfolgte mittels eines 2 %igen Agarosegels (SeaKemL, Biozym) mit 1x TBE-Puffer. Dieser Puffer diente auch als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer (Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, Biorad). Die PCR-Produkte wurden dazu, versetzt mit einem DNA-Auftragspuffer, in die jeweiligen Spuren des Agarosegels aufgetragen. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte schließlich für 40 min bei 100 V. Zur Visualisierung der DNA-Banden diente Ethidiumbromid (1 mg / ml), so dass im Anschluss an die Auftrennung die durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz mit einem Kamerasystem detektiert und digital gespeichert werden konnte.

### 3.4.6 Datenbank und Sequenzierung

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden alle PCR-Produkte sequenziert. Dafür wurden diese zunächst wie oben beschrieben mit dem Qiagen QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerprotokollen aufgereinigt und anschließend durch einen kommerziellen Dienst (AGOWA) direkt sequenziert. Die Ergebnisse wurden dann auf Übereinstimmung mit der jeweiligen Sequenz der Datenbank (MegAlign, DNASTar) überprüft.

Für die Hilfe bei der Durchführung molekularbiologischer Methoden beim H4-Rezeptor danke ich herzlich Frau Verónica Rey-Ares vom Anatomischen Institut der LMU München.

## 3.5 Amperometrie an Dünnschnitten des Glomus caroticum


### 3.5.1 Zellkultur mit PC12 – Zellen

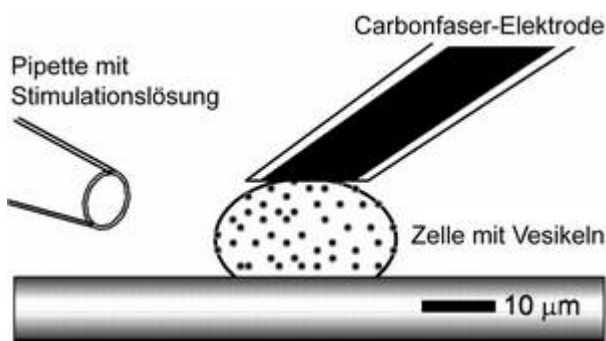
Zur Etablierung der Amperometrie-Methodik dienten elektrophysiologische Vorversuche mit **PC12-Zellen**, die entsprechend Greene und Tischler (1976) kultiviert wurden. Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen (alle Substanzen von Biochrom):

- RPMI-Medium (pH 7,2, Sigma) als Grundlage
- Penicillin  $5 \times 10^4$  IU / l
- Streptomycin  $5 \times 10^4$  µg / l
- HS 10%
- FCS (FCS Gold, PAA) 5%
- L-Glutamin 1%
- Na-Pyruvat 1%


Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Kulturen wurden bei 37° C im Wasserbad aufgetaut, anschließend in Medium suspendiert und in 60 ml Kulturflaschen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert (Brutschrank Heraeus BBD 6620). Das Wechseln des Mediums erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen alle 2 - 3 d. Dafür wurden die adherenten Zellen durch Spülen mechanisch vom Flaschenboden gelöst und der gesamte Flascheninhalt im Anschluss zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands konnten die Zellen je nach Menge in 15 - 30 ml frischem Medium resuspendiert werden. Um optimales Zellwachstum zu gewährleisten, wurden die Kulturen einmal wöchentlich gesplittet, d. h. der Flascheninhalt abzentrifugiert und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt.

### 3.5.2 Prinzip der Amperometrie und Signalaufzeichnung

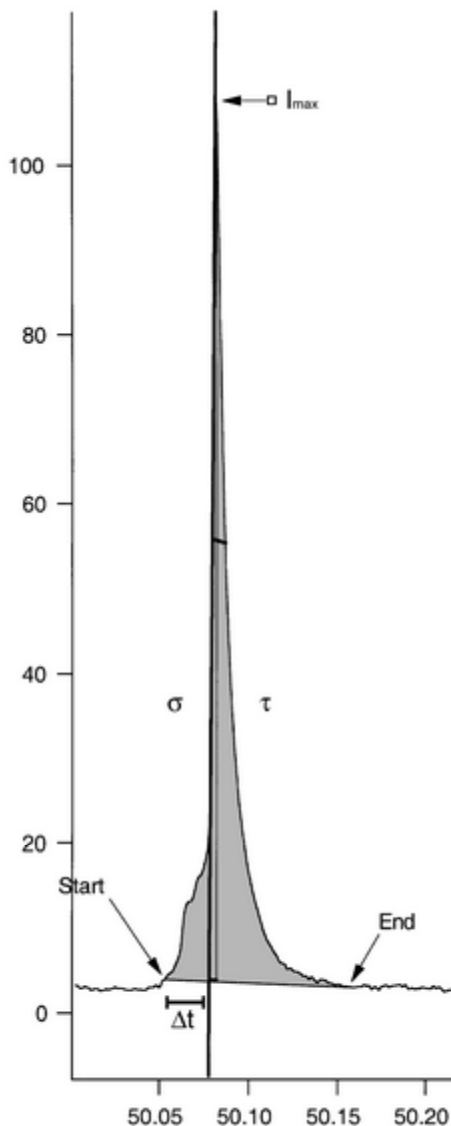
Die Methode der **Amperometrie** bietet eine elektrophysiologische Möglichkeit, die spontane oder stimulierte Sekretion von vesikelhaltigen Zellen in Echtzeit darzustellen. Man macht sich dabei zu nutze, dass viele Moleküle, darunter auch Neurotransmitter, ein bestimmtes Redox-Potential aufweisen und somit oxidierbar sind, also Elektronen (e<sup>-</sup>) abgeben können. Eine nur wenige µm dicke Carbonfaser-Elektrode wird dafür in unmittelbare Nähe bzw. direkt auf die Plasmamembran der zu untersuchenden Zelle platziert (siehe  Abbildung 3.1) und ein Spannungspotential angelegt. Dieses muss positiver sein als das Oxidationspotential des Zielmoleküls.



**Abbildung 3.1: Prinzip der Amperometrie.** Eine Carbonfaser-Elektrode wird in unmittelbarer Nähe oder direkt auf der Zellmembran einer an der Kulturschale adhärenen Zelle platziert. Sezernierte Transmitter werden durch das angelegte Spannungspotential an der Oberfläche der Carbonfaser oxidiert, so dass ein messbarer Strom entsteht. (mod. nach Travis und Wightman, 1998)


Ist das Redoxpotential eines sezernierten Moleküls negativer als das angelegte Spannungspotential, wird es bei Kontakt an der Oberfläche der Carbonfaser oxidiert, gibt also  $e^-$  ab. Der dadurch fließende Strom kann mit geeigneten Verstärkern und Software als Funktion der Zeit detektiert werden. Das typische – nur wenige ms andauernde – Signal einer Sekretion von Transmittern stellt sich als sog. **Spike** dar, dessen Verlauf der Verschmelzung eines Vesikels mit der Plasmamembran entspricht.  Abbildung 3.2 (folgende Seite) zeigt exemplarisch den Ausschnitt einer Messung der Dopamin-Freisetzung aus chromaffinen Zellen des Rindernebennierenmarks.

An diesem Beispiel ist der dreiphasige Verlauf eines klassischen Spike-Signals gut zu erkennen: Die erste Phase ( $\Delta t$ ) – auch *foot*-Signal – entspricht der ersten Verschmelzung des Vesikels mit der Zellmembran, so dass ein enger „Kanal“ entsteht, durch den bereits die ersten Moleküle in die Umgebung entlassen werden. Das *foot*-Signal mündet direkt in die explosionsartige Ausschüttung ( $\sigma$ ) der Moleküle, das Vesikel ist nun vollständig mit der Membran verschmolzen. Ist das Maximum der Stromstärke ( $I_{max}$ ) erreicht, erfolgt die Abnahme des Signals ( $\tau$ ), entsprechend dem Wegdiffundieren der Moleküle von der Oberfläche der Carbonfaser. Charakteristisch ist, dass der Anstieg wesentlich schneller (steilerer Kurvenverlauf) erfolgt, als die Signalabnahme. Dadurch lassen sich Spikes eindeutig von Artefakten, für die die Methodik recht anfällig ist, unterscheiden. Die in der Abbildung grau unterlegte Fläche unter der Kurve (AUC) ist dabei direkt proportional zur Menge der aus einem Vesikel freigesetzten Moleküle. Indirekt kann über die AUC schließlich auf die Vesikelgröße geschlossen werden.



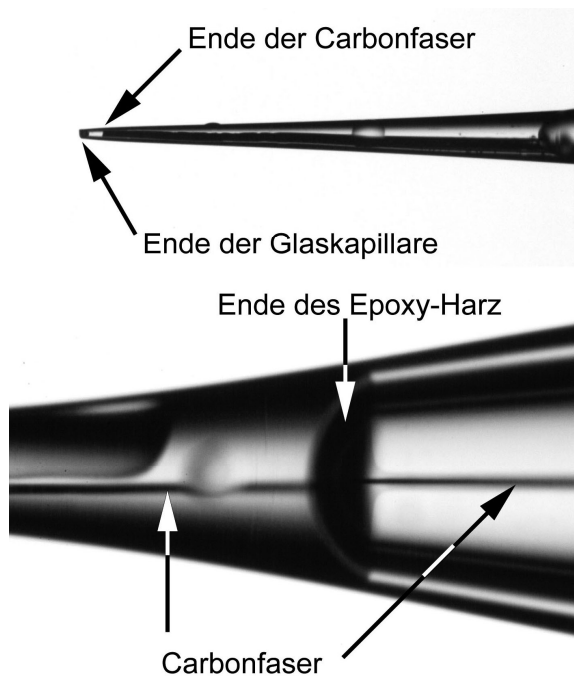
← **Abbildung 3.2: Spike als Amperometrie-Signal.** Ordinate: elektrischer Strom  $I$  [pA], Abszisse: Zeit  $t$  [s]. Gesamtdauer = 107,35 ms;  $I_{\max} = 103,99$  pA, AUC = 1,3239 pC.

### 3.5.3 Herstellung von Carbonfaser-Elektroden

Als Grundgerüst der **Elektrode** fungierte eine Glaskapillare (GB 150-8P, Science Products, Aussendurchmesser = 0,8 mm, Innendurchmesser = 0,4 mm), in die unter Verwendung eines Binokulars eine Carbonfaser von 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser inseriert wurde. Die so vorbereitete Kapillare wurde im Anschluss mittels eines automatischen Mikroelektroden-Pullers (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente) mit geeigneten Einstellungen in die gewünschte Form gezogen. Dabei entstanden aus einer Kapillare zwei Elektroden, deren Spitze ca. 12 – 15  $\mu\text{m}$  im Durchmesser betrug. Eine solche Spitze zeigt  Abbildung 3.3 auf der folgenden Seite.

Die Elektroden konnten nur dann Verwendung finden, wenn die Carbonfasern einige mm bis cm aus der Spitze hervorstanden, so dass diese vor der weiteren Verarbeitung passend abgetrennt werden konnten. Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Abdichtung und Isolierung der Elektrode: Durcupan Epoxy Harz (Fluka), ein 3 Komponenten-Harz, wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll (Mischungsverhältnis: 1 ml Komponente A, 1 ml Komponente B, 45  $\mu\text{l}$  Komponente C, 14  $\mu\text{l}$  Komponente D) angesetzt. Die Spitze der Elektrode wurde anschließend so in den im Wasserbad auf 80° C erhitzten Flüssigharz getaucht, dass diese abgedichtet und die Carbonfaser vollständig umgeben war. Die Aushärtung erfolgte schließlich für 2 - 3 h bei 80° C. Unmittelbar vor einer Messung wurde in einem letzten Arbeitsschritt mit Hilfe eines Diamantschleifers (Model EG-44, Narishige) die Spitze einer ausgehärteten Elektrode auf einen Winkel von 45° abgeschleift. Dies dient einerseits dem Entfernen von Verunreinigungen der Carbonfaser, andererseits erleichtert das Schleifen die Platzierung der Elektrode auf der Zelloberfläche. Nach dem Schleifvorgang musste die Spitze zusätzlich kurz mit Isopropanol gespült werden.





← **Abbildung 3.3: Carbonfaser-Elektrode** unmittelbar vor dem Schleifvorgang. Die überstehende Faser ( $\varnothing$  10  $\mu\text{m}$ ) wurde an der Elektrodenspitze abgetrennt und schließt die Öffnung der Glaskapillare ab (oben, Pfeile). Der gehärtete Epoxy-Harz füllt die Glaskapillare zur elektrischen Isolierung vollständig aus (unten).

Zur eigentlichen Strommessung dienten Ag/AgCl-Elektroden, zu deren Herstellung zwei Silberdrähte in eine saure (pH 2,0) 4 M KCl-Lösung getaucht wurden. Dabei erfolgte der Anschluss der zu chlorierenden Elektrode an den Pluspol, der Platinkathode an den Minuspol. Pro cm chloriertem Draht wurde dann bei einer

Gleichspannung von 4 V ein Strom von 7 mA angelegt, so dass sich auf der Drahtoberfläche ein schwarzer Chlorbelag bildete. Dieser Vorgang wurde bei Bedarf bzw. bei regelmäßigen Wartungsarbeiten an der amperometrischen Messstation wiederholt.

### 3.5.4 Herstellung von Dünnschnitten des Glomus caroticum

Als zylinderförmiger Behälter für die Einbettung fand eine auf ca. 1,5 cm abgeschnittene Insulinspritze (Innendurchmesser = 0,4 cm) Verwendung, wovon eine Seite mit Parafilm abgedichtet wurde. 3 %ige Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (Sigma) wurde in bidestilliertem Wasser angesetzt, in einer Mikrowelle geschmolzen und luftblasenfrei in die vorbereitete Form gefüllt. Die sorgfältig präparierten Glomera carotica befanden sich bis zur Einbettung ständig in eisgekühlter Tyrode-Lösung und wurden anschließend mit Hilfe einer feinen Pinzette in die ca. 40° C warme flüssige Agarose getaucht.

Nach kurzem Erkalten auf Eis konnte der säulenförmige Agaroseblock leicht aus der Form geschoben und mit Sekundenkleber in der Schneidekammer eines Vibratoms (VT1000 S, Leica Microsystems) befestigt werden. Zur Füllung der Kammer diente ebenfalls eisgekühlte,  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrode-Lösung. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge je Glomus drei bis vier Lebenschnitte von 150  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und aus der Vibratomkammer sofort in eisgekühlte Tyrode-Lösung überführt. Unter der Sterilbank wurden die gewonnenen Schnitte anschließend dreimal mit sterilem PBS gewaschen, bevor sie in folgendem Medium über Nacht inkubiert wurden ( $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pCO}_2 = 5\%$ ):

- DMEM / HAM'S F12 (pH 7,4, Sigma) als Grundlage
- Penicillin  $5 \times 10^4$  IU / l
- Streptomycin  $5 \times 10^4$   $\mu$ g / l
- FCS 10%
- L-Glutamin 1%
- Insulin Actrapid® 84 IE / l

### 3.5.5 Komponenten, Setup und Messungsablauf

Um eine Signalverfälschung zu minimieren, wurde eine aufrechtes Mikroskop (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) auf einem pneumatisch stoßgedämpften Arbeitstisch (VH-3848-OPT-8, Newport) installiert. Die Positionierung der Carbonfaserelektroden an die jeweilige Zelle erfolgte über einen Mikromanipulator (5171, Eppendorf), der Bewegungen in allen drei Dimensionen mit einer Auflösung von 50 nm ermöglicht. Eine Wärmeplatte auf der Arbeitsfläche des Mikroskops hielt die Temperatur des Trägermediums ( $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Tyrodelösung) bis zum eigentlichen Messvorgang konstant auf  $37^\circ\text{C}$ , wurde dann aber zugunsten der Störungsfreiheit abgeschaltet. Der Anschluss der Carbonfaserelektrode erfolgte über einen direkt bei der Messkammer angebrachten Vorverstärker an den EPC9-Verstärker.

Um generell eine störungs- und rauscharme Messung zu ermöglichen, wurden alle Geräte und Arbeitsflächen ausgehend vom Erdungsanschluss des Patch-Clamp-Verstärkers EPC9 (HEKA) über ein Kupfergewebeband geerdet. Besondere Sorgfalt wurde anderen kritischen Punkten der Apparatur zuteil, insbesondere freie Metalloberflächen in der Nähe der Messelektrode. Optimale Ergebnisse erbrachte das zusätzliche Anbringen eines mit Alufolie umwickelten Schirms direkt vor der Messkammer. Unter diesen Voraussetzungen stellte sich ein Grundrauschen zwischen 0,5 und 5 pA (Rauschanalyse der Software PULSE, peak-to-peak) ein. Dementsprechend wurden Stromspitzen von min. 3 pA bei einem Grundrauschen von 1 pA als amperometrisches Signal (Spike) angesehen.

Unmittelbar vor der Messung wurde der Kultur ein Lebenschnitt entnommen, im Deckel einer Petrischale positioniert und mittels eines geeigneten Draht-Nylon-Gestells (Slice Hold Down, Warner Instruments) mittig fixiert. Als Trägermedium diente hier jeweils  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Tyrodelösung. Die anschließende Fokussierung erfolgte unter Zuhilfenahme eines 63x-Objektivs (Achromplan W, Zeiss). Dabei stellten sich die Glomuszellen vor dem Hintergrund als leicht erhabene globoide Zellgruppen dar, so dass die Elektrode unter mikroskopischer Kontrolle in unmittelbarer Nähe bzw. direkt auf der Zelloberfläche platziert werden konnte.

Mittels eines doppelt angelegten Perfusionssystems wurde der Zu- und Ablauf der Trägermedien und Stimulationslösungen gewährleistet. Dabei sorgte eine Spritzenpumpe (Valve Link 8) für die kontinuierliche Zufuhr frischer Tyrodelösung, während eine Membranpumpe (Roth) überschüssige Badlösung absaugte. Für hypoxische Stimuli wurden die Lösungen mindestens 30 min vor der Messung mit einem Gemisch aus 95% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> vorgesättigt. Um normoxische Bedingungen zu schaffen, wurden alle anderen Lösungen für die gleiche Zeit mit einer Gasmischung aus 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 75% N<sub>2</sub> begast, bevor sie in das Bad geleitet wurden. Alle Lösungen waren dabei auf 37° C temperiert.

### **3.5.6 Auswertung und Analyse der Daten**

Die gemessenen Daten wurden mit der Software PULSE (HEKA) bei 100 Hz gefiltert und mit einem Intervall von 4 ms (250 Hz) aufgezeichnet. Die so gespeicherten Daten wurden für die weitere Analyse exportiert und in die Software IGOR Pro (Wavemetrics) geladen. Ein speziell programmiertes Makro diente der anschließenden Zusammenführung einzelner Messspuren und der graphischen Aufbereitung. Das Makro (v3.2) und benötigte FIR-Filter sind unter der Internetadresse <http://webpages.ull.es/users/rborges/Downloads.html> frei zugänglich (Stand 01/2010).

### 3.6 Fluoreszenzmessungen an Lebenschnitten des Glomusorgans

Im Zuge vorbereitender Versuche für die Amperometrie an Lebenschnitten des Glomus caroticum wurden **fluoreszenzmikroskopische Messungen** des mitochondrialen Membranpotentials durchgeführt (vgl. Gryniewicz et al., 1985). Dafür fand das lipophile Kation *DePsipher* (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin; R&D Systems) Verwendung: bei Hyperpolarisation des mitochondrialen Potentials liegt das Kation in Aggregat-Form vor, die eine orange-rote Fluoreszenz zeigt und anhand ihrer punktförmigen Verteilung erkennbar ist. Das Einbrechen des Membranpotentials (Depolarisation) führt zum zunehmenden Zerfall dieser Aggregate: der Anteil an Monomeren, die eine grüne Fluoreszenz zeigen und gleichmäßig verteilt sind, nimmt zu. Unter einem konfokalen Mikroskop (Leica DM IRB, Leica Microsystems) wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 488$  nm (Argon-Ionen Laser-System, Uniphase, San Jose, CA) in zeitlichen Abständen von 2 s detektiert (TCS SP2 Scanner-System, Leica Microsystems) und digital gespeichert. Die Messung erfolgte auf zwei Kanälen: die orange-rote Fluoreszenz ( $605 \pm 15$  nm) der Farbstoffaggregate und die grüne Fluoreszenz der Monomere ( $530 \pm 15$  nm) (Ishida et al., 2004). Dabei wurden die Werte über mehrere per Analysesoftware festgelegte Areale des Dünnschnittes (mindestens 3) gemittelt. Als Maß für Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials wurde das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenzintensität ( $I_{530}/I_{605}$ ) verwendet (Leica Confocal Software, Version 2.61, Leica Microsystems).

Für den Messungsvorgang wurde ein Lebenschnitt des Glomusorgans der Kultur entnommen, dreimal mit auf 37° C temperiertem PBS gewaschen und in eine Petrischale überführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit *DePsipher* (10 µg/ml) in DMEM / HAM'S F-12 Kulturmedium (10 % FCS) für mindestens 30 min bei 37° C in Dunkelheit. Ein weiterer Waschgang mit PBS sollte extrazelluläre Farbstoffreste entfernen und so einer Verfälschung der Ergebnisse vorbeugen. Während der anschließenden Messung wurde wiederum auf ausreichenden Lichtschutz geachtet, um vorzeitiges Verblässen des Fluoreszenzmarkers zu minimieren.

Nach Messung der basalen Fluoreszenzintensität über 240 s wurde als Positivkontrolle der Protonophor und Entkoppler CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, Sigma-Aldrich) (2 µM) appliziert.

### 3.7 Wirkung von Histamin-Agonisten und Antagonisten

Die folgenden physiologischen und pharmakologischen Experimente wurden parallel zu den Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe am Institut für Physiologie der Universität Göttingen von M. Rozloznik durchgeführt. Die Leitung hierfür trug Herr PD Dr. M. Dutschmann. Folgende Beschreibung soll einen kurzen Einblick in die Methodik geben.

#### 3.7.1 Herz-Hirnstamm-Präparation

Die Mikroinjektionen und Stimulationen der peripheren Chemorezeptoren wurden an dezerbrierten und intra-arteriell perfundierten lebenden **Herz-Hirnstamm-Präparationen** von Ratten des Stammes Sprague Dawley (75-150 g, beiderlei Geschlechts) durchgeführt (für Details siehe Paton, 1996). In dieser Präparation sind die durch Stimulierung peripherer chemosensorischer Afferenzen (Boscan und Paton, 2002; Boscan et al., 2002) induzierten kardio-respiratorischen Reizantworten konsistent und mit denen leicht anästhesierter bzw. wacher Tiere und Menschen vergleichbar (Ness und Gebhart, 1990; Oberlander et al., 1999).

Dabei wurden die Ratten tief mit Halothan anästhesiert, anschließend präcolliculär dezerbriert und cerebellektomiert, wobei Pons und Medulla intakt blieben. Alle Strukturen rostral der Decerebrierungshöhe wurden entfernt. Die Präparation wurde sodann subdiaphragmal geteilt, und die Aorta descendens mit einem Doppellumenkatheter kanüliert, um die Schädel-Thorax-Präparation zu perfundieren. Das Perfusionsmedium wurde mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 31° C begast. Mittels einer Rollerpumpe (28 - 32 ml / min, Watson Marlow, Rommerskirchen, D) wurde ein konstanter Fluss erreicht. Das zweite Katheterlumen wurde benutzt, um mittels eines Druckmessers den aortalen Perfusionsdruck zu bestimmen. Auf Höhe des Thorax wurde ein N. phrenicus isoliert und dessen Aktivität über eine Saug-Elektrode registriert. Die Signale wurden verstärkt, bei 8 Hz bis 3 kHz gefiltert und mittels eines PowerLab System (8s, ADInstruments, Spechbach, D) und geeigneter Software (Chart 5, ADInstruments) aufgezeichnet und analysiert.

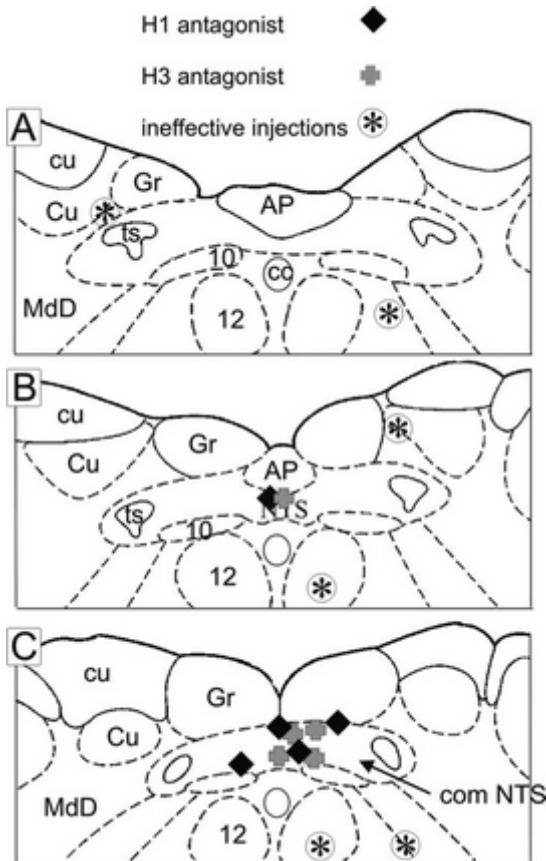
### 3.7.2 Stimulation isolierter Glomera

Zehn Präparationen wurden für die Stimulierung des Glomus caroticum mit **H1- und H3-Rezeptor-Agonisten** benutzt. Um die Glomera in der perfundierten Hirnstamm-Präparation selektiv zu stimulieren, wurde die jeweilige A. carotis distal und proximal der Bifurkation ligiert, um die Glomera vom Perfusionskreislauf der Präparation auszuschließen. Im Anschluss wurde die Arterie distal eröffnet und eine Kanüle eingesetzt, über die die Applikation der Substanzen erfolgte. Währenddessen wurde die Perfusion des Hirnstamms über die intakten Aa. basilaris und vertebralis aufrecht erhalten. Anzumerken ist, dass die Carotiden für die Perfusion des Hirnstamms nicht benötigt werden, da die Versorgung des Hirnstamms mit Perfusionsmedium vollständig durch die intakte A. basilaris erfolgt.

Um den Chemoreflex auszulösen, erfolgte eine Bolusinjektion von 200 µl Natriumcyanid NaCN (0.01%), gefolgt von 200 µl oxygeniertem Perfusionsmedium (Kontrolle), 200 µl H1-Rezeptor-Agonist 6-[2-(4-Imidazolyl)ethylamino]-N-(4-Trifluoromethylphenyl) Heptan-Carboxamid (*HTMT*) oder H3-Rezeptor-Agonist *Imetit*, beide 1 mM in Perfusionsmedium. Jede Injektion wurde zweimal im Abstand von 2 min wiederholt. Zehn Atmungszyklen wurden vor der vollständigen Reflexantwort analysiert, bevor die Atmungsaktivität auf Normalniveau zurückkehrte. Zehn weitere Zyklen folgten im post-stimulatorischen Zeitraum.

### 3.7.3 Mikroinjektion in den Nucleus tractus solitarii

Als Erkennungsmerkmal für die Positionierung der Mikropipetten in den Ncl. tractus solitarii (NTS) diente der IV. Ventrikel des Hirnstamms. Eine Kanüle mit drei Kammern (Außendurchmesser der Spitze ca. 10 - 30 µm) wurde mit Hilfe eines Binokulars in das Kerngebiet platziert. Dabei war eine Kammer mit dem **H1-Rezeptor-Antagonist** *Pyrilamine* (Mepyramine, Sigma) bzw. dem **H3-Rezeptor-Antagonisten** *Thioperamide* (Sigma) gefüllt, jeweils 1 mM in Mikroinjektionsmedium (wie Perfusionsmedium, jedoch ohne Ficoll). Die übrigen zwei Kammern enthielten Mikroinjektionsmedium und 2 %iges *Pontamin Sky Blue* (Sigma), welches der Identifikation der Injektionsorte diente. Die Pharmaka (Injektionsvolumina jeweils 40 nl) wurden in einer Tiefe von 100 – 200 µm von der dorsalen Oberfläche der Medulla in den Nucleus injiziert.



← **Abbildung 3.4: Injektionsorte von H1- und H3-Rezeptor-Antagonisten.** Halbschematische Darstellung dreier repräsentativer Schnitte durch den NTS (A bis C, von rostral nach kaudal)

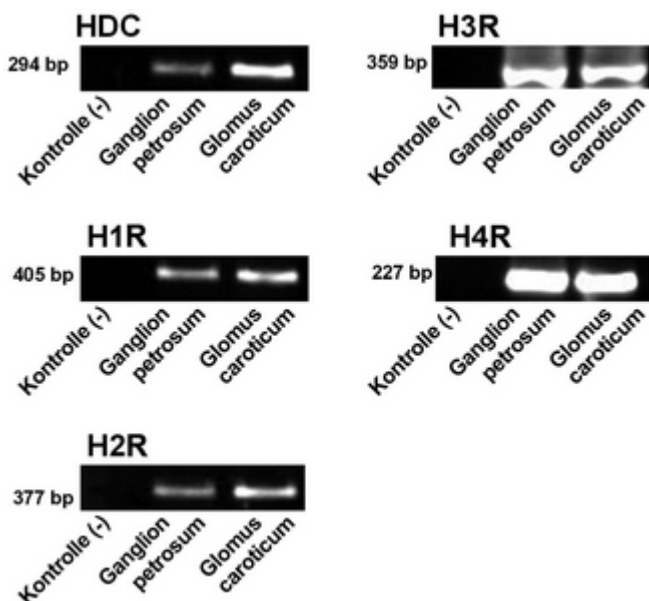
Zunächst wurde dreimalig ein Chemoreflex durch Bolusinjektion von 200 µl NaCN (0,01 % in Mikroinjektionsmedium) in die A. carotis in einem Intervall von 2 min ausgelöst. Zwischen der zweiten und dritten Stimulation erfolgte die Injektion von reinem Injektionsmedium zur Kontrolle. Nach der dritten Stimulation wurden die Rezeptor-Antagonisten in das Kerngebiet injiziert. Nach 5 min erfolgten drei erneute Tests im Abstand von 2 min, ein weiteres Mal nach 10 min. Nach den Versuchen wurde die Injektionsstelle mit 2 %igem *Pontamin Sky Blue* (40 nl) markiert, der Hirnstamm

entnommen, fixiert (4% PFA mit 20% Sucrose) und für histologische Analysen verarbeitet (Schnittdicke 50 µm). Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Neutralrot. Die Schnitte wurde anschließend unter einem Lichtmikroskop beobachtet und die Injektionsstellen entsprechend dem Atlas von Paxinos und Watson (1998) dokumentiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histaminerge Charakteristika der Chemoreflexbahn

Zur grundlegenden Orientierung, welche Enzyme und Rezeptoren im Zusammenhang mit Histamin exprimiert werden, diente im ersten Schritt zunächst die RT-PCR-Methodik. Unter Verwendung der in Tabelle 3.2 gelisteten Primer wurden die Gewebeproben auf die Präsenz der mRNA von HDC und den Histamin-Rezeptoren H1R bis einschließlich H4R untersucht. Wie Abbildung 4.1 zeigt, wurden entsprechende Banden in den jeweils zu erwartenden Größen nachgewiesen und durch Sequenzierung bestätigt. Die Ergebnisse konnten sowohl für das Glomusorgan selbst, als auch für dessen erste Umschaltstation – das Ganglion petrosum im Verlauf des N. glossopharyngeus – gezeigt werden. Nicht auszuschließen war eine Rezeptorexpression in Zellen der Gefäßwand kleiner Arterien oder Kapillaren bzw. kontaminierende Blutzellen, die zum Ergebnis dieser Analyse beigetragen haben könnten.

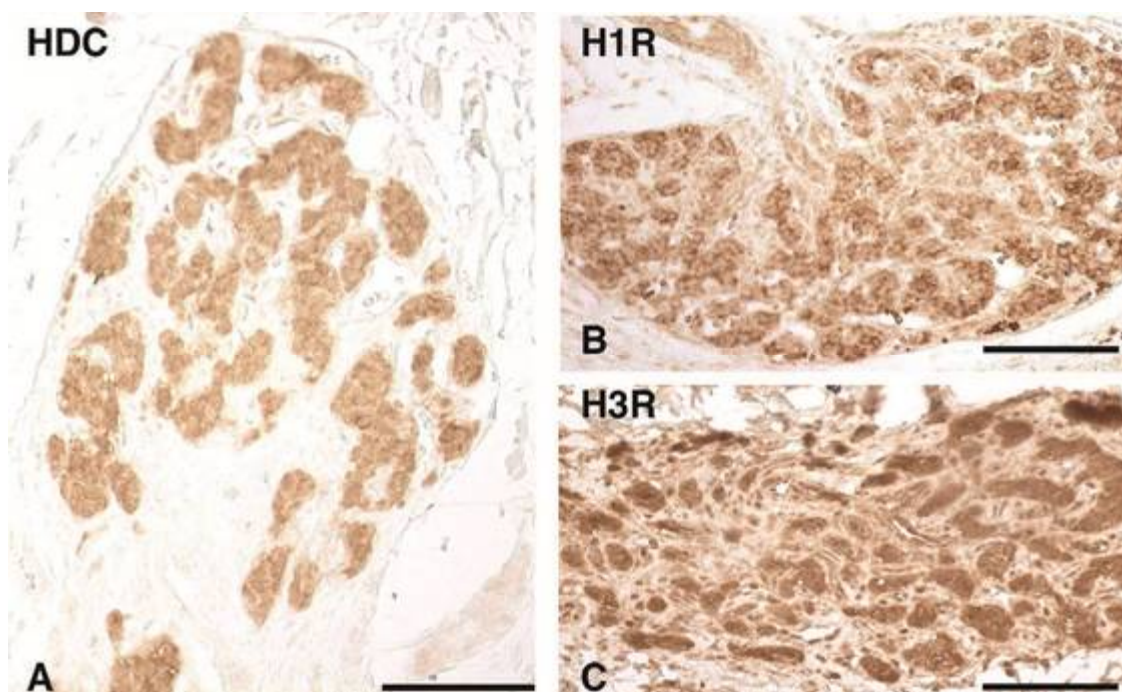


**Abbildung 4.1:** RT-PCR-Analyse von HDC sowie H1R bis H4R im Glomusorgan und Ggl. petrosum. Die Verwendung der in Tabelle 3.2 genannten Primer erbrachte Banden der erwarteten Größen. Durch anschließende Sequenzierung konnte die Identität der PCR-Produkte bestätigt werden. Zur Kontrolle wurde in jeweils einer PCR-Spur die entsprechende cDNA durch Wasser ersetzt.

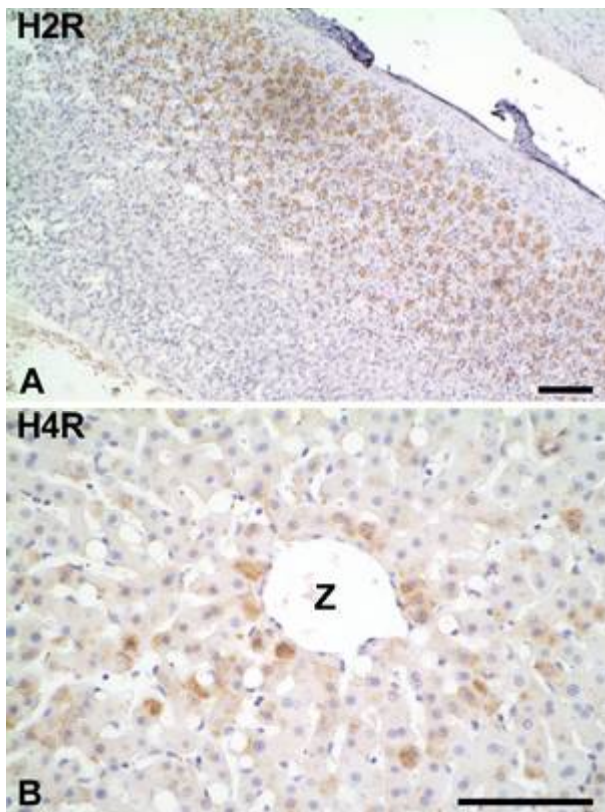


### 4.1.1 Glomus caroticum

Im zweiten Schritt sollte nachgewiesen werden, dass die per RT-PCR detektierten Enzyme und Rezeptoren auch auf Proteinlevel in relevanten Mengen exprimiert werden. Als Methode der Wahl dienen hierzu immunhistochemische Methoden mit geeigneten Antikörpern gegen HDC und die Histaminrezeptoren. Zugleich ließ sich hierdurch auch die zelluläre Verteilung eruieren. Zum einen wurden durch diese Versuchsreihe die zuvor von unserer Arbeitsgruppe gemachten Beobachtungen bestätigt: alle Glomuszellen waren deutlich immunopositiv für das Histamin-synthetisierende Enzym HDC (☞ Abbildung 4.2 A, vgl. Koerner et al., 2004). Zum anderen zeigte sich bei allen Zellen eindeutige Reaktivität für die Histaminrezeptoren H1R und H3R: sowohl die Zellkörper der Sensorzellen als auch entsprechende Nervenfasern erschienen deutlich immunopositiv. Beide Subtypen unterschieden sich augenscheinlich nicht in der Intensität ihrer Färbung. Die immunreaktiven Zellen imponierten in histologisch typischen Zellclustern. Punktförmige Strukturen, vermutlich Nervenendigung im Bereich der Sensorzellen, sind ebenfalls erkennbar. (Kontrollfärbungen für HDC [tuberomamilläre Ncll. des Hypothalamus] und H1R bzw. H3R [Hippocampus] zeigt ☞ Abbildung 4.7)




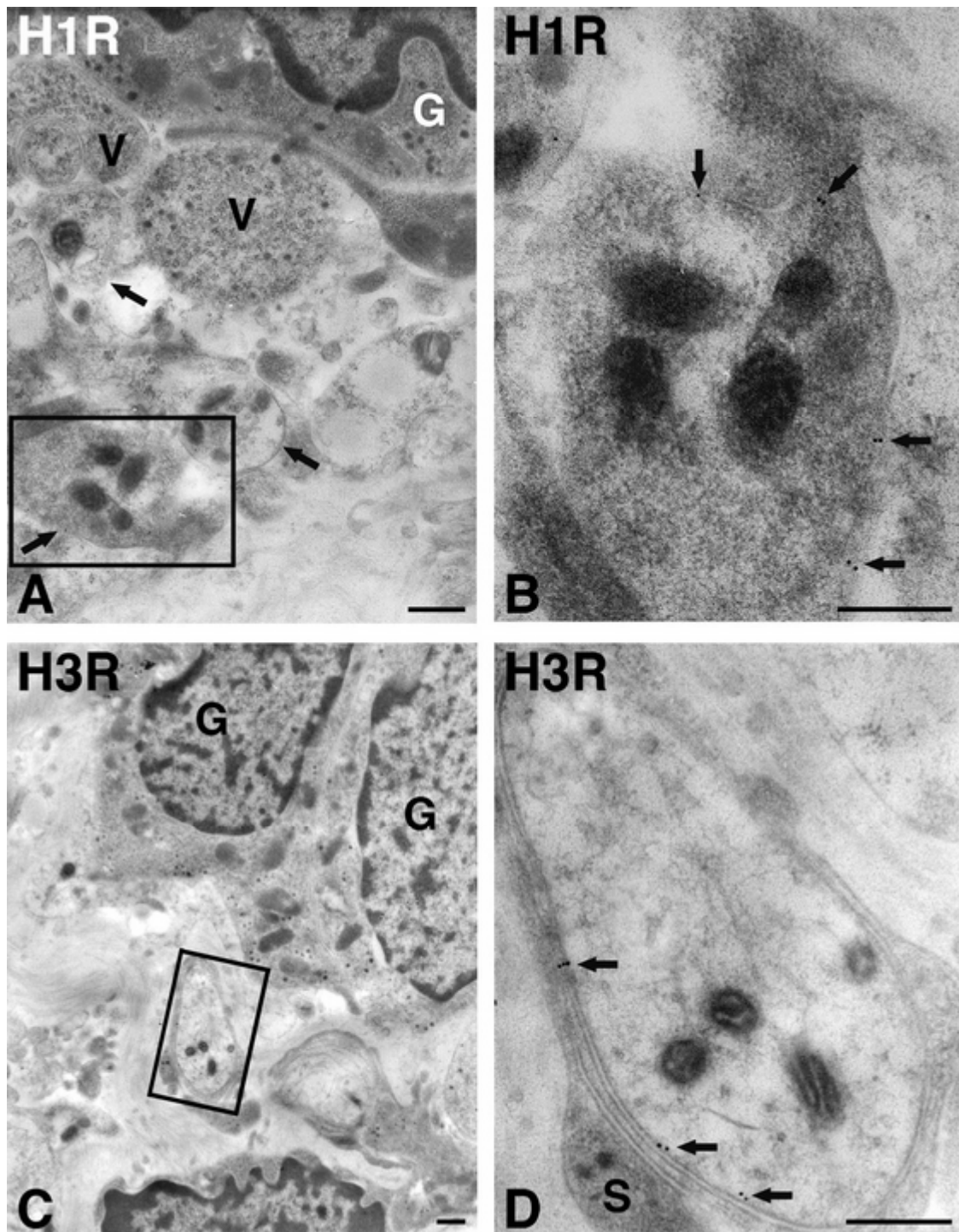
**Abbildung 4.2:** Immunhistochemische Färbungen gegen HDC und H1R / H3R im *Glomus caroticum*. Das Histamin-synthetisierende Enzym HDC (A) sowie die Rezeptoren H1R (B) und H3R (C) zeigen deutliche Immunreaktivität bei Verwendung geeigneter Antikörper. Zusätzlich waren auch Nervenfasern um die Glomuszellen gefärbt. Balken = 100 µm.



← **Abbildung 4.3: Immunhistochemische Färbung gegen H2R / H4R in Magen und Leber.** Positivkontrollen für die Histamin-Rezeptoren H2R in der Magenmukosa (A) sowie H4R in Hepatozyten eines Leberläppchens (B). Z, Zentralvene. Gegenfärbung mit Hämalaun. Skalierung = 100 µm

Überraschenderweise konnte während dieser Versuchsreihe im Glomusorgan keine Reaktivität für die Histaminrezeptoren H2R und H4R gezeigt werden. Entsprechende Positivkontrollen (Magenschleimhaut für H2R bzw. Lebergewebe für H4R) wurden jedoch erfolgreich durchgeführt.


Die lichtmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse ließen sich im Elektronenmikroskop bestätigen. Wie die folgende  Abbildung 4.4 verdeutlicht, fanden sich Histamin H1- und H3-Rezeptoren in Dendriten von Neuronen des Ggl. petrosum, die geflechtartig die Sensorzellen des Glomus caroticum umschließen. Dabei waren die 10 nm großen Goldpartikel auf ultrastrukturellem Level hauptsächlich auf den Plasmamembranen der jeweiligen Nervenfasern, vereinzelt auch an anderen Strukturen nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich mit den immunhistochemischen Ergebnissen, dass die Perikarya von Neuronen des Ganglion petrosum, dem Ort der Biosynthese der Enzyme und Rezeptoren, ebenfalls eine deutliche Färbung zeigten.

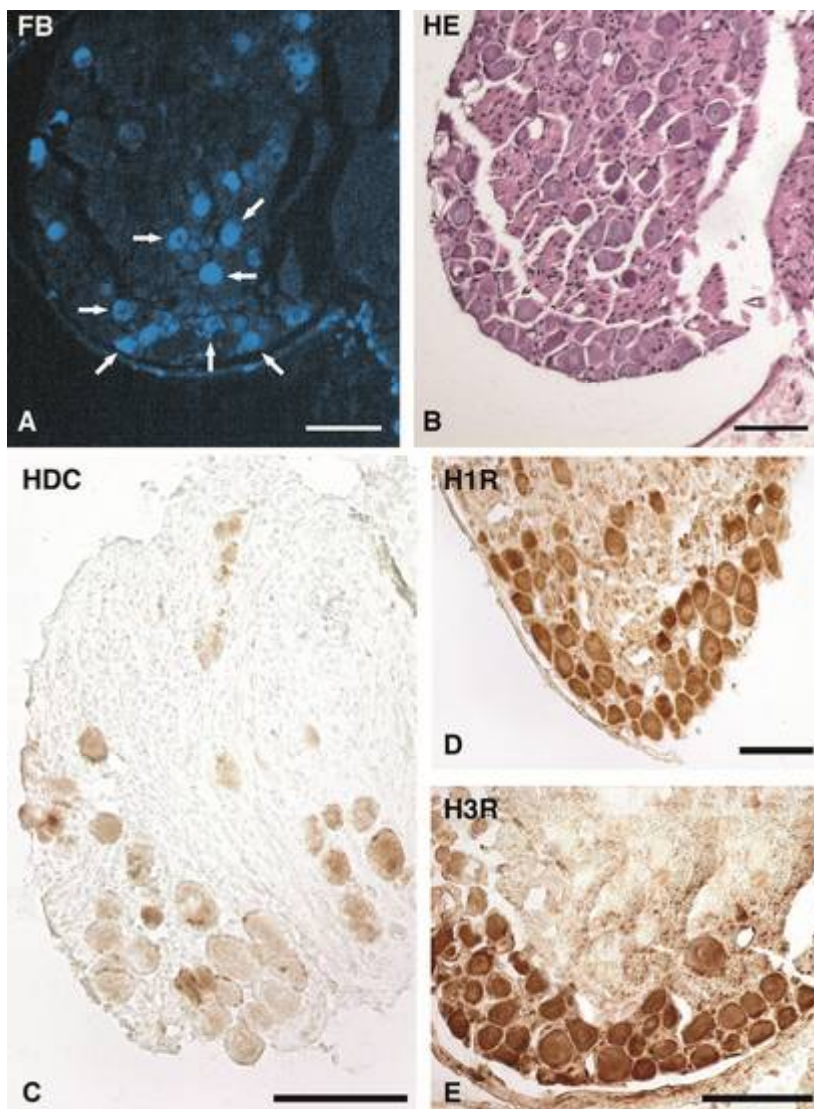


**Abbildung 4.4:** Immunogoldfärbung gegen H1R und H3R im *Glomus caroticum*. A zeigt eine autonome Nervenfasern mit charakteristischen Varikositäten (V) und zahlreichen Vesikeln in direkter Nähe einer Glomuszelle (G). Die Faser enthält typischerweise Mitochondrien. Den durch einen Kasten markierten Bereich zeigt B in höherer Vergrößerung: durch Pfeile markierte 10 nm Goldpartikel sind vornehmlich an der Plasmamembran des Dendriten lokalisiert. C und D zeigen entsprechende Resultate für H3-Rezeptoren. S = Stützzelle (Typ II-Zelle). Skalierung = 1  $\mu\text{m}$  (A und C) bzw. 0,25  $\mu\text{m}$  (B und D).



### 4.1.2 Ganglion petrosus

Um die Perikarya sensorischer Neurone, die die Sensorzellen des Glomus caroticum innervieren, exakt identifizieren und ihre genaue Lokalisierung bestimmen zu können, wurde eine retrograde Markierungstechnik mit dem Tracer *Fast Blue* (FB) eingesetzt. Der in das Glomusorgan der Versuchstiere injizierte Farbstoff wandert retrograd entlang dem Verlauf der Nervenfasern zu den ursprünglichen Neuronen des ipsilateralen Ggl. petrosus. Die so markierten Perikarya waren von unterschiedlicher Größe und konzentrierten sich in ihrer Lokalisation vor allem auf den kaudalen Anteil (siehe  Abbildung 4.5 A). Diese Region des Ganglions enthält die Zellkörper der ins Glomusorgan projizierenden Fasern im afferenten Schenkel der Chemoreflexbahn (vergleiche dazu auch Ruiz-Pesini et al., 1995).



**Abbildung 4.5: Retrograde Markierung von Ggl. petrosus-Neuronen und immunhistochemische Färbung.** Der fluoreszierende Tracer FB wurde ins Glomusorgan injiziert. Nach einer Woche Überlebenszeit erfolgte die Präparation des ipsilateralen Ggl. petrosus. Die Gewebsschnitte wurden unter Epifluoreszenz untersucht. A zeigt markierte Perikarya von Neuronen vor allem im kaudalen Bereich (Pfeile), B die normale Morphologie des Ganglions in HE-Färbung. Immunreaktive Zellkörper für HDC (C), H1R (D) und H3R (E) zeigten ein vergleichbares Verteilungsmuster, jedoch waren HDC-positive Zellen in ihrer Anzahl geringer und auch schwächer gefärbt. H1R- und H3R-positive Zellen waren in Größe, Form und Verteilung ähnlich.

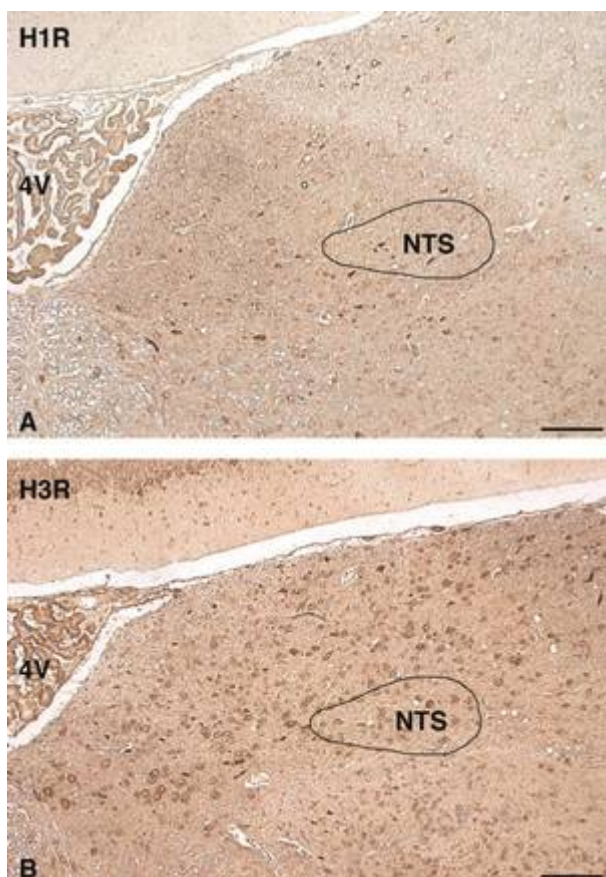
Skalierung (A-E) = 100 µm.

Diese Beobachtung bestätigten auch immunhistochemische Versuche: bei Verwendung von Anti-HDC-Antikörpern waren die schwächer gefärbten Zellkörper ebenfalls hauptsächlich in den kaudalen Bereichen des Ganglions anzutreffen (☞ Abbildung 4.5 C), das gleiche Verteilungsmuster zeigten zudem entsprechende Färbungen mit Anti-H1R- und Anti-H3R-Antikörpern (D und E). Dabei richtete sich die Färbungsintensität nach der Zellgröße: die stärkste Färbung zeigte sich in Perikarya kleiner Größe, mittelgroße und große Zellen zeigten sich schwächer angefärbt. Im direkten Vergleich decken sich die Beobachtungen der Immunhistochemie deutlich mit der retrograden Markierung der Neurone mittels FB. Wie schon im Glomusorgan beobachtet, fehlte auch im Ggl. petrosum eine Immunreaktivität für die beiden Histamin-Rezeptoren H2R und H4R, obwohl entsprechende Positivkontrollen problemlos durchgeführt werden konnten.



#### 4.1.3 Nucleus tractus solitarii

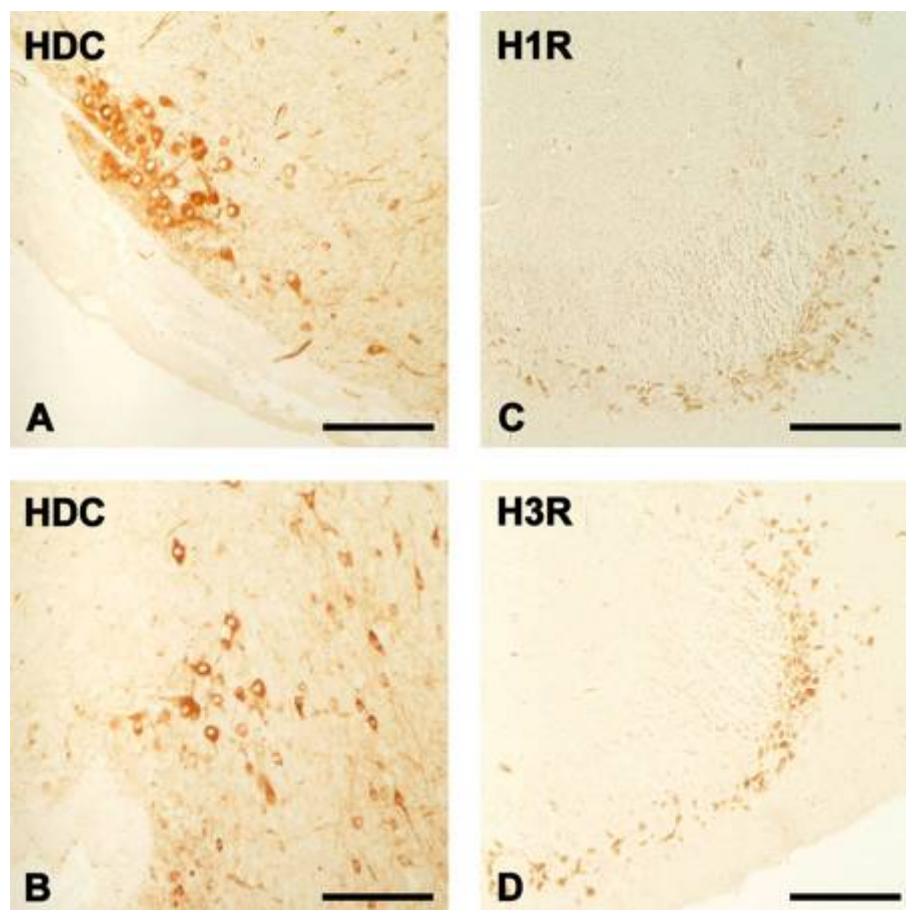
Die Signale der Chemozeptoren im Glomusorgan werden via N. glossopharyngeus in den Hirnstamm, genauer die Medulla oblongata, weitergeleitet. Der Ncl. tractus solitarii (NTS), ein Hirnkern des IX, dient der Integration und Verarbeitung der weitergeleiteten Informati-

onen, bevor Befehle an die peripheren Effektoren erteilt werden können. Im Falle der Chemozeption scheint dem kardiorespiratorischen Teil des Kerngebiets – gelegen in den kaudalen zwei Dritteln – die größte Bedeutung zuzukommen.



**Abbildung 4.6: Immunhistochemie der Histaminrezeptoren H1R und H3R im Ncl. tractus solitarii.** Bei Verwendung von Anti-H1R-Antikörper (A) zeigten sich nur wenige, im Vergleich schwächer gefärbte Neurone, vor allem im intermediären Subnucleus. H3R-positive Perikarya (B) hingegen waren zahlreicher und in allen Subnuclei des Kerngebiets präsent. Sowohl benachbarte Kerne als auch der cerebelläre Cortex zeigten sich ebenfalls H3R-positiv. 4V = IV. Ventrikel. Skalierung (A, B) = 200  $\mu$ m.

Um eine histaminerge Signalübertragung im NTS zu bestimmen, wurden wiederum immunhistochemische Versuchsreihen durchgeführt. Dort zeigte sich, dass die neuronalen Perikarya im Unterschied zu den zuvor untersuchten Strukturen keine Immunreaktivität für das Histamin-synthesierende Enzym HDC zeigten. Entsprechende Positivkontrollen in den tuberomamillären Ncll. des Hypothalamus waren eindeutig positiv (siehe folgende  Abbildung 4.7). Hingegen stellten sich in den ventrolateralen Regionen und den intermediären Subnuclei Neurone dar, die für die Rezeptorsubtypen H1R und H3R deutliche Immunreaktivität zeigten. Dies konnte auch in weiter kaudal gelegenen Bereichen des Kerns beobachtet werden. Im Vergleich waren H1R-positive Neurone den H3R-positiven zahlenmäßig unterlegen, erschienen kleiner und auch weniger intensiv gefärbt. Diese Ergebnisse sind in  Abbildung 4.6 (vorige Seite) zu sehen. Zur Identifizierung cerebraler Strukturen der Ratte wurde der Atlas von Paxinos und Watson (1998) hinzugezogen.



**Abbildung 4.7:** *Immunhistochemische Positivkontrollen in Hypothalamus und Hippocampus.* HDC in tuberomamillären Nuclei des Hypothalamus (A und B) und H1R bzw. H3R im Hippocampus der Ratte (C bzw. D).

Skalierung = 200  $\mu$ m.

## 4.2 Wirkung von Histaminika auf die Aktivität des N. phrenicus

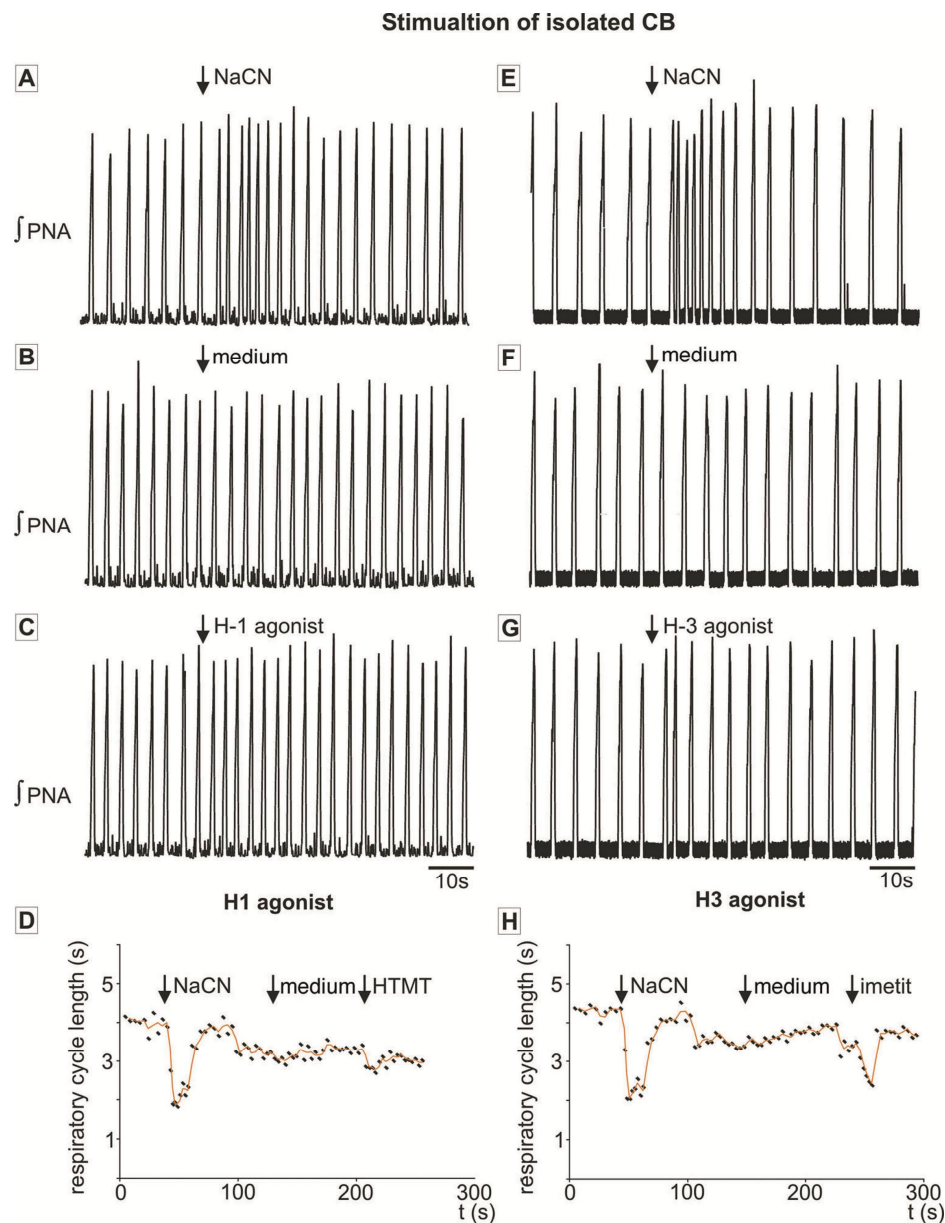
Dank der Vorversuche unserer Arbeitsgruppe (Koerner et al., 2004) und der oben beschriebenen Ergebnisse erscheint eine histaminerge Signalübertragung in der Chemoreflexbahn des Glomusorgans äußerst wahrscheinlich: Histamin wird im Glomus caroticum synthetisiert, gespeichert und bei Hypoxie ausgeschüttet, zusätzlich verfügen die Typ I-Zellen über Autorezeptoren der Subtypen H1R sowie H3R. Histaminerge Signale werden über Dendriten von Neuronen des Ggl. petrosus aufgenommen und via IX nach zentral weitergeleitet, wo sie im NTS weiterverarbeitet werden. Als nächste Frage stellte sich, ob und ggf. welche Auswirkungen eine direkte Stimulation von HIS-Rezeptoren auf die Aktivität des N. phrenicus hat, der das Zwerchfell und somit die Atmung kontrolliert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen wurden am Institut für Physiologie der Universität Göttingen unter Leitung von Herrn PD Dr. M. Dutschmann erarbeitet.

### 4.2.1 H1R- und H3R-Agonisten am perfundierten Glomusorgan

In einer Herz-Hirnstamm-Präparation der Ratte wurde NaCN (200 µl, 0,01 %), ein mitochondrialer Blocker und damit hochpotentes Hypoxie-Signal, direkt auf das von der Hirnstamm-Perfusion separierte Glomusorgan appliziert: ein sofortiger Chemoreflex (CR) mit Zunahme der Frequenz von Aktionspotentialen im N. phrenicus war die Folge (☞ Abbildung 4.8 A, folgende Seite). In insgesamt fünf Experimenten verkürzte NaCN die Länge des Respirationszyklus von  $3,99 \text{ s} \pm 0,07 \text{ s}$  auf  $2,18 \text{ s} \pm 0,05 \text{ s}$  ( $p < 0.001$ , D). Die Verwendung von reinem Medium (ohne Agonisten) vermochte diesen Effekt nicht hervorzurufen (B). Die Verwendung des H1R-Agonisten *HTMT* an Stelle des NaCN löste einen vergleichbaren, wenngleich schwächeren Chemoreflex aus: die Zykluslänge verkürzte sich von  $3,33 \text{ s} \pm 0,23 \text{ s}$  auf  $2,91 \text{ s} \pm 0,25 \text{ s}$  ( $p < 0.05$ , C und D).

In einer zweiten Versuchsserie wurde nach erneuter Applikation gleicher Mengen NaCN (Abnahme der Zykluslänge von  $4,32 \text{ s} \pm 0,09 \text{ s}$  auf  $2,45 \text{ s} \pm 0,03 \text{ s}$ ,  $p < 0.001$ , E) bzw. Medium als Kontrolle (ohne Effekt, F) der H3R-Agonist *Imetit* eingesetzt. Auch hier konnte ein eindeutiger Chemoreflex ausgelöst werden, der zwar den Effekt von HTMT übertraf, doch nicht an NaCN heranreichte: die Zykluslänge verringerte sich hier von  $3,84 \text{ s} \pm 0,07 \text{ s}$  auf  $3,39 \pm 0,05 \text{ s}$  ( $p < 0.001$ , G und H).



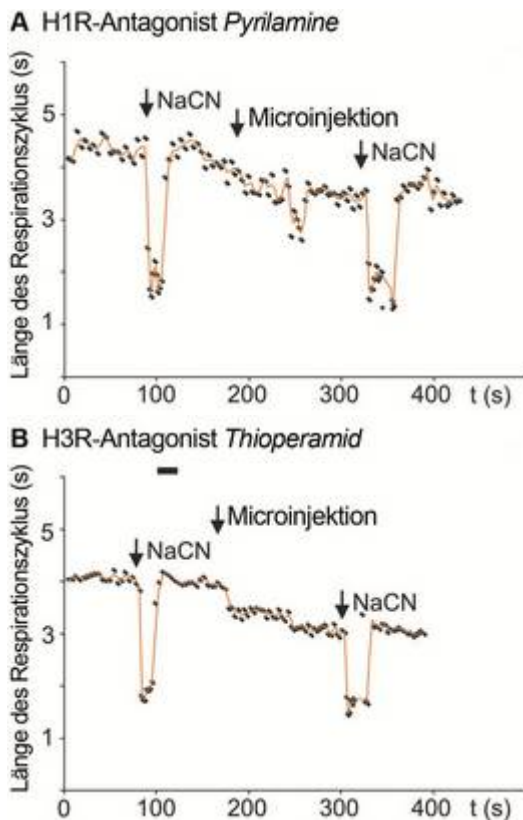


**Abbildung 4.8:** *Effekt von H1R- und H3R-Agonisten auf die Aktivität des N. phrenicus.* Wirkung von NaCN (200  $\mu$ l, 0,01 %, A und E), oxygeniertem Medium (B und F), H1R-Agonisten *HTMT* (C), H3R-Agonist *Imetit* (G) nach Applikation in das präparatorisch isolierte Glomusorgan (jeweils 1 mM in Perfusionsmedium). D und H: Länge des Respirationszyklus in Mittelwerten aus fünf Experimenten.

#### 4.2.2 H1R- und H3R-Antagonisten bei Mikroinjektion in den NTS

Der gleiche Versuchsaufbau ermöglichte es zudem, die im NTS identifizierten H1- und H3-Rezeptoren auf Ihre Funktion in der Atmungsregulation zu prüfen. Dafür wurden H1R- und H3R-Antagonisten in unmittelbare Nähe des NTS injiziert und die Wirkung auf die basale Phrenicus-Aktivität (Chemoreflex), aufgezeichnet. Abbildung 4.9 vermittelt die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuchsreihe:





← **Abbildung 4.9: Effekt von H1R- und H3R-Antagonisten auf die Länge des Inspirationszyklus.** Die Pharmaka *Pyrilamin* (H1R) sowie *Thioperamid* (H3R) wurden in einer Konzentration von 1 mM in den NTS appliziert. Die Graphen zeigen jeweils gemittelte Daten aus fünf Experimenten und wurden nicht kontinuierlich aufgenommen (siehe dazu auch [Kapitel 3.7](#)).

So löste die Mikroinjektion des H1-Rezeptor-Antagonisten *Pyrilamin* (1 mM in Perfusionsmedium) in den kommissuralen Teil der NTS eine Veränderung der basalen Atmungsaktivität aus A): 1 min nach der Injektion des Pharmakons sank die Länge des Respirationszyklus von  $4,36 \text{ s} \pm 0,18 \text{ s}$  auf  $3,42 \text{ s} \pm 0,38 \text{ s}$  ( $p < 0,001$ , Mittelwerte aus fünf Experimenten). Insgesamt erhöhte die Injektion von *Pyrilamin* die Minutenaktivität des N. phrenicus ( $\text{PNA}_{\text{min}}$ ) um 29,9 % durch eine Erhöhung der basalen Atemfrequenz. Zusätzlich beeinflusste der H1R-Antagonist die Chemoreflex-Antwort auf NaCN: 5 min im Anschluss an die Injektion von *Pyrilamin* verlängerte sich die Dauer der Chemoreflex-Antwort im Mittel (fünf Experimente) von  $13,64 \text{ s} \pm 0,74 \text{ s}$  auf  $17,73 \text{ s} \pm 1,07 \text{ s}$  ( $p < 0,01$ ). Doch obwohl die Antwort länger ausfiel, wurde die Stärke des CR eher abgeschwächt – wie aus dem Graphen (A) ersichtlich.

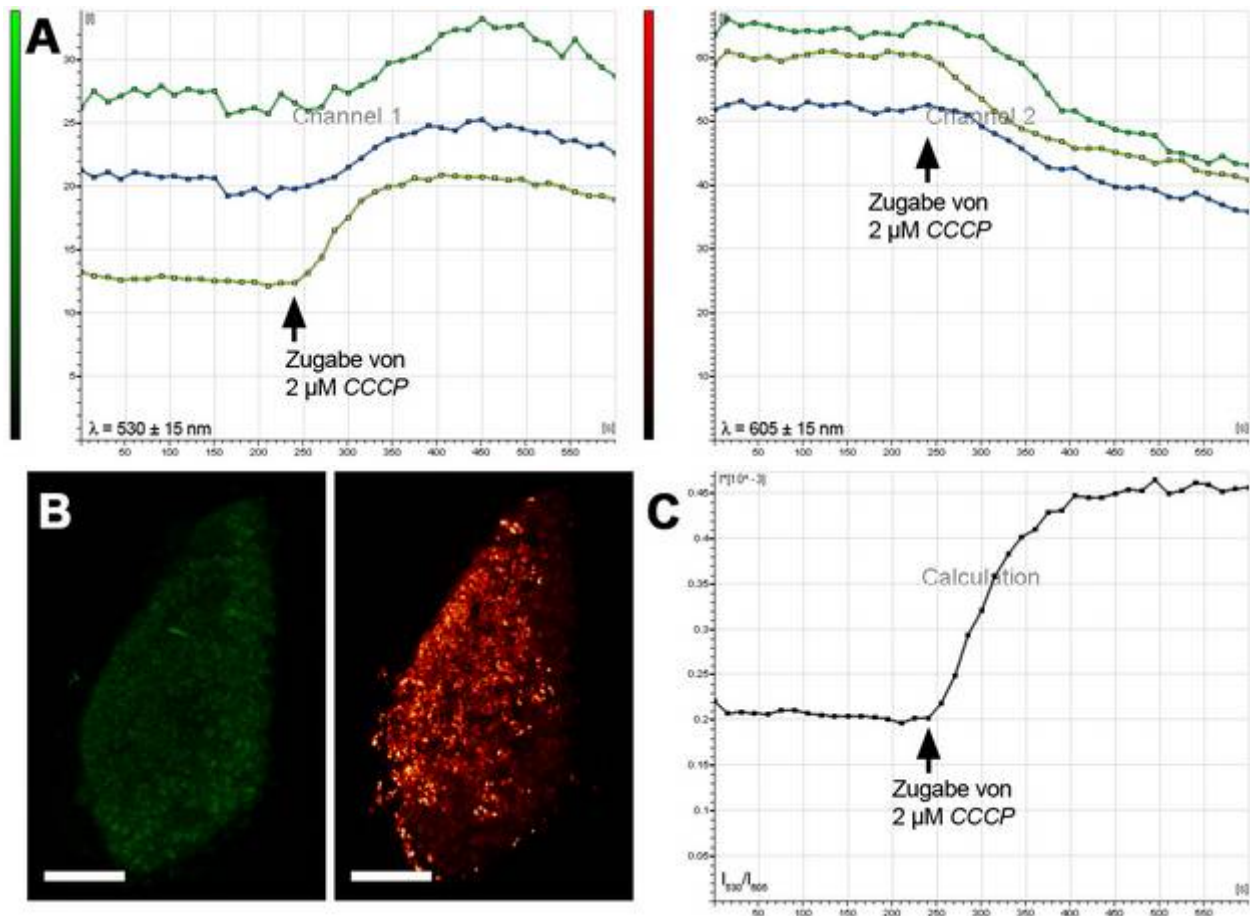
Vergleichbare Resultate erzielte die Versuchsreihe mit dem H3-Rezeptor-Antagonisten *Thioperamid* (1 mM in Perfusionsmedium, B): hier war eine Verkürzung des Respirationszyklus von  $4,06 \text{ s} \pm 0,08 \text{ s}$  auf  $3,4 \text{ s} \pm 0,08 \text{ s}$  ( $p < 0,001$ , Mittelwerte aus fünf Versuchen) zu verzeichnen. Zusammen mit der verringerten Inspirationslänge zeigte sich ein Anstieg der  $\text{PNA}_{\text{min}}$  um 52,3 %. Ebenso war auch hier eine Beeinflussung des NaCN-Chemoreflexes sichtbar: dessen Dauer verlängerte sich im Mittel (fünf Experimente) von  $12,44 \text{ s} \pm 0,47 \text{ s}$  auf  $16,13 \text{ s} \pm 1,19 \text{ s}$  ( $p < 0,01$ ).

### 4.3 Transmitter-Freisetzung durch Sensorzellen in Lebendschnitten

Weder der genaue Mechanismus der Speicherung noch der Freisetzung der im Glomusorgan bekannten Neurotransmitter und -modulatoren ist bislang detailliert geklärt. Unklar ist beispielsweise, ob die verschiedenen Überträgersubstanzen, wie z. B. Dopamin und Histamin in gemeinsamen Vesikeln gespeichert und sezerniert werden. Interessante Hinweise bieten in dieser Hinsicht immunhistochemische Untersuchungen mit den Transportproteinen VMAT 1 und VMAT 2 (Vesicular Monoamino Transporter 1 und 2): beide Systeme konnten von unserer Arbeitsgruppe durch PCR-Untersuchungen und immunhistochemische Nachweismethoden gezeigt werden. Während VMAT 1 eine höhere Affinität zu Dopamin besitzt, sorgt VMAT2 vornehmlich für eine Vesikelspeicherung des Histamins (Erickson et al. 1995; Merickel und Edwards, 1995). Dies legt eine getrennte Speicherung beider Moleküle nahe. Amperometrie bzw. Voltammetrie stellt eine elegante Methode dar, um dieser Frage nachzugehen, da sich durch geeignete Messtechniken verschiedene Moleküle anhand ihres Redox-Potentials unterscheiden lassen. Es lässt sich zudem die Sekretion von Neurotransmittern in Echtzeit beobachten und auch die Wirkung verschiedener Pharmaka untersuchen. Eine erste Versuchsreihe beschreibt folgender Abschnitt.

#### 4.3.1 Vorversuche zum Überleben von Glomus-Dünnschnitten

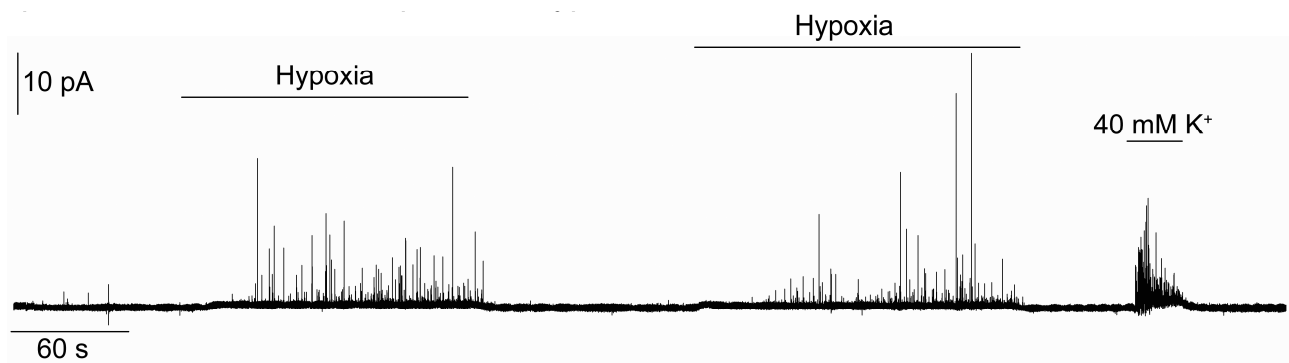
Da das Gewebe während der mehrstündigen Herstellung von Dünnschnitten durch mechanische Irritation und Hypoxie starken physikalischen Noxen ausgesetzt ist, sollte in einem Vorversuch das Überleben einer ausreichenden Anzahl von Glomuszellen durch fluoreszenzmikroskopische Messungen des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt werden. Hierfür wurden Lebendschnitte von Glomera carotica der Ratte hergestellt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff *DePsipher* beladen. Im Anschluss wurde die Intensität sowohl der Farbstoff-Aggregate (orange-rote Fluoreszenz bei  $605 \pm 15$  nm) als auch der Monomere (grüne Fluoreszenz bei  $530 \pm 15$  nm) detektiert und aufgezeichnet. In vitalen Zellen führt die Zugabe des Protonophors und Entkopplers *CCCP* zu einem Anstieg des Verhältnisses der Rot- / Grün-Fluoreszenzintensität, was den Anstieg der Zahl an depolarisierten Mitochondrien anzeigt. ☞ Abbildung 5.1 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe: vitales Glomusgewebe fand sich bevorzugt in den peripheren Bezirken der Dünnschnitte. Dies weist eine ausreichende Anzahl vitaler Zellen nach, um amperometrische Versuche durchzuführen.



**Abbildung 4.10: Fluoreszenzmessung mit DePsiher an Lebenschnitten des *Glomus caroticum*.** Die Graphen in A zeigen die Fluoreszenz-Intensität des Farbstoffs DePsiher vor und nach ( $t = 240 \text{ s}$ ) Zugabe des Entkopplers CCCP. Links grüner Farbkanal (Monomere,  $530 \pm 15 \text{ nm}$ ), rechts roter Farbkanal (Aggregate,  $605 \pm 15 \text{ nm}$ ) (schwarz = niedrige, grün bzw. rot = hohe Intensität). B: exemplarische Aufnahme beider Kanäle während des Messvorgangs. Die Intensitätsänderung ( $I_{530}/I_{605}$ , C) macht den Anstieg von Monomeren nach Zugabe von CCCP deutlich. Skalierung (B) =  $100 \mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Sekretion von Katecholaminen bei Hypoxie

In einem ersten Versuch sollte die Sekretion von monoaminen Transmittern (Katecholaminen) aus den Sensorzellen des Glomusorgans gezeigt werden. Die kontinuierliche Perfusion der Badkammer mit entsprechend gesättigter Tyrode-Lösung lieferte das hypoxische Signal. Bei einer Spannung von  $800 \text{ mV}$ , die das Redoxpotential von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin übersteigt, wurden Spike-ähnliche Ereignisse aufgezeichnet. Als Positivkontrolle erfolgte in allen Versuchen mindestens eine Messung mit  $40 \text{ mM K}^+$  enthaltender Extrazellulärlösung, die gleichfalls zur Membrandepolarisation und Transmitterausschüttung führt. Dies sollte die grundsätzliche Aktivität der Sensorzellen und eine ausreichende Zahl funktioneller Exozytosen belegen (☞ Abbildung 4.11).

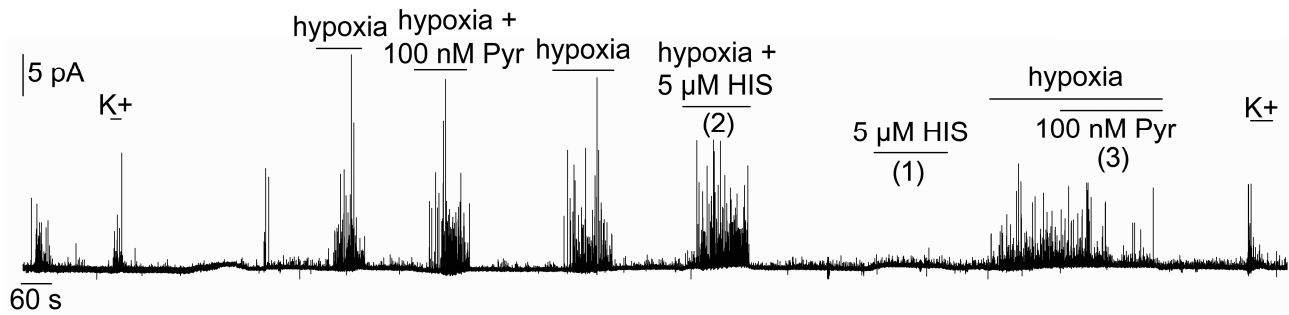


**Abbildung 4.11: Amperometrie am Glomus- Lebendschnitt: Antwort auf Hypoxie und 40 mM K<sup>+</sup>.** Detektiert wurde mit einer angelegten Spannung von 800 mV.

Unter normoxischen Bedingungen (Tyrode-Lösung gesättigt mit einem Gasgemisch aus 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 75% N<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ~ 140 mmHg) zeigten die Glomuszellen kaum oder nur geringste sekretorische Aktivität. Unmittelbar nach Perfusion mit hypoxischer Tyrodelösung (5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ~ 20 mmHg) konnten zahlreiche Spike-förmige exozytische Ereignisse aufgezeichnet werden, die der Sekretion von Katecholaminen entsprechen. Diese Sekretionsereignisse hielten für die Dauer des Hypoxiesignals an und verschwanden vollständig bei Umschalten der Perfusion auf normoxische Lösung. Die beobachteten Ereignisse entsprachen dabei den in der Literatur publizierten Daten (Pardal et al., 2000).

### 4.3.3 Wirkung von (Anti-) Histaminika auf die Katecholamin-Sekretion

In Bezug auf die im vorigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse sollte in einem zweiten Schritt die Wirkung einer Aktivierung von Histamin-Rezeptoren auf das Sekretionsverhalten der Sensorzellen untersucht werden. Der Versuchsaufbau entsprach dem Experiment im vorigen Abschnitt, jedoch fanden zusätzlich das Pharmakon *Pyrilamin* (N-(4-Methoxyphenyl)methyl-N',N'-dimethyl-N-(2-pyridinyl)-1,2-ethanediamin) in einer Konzentration von 100 nM als H1R-Antagonist und *Histamin* (5 µM) als Agonist an allen bekannten Histamin-Rezeptoren Verwendung. Da das Redoxpotential von Pyrilamin und Histamin (jeweils ~ 1,25 V) die an der Elektrode angelegte Spannung von 800 mV übersteigt, wurde die Messung durch die Pharmaka selbst nicht gestört.

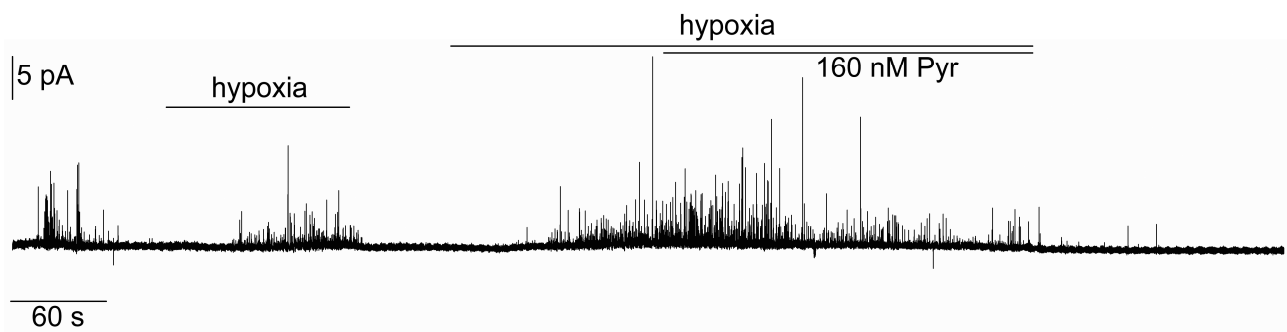


**Abbildung 4.12: Amperometrie am Glomus-Lebenschnitt: Antwort auf Hypoxie, Histamin und Pyrilamin.** Es wurde die Sekretion der Sensorzellen auf Histamin (5  $\mu\text{M}$ ), Hypoxie plus Histamin und Hypoxie plus Pyrilamin (100 nM) detektiert. Messspannung = 800 mV. Positivkontrolle Hypoxie und  $\text{K}^+$  (40 mM). Pyr = Pyrilamin.

☞ Abbildung 4.12 zeigt die Aufzeichnung eines vollständigen Experiments dieser Versuchsreihe: Deutlich zu erkennen ist die ausbleibende Sekretion nach Applikation von *Histamin*: nach Zugabe (5  $\mu\text{M}$  in Perfusionsmedium) wurde in mehreren Versuchen ( $n = 4$ ) keine Sekretion registriert (1). Die zeitgleiche Applikation des biogenen Amins zu einem hypoxischen Stimulus (2) führte jedoch zu einer scheinbar höheren Rate von Exozytose-Ereignissen: eine Zunahme der detektierten Spikes war zu verzeichnen. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, müssen die vorliegenden Ergebnisse wiederholt und in detaillierten Statistiken analysiert werden: zu klären ist, ob die Anzahl der Spike-ähnlichen Ereignisse durch die Applikation der Pharmaka tatsächlich zunehmen. Über die AUC eines Spikes lässt sich im Folgenden indirekt auf die sezernierte Menge an Neurotransmittern schließen (im Beispiel Katecholamine, siehe auch [Kapitel 3.5](#) sowie ☞ Abbildung 3.2).

Der H1R-Blocker *Pyrilamin* löste gegenteilige Effekte aus: zwar zeigte während kurzzeitiger Hypoxie die Zugabe des Pharmakons (100 nM in Perfusionsmedium) keine nennenswerten Auswirkungen, bei länger dauernder hypoxischer Perfusion wurde die Signalantwort hingegen abgeschwächt (3): die Anzahl der Spike-ähnlichen Ereignisse nahm durch die Zugabe des Pharmakons zu einem bestehenden hypoxischen Stimulus ab.

Die nachfolgende ☞ Abbildung 4.13 zeigt zur Verdeutlichung den Ausschnitt eines weiteren Experiments unter gleichen Versuchsbedingungen, die Konzentration des H1R-Antagonisten *Pyrilamin* wurde hier jedoch auf 160 nM erhöht. Die Abschwächung des Signals im Sinne einer verringerten Anzahl Spike-ähnlicher Exozytose-Ereignisse ist ersichtlich. Zu beachten ist, dass im Rahmen des Versuchsaufbaus die Hypoxie-Zeit mehrere Minuten betrug. Dabei ist es nicht auszuschließen, dass die Signalantwort der Glomuszellen auf niedrige  $\text{pO}_2$ -Werte über einen solchen Zeitraum rückläufig ist.




**Abbildung 4.13: Amperometrie am Glomus-Lebenschnitt: Antwort auf Hypoxie und Pyrilamine.** Erneut wurde die Sekretion der Sensorzellen detektiert (Messspannung = 800 mV), als Stimuli fungierten Hypoxie und Hypoxie plus Pyrilamine (160 nM). Die amperometrische Spur zeigt den vergrößerten Ausschnitt eines Experiments. Positivkontrolle Hypoxie.



Zusammengenommen machen diese Beobachtungen deutlich, dass Aktivierung bzw. Blockade von Histamin-Rezeptoren in den Sensorzellen des Glomusorgans deren Signalantwort auf Hypoxie beeinflusst. Da die Sensorzellen den vollständigen Apparat für Synthese, Speicherung und Exozytose von Histamin besitzen, liegt eine autokrine Wirkung des biogenen Amins nahe, muss jedoch in weiteren Studien inkl. einer detaillierten statistischen Auswertung bestätigt werden.

## 4.4 Biogene Amine im Glomus caroticum des Menschen

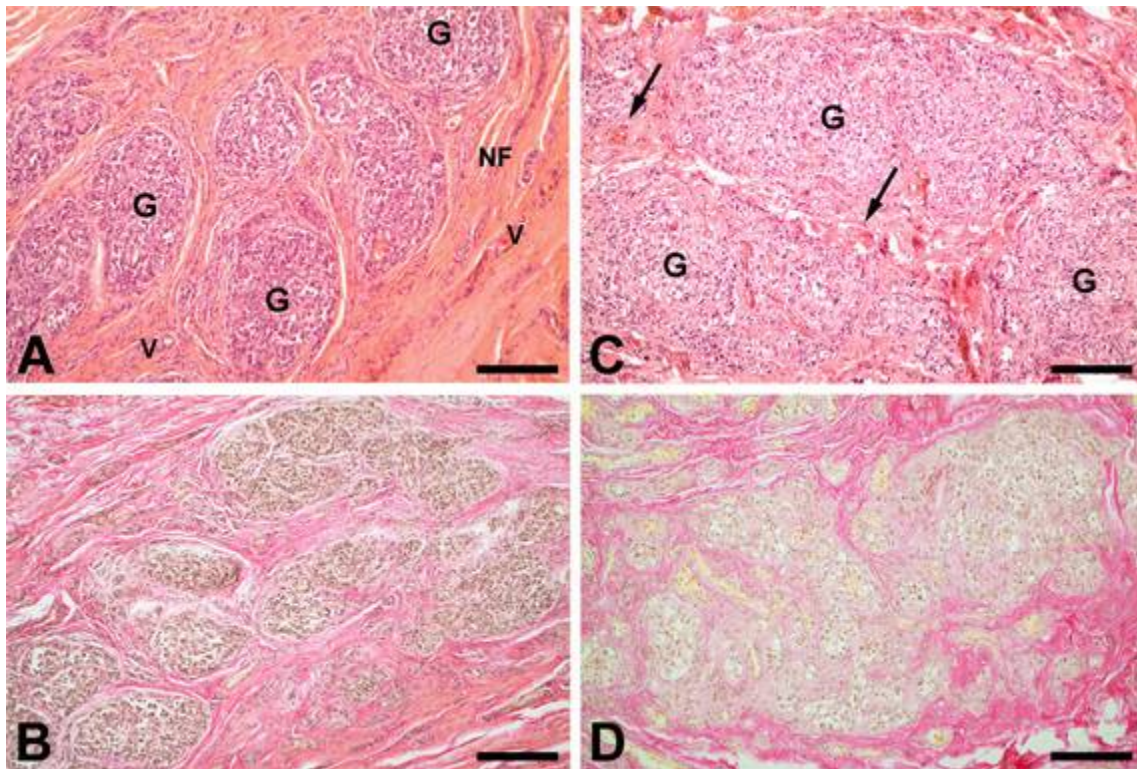
Im Hinblick auf die beim Nager gewonnen Erkenntnisse zur histaminergen Signalübertragung des Glomusorgans erschien die Untersuchung des menschlichen Pendant als logische Konsequenz. Aus diesem Grunde wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München sowohl die dopaminergen als auch die histaminergen Merkmale (synthetisierende Enzyme, Exozytose-Apparat und Rezeptoren) in den Glomusorganen menschlicher Leichen untersucht. Zur Transmitter-Situation im menschlichen Glomus caroticum ist bislang wenig bekannt: lediglich Kummer und Habeck konnten in einer Publikation aus dem Jahre 1992 die Lokalisation der Tyrosin-Hydroxylase (TH, Synthese-Enzym von Dopamin) im menschlichen Glomusorgan zeigen.

Wie der gesamte menschliche Organismus unterliegt auch das Glomusorgan mit zunehmendem Alter deutlichen strukturellen und physiologischen Veränderungen. Im Verlauf des Alterns könnte die Zusammensetzung der Transmitter- und Rezeptorprofile im Glomus caroticum deutliche Auswirkungen auf die reflektorische Hypoxie-Antwort des Organs haben (siehe dazu auch [Kapitel 5.2](#) sowie Gauda et al., 1996, Gauda und Lawson, 2000; Gauda, 2002). Aus diesem Grund erhielten altersbezogene Merkmale des Glomus caroticum besondere Aufmerksamkeit. Dazu wurden Proben von Leichnamen verschiedener Altersstufen untersucht, die der  Tabelle 2.1 zu entnehmen sind.

### 4.4.1 Altersbezogene Veränderungen im menschlichen Glomusorgan

Die untersuchten Gewebeproben zeigten, dass das Glomusorgan bei Kindern und jungen Erwachsenen ausgeprägter entwickelt ist, als in späteren Lebensstufen. Dabei wirken die charakteristischen Zell-Cluster kompakter und werden durch dünne Züge von Bindegewebsfasern septiert. Diese enthalten zahlreiche Kapillaren, feine Blutgefäße sowie Nervenfasern und konvergieren an der Oberfläche zur externen Organkapsel (siehe nachfolgende  Abbildung 4.14). Strukturell bleibt dieser Aufbau auch im Erwachsenen- und höheren Alter erhalten, jedoch verringert sich die Gesamtgröße des Organs. Zudem zeigten sich die Glomerula bei älteren Probanden auffallend weniger kompakt und wiesen eine deutlich höhere Vaskularisierung auf. Damit scheint eine Abnahme der Anzahl an Nervenfasern und Sensor-Zellen durch zunehmende zelluläre Degeneration gegeben zu sein. Im Gegenzug nimmt die Masse des Bindegewebes auffällig zu – vor allem im hohen Alter (76 Jahre, vgl. auch  Abbildung 5.1).





**Abbildung 4.14:** *Morphologische Veränderung des humanen Glomus caroticum im Alter.*

Normale Morphologie des menschlichen Glomusorgans im juvenilen Alter (vier Monate, A und B) sowie im Erwachsenenalter (44 Jahre, C und D). A zeigt charakteristische Glomerula (G), die durch dünne Bindegewebssepten mit zahlreichen Blutgefäßen (V) und Nervenfasern (NF) getrennt werden (HE-Färbung). Die Septen wiederum vereinigen sich an der Oberfläche zur externen Kapsel. Eine entsprechende van Gieson-Färbung (B) bringt Bindegewebsfasern deutlicher zum Vorschein. C: Auch beim Erwachsenen zeigen sich in HE-Färbung durch reich vaskularisiertes (Pfeile) Bindegewebe separierte, jedoch im Vergleich weniger kompakte Glomerula (G), die in einer van Gieson-Färbung (D) deutlicher hervortreten. Skalierung = 150 µm

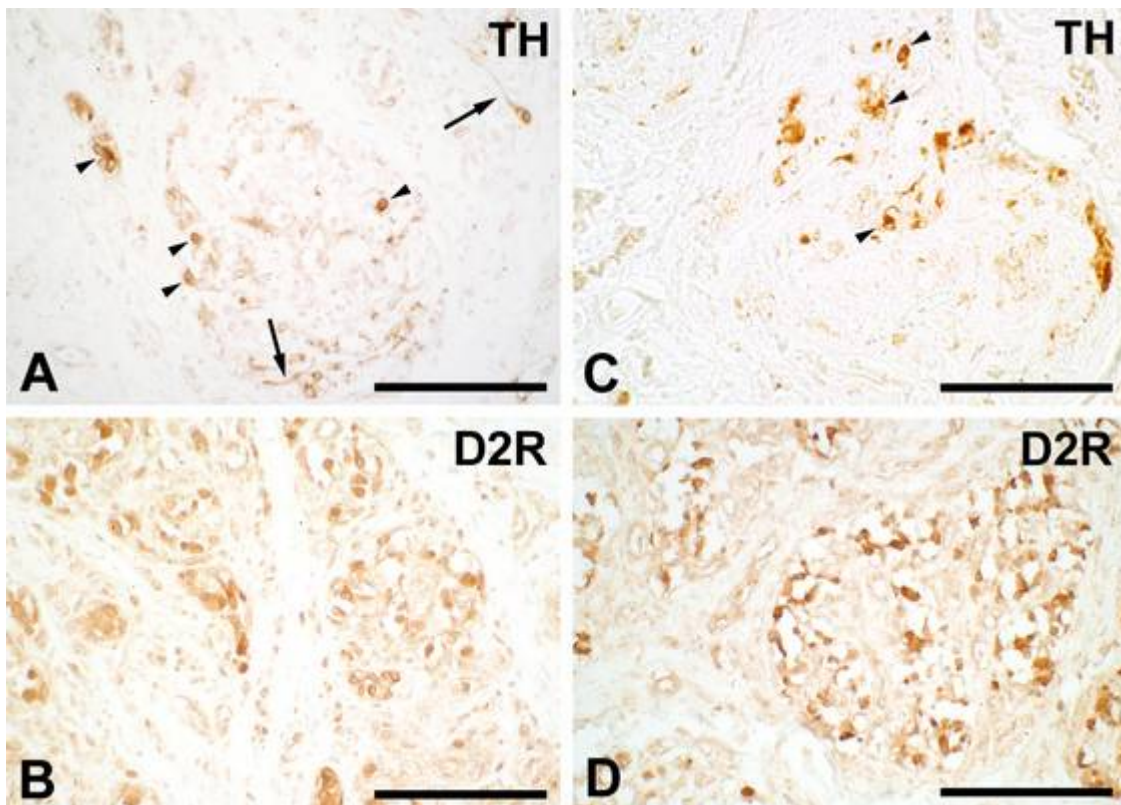
Nun sollten die bei Nagern beobachteten Neurotransmitter-Systeme, vornehmlich dopaminerge und histaminerge Charakteristika, untersucht werden.

#### 4.4.2 Dopaminerge Charakteristika im menschlichen Glomusorgan

Dafür wurden zunächst immunhistochemische Färbungen für das Katecholaminsynthetisierende Enzym TH durchgeführt. Dabei fiel auf, dass TH-immunoreaktive Zellen in den Glomera carotica in vergleichsweise geringer Anzahl vorkommen (☞ Abbildung 4.15). Dies gilt für alle untersuchten Alterstufen – juvenil (A), adult (C) und alt (ohne Abbildung) – gleichermaßen. Darüber hinaus wurden extraglomeruläre und perivaskuläre Nervenfasern beobachtet, die ebenfalls Immunreaktivität für das Enzym zeigten, während bei Typ II-Zellen keinerlei Reaktivität gefunden wurde. Wie erwartet zeigten immunhistoche-






mische Studien ein ähnliches zelluläres Verteilungsmuster für das Transportprotein VMAT 1, das im Gegensatz zu VMAT 2 überwiegend für den vesikulären Transport dopaminergere Transmitter verantwortlich zeichnet. Auch das an der vesikulären Speicherung beteiligte Protein SNAP 25 konnte in Sensorzellen sowie in Nervenfasern innerhalb und um einzelne Glomerula herum gefunden werden (ohne Abbildung). Im Vergleich zu TH-positiven Sensorzellen konnten solche mit Immunreaktivität für Dopamin-D2-Rezeptoren in wesentlich größerer Anzahl nachgewiesen werden, sowohl in Glomera kindlicher (B) als auch erwachsener Leichname (D). Dieser Kontrast zeigte sich äquivalent in den Glomera aller untersuchter Altersgruppen: den zahlenmäßig geringeren TH-positiven Zellen steht eine große Anzahl von Zellen mit Expression von D2R gegenüber.

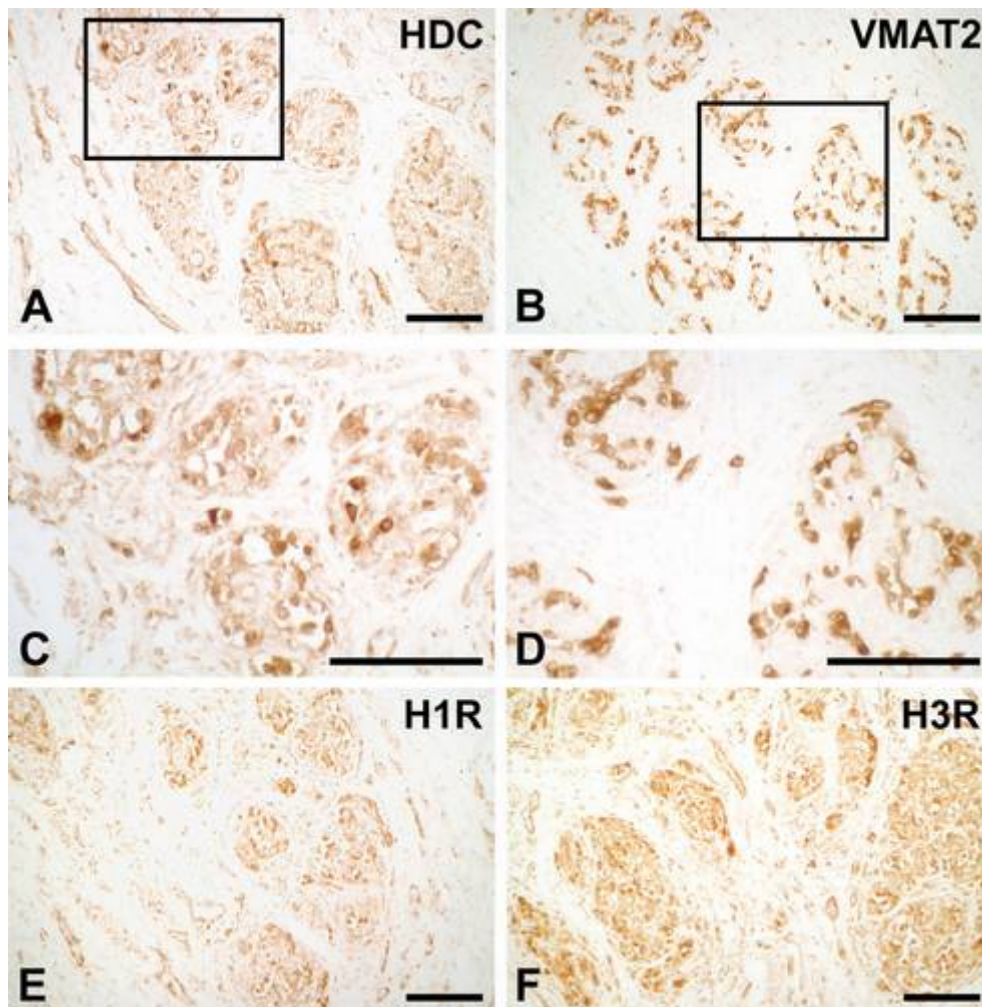


**Abbildung 4.15: Immunhistochemischer Nachweis dopaminergere Merkmale Glomusorgan des Menschen.** Linke Spalte (A, B): juveniles Glomus caroticum, rechte Spalte (C, D): adultes Glomus caroticum. A: Glomerulum eines vier Monate alten Kindes mit immunhistochemischer Färbung gegen TH. Nur wenige Sensorzellen (Pfeilspitzen) sind immunopositiv, zusätzlich zeigen sich Nervenfasern (Pfeile) innerhalb und um die Zell-Cluster, während Typ II- (Stütz-) Zellen keine Immunreaktivität zeigen. Dopamin-D2-Rezeptoren (B) finden sich in beinahe allen Sensorzellen. Gleichsam zeigen sich nur wenige TH-immunopositive Zellen (Pfeilspitzen) beim Erwachsenen (C, 44 Jahre), während D2R in dieser Alterstufe ebenfalls in beinahe allen Sensorzellen nachweisbar sind (D). Balken = 100 µm.

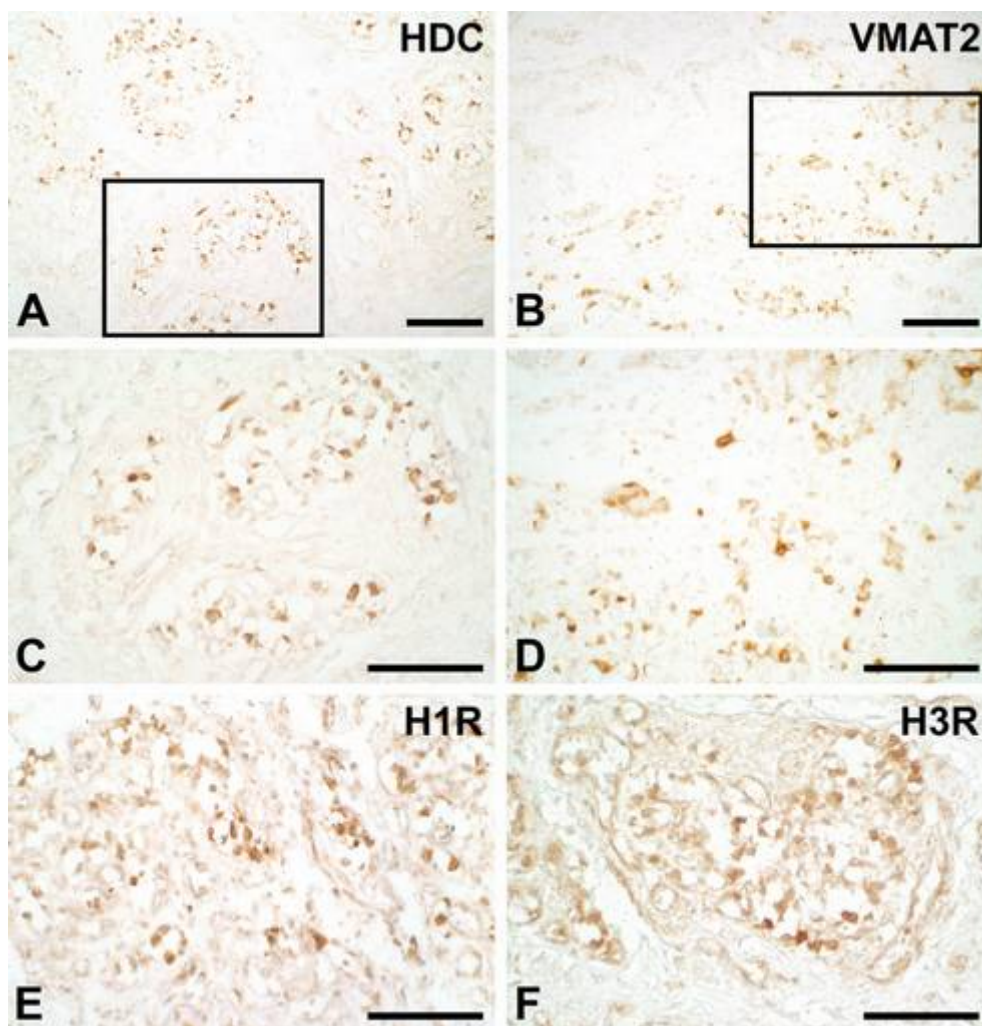
### 4.4.3 Histaminerge Charakteristika im menschlichen Glomusorgan


Um histaminerge Wege der Signaltransduktion zu identifizieren, wurden Antikörper gegen Histamin, HDC, VMAT 2 sowie die bekannten Histamin-Rezeptoren (H1R bis H4R) verwendet. Dadurch konnte eine große Anzahl immunreaktiver Zellen identifiziert werden, die organ-typisch in Zellaggregaten angeordnet waren. Die Verteilung histaminergere Zellen waren erneut für die Glomera im Kindes- und Erwachsenenalter vergleichbar: in den untersuchten Gewebeproben offenbarten sich keine auffälligen Unterschiede, lediglich in den Sensor-Zellen des 76-jährigen Probanden konnten nur wenige immunopositive Zellen gefunden werden. Auch die Größe des Organs erschien deutlich geringer.

Insgesamt zeigten sich alle Glomus-Zellen immunopositiv für HDC, das Histaminsynthetisierende Enzym, sowie für VMAT 2, ein im Vergleich zu VMAT 1 spezifischer Transporter für Histamin. Vergleichbar mit den Vorversuchen bei Nagern konnten auch die Histamin-Rezeptoren H1R sowie H3R nachgewiesen werden, während H2R und H4R negative Ergebnisse erbrachten (ohne Abbildung, Positivkontrollen siehe  Abbildungen 4.3 und 4.7). Die Resultate der Versuchsreihe zeigt  Abbildung 4.16 für kindliche Glomera sowie  Abbildung 4.17 für Glomera erwachsener Probanden. In allen Experimenten blieben die Typ II-Zellen, die die sensorischen Zellen umgeben, ungefärbt: sie zeigten weder dopaminerge noch histaminerge Merkmale.



**Abbildung 4.16:** *Immunhistochemischer Nachweis histaminerger Merkmale im juvenilen Glomusorgan des Menschen.* A und B: Übersichtsaufnahmen von Zell-Clustern des kindlichen Glomusorgans mit Immunreaktivität für HDC (A) und VMAT 2 (B). C bzw. D: Vergrößerungen der in A respektive B durch Rechtecke markierten Bildausschnitte: beinahe alle Sensorzellen eines Glomerulums exprimieren die genannten Enzyme auf Proteinebene. Ebenfalls deutliche Färbung der Zellkonglomerate für H1R und H3R (E und F). Skalierung = 100  $\mu$ m




**Abbildung 4.17: Immunhistochemischer Nachweis histaminerger Merkmale im adulten Glomusorgan des Menschen.** Die Anordnung der Abbildung entspricht derjenigen in . A und B: Übersichtsaufnahmen mit geringer Vergrößerung verdeutlichen die Präsenz von HDC (A) bzw. VMAT2 (B) auch im adulten Glomusorgan. C und D: vergrößerte Aufnahmen der in A und B durch Rechtecke markierten Bereiche. Gleiches gilt für die Histamin-Rezeptoren H1R und H3R: der überwiegende Anteil der Sensor- (Typ I-) Zellen zeigt deutliche Immunreaktivität für die Subtypen der Histamin-Rezeptoren. Skalierung = 100  $\mu\text{m}$ .



## 5 Diskussion

### 5.1 Der Neurotransmitter-„Cocktail“ des *Glomus caroticum*

#### 5.1.1 Die Vielfalt der Neurotransmitter

Als wichtigster arterieller Sauerstoffsensor stellt das *Glomus caroticum* essentielle Informationen für die Aufrechterhaltung und Regulation der Atmung zur Verfügung. Wie schon im einleitenden Abschnitt beschrieben, agieren im *Glomus caroticum* der Ratte zu diesem Zweck eine Vielzahl von Stoffen als Neurotransmitter und Neuromodulatoren (vgl. dazu auch  Tabelle 1.1 sowie [Kapitel 1.3](#)).

Unklarheit besteht bislang bei der Rolle primärer und sekundärer Transmittersysteme. Unter den bis heute identifizierten Systemen befindet sich auch *Acetylcholin* und der Co-Transmitter *ATP*: beide Stoffe werden durch die Typ I-Zellen des Glomusorgans auf das Signal Hypoxie bzw. Hyperkapnie hin freigesetzt. Diverse Subtypen muskarinerg und nikotinerg ACh-Rezeptoren konnten sowohl in afferenten Nervenendigungen als auch in den Glomuszellen selbst nachgewiesen werden, womit ACh je nach verfügbaren Rezeptorsubtypen in der Nähe der Freisetzung hyperpolarisierend *oder* depolarisierend auf die Plasmamembran der Glomuszellen einwirken kann. Unterschiede im cholinergen Stoffwechsel bestehen dabei sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch innerhalb einer Spezies, unter anderem abhängig von genetischen Determinanten (Shirahata et al., 2007). Die unterschiedliche Wirkungsweise sowie die fehlende Expression des synthetisierenden Enzyms ChAT lässt eine Rolle als primärer Transmitter wenig plausibel erscheinen. Ähnliches gilt für die cholinerg-purinerge Co-Transmission: zwar sistiert die Aktivität von Neuronen in Co-Kultur mit Sensorzellen des Glomusorgans durch die Blockade exzitatorischer nAChR bzw. P<sub>2</sub>X-Purinozeptoren, im Gegenzug bleibt jedoch eine basale chemosensorische Antwort des Glomusorgans auf hypoxische Stimuli erhalten (Zapata, 2007).

Im Falle des biogenen Amins *Serotonin* sprechen gleichfalls einige Kriterien für die Rolle als primärer Transmitter (Präsenz in Glomuszellen und Identifikation von 5-HT<sub>5a</sub> und 5-HT<sub>2a</sub>-Rezeptoren, siehe Wang et al., 2000; Zhang et al., 2003). Obwohl 5HT von Glomuszellen *in vitro* freigesetzt wird (Zhang und Nurse, 2000), konnte eine Freisetzung im Rahmen der Hypoxieantwort durch Glomuszellen *in vivo* bislang jedoch nicht gezeigt werden (Jacono et al., 2005)

Da es viele Kriterien wie z. B. die Biosynthese, Speicherung oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Freisetzung aus Vesikeln erfüllt, gilt *Dopamin* derzeit als führender Neurotransmitter in den Sensorzellen des Glomusorgans. Unterstützt wird diese These durch die Expression des Synthese-Enzyms TH (siehe Ichikawa, 2002; Iturriaga und Alcayaga, 2004; Nurse, 2005 und diese Arbeit) und funktioneller DA-Rezeptoren in Typ I-Zellen und afferenten sensorischen Neuronen. Weitere tierexperimentelle Studien in verschiedenen Spezies gehen mit diesen Beobachtungen konform (Huey et al., 2003; Tankersley, 2003). Fehlende Expression von exzitatorischen D1-Rezeptoren mit deutlicher Präsenz hyperpolarisierender und damit inhibierender D2-Rezeptoren in Typ I-Zellen und Ganglion petrosum-Neuronen legen allerdings eine inhibitorische Funktion des Amins in der Signalübertragung zu höheren Zentren nahe (vergleiche Gauda, 2002 und dortige Referenzen, sowie diese Arbeit).


### 5.1.2 Histamin in der Signaltransduktion der $\text{O}_2$ -Chemozeption

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass das biogene Amin **Histamin** im Glomusorgan nicht nur synthetisiert, gespeichert und freigesetzt wird (Koerner et al., 2004), sondern auch über die afferenten Stationen des Atmungsreflexes sowie im zentralen Rhythmusgenerator selbst eine bedeutende Rolle bei dessen Regulation und Modulation spielt. Durch geeignete Experimente konnte die Expression des Histamin-Syntheseenzym *HDC* in Neuronen des **Ggl. petrosum** nachgewiesen werden. Ebenso wurden die Histamin-Rezeptoren *H1R* und *H3R* als führende Subtypen identifiziert – nicht nur in den Sensorzellen des Glomusorgans, sondern auch in den afferenten Neuronen des Ggl. petrosum sowie im Kerngebiet des N. glossopharyngeus, dem **Ncl. tractus solitarii**, genauer in den kommissuralen Subnuklei des Kerns.

Während H1-Rezeptoren über die Aktivierung der Phospholipase-C und  $\text{IP}_3$ -Signalkaskade exzitatorische Effekte hervorrufen (Schwartz et al., 1991), gelten H3-Rezeptoren als Autorezeptoren, die über eine  $\text{G}_{i/o}$ -Protein-abhängige Inhibition der Adenylatcyclase – und damit einer Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Spiegels – wirken (Lovenberg et al., 1999; Drutel et al., 2001). Die erregenden Effekte der H1-Rezeptoren könnten somit das Membranpotential der Glomuszellen beeinflussen, die über  $\text{K}^+$ -Kanäle der TASK-Familie verfügen (Two-pore-domain Acid Sensing  $\text{K}^+$  channels, Buckler, 2007). Diese wiederum sind an der Signaltransduktion der Sauerstoff-Perzeption beteiligt.

Um die Effekte histaminergischer Pharmaka auf die Glomus-vermittelte Atmungsregulation zu prüfen, wurden am Institut für Physiologie in Göttingen selektive Histamin-Rezeptor-

Agonisten in das Glomusorgan einer Herz-Hirnstamm-Präparation der Ratte appliziert. Wie vermutet erhöhte die Applikation eines H1-Agonisten die neuronale Aktivität des N. phrenicus, wenngleich die Inspirationszeit unverändert blieb. Überraschenderweise provozierte jedoch auch die Verwendung eines H3-Agonisten eine chemoreflex-artige Antwort – trotz der oben beschriebenen inhibitorischen Signalwirkung (Arrang et al., 1985). Dies könnte sich dadurch erklären, dass sich die entsprechenden Rezeptoren auch auf den Dendriten und Perikarya chemosensorischer afferenter Neurone des Ggl. petrosum fanden. Damit kann die Signalübertragung im Glomusorgan sowohl auf prä- als auch auf postsynaptischer Ebene moduliert werden. Andererseits agieren nicht alle H3R-Isoformen über die  $G_{i/o}$ -Kaskade mit sequentieller Erniedrigung der cAMP-Konzentration (Coge et al., 2001; Drutel et al., 2001; Rouleau et al., 2004), sodass potentiell auch exzitatorische Signalwege in Frage kommen.

Durch Mikroinjektion von H1R- bzw. H3R-Antagonisten in die kommissuralen und medialen Subnuclei des NTS beeinflusste gleichfalls die Chemoreflex-Antwort und die Länge des Inspirationszyklus: so führte eine H3R-Blockade zur Erhöhung der Respirationsrate, verkürzte die Inspirationszeit und förderte damit die Reflexantwort. Gleiches gilt für die Blockade von H1-Rezeptoren, wenngleich weniger ausgeprägt. Dies legt eine Expression der H1R-Rezeptoren in funktionell unterschiedlichen Zelltypen des Ncl. tractus solitarii nahe: würden H1-Rezeptoren von inhibitorischen Interneuronen im NTS exprimiert, hätte eine Blockade der Rezeptoren eine sekundäre Disinhibition, und somit eine Aktivierung im respiratorischen Neuronennetzwerk des NTS zur Folge. Die in  Abbildung 4.6 gezeigten immunhistochemischen Daten unterstützen diese These: morphologisch imponierten die H1R-immunopositiven Neurone im Vergleich zu H3R-immunopositiven in geringerer Anzahl und mit kleineren Somata – ein typisches Kennzeichen von Interneuronen im ZNS. Die Beteiligung inhibitorischer Interneurone bei der Modulation viszero- und somatosensorischer Reflexbögen ist bekannt (siehe Boscan et al., 2002).

Die Expression von H1- und H3-Rezeptoren im Ncl. tractus solitarii als primäre Verschaltungsstation für Neurone von arteriellen Chemorezeptoren legt eine wichtige Rolle von Histamin in der Regulation der Atmungsaktivität nahe. Für eine Funktion dieses biogenen Amins in der hypoxischen Atemantwort wie auch in der Regulation der Inspirationszeit (ohne Beteiligung pulmonaler Dehnungsrezeptoren, Hering-Breuer-Reflex) sprechen mehrere Studien jüngerer Zeit (Dutschmann et al., 2003, Miyamoto et al., 2004). Dennoch entsprechen nicht alle in dieser Arbeit erhobenen Daten anderen Studienergebnissen bezüg-

lich einer histaminergen Modulation der zentralen Atmungsaktivität. So führte beispielsweise die systemische Applikation hoher Konzentrationen von H1R-Antagonisten zu einer schwerwiegenden Atemdepression, wohingegen die Verwendung entsprechender H3R-Antagonisten keine derartigen Effekte zeigte. Möglicherweise entspringen die Unterschiede der Applikationsweise – lokale Mikroinjektion in die genannten Subnuclei des NTS versus systemische Applikation –, was möglicherweise andere neuronale Population des ponto-medullären cardio-respiratorischen Netzwerks beeinflusst.

## 5.2 Signalübertragung im Glomus caroticum des Menschen

### 5.2.1 Neurotransmitter im humanen Glomusorgan

Weiterhin wurde durch diese Arbeit erstmals gezeigt, dass **menschliche Sensorzellen des Glomus caroticum** die nötigen Komponenten für Biosynthese, Speicherung und Freisetzung sowohl von *Dopamin* als auch von *Histamin* – sowie deren Rezeptoren – ausbilden. Durch immunhistochemische Studien in verschiedenen Alterstufen konnte belegt werden, dass nicht nur TH und VMAT1 von einem Teil der Typ I-Zellen im Glomusorgan exprimiert werden, sondern auch HDC und VMAT2. Die Sensorzellen sind zudem reichlich mit den Histamin-Rezeptoren H1R und H3R sowie dem Dopamin-Rezeptor D2R ausgestattet. Auffällig dabei war, dass die Anzahl dopaminergere im Vergleich zu histaminergen Zellen in allen untersuchten Altersklassen geringer ausfiel. Diese Beobachtung geht mit mehreren Studien konform: so zeigten beispielsweise Ichikawa (2002) und Iturriaga und Alcajaga (2004), dass in verschiedenen Tierspezies die große Mehrheit der Glomuszellen das Katecholamin-Syntheseenzym TH exprimieren. Beim Menschen ist dies jedoch nur in einer kleineren Subpopulation von Zellen der Fall (Kummer und Habeck, 1992).

Wie beschrieben gilt im Glomusorgan vieler Tierarten Dopamin als führender Neurotransmitter (Bairam und Carroll, 2005), dessen hoher Gehalt aber auf einer niedrigen funktionellen Expression präsynaptischer D2-Rezeptoren basiert (Bairam et al., 2000). So sinken bei Ratten (Gauda et al., 1996) und Hasen (Bairam et al., 1996) die TH-Spiegel mit zunehmender Reifung des Glomusorgans, während die Dichte von D2-Rezeptoren zunimmt. Entsprechend könnte auch die Freisetzung von DA im Rahmen der hypoxischen Signalantwort abnehmen (Gauda, 2002). Im Gegensatz dazu weisen die meisten Glomuszellen der Ratte und des Menschen histaminerge Merkmale auf (diese Arbeit) und verfügen zudem über H1- und H3-Rezeptoren. Damit zeigt sich auch im Menschen das ambivalente Modell von exzitatorischer (H1) und inhibitorischer (H3) Modulation der Atmungsregulation



durch das biogene Amin Histamin. Leider konnte die histaminerge Signalübertragung im afferenten Zweig der Reflexbahn sowie die zentralen Atmungsgeneratoren im Menschen bislang nicht untersucht werden. Dennoch sprechen die oben beschriebenen Forschungsergebnisse zur Expression von H1- und H3-Rezeptoren in afferenten Neuronen des Ggl. petrosum und auch im Ncl. tractus solitarii der Ratte für eine wichtige Rolle des Amins in der Atmungsregulation.


### 5.2.2 Ontogenetische Entwicklung

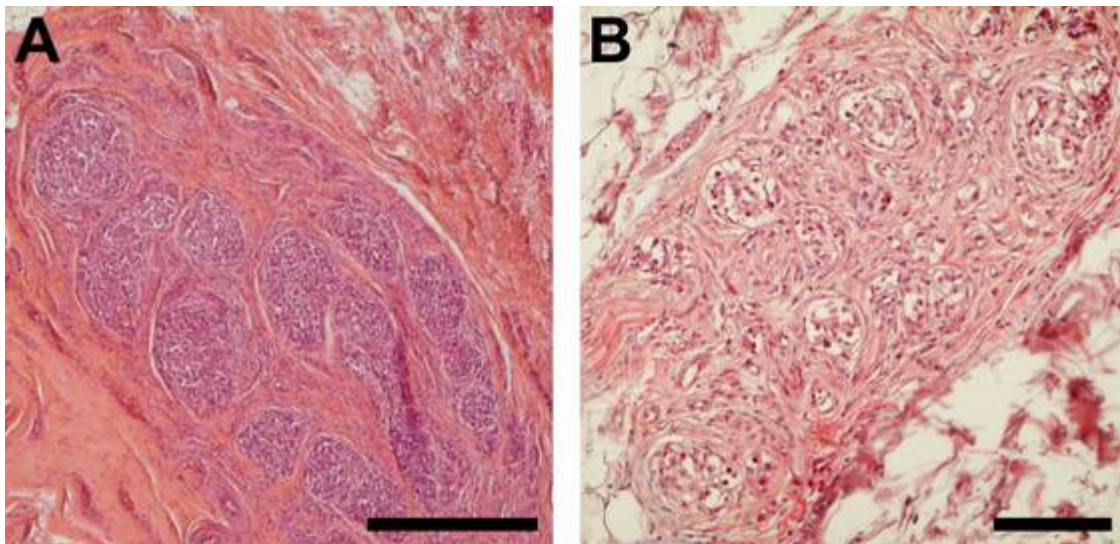
Grundsätzlich ist im gesunden Fötus bzw. Neugeborenen die Funktion peripherer arterieller Chemorezeptoren wie dem Glomus caroticum nicht ausschlaggebend für die Atmung. Auch für die Generierung und Aufrechterhaltung einer rhythmischen Respiration ist die chemozeptorische Funktion des Glomusorgans nicht zwangsweise erforderlich, wie eine Denervierungsstudie von Jansen et al. (1981) zeigte. Nichtsdestotrotz belegen mehrere Studien in verschiedenen tierischen Spezies, dass arterielle Chemozeptoren während einer kritischen Periode der früh-postnatalen Entwicklung zur Stabilität der Ventilation beitragen (Bureau et al., 1985; Hofer, 1984). Dies wiederum bedingt in gewissem Maße eine „erlernte“ Rhythmogenese, die für das ganze übrige Leben erhalten bleibt.

Dabei ist zum Zeitpunkt der Geburt auch das Glomus caroticum – wie jedes Organ eines Säugetiers – nicht vollständig ausgereift und unterliegt ausgeprägten Veränderungen im weiteren Verlauf des Lebens, vor allem in den ersten Lebensmonaten. So konnte beispielsweise bei Ratten gezeigt werden, dass die Organgröße des Glomus caroticum im ersten Lebensmonat zunimmt (Wang und Bisgard, 2005). Über einen Zeitraum von mindestens einem Monat konnte eine deutliche Zellproliferation bei den Typ I- (Sensor-) Zellen beobachtet werden. Beachtlich ist, dass die Proliferationsrate vom O<sub>2</sub>-Partialdruck der Atemluft beeinflusst wurde: während eine hypoxische Umgebung für deutliches Organwachstum sorgte, nahm die Proliferation unter Hyperoxie ab – was für die restliche Lebenszeit in kleineren Glomera resultierte. Zusätzlich konnten in Typ I-Zellen die neurotrophen Faktoren BDNF und GDNF (*Brain bzw. Glial Derived Neurotrophic Factor*) gefunden werden, die weitere funktionelle Änderungen induzieren könnten (siehe dazu auch Erickson et al., 2001).

Allerdings beziehen sich die Veränderungen nicht nur auf die lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Morphologie des Glomusorgans, sondern auch auf die neurochemische Zusammensetzung der Sensorzellen (Gauda et al., 2007). So ist beispielsweise die postnatale Zunahme dopaminerger Merkmale (TH, GTP-CH und D2-Rezeptoren) und deren Plastizität bis zum Erwachsenenalter ein wohlbekanntes Phänomen (Donnely, 2000; Hui et al., 2003). Entsprechend nimmt auch der Dopamin-Gehalt im Vergleich zu anderen Neurotransmitter-Systemen im Glomusorgan zu, ebenso wie dessen Rezeptoren.

Dennoch scheinen nicht ausschließlich morphologische und neurochemische Änderungen in den Transmittersystemen für die funktionellen Veränderungen verantwortlich zu sein. Anhand einer Testreihe mit jungen (Alter Ø 24 a) und älteren Frauen (Alter Ø 71 a) konnten Pokorski et al. (2004) zeigen, dass sich die hypoxische Atemantwort in beiden Altersgruppen nur marginal unterscheiden.

Im Gegensatz dazu zeigten sich deutliche degenerative Veränderungen in der Ultrastruktur der Glomera carotica. Diese Beobachtung stützt auch die in dieser Arbeit vorgestellten altersabhängigen Änderungen in der Glomus-Morphologie. Folgende  Abbildung 5.1 verdeutlicht die Altersunterschiede in der lichtmikroskopischen Beschaffenheit des menschlichen Glomusorgans (unterschiedliche Vergrößerung):



**Abbildung 5.1: Morphologischer Vergleich des juvenilen und senilen Glomus caroticum des Menschen.** (A): juveniles Glomusorgan (vier Monate) in HE-Färbung mit deutlich durch Bindegewebssepten differenzierbaren kompakten Glomerula. *Skalierung = 125 µm.*

(B): seniles Glomusorgan (76 a) in HE-Färbung. Das insgesamt kleinere Organ ist im Vergleich deutlich stärker vaskularisiert, Bindegewebsfasern unterteilen die Glomerula in kleinere Gruppen. *Skalierung = 50 µm.*

Darüber hinaus unterliegt auch der Gehalt an Chemorezeptoren im zentralen Nervensystem deutlichen Veränderungen im Zusammenhang mit verschiedensten Atmungs- und Atemwegserkrankungen (Neubauer und Sunderram, 2004). Schließlich werden pathologische Veränderungen der Chemosensitivität des Glomusorgans während der postnatalen Entwicklung als ein Hauptgrund des plötzlichen Kindstods (SIDS, Sudden Infant Death Syndrome) diskutiert (Gauda et al., 2007).

### 5.3 Medizinisches Interesse

Aufbauend auf den beschriebenen Forschungsergebnissen könnte die vorliegende Arbeit auch bei der Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen der Chemosensibilität von Interesse sein. Wie beispielsweise Neubauer und Sunderram (2004) in einem Review beschreiben, sind zentrale und periphere O<sub>2</sub>-Sensoren an wichtigen Adaptionsvorgängen in Antwort auf chronische oder intermittierende Hypoxie beteiligt. Dies gilt sowohl für physiologische Vorgänge wie die Höhenadaptation, als auch bei pathologischen Kondition, etwa chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, Schlafapnoe-Syndrom oder Herzfehlern. Schultz und Li (2007) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der Chemoreflex des Glomus caroticum bei Patienten mit chronischen Herzfehlern gesteigert ist und auch zur tonischen Erhöhung der sympathischen Nervenaktivität beiträgt. Inwieweit eine histaminerge Signalübertragung bzw. eine Veränderung derselben an solchen Mechanismen beteiligt ist, ist zum jetzigen Stand der Forschung indes nicht abzusehen, könnte jedoch eine Basis für neue oder alternative therapeutische Strategien bei der Behandlung von Atmungsstörung zur Verfügung stellen.

#### 5.3.1 Interaktionsort für Pharmakawirkungen und -nebenwirkungen

Durch die Vielzahl identifizierter Neurotransmitter und -modulatoren sowie der im Übertragungsprozess involvierten Ionenkanäle (z. B. TASK-ähnliche K<sup>+</sup>- oder spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle) bietet das Glomus caroticum eine Fülle möglicher **Interaktionsorte bei der Anwendung pharmakologischer Substanzen**. Vor allem im Bereich der Anästhesiologie, wo eine Vielzahl neurologisch und atmungsdepressiv wirksamer Pharmaka Verwendung findet, spielt die Physiologie des Glomusorgans eine bedeutende Rolle. So wurde die reflektorische Antwort des Glomus caroticums durch die Anwendung gebräuchlicher volatiler Anästhetika um 24% gesenkt (Pandit und O’Gallagher, 2008). Die drei untersuchten Agenzien – *Halothan*, *Enfluran* und *Isofluran* – unterschieden sich dabei nicht in ihrer

Wirkung. Auch die üblicherweise bei Intubationsnarkosen verwendeten Muskelrelexanzien, die vorrangig über die Blockade nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren der motorischen Endplatte wirken, bleiben nicht ohne Effekt auf Chemozeption bzw. Signalübertragung des Glomus caroticum: Jonsson et al. (2004) untersuchten an isolierten Präparationen des Glomusorgans sowie des N. sinus carotici bei Kaninchen die Wirkung der gebräuchlichen Muskelrelexanzien *Atracurium* und *Vecuronium* als Antagonisten an nikotinergeren AChR der Sensorzellen. Dabei konnte eine signifikante dosis-abhängige Verringerung der Nikotin-induzierten Chemorezeptor-Antwort festgestellt werden. Ähnliches berichten Igarashi et al. (2002) für Präparationen des Glomusorgans und des zugehörigen Nervs bei Wistar Ratten: die Ergebnisse machten ebenfalls deutlich, dass Vecuronium durch Inhibition neuraler nAChR im Glomusorgan dessen Antwort auf Hypoxie, Nikotin und ACh signifikant mindert. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die bekannten Nebenwirkungen des Vecuronium – Bronchospasmen, Blutdruckanstieg und Tachykardie – unter anderem auf die Freisetzung von Histamin zurückzuführen sind.

Darüber hinaus gibt der in dieser Arbeit vorgestellte histaminerge Übertragungsweg im Glomusorgan Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen weit verbreiteter Antihistaminika, die beispielsweise als Sedativa, Antiemetika oder Medikamente zur Behandlung von Kinetosen (Seekrankheit) Verwendung finden. Auch eine große Anzahl von Neuroleptika besitzen teils ausgeprägte antihistaminerge Wirkung an H1-Rezeptoren. Einige Nebenwirkungen solcher Medikamente ließen sich z. B. durch das Vorhandensein dieser Rezeptoren im System der arteriellen Chemozeptoren (Glomera carotica und Glomera aortica) erklären.

Derzeit intensiv beforscht werden auch die Möglichkeiten serotonerger Modulation der Atmungsfunktion im Hinblick auf respiratorische Störungen (Richter et al., 2003; Richerson, 2004).

### 5.3.2 Mögliche Rolle bei SIDS

Unter dem **Syndrom des Plötzlichen Kindstods** (SIDS, Sudden Infant Death Syndrome) wird gemeinhin der unvorhersehbare Tod eines mehr als ein Monat alten Säuglings verstanden. Aus epidemiologischer Sicht zählt das SIDS zu einer der häufigsten Todesursachen bei Säuglingen / Kleinkindern im Alter zwischen einem Monat und einem Jahr. Auffälligerweise stieg die Rate an SIDS-Patienten in den Jahren 1988 bis 2003 von 12 auf 34% an (Gauda et al., 2007). Als Risikofaktoren gelten neben perinataler Asphyxie und bron-

chopulmonaler Dysplasie bei Frühgeborenen auch andere Ursachen, etwa eine Bauchlage des Kindes oder ein Nikotinabusus der Eltern. Genaue Ursachen sind unbekannt, jedoch wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Eine primäre Störung im ZNS mit Dysregulation der Atemfunktion wird diskutiert.

Gleichfalls stehen pathologische Veränderung des Glomusorgans zur Debatte, weshalb detaillierte Kenntnisse zur Physiologie und Pathophysiologie auch unter diesem Gesichtspunkt von Interesse scheinen. Neugeborene reagieren im Schlaf besonders vulnerabel auf hypoxische bzw. hyperkapnische Episoden. Gerade bei Frühgeborenen werden pathologische Veränderungen in peripheren Chemorezeptoren als Risikofaktor für eine höhere Inzidenz des Plötzlichen Kindstods angesehen (Gauda et al., 2007). So können sowohl hypoxische als auch hyperoxische Gegebenheiten während der frühen postnatalen Entwicklung zu einer veränderten Sensibilität peripherer Chemorezeptoren im späteren Leben führen. Hypo- oder hypersensible Chemozeptoren könnten dann im Zusammenhang mit weiteren Risikofaktoren zu SIDS prädisponieren. Tatsächlich beschreiben bereits ältere Studien bei SIDS-Fällen abnorme Veränderungen in der Morphologie des Glomusorgans, etwa Größenunterschiede oder Zellabnormitäten (Cole et al., 1979; Heath et al., 1990). Auch Auffälligkeiten im Transmittergehalt bzw. deren Zusammensetzung wurden beschrieben: so fanden sich in Glomera von an SIDS verstorbenen Neugeborenen / Kleinkindern mehrfach erhöhte Konzentrationen der Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin im Vergleich zu einer alterskorrelierten Kontrollgruppe (zwei Studien von Perrin et al., 1984). Entsprechend sei an dieser Stelle nochmals an die Veränderungen dopaminerge Merkmale der Sensorzellen des Glomus caroticum im Laufe der postnatalen Entwicklung erinnert (siehe [Kapitel 5.2](#)).

Aus diesem Grunde ist es ersichtlich, dass eine weiterführende und detaillierte Untersuchung der Entwicklung des Glomusorgans erforderlich ist. Genaue Kenntnisse der Physiologie und Pharmakologie – sowie der Histamin-Rezeptoren – im afferenten Zweig des Reflexbogens sowie im neuronalen Respirationsnetzwerk des ZNS könnten zur weiteren Aufklärung des SIDS beitragen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle des biogenen Amins Histamin in der hypoxischen Signaltransduktion des Glomus caroticum der Ratte spezifiziert. Dafür wurde die Verteilung des synthetisierenden Enzyms HDC und spezifischer Histamin-Rezeptoren im Glomusorgan selbst sowie in Neuronen des Ggl. petrosum und des Ncl. tractus solitarii bestimmt. Mittels RT-PCR-Methoden, Tracing-Techniken und immunohistochemischen Versuchen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene konnten die Histamin-Rezeptoren H1R und H3R als führende Subtypen der vier bis dato bekannten Vertreter identifiziert werden. Diese finden sich als Autorezeptoren in den Sensor-(Typ I)-Zellen des Glomusorgans sowie in den chemosensorischen afferenten Neuronen im kaudalen Anteil des Ggl. petrosum und in Neuronen des zentralen Respirationsnetzwerks. Zudem konnte durch physiologische Experimente an einer Herz-Hirnstamm-Präparation die Beteiligung der Histamin-Rezeptoren an der O<sub>2</sub>-Perzeption und auch der histaminergen Signalübertragung gezeigt werden. Mikroinjektionen von H1- und H3-Rezeptor-Antagonisten in den NTS legen darüber hinaus eine wichtige neuromodulatorische Funktion histaminergere Signalwege in der zentralen Verarbeitung und Regulierung chemozeptorischer Afferenzen nahe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion von Histamin bei der hypoxischen Signalantwort des Glomusorgans des Menschen untersucht. Dafür wurde an menschlichem Glomusgewebe die Expression spezifischer Marker des Histamin-Metabolismus (Synthese, Transport und Rezeptoren) analysiert und mit dopaminergen Merkmalen verglichen. So konnten das Histamin-Syntheseenzym HDC, das Transportprotein VMAT 2 sowie die Rezeptorsubtypen H1R und H3R in den Sensor-(Typ I)-Zellen identifiziert werden. Der Dopamin-D2-Rezeptor fand sich darüber hinaus auch in Nervenfasern des Glomusorgans. Im Gegensatz dazu werden das Dopamin-Syntheseenzym TH und der zugehörige Transporter VMAT1 nur in einer kleineren Untergruppe der Sensorzellen exprimiert. Altersvergleiche erbrachten zudem, dass das Glomusorgan in höheren Lebensaltern zunehmend durch Fibrosierung und zellulären Untergang degeneriert. Die Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl Dopamin als auch Histamin (in unterschiedlichem Ausmaß) an der Regulation cardio-respiratorischer Funktionen eine wichtige Rolle spielen.

In Zusammenschau der präsentierten Fakten scheint Dopamin im Menschen als inhibitorischer präsynaptischer Transmitter über D2-Rezeptoren zu wirken, die in einer Subpopulation TH-positiver Sensorzellen exprimiert werden. Darüber hinaus unterliegen die meisten Sensorzellen einer inhibitorischen Kontrolle durch H3-Autorezeptoren sowie sympathischen Signalen des Ggl. cervicale superior des Sympathicus-Grenzstrangs. Eine exzitatorische Komponente erfolgt aufgrund der Präsenz erregender H1-Rezeptoren, sodass dem biogenen Amin eine wichtige Rolle als Neurotransmitter im afferenten Zweig des chemosensorischen Reflexbogens zugesprochen werden kann. Welche Funktion Histamin in der respiratorischen Kontrolle des Menschen im Detail spielt, bleibt eine Frage zukünftiger Forschung.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALMARAZ L., PÉREZ-GARCÍA M.T., GÓMEZ-NINO A. AND GONZÁLEZ C. (1997) Mechanisms of alpha2-adrenoceptor-mediated inhibition in rabbit carotid body. *Am J Physiol*;72(2 Pt 1):C628-637.
- ARRANG, J.M., GARBARG M. AND SCHWARTZ, J.C. (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*,302:832–837.
- ARRANG, J.M., GARBARG, M. AND SCHWARTZ, J.C. (1985) Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience*,15: 553–562.
- BAIRAM A., DAUPHIN C., ROUSSEAU F. AND KHANDJIAN E.W. (1996) Dopamine D2 receptor mRNA isoforms expression in the carotid body and petrosal ganglion of developing rabbits. *Adv Exp Med Biol*;410:285-289.
- BAIRAM A., NÉJI H., DE-GRANDPRÉ P. AND CARROLL J.L. (2000) Autoreceptor mechanism regulating carotid body dopamine release from adult and 10-day-old rabbits. *Respir Physiol*;120(1):27-34.
- BAIRAM A. AND CARROLL J.L. (2005) Neurotransmitters in carotid body development. *Respir Physiol Neurobiol*;149(1-3):217-232.
- BOSCAN P. AND PATON J.F. (2002) Nociceptive afferents selectively modulate the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex via actions within the solitary tract nucleus. *Neuroscience*,110:319–328.
- BOSCAN P., PICKERING A.E. AND PATON J.F. (2002) The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents. *Exp Physiol*,87:259–266.
- BUCKLER K.J. (2007) TASK-like potassium channels and oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*;157(1):55-64.
- BUREAU M.A., LAMARCHE J., FOULON P. AND DALLE D. (1985) Postnatal maturation of respiration in intact and carotid body-chemodenervated lambs. *J Appl Physiol*;59:869-874.
- BUTTIGIEG J. AND NURSE C.A. (2004) Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem Biophys Res Commun*;322(1):82-87.
- CARUANA-MONTALDO B., GLEESON K. AND ZWILLICH C.W. (2000) The control of breathing in clinical practice. *Chest*;117(1):205-225.
- COGE F., GUENIN S.P., AUDINOT V., RENOARD-TRY A., BEAUVERGER P., MACIA C., OUVRY C., NAGEL N., RIQUE H., BOUTIN J.A. AND GALIZZI, J.P. (2001) Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. *Biochem J*, 355:279–288.
- COLE S., LINDENBERG L.B., GALIOTO F.M. JR, HOWE P.E., DEGRAFF A.C. JR, DAVIS J.M., LUBKA R. AND GROSS E.M. (1979) Ultrastructural abnormalities of the carotid body in sudden infant death syndrome. *Pediatrics*;63(1):13-17.
- DONNELLY D.F. (2000) Developmental aspects of oxygen sensing by the carotid body. *J App. Physiol*;88:2296–2301.



- DRUTEL G., PEITSARO N., KARLSTEDT K., WIELAND K., SMIT M.J., TIMMERMAN H., PANULA P. AND LEURS R.** (2001) Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol. Pharmacol*;59:1–8.
- DUTSCHMANN M., BISCHOFF A.M., BUSSELBERG D. AND RICHTER, D.W.** (2003) Histaminergic modulation of the intact respiratory network of adult mice. *Pflugers Arch*;445:570–576.
- ERICKSON J.D., EIDEN L.E., SCHAFFER M.K. AND WEIHE E.** (1995) Reserpine- and tetrabenazine-sensitive transport of (3)H-histamine by the neuronal isoform of the vesicular monoamine transporter. *J Mol Neurosci*;6:277–287.
- ERICKSON J.T., BROSENITSCH T.A. AND KATZ D.M.** (2001) Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci*;21(2):581-589.
- FELDMAN J.L., MITCHELL G.S. AND NATTIE E.E.** (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci*;26:239–266.
- FITZGERALD R.S., SHIRAHATA M. AND IDE T.** (1997) Further cholinergic aspects of carotid body chemotransduction of hypoxia in cats. *J Appl Physiol*;82(3):819-827.
- GAUDA E.B. AND GERFEN C.R.** (1996) Expression and localization of enkephalin, substance P, and substance P receptor genes in the rat carotid body. *Adv Exp Med Biol*;410:313-318.
- GAUDA EB, BAMFORD O AND GERFEN C.R.** (1996) Developmental expression of tyrosine hydroxylase, D2-dopamine receptor and substance P genes in the carotid body of the rat. *Neuroscience*;75(3):969-77.
- GAUDA E.B. AND LAWSON E.E.** (2000) Developmental influences on carotid body responses to hypoxia. *Respir Physiol*;121(2-3):199-208.
- GAUDA E.B.** (2002) Gene expression in peripheral arterial chemoreceptors. *Microsc Res Tech*;59:153–167.
- GAUDA E.B., COOPER R., JOHNSON S.M., MCLEMORE G.L. AND MARSHALL C.** (2004) Autonomic microganglion cells: a source of acetylcholine in the rat carotid body. *J Appl Physiol*;96(1):384-391.
- GAUDA E.B., CRISTOFALO E. AND NUNEZ J.** (2007) Peripheral arterial chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol*;157(1):162-170.
- GONZALEZ C., ALMARAZ L., OBESO A. AND RIGUAL R.** (1994) Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*;74(4):829-898.
- GREENE L. A. AND TISCHLER A. S.** (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*;73:2424–2428.
- GRYNKIEWICZ G., POENIE M. AND TSIEN R.Y.** (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*;260:3440-3450.
- HEATH D., KHAN Q. AND SMITH P.** (1990) Histopathology of the carotid bodies in neonates and infants. *Histopathology*;17(6):511-9.

- HOFER M.A.** (1984) Lethal respiratory disturbance in neonatal rats after arterial chemoreceptor denervation. *Life Sci*;34:489-496.
- HOUGH L.B.** (2001) Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol*;59:415–419.
- HUEY K.A., SZEWCZAK J.M. AND POWELL F.L.** (2003) Dopaminergic mechanisms of neural plasticity in respiratory control: transgenic approaches. *Respir Physiol Neurobiol*;135:133–144.
- HUI A.S., STRIET J.B., GUDELSKY G., SOUKHOVA G.K., GOZAL E., BEITNER-JOHNSON D., GUO S.Z., SACHLEBEN L.R. JR, HAYCOCK J.W., GOZAL D. AND CZYZYK-KRZESKA M.F.** (2003) Regulation of catecholamines by sustained and intermittent hypoxia in neuroendocrine cells and sympathetic neurons. *Hypertension*;42:1130–1136.
- ICHIKAWA H.** (2002) Innervation of the carotid body: Immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc Res Tech*;59:188–195.
- IGARASHI A., AMAGASA S., HORIKAWA H. AND SHIRAHATA M.** (2002) Vecuronium directly inhibits hypoxic neurotransmission of the rat carotid body. *Anesth Analg*;94(1):117-22.
- ISHIDA H., HIGASHIJIMA N., HIROTA Y., GENKA C., NAKAZAWA H., NAKAYA H. AND SATO T.** (2004) Nicorandil attenuates the mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload with accompanying depolarization of the mitochondrial membrane in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;369(2):192-7.
- ISHIGURO T., IWASE M., KANAMARU M., IZUMIZAKI M., OHSHIMA Y. AND HOMMA I.** (2006) Contribution of histamine type-1 receptor to metabolic and behavioral control of ventilation. *J Physiol Sci*;56(4):287-295.
- ITURRIAGA R. AND ALCAYAGA J.** (2004) Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Rev*;47:46–53.
- IWASE M., IZUMIZAKI M., MIYAMOTO K., ISHIGURO T., KANAMARU M. AND HOMMA I.** (2007) Lack of histamine type-1 receptors impairs the thermal response of respiration during hypoxia in mice (*Mus musculus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*;146(2):242-251.
- JACONO F.J., PENG Y.J., KUMAR G.K. AND PRABHAKAR N.R.** (2005) Modulation of the hypoxic sensory response of the carotid body by 5-hydroxytryptamine: role of the 5-HT<sub>2</sub> receptor. *Respir Physiol Neurobiol*;145:135–142.
- JANSEN A.H., IOFFE S., RUSSELL B.J. AND CHERNICK V.** (1981) Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth. *J Appl Physiol*;51: 630-633.
- JONES J.F.X.** (2003) Retrospective view of the carotid body research of Ronan G. O'Regan. *Exp Physiol*;89(1):39-43.
- JONSSON M., WYON N., LINDAHL S.G., FREDHOLM B.B. AND ERIKSSON LI.** (2004) Neuromuscular blocking agents block carotid body neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*;497(2):173-180.
- KOERNER P., HESSLINGER C., SCHAEFERMEYER A., PRINZ C. AND GRATZL M.** (2004) Evidence for histamine as a transmitter in rat carotid body sensor cells. *J Neurochem*;91:493–500.
- KUMMER W. AND HABECK J.O.** (1992) Chemoreceptor A-fibres in the human carotid body contain tyrosine hydroxylase and neurofilament immunoreactivity. *Neuroscience*;47(3):713-725.

- LAHIRI S. AND FORSTER R.E. 2ND.** (2003) CO<sub>2</sub>/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol*;35(10):1413-1435
- LAHIRI S., ANTOSIEWICZ J. AND POKORSKI M.** (2007) A common oxygen sensor regulates the sensory discharge and glomus cell HIF-1 $\alpha$  in the rat carotid body. *J Physiol Pharmacol*;58 Suppl 5(Pt 1):327-333.
- LAZAROV N.E., REINDL S. AND GRATZL M.** (2009) Neurotransmitters and their receptors in the rat superior cervical ganglion. *J Biomed Clin Res*: 2(1):19-25
- LAZAROV N.E. AND GRATZL M.** (2006) Selective expression of histamine receptors in rat mesencephalic trigeminal neurons. *Neurosci. Lett*;404:67–71.
- LOPEZ-BARNEO J., PARDAL, R. AND ORTEGA-SAENZ, P.** (2001) Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol*;63:259–287.
- LOPEZ-BARNEO J.** (2003) Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol*;13(4): 493-499.
- LOVENBERG T.W., ROLAND B.L., WILSON S.J., JIANG X., PYATI J., HUVAR A., JACKSON M.R. AND ERLANDER M.G.** (1999) Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol. Pharmacol*;55:1101–1107.
- MERICKEL A. AND EDWARDS R.H.** (1995) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology*;34:1543–1547.
- MIYAMOTO K., IWASE M., KIMURA H. AND HOMMA I.** (2004) Central histamine contributes to the inspiratory off-switch mechanism via H1 receptors in mice. *Respir Physiol Neurobiol*;144, 25–33.
- NEUBAUER J.A. AND SUNDERRAM J.** (2004) Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol*;96:367–374.
- NESS T.J. AND GEBHART G.F.** (1990) Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*;41(2):167-234
- NGUYEN T., SHAPIRO D.A., GEORGE S.R., SETOLA V., LEE D.K., CHENG R., RAUSER L., LEE S.P., LYNCH K.R., ROTH B.L. AND O'DOWD B.F.** (2001) Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol*;59(3):427-433.
- NURSE C.A. AND ZHANG M.** (1999) Acetylcholine contributes to hypoxic chemotransmission in co-cultures of rat type 1 cells and petrosal neurons. *Respir Physiol*;115(2):189-199.
- NURSE C.A.** (2005) Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton Neurosci*;120:1–9.
- O'REGAN R.G.** (1981) Responses of carotid body chemosensory activity and blood flow to stimulation of sympathetic nerves in the cat. *J Physiol*;315:81-98.
- OBERLANDER T.F., GILBERT C.A., CHAMBERS C.T., O'DONNELL M.E. AND CRAIG K.D.** (1999) Biobehavioral responses to acute pain in adolescents with a significant neurologic impairment. *Clin J Pain*;15(3):201-209.
- PANDIT J.J. AND O'GALLAGHER K.** (2008) Effects of volatile anesthetics on carotid body response to hypoxia in animals. *Adv Exp Med Biol*;605:46-50.

- PARDAL R., LUDEWIG U., GARCIA-HIRSCHFELD J. AND LOPEZ-BARNEO J.** (2000) Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proc Natl Acad Sci*;97(5):2361-2366.
- PARDAL R. AND LOPEZ-BARNEO J.** (2002) Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci*;5(3):197-208.
- PARDAL R., ORTEGA-SÁENZ P., DURÁN R. AND LÓPEZ-BARNEO J.** (2007) Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):364-77.
- PATON J.F.** (1996) The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J Physiol (Lond)*;493, 819–831.
- PAULDING W.R., SCHNELL P.O., BAUER A.L., STRIET J.B., NASH J.A., KUZNETSOVA A.V. AND CZYZYK-KRZESKA M.F.** (2002) Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells. *Microsc Res Tech*;59(3):178-187.
- PAXINOS G. AND WATSON C.** (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press, Sydney*
- PERRIN D.G., CUTZ E., BECKER L.E. AND BRYAN A.C.** (1984) Ultrastructure of carotid bodies in sudden infant death syndrome. *Pediatrics*;73(5):646-651.
- PERRIN D.G., CUTZ E., BECKER L.E., BRYAN A.C., MADAPALLIMATUM A. AND SOLE M.J.** (1984) Sudden infant death syndrome: increased carotid-body dopamine and noradrenaline content. *Lancet*;2(8402):535-537.
- POKORSKI M., WALSKI M., DYMECKA A. AND MARCZAK M.** (2004) The aging carotid body. *J Physiol Pharmacol;Suppl 3*:107-113.
- PRASAD M., FEARON I.M., ZHANG M., LAING M., VOLLMER C. AND NURSE C.A.** (2001) Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *J Physiol*;537(Pt 3):667-677.
- PRINZ C., ZANNER R. AND GRATZL M.** (2003) Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annu Rev Physiol*;65:371-382.
- RICHERSON G.B.** (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci*;5:449–461.
- RICHTER, D.W., MANZKE, T., WILKEN, B. AND PONIMASKIN, E.** (2003), Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med*;9:542–548.
- ROULEAU A., HERON A., COCHOIS V., PILLOT C., SCHWARTZ J.C. AND ARRANG J.M.** (2004) Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. *J Neurochem*,90:1331–1338.
- RUIZ-PESINI P., TOMÉ E., BALAGUER L., ROMANO J. AND YLLERA M.** (1995) The localization of neurons innervating the carotid sinus in the dog. *J Auton Nerv Syst*;50(3):291-297.
- SAPRU H.N.** (1996) Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol*;410:357–364.

- SATODA T., TAKAHASHI O., UCHIDA T. AND MIZUNO N.** (1995) An anterograde-retrograde labeling study of the carotid sinus nerve of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Neurosci Res*;22(4):381-387.
- SCHULTZ H.D. AND LI Y.L.** (2007) Carotid body function in heart failure. *Respir Physiol Neurobiol*;157(1):171-185.
- SCHÜTZ B., WEIHE E., EIDEN L.E.** (2001) Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience*;104(3):633-642.
- SCHWARTZ J.C., ARRANG J.M., GARBARG M., POLLARD H. AND RUAT M.** (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev*;71:1-51.
- SHIRAHATA M., BALBIR A., OTSUBO T. AND FITZGERALD R.S.** (2007) Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*;157(1):93-105.
- SONG G. AND POON C.S.** (2004) Functional and structural models of pontine modulation of mechanoreceptor and chemoreceptor reflexes. *Respir Physiol Neurobiol*;143:281-292.
- TANKERSLEY C.G.** (2003) Genetic aspects of breathing: on interactions between hypercapnia and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*;135:167-178.
- TRAVIS E.R. AND WIGHTMAN R.M.** (1998) Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*;27:77-103.
- VERNA A.** (1979) Ultrastructure of the carotid body in the mammals. *Int Rev Cytol*;60:271-330.
- WANG Z.Y., KEITH I.M., BECKMAN M.J., BROWNFIELD M.S., VIDRUK E.H. AND BISGARD G.E.** (2000) 5-HT<sub>5a</sub> receptors in the carotid body chemoreception pathway of rat. *Neurosci Lett*;278:9-12.
- WANG Z.Y. AND BISGARD G.E.** (2005) Postnatal growth of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*;149(1-3):181-190.
- XU J., TSE F.W. AND TSE A.** (2003) ATP triggers intracellular Ca<sup>2+</sup> release in type II cells of the rat carotid body. *J Physiol*;549(Pt 3):739-747.
- XU J., XU F., TSE F.W. AND TSE A.** (2005) ATP inhibits the hypoxia response in type I cells of rat carotid bodies. *J Neurochem*;92(6):1419-1430.
- ZAPATA P.** (2007) Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors? *Respir Physiol Neurobiol*;157(1):106-115.
- ZHANG M. AND NURSE C.A.** (2000) Does endogenous 5-HT mediate spontaneous rhythmic activity in chemoreceptor clusters of rat carotid body? *Brain Res*;872:199-203.
- ZHANG M., ZHONG H., VOLLMER C., AND NURSE C.A.** (2000) Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *J Physiol*;525 Pt 1:143-158.
- ZHANG M., FEARON I.M., ZHONG H. AND NURSE C.A.** (2003) Presynaptic modulation of rat arterial chemoreceptor function by 5-HT: role of K<sup>+</sup> channel inhibition via protein kinase C. *J Physiol (Lond)*;551:825-842.

## 8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN	geb. am	11.04.1981 in Dachau
	Staatsangehörigkeit	deutsch
	Familienstand	ledig
	Eltern	Herr Hans-Jürgen Reindl (grad. Betriebswirt) Frau Monika Reindl (Einzelhandelskauffrau)
AUSBILDUNG	1987-1990	Grundschule Maria Ward, Augsburg
	1990-2000	Hum. Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg
	06/2000	Allgemeine Hochschulreife (Abitur) Note 2,0
	10/2001-11/2008	Studium der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München
	09/2003	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
	11/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note „gut“
ERSATZDIENST	07/2000-05/2001	Evang. Diakonissenanstalt, Augsburg Innere Medizin
FAMULATUREN	09/2004	Praxis Dr. med. Hans R. Slawik Innere Medizin, Hämatologie und Onkologie
	03/2005	Klinikum Augsburg, Lehrkrankenhaus der LMU Innere Medizin, Kardiologie
	03/2006	Kreiskrankenhaus Erding Anästhesie und operative Intensivmedizin
	08/2006	Krankenhaus Friedberg Viszeralchirurgie und chirurgische Ambulanz
	06/2007	Universitätsklinikum Freising Viszeralchirurgie und chirurgische Ambulanz

PRAKTISCHES JAHR	08-12/2007	Klinik Adelheid, Zentrum für Rehabilitation und Nachbehandlung Unterägeri / Zug, Schweiz
	Innere Medizin	
	12/2007-03/2008	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Bereich Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie Klinikum Augsburg Akad. Lehrkrankenhaus der LMU München
	03-07/2008	Neurologische Klinik und klin. Neurophysiologie Klinikum Augsburg Akad. Lehrkrankenhaus der LMU München
	Neurologie	
STIPENDIUM	02/2004-02/2007	Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“
DISSERTATION	ab 02/2004	Dissertation zur „Analyse von Sauerstoff-Sensorzellen im Glomus caroticum“ Anatomisches Institut der LMU München Betreuer: Prof. Dr. med. Manfred Gratzl
FORSCHUNGS-AUFENTHALTE IM AUSLAND	03/2004	Institutio de Farmacologia Universidad de La Laguna, Teneriffa, Spanien
	09/2005	Institutio de Investigaciones Biomedicas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spanien
BERUFLICHER WERDEGANG	03.12.2009	Approbation zum Arzt
	01.01.2009 bis	Assistenzarzt Klinikum Augsburg Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie Chefarzt Prof. Dr. Dr.h.c. Michael Beyer
	aktuell	

## 9 Eigene Veröffentlichungen

### **Originalarbeiten:**

---

LAZAROV N., ROZLOZNIK M., REINDL S., REY-ARES V., DUTSCHMANN M. AND GRATZL M.  
Expression of histamine receptors and effect of histamine in the rat carotid body chemoafferent pathway.  
Eur J Neurosci. 2006 Dec; 24(12):3431-44.

LAZAROV N., REINDL S., FISCHER F. AND GRATZL M.  
Histaminergic and dopaminergic traits in the human carotid body.  
Respir Physiol Neurobiol. 2009 Feb;165(2-3):131-6

LAZAROV N., REINDL S. AND GRATZL M.  
Neurotransmitters and their receptors in the rat superior cervical ganglion.  
J Biomed Clin Res. 2009 Jul;2(1):19-25

### **Kongressbeiträge**

---

LAZAROV N., REINDL S., REY-ARES V. AND GRATZL M.  
Evidence for a histaminergic signal transduction in rat carotid body neural pathways.  
10th Anniversary Scientific Conference, Thrakia University, Stara Zagora, Bulgaria,  
29.09.2005

LAZAROV N., ROZLOZNIK M., REINDL S., REY-ARES V., DUTSCHMANN M. AND GRATZL M.  
Expression of histamine receptors and effect of histamine in the rat carotid body chemoafferent pathway  
Joint Meeting of The German Society of Physiology 2006, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany, 27-29.03.2006 sowie  
Annual Meeting 2006, Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., Deutsches Herzzentrum München, München, Germany, 12-14.10.2006



## **10 Danksagung**

Allen voran danke ich meinen Eltern, ohne deren Liebe, Unterstützung und Geduld all dies nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Manfred Gratzl gilt mein aufrichtigster Dank für die Überlassung des Themas und die jederzeit hervorragende und intensive Betreuung. Dank zahlreicher Ideen und anregender Diskussionen hat diese Arbeit mein Leben mehr als bereichert. In gleichem Maße richte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Nikolai Lazarov, der maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug und mich in jeglicher Hinsicht freundschaftlich unterstützte.

Für die engagierte Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ danke ich zudem Frau Dr. Karen Schmid-Bäse, die stets interessante und lehrreiche Veranstaltungen organisierte.

Für die detaillierte Einführung in Technik und Feinheiten der Amperometrie danke ich Herrn Prof. Dr. Ricardo Borges, sowie Herrn Prof. Dr. José Lopez-Barneo, die mich tatkräftig bei der Herstellung und Messung von Glomus-Lebenschnitten unterstützten. Der Forschungsgruppe um Herrn PD Dr. Matthias Dutschmann, Georg-August-Universität, Göttingen, gebührt mein Dank für die ertragreiche Zusammenarbeit bei diesem Projekt. Herrn Prof. Dr. Eisenmenger und Herrn Florian Fischer gilt mein aufrichtiger Dank für die gute Zusammenarbeit während der Gewinnung humanen Glomusgewebes.

Besonderer Dank geht an Dr. Pia Körner, die mir mit Rat und Tat den Einstieg in Thematik und Laborarbeit erleichterte. Auch Herrn PD Dr. Lars Kunz bin ich für die Durchsicht dieser Arbeit, viele wertvolle Diskussionen und nicht zuletzt auch bei der praktischen Durchführung der Experimente zu herzlichem Dank verpflichtet.

Unter den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts gilt mein besonderer Dank Frau Gabriele Terfloth und Astrid Tiefenbacher für Ihre kompetente Unterstützung im Laboralltag. Daneben danke ich auch Herrn PD Dr. Martin Albrecht, Dr. Thomas Braun, Dr. Andreas Bulling, Annette Krieger, Herrn Prof. Dr. Arthur Mayerhofer, Dr. Klaus Metzeler, Karin Metzrath, Gerhard Prechtner, Romi Rämsch, Marlies Rauchfuß, Dr. Axel W. Reinhardt, Dr. Johanna Richter, Matthias Traut, Herrn Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger und Barbara Zschiesche für die stets angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre im Anatomischen Institut.