

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung
Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Urocortin-abhängige Effekte auf die Struktur und Funktion der Nebenniere *in vivo*

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

vorgelegt von
Anna Riester (geb. Hill)
aus
Lindenberg i. Allgäu
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Susanne Bechtold-Dalla Pozza
Prof. Dr. Stefan R. Bornstein
Prof. Dr. Martin Storr

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. A. Spyroglou

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2013

Meinen Eltern
und meinem Mann Martin

„Die verborgene Lage und die unbekante Bestimmung der Nebennieren sind der Grund, warum in der Heilwissenschaft um sie noch keine Frage war.“

Josef Hyrtl (1810-1894)
in „Anatomie des Menschen“

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Anatomie und Physiologie der Nebenniere.....	6
1.1.1	Anatomie der Nebenniere	6
1.1.2	Steroidbiosynthese	7
1.1.3	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.....	9
1.1.4	Nebennierenmark und Katecholaminsynthese	10
1.2	Familie der Urocortine und ihre Rezeptoren	11
1.2.1	Urocortin-Familie	11
1.2.2	CRF-Rezeptoren	11
1.2.3	CRF-binding Protein	12
1.2.4	Expression der Urocortine	12
1.2.5	Bekannte Funktionen der Urocortine	13
1.2.6	Expression und Funktion der Urocortine in der Nebenniere.....	14
1.3	Genetisch modifizierte Mausmodelle.....	15
1.3.1	Knock-out Modelle	15
1.3.2	Cre/loxP-System	15
1.4	Ziele der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	17
2.2	Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	18
2.3	Puffer	19
2.4	Versuchstiere.....	21
2.4.1	Urocortin Knock-out Mäuse (Ucn KO)	21
2.4.2	SF1-Promotor-abhängige Ucn2 überexprimierende Mäuse (Ucn2 OE).....	22
2.5	Genotypisierung	25
2.5.1	Gewinnung von genomischer DNA.....	25
2.5.2	Genotypisierung der SF1-Cre Mauslinie.....	26
2.5.3	Genotypisierung der R26 Mauslinie.....	27
2.6	Stresstests	29
2.7	Blut- und Organentnahme und Gewinnung von Plasma	29
2.8	Histologische Untersuchungen	29
2.8.1	Paraffin-Einbettung	29
2.8.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	30
2.8.3	Quantifizierung der Flächen von Nebennierenschnitten.....	30
2.8.4	Quantifizierung der zellulären Hypotrophie bzw. Hypertrophie	30
2.8.5	PCNA-Färbung.....	31
2.9	Molekularbiologische Untersuchungen	32
2.9.1	RNA Extraktion.....	32
2.9.2	cDNA Synthese.....	32
2.9.3	Real-time PCR	32

2.10	Messung von Hormonkonzentrationen im Plasma	34
2.10.1	Corticosteron.....	34
2.10.2	ACTH	34
2.10.3	Ucn2.....	35
2.11	Statistische Auswertung	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Urocortin Knock-out Mäuse (Ucn KO)	36
3.1.1	Ucn1 KO Mäuse.....	37
3.1.2	Ucn2 KO Mäuse.....	38
3.1.3	Ucn3 KO Mäuse.....	39
3.1.4	Ucn1/Ucn2 dKO Mäuse	39
3.1.5	Ucn2/Ucn3 dKO Mäuse	40
3.1.6	Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO Mäuse.....	40
3.2	Urocortin2 überexprimierende Mäuse (Ucn2 OE)	41
3.2.1	Nachweis der Ucn2 Überexpression.....	41
3.2.2	Ucn2 OE Mäuse unter Basal-Bedingungen.....	43
3.2.3	Ucn2 OE Mäuse nach ACTH-Stimulationstest	45
3.2.4	Ucn2 OE Mäuse nach Restraint-Stress-Test.....	47
4	DISKUSSION	50
4.1	Bedeutung der Urocortine in der Nebenniere	50
4.2	Ergebnisse der Experimente an Urocortin Knock-out Mäusen	50
4.2.1	Besonderheiten, Vorteile und Einschränkungen dieses Mausmodells	50
4.2.2	Vergleich der Ergebnisse mit Daten der Literatur	51
4.3	Ergebnisse der Ucn2 transgener Mäuse	54
4.3.1	Besonderheiten, Vorteile und Einschränkungen dieses Mausmodells	54
4.3.2	Vergleich der Ergebnisse mit Daten der Literatur	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
8	DANKSAGUNG	70
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	71
9.1	Publikationen	71
9.2	Vorträge.....	71
9.3	Poster	72
10	LEBENS LAUF	73

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Nebenniere

1.1.1 Anatomie der Nebenniere

Die Nebennieren sind retroperitoneal gelegene paarige Organe, die dem oberen Nierenpol aufsitzen. Sie bestehen aus zwei funktionell und entwicklungsgeschichtlich verschiedenen Teilen: dem Nebennierenmark, das aus dem Neuroektoderm stammt und Teil des Sympathischen Nervensystems ist, sowie der Nebennierenrinde, die ihren Ursprung im Mesoderm hat (Hammer et al. 2005).

Die Nebennieren der Maus sind oval geformt und wiegen etwa 3 mg, wobei die Organe männlicher Tiere etwas kleiner sind als die weiblicher (Bielohuby et al. 2007). Die Blutversorgung erfolgt über die Arteriae suprarenales, die unter der Kapsel ein Geflecht bilden. Von diesen ziehen Kapillaren und kleine Arterien durch die Rinde zum Mark. Der Abfluss erfolgt über zentrale Markvenen in die Venae suprarenales (Lüllmann-Rauch 2009).

Die Nebenniere ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. An diese schließt sich die Nebennierenrinde an, die sich mikroskopisch bei adulten Mäusen in nicht scharf abgrenzbare Zonen gliedern lässt. Direkt unter der Kapsel befindet sich die Zona glomerulosa, in welcher die Produktion der Mineralocorticoide erfolgt. Sie zeichnet sich durch kleine azidophile Zellen aus, die sich in Nestern zusammenlagern, welche von bindegewebigen Fasern umgeben sind. Es folgt nach innen die größte der Zonen, die Zona fasciculata, die für die Synthese der Glucocorticoide zuständig ist. Die Zellen sind relativ groß, polygonal geformt und formieren sich zu radiär verlaufenden Zellsäulen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Dichte an Lipideinschlüssen, Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum aus (Arnold 1866; Nussdorfer 1986). Die Nebennierenrinde kann sowohl durch Proliferation als auch durch Hypertrophie der Zellen an Größe zunehmen (Wolkersdorfer et al. 1998; Bielohuby et al. 2007). Im Gegensatz zum Menschen weist die Nebenniere der Maus keine Zona reticularis auf, dagegen existiert bei Mäusen teils eine zusätzliche Zone, die X-Zone, deren funktionelle Relevanz bis jetzt unklar ist. Sowohl weibliche als auch männliche Mäuse haben am Anfang ihrer Entwicklung diese Zone. Bei Männchen verschwindet diese jedoch im fünften Monat mit Beitritt in die Pubertät, bei Weibchen mit der ersten Schwangerschaft (Beuschlein et al. 2002; Bielohuby et al. 2007; Hershkovitz et al.

2007). Im Nebennierenmark werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin gebildet.

1.1.2 Steroidbiosynthese

Cholesterin dient bei allen in der Nebenniere produzierten Hormonen als Ausgangsstoff der Steroidbiosynthese. Dieses stammt hauptsächlich aus den im Blut zirkulierenden low-density Lipoproteinen (LDL), allerdings ist auch eine De-novo-Synthese aus Acetyl-Coenzym A möglich. LDLs werden in der Leber synthetisiert und ins Blut freigesetzt. Bei Bindung an einen spezifischen LDL-Rezeptor erfolgt die Aufnahme durch Endozytose. Das aufgenommene Cholesterin kann nun in Lipidtröpfchen als Cholesterinester gespeichert oder direkt in Steroidhormone umgewandelt werden (Löffler 2007).

Die Hormonsynthese ist aufgeteilt in zwei Zellkompartimente: der erste und der letzte Syntheseschritt erfolgen im Mitochondrium, die restlichen am glatten endoplasmatischen Retikulum. Zuerst muss daher Cholesterin mittels eines Translokators (Steroid Acute Regulatory Protein, StAR) in den Innenraum der Mitochondrien transportiert werden. StAR fungiert als hydrophober Kanal in der inneren Mitochondrienmembran (s. Abb. 1). Dieser Transport stellt den limitierenden Schritt in der Steroidbiosynthese dar. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine enge Korrelation zwischen StAR Expression und der Steroidbiosynthese besteht (Stocco et al. 1996). Die folgenden Syntheseschritte werden von Enzymen der Cytochrom-P450-Familie katalysiert. Im Innenraum der Mitochondrien erfolgt nun die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon mit Hilfe des Enzyms Cholesterin-Desmolase (Cytochrom P450 Side Chain Cleavage Enzyme, P₄₅₀SCC, Cyp11a1) durch die Abspaltung der Seitenkette des Cholesterins und der Einführung einer Ketogruppe am C-20-Atom. Nach Verlassen des Mitochondriums wird Pregnenolon durch das Enzym 3 β -Hydroxydehydrogenase (Hsd3b) in Progesteron umgewandelt. Bei der Maus erfolgt nun die Hydroxylierung durch das Enzym 21-Hydroxylase (Cyp21) zu 11-Desoxycorticosteron. Das Enzym 11 β -Hydroxylase (Cyp11b1), das sich wiederum im Mitochondrium befindet, katalysiert anschließend die Dehydrierung zu Corticosteron. Dies ist das Hauptprodukt der murinen Zona fasciculata. In der Zona glomerulosa wird Corticosteron noch mittels des Enzyms Aldosteronsynthase (Cyp11b2) in Aldosteron umgewandelt (Keegan et al. 2002; Löffler 2007).

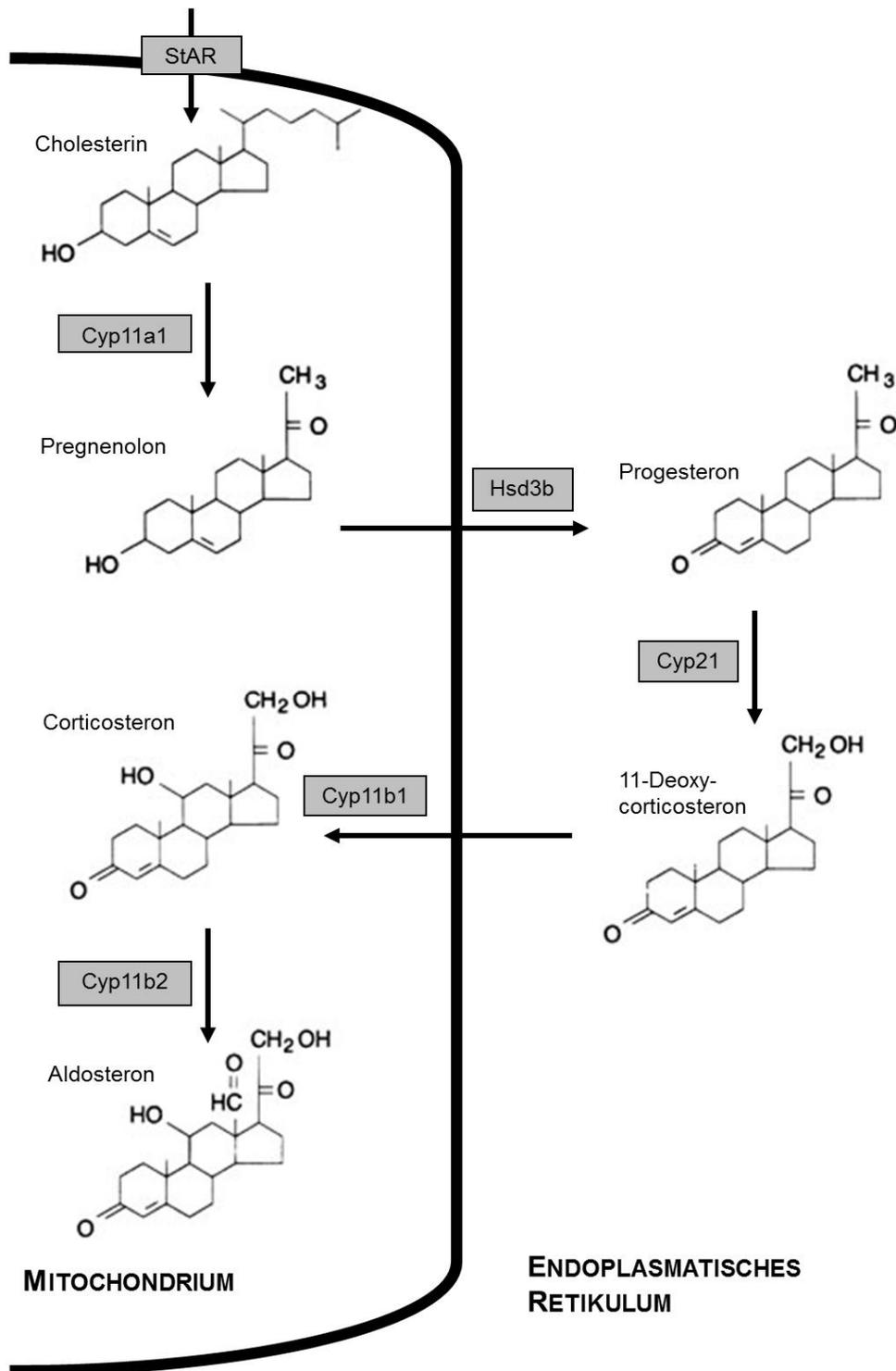


Abb. 1: Steroidbiosynthese

Überblick über die Synthese von Corticosteron und Aldosteron in den Zellen der murinen Nebennierenrinde (StAR: Steroidogenic Regulatory Protein, Cyp11a1: Cholesterin-Desmolase, Hsd3b: 3 β -Hydroxydehydrogenase, Cyp21: 21-Hydroxylase, Cyp11b1: 11 β -Hydroxylase, Cyp11b2: Aldosteronsynthase)

Da die Maus im Gegensatz zum Menschen keine 17 α -Hydroxylase (Cyp17) besitzt, können in der Nebenniere der Maus weder Androgene (DHEA, Dihydroepiandrosteron) noch Cortisol gebildet werden (Perkins et al. 1988). In der Nebenniere des Menschen führt die Expression von Cyp17 zusätzlich zu einer Hydroxylierung des C-17-Atoms von Pregnenolon oder Progesteron, wodurch 17 α -Hydroxypregnenolon bzw. 17 α -Hydroxyprogesteron entsteht. Cyp21 katalysiert aus letzterem die Hydroxylierung zu 11-Desoxycortisol, welches wiederum durch Cyp11b1 zu Cortisol wird, dem Effektorhormon der Glucocorticoide beim Menschen.

1.1.3 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die Regulation der Synthese von Glucocorticoiden betrifft zum einen die spontane Sekretion unter Basalbedingungen, die einer zirkadianen Rhythmik unterworfen ist, und zum anderen die stimulierte Sekretion bei jeglicher Art von Stress.

Diese Steuerung ist hierarchisch geordnet: Im Hypothalamus wird der Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF, Corticotropin-Releasing-Hormon, CRH, Corticolibrin) gebildet; dieser wird in den portalen Kreislauf der Hypophyse freigesetzt und veranlasst in der Adenohypophyse die Synthese und Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH, Corticotropin). ACTH gelangt über den Blutkreislauf zur Nebenniere und stimuliert dort in der Zona fasciculata die Produktion des Corticosterons. Die Erhöhung der Glucocorticoid-Konzentration im Blut hemmt direkt und schnell die ACTH-Synthese und -Sekretion auf Hypophysenebene und langsamer, allerdings mit länger wirksamem Effekt, die CRF-Produktion auf Hypothalamusebene - dies wird als negative Rückkopplung bezeichnet (Eberwine et al. 1987). Da über die Regulation und die Feedbacksysteme der beschriebenen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bereits relativ viel bekannt ist, gilt diese als Paradigma für andere neuroendokrine Regulationskreisläufe (Klinke 2005).

CRF ist ein 41 Aminosäuren langes Peptidhormon, welches vor allem im Hypothalamus, aber auch in anderen Teilen des Gehirns und teilweise in peripheren Organen gebildet wird. Es wird in den parvocellulären Neuronen des Nucleus paraventricularis durch proteolytische Prozessierung aus einem Prohormon gebildet. Über den portalen Kreislauf gelangt CRF in die Adenohypophyse, wo es an den CRF-Rezeptor Typ 1 (Crf1r) bindet. Dieser ist ein membranständiger G-Protein-gekoppelter Rezeptor und bewirkt über den cAMP-Pathway die Freisetzung von ACTH sowie dessen Synthese (Vale et al. 1981; Chen et al. 1993). Außerdem aktiviert CRF bei Stress das autonome Nervensystem über den Locus coeruleus (Tsatsanis et al. 2007). Synergistisch zu CRF stimuliert das Antidiuretische Hormon (ADH, Adiuretin,

Vasopressin) über den V3-Rezeptor die Sekretion und Produktion von ACTH (Plotsky 1988).

ACTH ist ein Peptidhormon aus 39 Aminosäuren, das mittels posttranslationaler Prozessierung aus dem Vorläuferhormon Proopiomelanocortin (POMC) in den corticotropen Zellen der Adenohypophyse gebildet wird. ACTH bindet in der Nebenniere an den ACTH-Rezeptor (Melanocortin-2-Rezeptor, MC2-R), einen G-Protein-gekoppelten, membranständigen Rezeptor. Über Aktivierung der Adenylatcyclase, den daraus resultierenden Anstieg der cAMP-Konzentration und der folgenden Aktivierung der Proteinkinase A wird die Steroidbiosynthese gesteigert. Dies erfolgt zum einen durch eine erhöhte durch StAR vermittelte Cholesterinzufuhr in die Mitochondrien und zum anderen durch die Stimulation der Transkription der erforderlichen CYP450-Enzyme.

Sowohl die Sekretion von CRF als auch von ACTH erfolgen pulsatil und unterliegen einer zirkadianen Rhythmik. Dabei ist beim Menschen die Konzentration von CRF, ACTH und in Folge davon von Cortisol in den Morgenstunden besonders hoch und fällt im Tagesverlauf ab (Löffler 2007). Bei vielen nachtaktiven Nagetieren einschließlich Mäusen ist diese Rhythmik umgekehrt mit morgendlich niedrigen Corticosteron-Spiegeln.

1.1.4 Nebennierenmark und Katecholaminsynthese

Das Nebennierenmark ist physiologisch und embryologisch gesehen ein großes sympathisches Ganglion, wobei postganglionäre Nervenfasern fehlen und die Katecholamine direkt ins Blut abgegeben werden. Katecholamine werden aus der Aminosäure Tyrosin in vier bzw. drei Schritten gebildet. Zuerst wird Tyrosin durch die Tyrosinhydroxylase (TH) zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) konvertiert, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. DOPA wird durch die DOPA-Decarboxylase in Dopamin umgewandelt und dieses schließlich durch die Dopamin- β -Hydroxylase zu Noradrenalin hydroxyliert. Der größte Teil des Noradrenalins wird durch Phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT) zu Adrenalin methyliert (s. Abb. 2). Aus dem Nebennierenmark wird zu 80 % Adrenalin und nur zu 20 % Noradrenalin freigesetzt. Katecholamine können in den Zellen in Granula gespeichert werden und werden bei Bedarf freigesetzt. Die Stimulation zur Produktion und Sekretion erfolgt vor allem durch präganglionäre sympathische Fasern mit dem Neurotransmitter Acetylcholin. Daneben wirken auch Glucocorticoide, die aufgrund der Blutversorgung der Nebenniere von außen nach innen reichlich im Mark vorhanden

sind, stimulierend auf die Katecholaminsynthese (Dickerman et al. 1984; Wan et al. 1989).

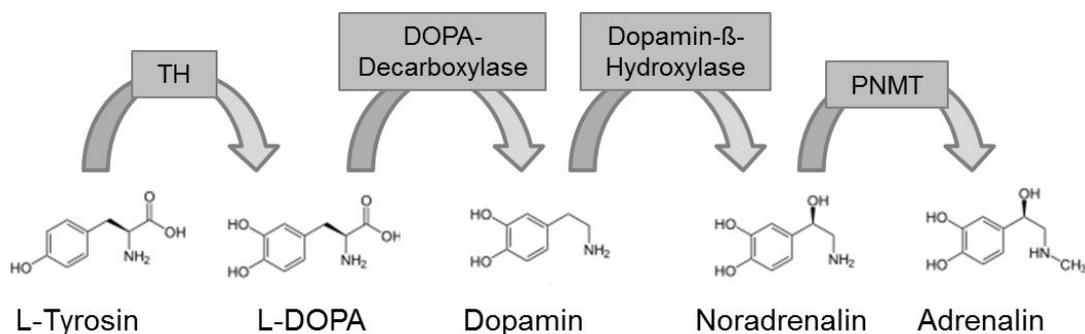


Abb. 2: Synthese der Katecholamine

TH: Tyrosinhydroxylase, PNMT: Phenylethanolamin-N-methyltransferase, DOPA: Dihydroxyphenylalanin

1.2 Familie der Urocortine und ihre Rezeptoren

1.2.1 Urocortin-Familie

Urocortine sind Peptidhormone der Familie des Corticotropin-Releasing-Faktors (CRF). Die Urocortin-Familie besteht aus drei Mitgliedern: Urocortin 1 (Ucn1; Urotensin-like Molecul), Urocortin 2 (Ucn2; Stresscopin-related Peptide) und Urocortin 3 (Ucn3, auch Stresscopin genannt). Als erstes wurde Ucn1 von Vaughan et al. im Jahre 1995 im Rattengehirn identifiziert. Er nannte das 40 Aminosäuren lange Neuropeptid Urocortin, um sowohl die Homologie zu Urotensin I, einem Neuropeptid bei Fischen (63 % Sequenzhomologie), sowie zum Corticotropin-Releasing-Faktor (45 % Sequenzhomologie zu CRF der Ratte/des Menschen) deutlich zu machen (Vaughan et al. 1995). Einige Jahre später (2001) wurden Ucn2 und Ucn3 identifiziert, die zueinander eine sehr hohe (>80 %) Homologie ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Lewis et al. 2001; Reyes et al. 2001).

1.2.2 CRF-Rezeptoren

Die biologische Aktivität der Urocortine wird über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt: CRF₁-Rezeptor (Crf1r) und CRF₂-Rezeptor (Crf2r). CRF-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranösen Domänen. Während der Crf1r vor allem im Gehirn und in der Hypophyse exprimiert wird, wird der Crf2r hauptsächlich in peripheren Geweben gebildet (Tsatsanis et al. 2007).

Neben ihrem Expressionsmuster unterscheiden sich die beiden Rezeptoren außerdem in der Affinität zu CRF und den Urocortinen (s. Abb. 3): Während Ucn1 eine dreimal höhere Affinität als CRF zum Crf1r hat, hat Ucn2 eine sehr geringe Affinität und Ucn3 keine. Ucn2 und Ucn3 vermitteln ihre Wirkung vor allem über den Crf2r; aber auch Ucn1 bindet an diesen Rezeptor ebenso stark wie an den Crf1r. CRF dagegen hat zum Crf2r eine geringere Affinität (Fekete et al. 2007).

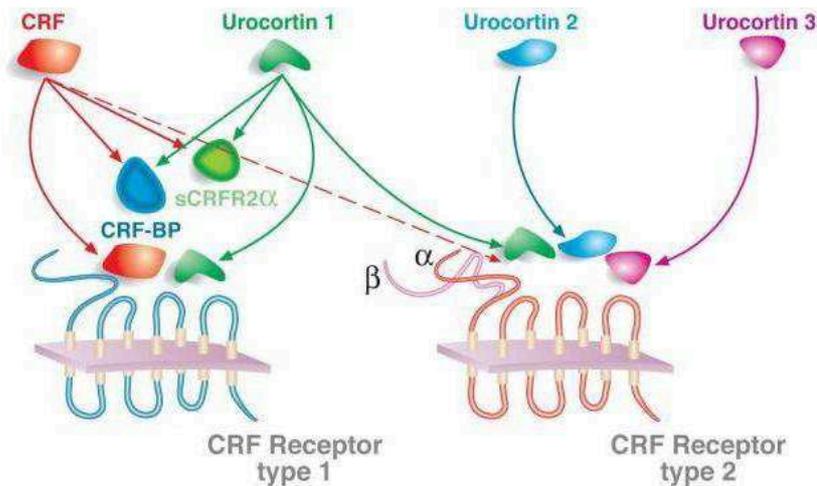


Abb. 3: Familie der CRF-verwandten Neuropeptide und ihre Rezeptoren

CRF besitzt eine höhere Affinität zu dem Crf1r, wohingegen Ucn2 und Ucn3 spezifische Liganden für den Crf2r sind. Ucn1 kann an beide CRF-Rezeptoren mit gleicher Affinität binden (Kuperman et al. 2008).

1.2.3 CRF-binding Protein

Das CRF-binding Protein (CRF-BP), ein 37 kD Glycoprotein, ist ein lösliches Protein, das sowohl CRF als auch Urocortine mit hoher Affinität bindet. Somit wird die Bioverfügbarkeit der Neuropeptide reduziert und deren Bindung an die CRF-Rezeptoren verhindert. Dies stellt ein schnelles und kurzwirksames Kontrollsystem über die Verfügbarkeit der bioaktiven Liganden dar (Behan et al. 1995). CRF-BP wird unter anderem in der Nebenniere, der Leber, der Plazenta und im Gehirn exprimiert (Baigent et al. 2000; Chatzaki et al. 2002).

1.2.4 Expression der Urocortine

Ucn1 wurde als erstes im Edinger Westphal Kern einer Ratte von Vaughan im Jahre 1995 identifiziert (Vaughan et al. 1995). Danach konnte die Expression von Ucn1 auch in anderen Teilen des Gehirns, unter anderem der lateralen oberen Olive, dem Nucleus supraopticus und im lateralen Hypothalamus gezeigt werden. Aber die Expression

beschränkt sich nicht nur auf das Zentrale Nervensystem, vielmehr findet sich Ucn1 auch im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, im Hoden, im Fettgewebe, im Herz und in Geweben des Immunsystems wie dem Thymus, der Milz und auch der Haut (Baigent et al. 2000; Takahashi 2012).

Die Expression von Ucn2 und Ucn3 beschränkt sich im Gehirn hauptsächlich auf den Locus coeruleus und Teile des Hypothalamus. Dagegen konnte Ucn2 in fast allen Geweben außerhalb des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden, in größerem Umfang im Herz, in der Lunge, im Muskel, im Gastrointestinaltrakt, in der Nebenniere und in peripheren Blutzellen (Chen et al. 2004; Yamauchi et al. 2005). Auch Ucn3 wird unter anderem in Fettzellen, im Herz und in der Haut exprimiert, allerdings auf einem niedrigeren Level als Ucn2. Zudem konnte Ucn3 in den beta-Zellen des Pancreas nachgewiesen werden (Lewis et al. 2001).

1.2.5 Bekannte Funktionen der Urocortine

Im Zentralen Nervensystem beeinflussen Urocortine das Stress- und Angstverhalten, wobei Ucn1 vermehrt zu einer Stressantwort und gesteigertem Angstverhalten führt und Ucn2 und Ucn3 eher hemmend auf die Stressantwort wirken. Außerdem sind auch Effekte von Ucn2 und Ucn3 auf „Stress-Coping“-Mechanismen beschrieben (Suda et al. 2004; Lin 2012). In der Peripherie führt Ucn1 zu einer Reduktion der Darmmotilität und der Nahrungsaufnahme sowie zu einer proinflammatorischen Reaktion (Yakabi et al. 2011). Kürzlich wurde ebenso publiziert, dass sowohl eine intraventrikuläre als auch eine systemische Ucn1-Gabe bei Ratten mit intracerebraler Blutung zu einer Reduktion eines neurologischen Defizits führt (Liew et al. 2012; Liew et al. 2012). Auch verringert Ucn1 die Differenzierung der Osteoklasten und ist als anti-resorptives Molekül des Knochenstoffwechsels bekannt (Combs et al. 2012). Ucn2 ist an der Regulation von metabolischen Stoffwechselwegen, der Immunantwort und der gastrointestinalen Peristaltik beteiligt (Martinez et al. 2004; Gravanis et al. 2005; Kuperman et al. 2008). Außerdem hat es Auswirkungen auf Reproduktion und Schwangerschaft (Florio et al. 2004). Zudem zeigt Ucn2 weitere – möglicherweise für therapeutische Zwecke interessante – Eigenschaften wie z. B. die Inhibition der Tumorgenese (Hao et al. 2008) und kardioprotektive Effekte (Huang et al. 2004; Davidson et al. 2009; Ikeda et al. 2012). Im Nebennierenmark kann Ucn2 zur Stimulation der Katecholaminsynthese führen (Nemoto et al. 2005). Ucn3 hat neben anderen Wirkungen, wie der Steigerung der Darmmotilität, eine entscheidende Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase, indem es die Glucose-abhängige Insulinsekretion reguliert (Li et

al. 2007). Für alle Urocortine konnten vasodilatatorische und kardioprotektive Effekte gezeigt werden (Emeto et al. 2011).

1.2.6 Expression und Funktion der Urocortine in der Nebenniere

Eine Expression in der Nebenniere ist für alle Urocortine sowie deren Rezeptoren beschrieben. Es wird daher vermutet, dass diese die Nebenniere direkt, d. h. über eine parakrine oder autokrine Regulationsschleife, beeinflussen können. Die Expressionslevel der Urocortine und deren Rezeptoren unterscheiden sich in den verschiedenen Zonen des Cortex sowie im Nebennierenmark. Während CRF in der gesamten Nebenniere exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass Ucn1 und Crf1r vor allem im Nebennierenmark zu finden sind und Ucn2, Ucn3 und Crf2r bevorzugt in der Nebennierenrinde (Dermitzaki et al. 2007). Die Studienlage zur Expression von Ucn3 ist allerdings kontrovers (Hsu et al. 2001; Fukuda et al. 2005; Deussing et al. 2010). Durch die Anwesenheit der fünf verschiedenen Liganden und den dazugehörigen Rezeptoren ist eine angenommene intraadrenale Regulationsschleife sehr komplex und abhängig vom Gleichgewicht der lokalen Konzentrationen von CRF und den Urocortinen sowie der Anwesenheit der Rezeptoren (Tsatsanis et al. 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Expression könnte daher ein CRF₁-Rezeptor/Ligand-System im Nebennierenmark eine Rolle spielen und dementsprechend in der Nebennierenrinde ein CRF₂-Rezeptor/Ligand-System, wie es Fukuda et al. in ihrem Modell (s. Abb. 4) für Ucn1 und Ucn3 und deren Rezeptoren angenommen haben (Fukuda et al. 2005).

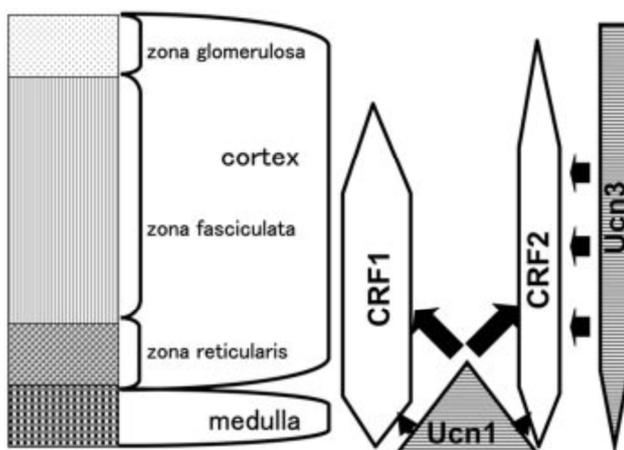


Abb. 4: Modell eines CRF-Rezeptor/Ligandensystems

Dieses Modell zeigt mögliche intraadrenale Regulationsschleifen mit einem CRF₁-Rezeptor/Ligand (Ucn1)-System im Nebennierenmark und ein CRF₂-Rezeptor/Ligand (Ucn3)-System in der Nebennierenrinde (Fukuda et al. 2005).

Bezüglich der Regulation der Urocortine in der Nebennierenrinde ist insgesamt noch wenig bekannt. Chen et al. konnten zeigen, dass eine Exposition mit Glucocorticoiden zu einer erhöhten Expression von Ucn2 führt (Chen et al. 2004).

1.3 Genetisch modifizierte Mausmodelle

1.3.1 Knock-out Modelle

Bei Knock-out Mäusen werden mit Hilfe genetischer Manipulationen gezielt Gene deaktiviert. Dazu werden embryonale Stammzellen aus Blastozysten gewonnen und *in vitro* vermehrt. Anschließend wird ein Zielvektor, der das inaktivierte Zielgen und Marker (z. B. Neomycinresistenzgen und Thymidinkinase) enthält, mittels homologer Rekombination in das Mausgenom eingeführt. Nachdem geprüft wurde, ob der Zielvektor an der richtigen Stelle in das Genom eingebaut wurde, werden die embryonalen Stammzellen in Blastozysten eingesetzt. Diese werden in eine vorbehandelte Empfängermaus eingepflanzt, woraufhin chimäre Tiere entstehen. Durch Rückkreuzung mit Wildtyp Tieren werden heterozygote Mäuse nach entsprechender Genotypisierung herausgefiltert. Diese werden wiederum untereinander gekreuzt, wodurch homozygote Knock-out Mäuse entstehen.

1.3.2 Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System ist eine weit verbreitete Methode zur Generierung gewebespezifischer transgener Mäuse. Dazu werden zwei transgene Mausstämme miteinander gekreuzt: Die Cre-Mauslinie exprimiert hierbei die Cre-Rekombinase ortsspezifisch und zeitspezifisch, d. h. abhängig von einem vorgeschalteten, gewebespezifischen Promotor. Die Cre-Rekombinase entfernt von loxP-Kassetten flankierte Gensequenzen aus dem Genom der Maus dauerhaft. Die andere Mauslinie („gefloxt“) trägt in sich nach homologer Rekombination einen Genabschnitt, der von loxP-Sequenzen flankiert ist. Dabei muss unterschieden werden zwischen Knock-in und Knock-out Systemen: Entweder wird das Zielgen von zwei loxP-Kassetten flankiert und wird somit nach der Kreuzung mit Cre-Mäusen aus dem Genom entfernt (Knock-out) oder vor dem Zielgen wird eine Stopp-Sequenz geschaltet, die wiederum von zwei loxP-Kassetten flankiert ist. In diesem Fall führt dies zu einer Überexpression des Zielgens bei Kreuzung mit Cre-Mäusen.

1.4 Ziele der Arbeit

In einem kurzen Brief an „Nature“ stellte Hans Selye 1936 erstmals das Konzept von biologischem Stress dar (Selye 1936). In den darauf folgenden Jahrzehnten intensiver Forschung wurde die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse als bedeutender Regulator der Stressantwort identifiziert. Inzwischen weiß man allerdings, dass die Regulation der Nebenniere nicht nur durch höher geordnete Zentren erfolgt, sondern auch durch autokrine und parakrine Einflüsse moduliert werden kann (Bornstein et al. 2000). Ein derartiger intraadrenaler Regulationsmechanismus soll, wie vermutet wird, das Urocortin-System und die dazugehörigen Rezeptoren darstellen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Urocortin-abhängigen Effekte auf die murine Nebenniere zu untersuchen. Dazu wurde eine Reihe unterschiedlicher, genetisch modifizierter Mausstämmen verwendet und phänotypisch im Hinblick auf die Struktur und Funktion der Nebenniere charakterisiert: ein Mausmodell, in dem ein oder mehrere Urocortine deletiert wurden, und ein Mausmodell, in dem organspezifisch *Ucn2* überexprimiert wurde. Durch diese Kombination zweier im Sinne der Expression entgegengesetzter Modelle ist es möglich, Hypothesen über die physiologische Rolle der Urocortine aufzustellen. Nicht zuletzt kann damit auf mögliche Auswirkungen erniedrigter oder erhöhter Urocortin-Level geschlossen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Biofuge fresco Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Bio-Rad Powerpac 300, 1000	Bio-Rad, München
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Delfia Plateshaker	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
EC-350-Paraffin-Ausgießstation	Microm, Walldorf
Futtermittel	Ssniff, Soest
Glaskapillaren	Brand, Wertheim
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
HM 335 E Rotationsmikrotom	Microm, Walldorf
Intas GDS Software	Intas, Göttingen
Käfige	TDI, Alcobendos, Spanien
Leica DM 2500 Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DMRB Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler Real time PCR Machine	Roche Applied Science, Mannheim
Liquid Blocker Super PapPen	G. Kisker, Steinfurt
Mikroplattenreader SPECTRA	Tecan, Crailsheim
Mikroplattenwascher Columbus	Tecan, Crailsheim
Mikrowelle	Bomann, Kempen
Mx3000P Stratagene qPCR Cycler	Stratagene, La Jolla, CA, USA
MxPro V.4.01 Software	Stratagene, La Jolla, WI, USA
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Ohrmarken und Ohrzange	Hartenstein, Würzburg
Pipette Pipetman®	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Reference® PhysioCare	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Primus 25 advanced PCR Machine	PEQLAB, Erlangen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	PFM, Köln
Spot Basic Software V4.09	Spot, Burroughs, MI, USA
Spot insight QE	Visitron Systems, Puchheim

Spritzen BD Microfine (U40)	Becton Dickinson, Heidelberg
Stereo-Dissektionsmikroskop	Carl Zeiss AG, Ulm
STP Spin 120 Gewebereinbettungsautomat	Microm, Walldorf
Superfrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
T8 Ultra Turrax Homogenizer	IKA-Werke, Staufen
UV Camera	INTAS UV-System, Göttingen
Victor ³ 1420 Multilabel Counter	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Wasserbad SB 80	Microm, Walldorf

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ACTH ELISA	Biomerica, Irvine, CA, USA
Agarose	PEQLAB, Erlangen
Aqua ad injectabilia	Braun, Tuttlingen
Aqua destillata (Aqua dest.)	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
Biotinylated goat anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, CA, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Corticosteron HS EIA	IDS, Frankfurt
DNA Leiter (100bp, 1kb)	Biolabs, Frankfurt
DNA Leiter BenchTop 100 bp	Promega, Mannheim
dNTP Mix	Promega, Mannheim
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %, 96%, 70%	Apotheke Innenstadt Uni München
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fast EVA Green Supermix	Biorad Laboratories Berkley, CA, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histoacryl ®	Braun, Tuttlingen
Isofluran – Forene ®	Abbott GmbH, Wiesbaden
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I reaction mix	Roche Applied Science, Mannheim

Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Rev Transcriptase 5 x Buffer	Promega, Mannheim
M-MLV RT, RNase H minus, PM	Promega, Mannheim
Mounting Medium	Microm, Walldorf
Natriumchlorid 0.9%	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Oligo (dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PCI (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1)	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
PCNA-Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered Saline, PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
Recombinant RNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SV Total RNA Isolation System	Promega, Mannheim
Synacthen®	Novartis, Nürnberg
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Urocortin 2 Kit Mouse EIA	BioVendor, Modrice, Tschechien
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, CA, USA
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch Lab, PA, USA

2.3 Puffer

1%iges Agarosegel

1 mg Agarose

100 ml TBE 1x

Schmelzen der Agarose in der Mikrowelle

5 µl Ethidiumbromid hinzufügen

TBE 10x Puffer

108 g Tris
55 g Borsäure
7,4 g EDTA
1000 ml Aqua dest.
Salzsäure bis pH=8,2

4%ige Paraformaldehyd-Lösung

40 g Paraformaldehyd (PFA)
1000 ml 1x PBS-Lösung unter der Abzugshaube auf 65 °C erwärmen
Aufbewahrung bei -20 °C

TNES-Puffer

10 mM Tris, pH 7,5
400 mM Natriumchlorid
100 mM EDTA
0,6 % SDS

TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

Citratpuffer

2,94 g Natriumcitrat
Salzsäure bis pH = 6 hinzufügen
Ad 1000ml Aqua dest.

Blocking Solution

3 g Rinderserumalbumin
Ad 100 ml PBS

Blocking Buffer

95 µl Blocking Solution
5 µl Ziegenserum

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Urocortin Knock-out Mäuse (Ucn KO)

Die Züchtung und Haltung der Urocortin Knock-out (Ucn KO) Mäuse erfolgte im Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. Es wurden neben Wildtyp Mäusen folgende sechs verschiedene homozygote Genotypen mit dem genetischen Background C57BL/6 x 129 gezüchtet (s. Abb. 5):

Single KO Mäuse, bei denen jeweils eines der Urocortine nicht exprimiert wird:

- Ucn1 KO Mäuse: Ucn1^{-/-} (Vetter et al. 2002)
- Ucn2 KO Mäuse: Ucn2^{-/-} (Chen et al. 2006)
- Ucn3 KO Mäuse: Ucn3^{-/-}

Double KO Mäuse (dKO), bei denen jeweils zwei der Urocortine nicht exprimiert werden:

- Ucn1/Ucn2 dKO Mäuse: Ucn1^{-/-} / Ucn2^{-/-} (Neufeld-Cohen et al. 2010)
- Ucn2/Ucn3 dKO Mäuse: Ucn2^{-/-} / Ucn3^{-/-}

Triple KO Mäuse (tKO), bei denen alle drei Urocortin nicht exprimiert werden:

- Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO Mäuse: Ucn1^{-/-} / Ucn2^{-/-} / Ucn3^{-/-} (Neufeld-Cohen et al. 2010)

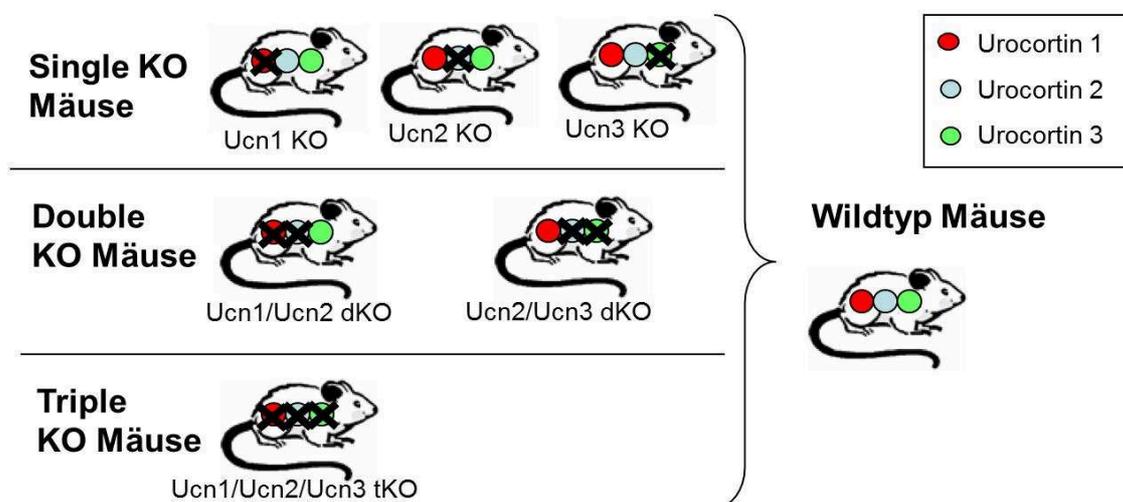


Abb. 5: Schematische Darstellung der verwendeten Urocortin Knock-out Mäuse

Nach der Tötung der 3 Monate alten, männlichen Mäuse wurden die Nebennieren sofort frei präpariert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert bzw. in eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung gegeben. Diese Proben wurden uns auf Trockeneis bzw. bei Raumtemperatur zugesandt (s. Tab. 1).

Bezeichnung	Genotyp	Nebennieren in PFA		Nebennieren bei -80 °C	
		Alter (Monate)	Anzahl	Alter (Monate)	Anzahl
Ucn1 KO	Ucn1 ^{-/-}	3	11	3	7
Ucn2 KO	Ucn2 ^{-/-}	3	7	3	6
Ucn3 KO	Ucn3 ^{-/-}	3	14	3	6
Ucn1/Ucn2 dKO	Ucn1 ^{-/-} / Ucn2 ^{-/-}	3	7	3	4
Ucn2/Ucn3 dKO	Ucn2 ^{-/-} / Ucn3 ^{-/-}	6	12	3	8
Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO	Ucn1 ^{-/-} / Ucn2 ^{-/-} / Ucn3 ^{-/-}	3	12	3	4
WT		3	12	3	9
		6	19		
Gesamtanzahl			94		44

Tab. 1: Alter der verwendeten Ucn KO und WT Mäuse und die Anzahl der entsprechenden Nebennieren

2.4.2 SF1-Promotor-abhängige Ucn2 überexprimierende Mäuse (Ucn2 OE)

Die Haltung sowie Züchtung der SF1-Promotor-abhängigen Ucn2 überexprimierenden Mäuse erfolgte im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt.

Die Tiere wurden in Standard-Maus-Käfigen mit einer Größe von 15 cm x 27 cm x 42 cm mit einer Dichte von maximal 8 Tieren pro Käfig gehalten bzw. in Käfigen der Größe 15 cm x 17 cm x 37 cm mit maximal 3 Tieren. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 h, die Tiere wurden *ad libitum* mit Standard-Maus-Futter und Wasser versorgt. Zur Züchtung wurde ein Männchen zu maximal drei Weibchen gesetzt. War das Weibchen trächtig, wurde es noch vor der Geburt von den anderen Tieren getrennt. Im Alter von 4-5 Wochen wurden die Nachkommen nach Geschlechtern getrennt. Männliche Tiere wurden entweder alleine oder zusammen mit männlichen Geschwistertieren gehalten.

Zur Züchtung von SF1-Promotor-abhängigen Ucn2 überexprimierenden Mäusen mussten zwei verschiedene genetisch veränderte Mausstämme auf der Basis des cre/loxP-Systems gekreuzt werden:

SF1-Cre Mausstamm

Die SF1-Cre Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Keith Parker (Bingham et al. 2006) entwickelt und werden bereits seit einigen Jahren bei uns im Labor gezüchtet. Dabei handelt es sich um Mäuse, die abhängig vom SF1-Promotor Cre-Rekombinase exprimieren. Der SF1-Promotor ist in den Zellen der Nebennierenrinde, der Gonaden, des ventromedullären Teil des Hypothalamus, des Hypophysenvorderlappens und der Milz aktiviert. In diesen Geweben wird dementsprechend die Cre-Rekombinase exprimiert (Bingham et al. 2006).

R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mausstamm

Die R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Jan Deussing, Max Planck Institut für Psychiatrie, München, entwickelt (Rhode 2007). R26 wurde als ubiquitär exprimierender Locus identifiziert (Zambrowicz et al. 1997), d. h. in diesen Locus eingebrachte Gene werden in jedem Zelltyp der Maus aktiviert (Soriano 1999). In den R26 Locus wurde nun das Zielgen Ucn2 und ein IRES tau-LacZ Reporter gen zusammen mit einer vorgeschalteten Stoppssequenz, die von loxP-Kassetten flankiert wird, eingebracht. Aufgrund der Stoppssequenz werden weder Ucn2 noch das tau-LacZ-Reporter gen exprimiert. Es handelt sich damit um einen „stillen“ Knock-in.

Bei der Kreuzung heterozygoter SF1-Cre Mäuse (SF1-Cre^{+/-}) mit homozygoten R26^{stopUcn2/stopUcn2} Mäusen entstehen folgenden Genotypen mit gleicher Wahrscheinlichkeit (s. Abb. 6):

- R26^{+/stopUcn2} SF1-Cre^{+/-} (**Ucn2 OE** = Ucn2 overexpressing) :
Mäuse, die heterozygot in Geweben, die normalerweise SF1 exprimieren, Ucn2 überexprimieren.
- R26^{+/stopUcn2} SF1-Cre^{-/-} (**Controls** = Kontrolltiere):
Mäuse, die Ucn2 nicht überexprimieren; entsprechen Wildtyp Mäusen.

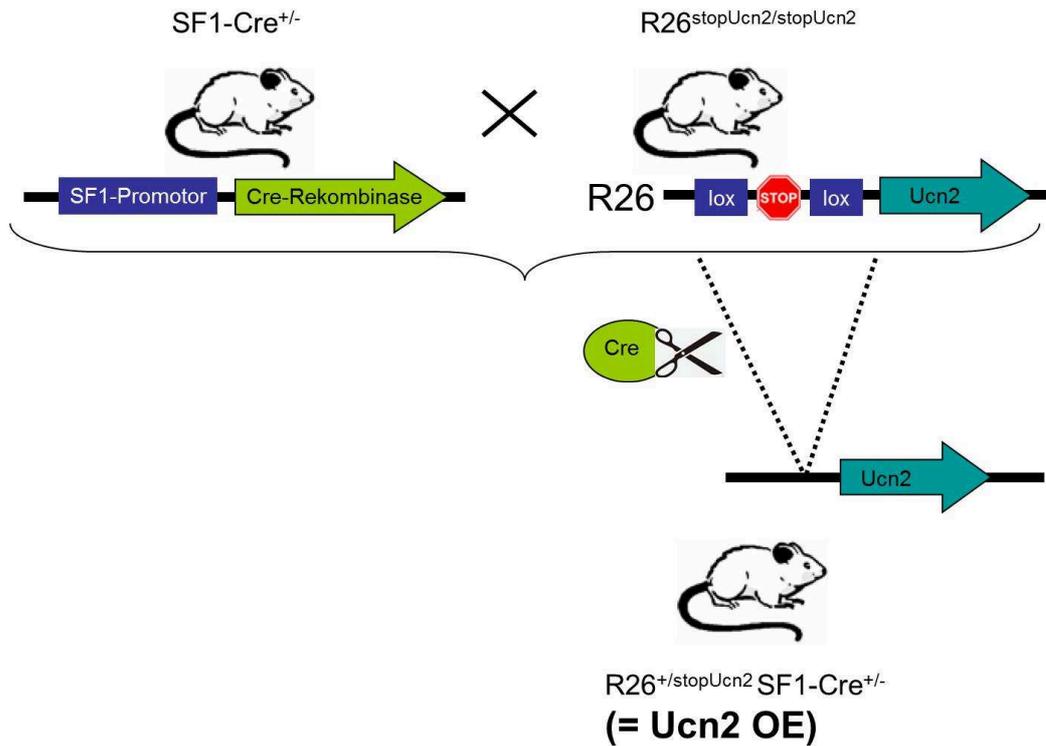


Abb. 6: Schematische Darstellung der Züchtung von Ucn2 OE Mäusen

Die Mäuse wurden neben der Unterteilung in Männchen und Weibchen in drei verschiedene Gruppen unterteilt:

- Basal-Gruppe: Die Mäuse wurden ohne vorherigen Versuch getötet.
- ACTH-Test-Gruppe: Die Mäuse wurden 1 h nach einer intraperitonealen ACTH-Injektion getötet.
- Restraint-Stress-Test (RST)-Gruppe: Die Mäuse wurden 15 min in einem kleinen Container gehalten und anschließend getötet.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Versuches jeweils 2 Monate alt. Neben der Blutentnahme wurden Nebennieren und Gonaden asserviert (s. Tab. 2). Die Versuche erfolgten aufgrund der zirkadianen Rhythmik der Hormone gegen 16 Uhr.

Alle Tierversuche wurden von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag Aktenzeichen 2531-99-09) und gemäß den lokalen Bestimmungen und den Richtlinien des National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals durchgeführt.

Bezeichnung	Anzahl der Mäuse	Anzahl der Nebennierenproben			
		Basal-Gruppe		ACTH-Test-Gruppe	RST-Gruppe
		in PFA	in -80 °C	in -80 °C	in -80 °C
Ucn2 OE m	23	5	8	7	8
Controls m	23	4	8	7	8
Ucn2 OE w	23	5	8	7	8
Controls w	23	4	8	7	8
	92	18	32	28	32

Tab. 2: Anzahl der Ucn2 OE Mäuse bzw. Kontrolltiere (Controls) und Anzahl der Nebennierenproben unterteilt in die verschiedenen Gruppen

2.5 Genotypisierung

2.5.1 Gewinnung von genomischer DNA

Um den Genotyp der Nachkommen von SF1-Cre^{+/-} Mäusen und *R26^{stopUcn2/stopUcn2}* Mäusen zu bestimmen, war es notwendig, genomische DNA zu gewinnen. Dazu wurde bei den Mäusen im Alter von drei Wochen unter einer Kurznarkose mit Isofluran eine Schwanzbiopsie durchgeführt, indem ein ca. 3 mm großes Stück des Schwanzes mit einem Skalpell abgetrennt wurde. Zur Blutstillung wurde zum einen ein rotglühendes Skalpell zur direkten Kauterisation und zum anderen ein Fibrinkleber verwendet. Um die Mäuse im Verlauf wieder identifizieren zu können, wurde sofort nach der Biopsie an das Ohr der Maus ein Ohrclip mit eingprägter Nummer angehängt,

Die Schwanzbiopsie wurde über Nacht bei 55 °C in 600 µl TNES Puffer und 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 170 µl 6 M NaCl und 100 µl PCI (Chloroform:Isoamylalkohol = 24:1) hinzugefügt und vermischt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren konnte 700 µl Überstand abpipettiert werden. Das Ausfällen der DNA erfolgte mit 700 µl bei -20 °C vorgekühltem 95%igem Ethanol. Die DNA wurde mit einer zuvor über der Bunsenbrennerflamme verschlossenen Glaskapillare gewonnen. Nach kurzem Eintauchen in 70%iges Ethanol wurde die DNA an der Luft

getrocknet und anschließend in 100 µl TE Puffer resuspendiert. Um die DNA besser zu lösen, wurde das Gemisch bei 65 °C für 10 min erhitzt.

Im Anschluss an die Gewinnung von DNA erfolgte die Identifizierungen der Genotypen, indem zwei verschiedenen Polymerasekettenreaktionen mit anschließender Produktlängenbestimmung mittels Gelelektrophorese durchgeführt wurden.

2.5.2 Genotypisierung der SF1-Cre Mauslinie

Um die Tiere mit den Genotypen SF1-Cre^{+/-} und SF1-Cre^{-/-} unterscheiden zu können, wurden folgende Primer verwendet:

SF1 for 5'-GAG-TGA-ACG-AAC-CTG-GTC-GAA-ATC-AGT-GCG-3'

SF2 rev 5'-GCA-TTA-CCG-GTC-GAT-GCA-ACG-AGT-GAT-GAG-3'

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 40 Zyklen mit je 30 sec auf 94 °C, 30 sec auf 55 °C und 40 sec auf 72 °C.

Danach wurden die PCR-Produkte neben einer DNA-Leiter und einer Positiv-Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und für 20 min bei 100 V aufgetrennt. Bei Mäusen mit SF1-Cre Allel ist ein PCR-Produkt der Länge 407 bp detektierbar (s. Abb. 7). Dadurch können homozygote positive (SF1-Cre^{+/+}) von heterozygoten (SF1-Cre^{+/-}) Tieren nicht unterschieden werden, was aber beim aktuellen Versuch nicht relevant ist, da auch zur Zucht nur heterozygote Tiere mit dem Genotyp SF1-Cre^{+/-} verwendet wurden.

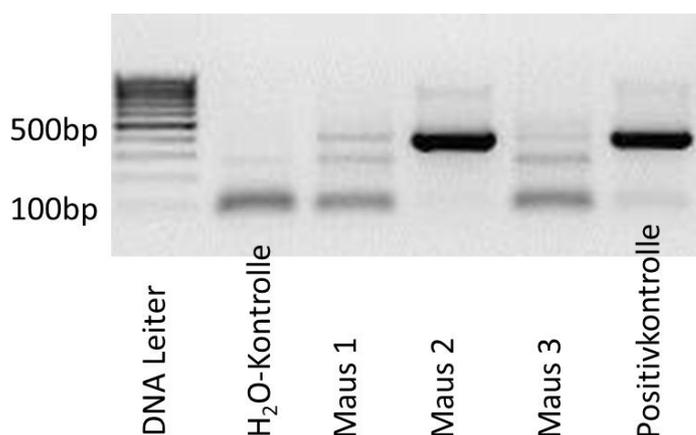


Abb. 7: Beispiel eines Agarosegels zur Genotypisierung der SF1-Cre Mäuse

Zur Genotypisierung erfolgte eine PCR mit dem Primerpaaren SF1 for und SF1 rev der jeweiligen Proben sowie einer Negativkontrolle (H₂O-Kontrolle) und einer Positivkontrolle (DNA einer Maus mit bekanntem Genotyp SF1-Cre^{+/-}) mit anschließender Visualisierung auf einem Agarosegel. In diesem Beispiel sind Maus 1 und Maus 3 negativ für SF1, während Maus 2 eine positive Bande aufweist.

2.5.3 Genotypisierung der R26 Mauslinie

Für die Genotypisierung der Mäuse aus dem R26 Stamm wurden folgende vier Primer verwendet (s. Abb. 8 und Tab. 3):

ROSA-1	5´- AAA-GTC-GCT-CTG-AGT-TGT-TAT-3´
ROSA-5	5´- TAG-AGC-TGG-TTC-GTG-GTG-TG-3´
ROSA-6	5´- GCT-GCA-TAA-AAC-CCC-AGA-TG-3´
ROSA-7	5´- GGG-GAA-CTT-CCT-GAC-TAG-GG-3´

Dabei bilden die Primerpaare ROSA-1 und ROSA-6 ein PCR-Produkt von 398 bp, das bei Mäusen mit dem Wildtyp R26 Allel exprimiert wird, d. h. bei R26^{+/+} bzw. auch R26^{+/stopUcn2}. Mausmutanten mit einer Insertion der „stopUcn2“-Kassette, d. h. Genotypen R26^{+/stopUcn2} oder R26^{stopUcn2/stopUcn2}, zeigen bei den Primerpaaren ROSA-1 und ROSA-7 ein PCR Produkt der Länge 646 bp (s. Abb. 9). Bei Zellen, in denen Cre-Rekombinase exprimiert wird (hier: Zellen, in denen der SF1-Promotor aktiviert wird), wird die Stopp-Sequenz aus dem Genom herausgeschnitten, was sich mit einem PCR-Produkt von 505 bp der Primer ROSA-1 und ROSA-5 zeigen lässt. Ohne Deletion dieser Stopp-Sequenz wäre das PCR Produkt 3174 bp lang (Rhode 2007).

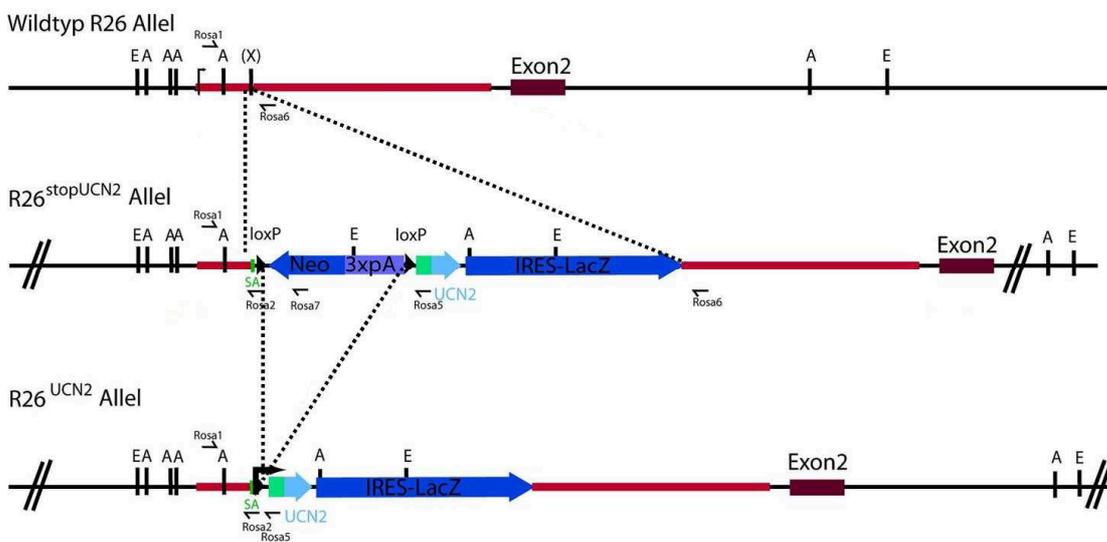


Abb. 8: Schematische Darstellung des veränderten Genlocus R26

„Wildtyp R26 Allel“ entspricht dem Genlocus vor Manipulation, „R26^{stopUcn2} Allel“ zeigt den gleichen Locus nach Insertion der „stopUcn2“-Kassette und das abgebildete „R26^{Ucn2} Allel“ entspricht dem Zustand eines mutierten Allels nach Deletion der Stopp-Kassette durch eine Cre-Rekombinase (modifiziert nach (Rhode 2007)).

Allel	Beschreibung	Primerpaare	PCR-Produkt
<i>R26⁺</i>	Wildtyp-Allel	ROSA-1/ROSA-6	398 bp
<i>R26^{stopUcn2}</i>	Mutiertes Allel (=in Zellen ohne Deletion, d. h. ohne Cre-Rekombinase)	ROSA-1/ROSA-7	646 bp
<i>R26^{Ucn2}</i>	Mutiertes Allel (=in Zellen nach Deletion, d. h. mit Cre-Rekombinase)	ROSA-1/ROSA-5	505 bp

Tab. 3: PCR-Produkte der veränderten R26-Allele mit den jeweiligen Primerpaaren

Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt je Zyklus jeweils 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Annealing bei 55 °C und 90 sec Extension bei 72 °C. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf einem 1%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt (30 min, 100 V).

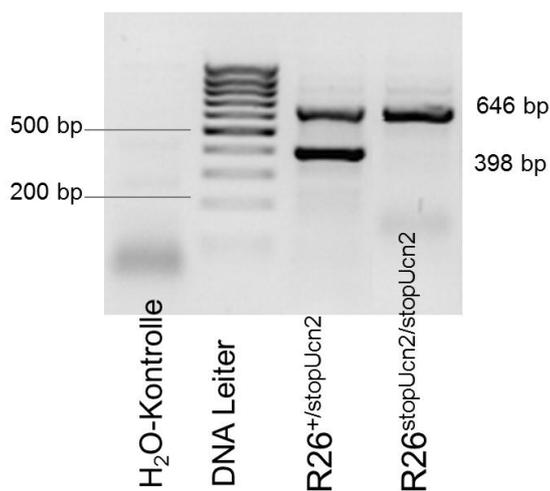


Abb. 9: Beispiel eines Agarosegels zur Genotypisierung der R26 Mauslinie

PCR der genomischen DNA von Mäusen aus der R26 Mauslinie mit den Primern ROSA-1, ROSA-5, ROSA-6 und ROSA-7 und Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese: Bei der heterozygoten Maus *R26^{+/stopUcn2}* sind PCR-Produkte der Primer ROSA-1 und ROSA-6 mit einer Länge von 398 bp sowie PCR-Produkte der Primer ROSA-1 und ROSA-7 mit der Länge 646 bp nachweisbar, dagegen zeigt sich bei der für den R26 Locus homozygoten Maus *R26^{stopUcn2/stopUcn2}* nur ein PCR-Produkt mit der Länge 646 bp.

2.6 Stresstests

Bei den Ucn2 OE Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren wurden zwei Arten von Stresstests durchgeführt: Zum einen ein ACTH-Kurztest, bei dem exogen mit Hilfe von Synacthen (Tetracosactid-hexaacetat: ACTH 1-24) eine supraphysiologische Stressantwort primär in der Nebennierenrinde erzeugt wird, und zum anderen ein Restraint-Stress-Test, bei dem die Mäuse durch die beschränkte Beweglichkeit endogen gestresst werden.

- ACTH-Stimulationstest:
Den Mäusen wurde 100 µl Synacthen intraperitoneal injiziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere getötet.
- Restraint-Stress-Test:
Die Mäuse wurden in einen kleinen Container (Volumen 200 ml) gesetzt und dort bei ausreichender Luftzufuhr für 15 min gehalten. Anschließend wurden sie ebenfalls getötet.

2.7 Blut- und Organentnahme und Gewinnung von Plasma

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend dekapitiert. Das Blut wurde direkt aus dem Torso mit einem mit EDTA (10 µl) vorbereiteten Reaktionsgefäß aufgefangen. Dieses wurde 10 min bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipetiert und bei -20 °C gelagert. Nach Eröffnung der Peritonealhöhle wurde zuerst die linke, dann die rechte Nebenniere entnommen und unter einem Stereoskop von Fett frei präpariert und im Anschluss in eine 4%ige PFA-Lösung gegeben bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Paraffin-Einbettung

Für die histologische Analyse wurden die Nebennieren der getöteten Mäuse sofort in eine 4%ige PFA Lösung eingebettet und über Nacht bei 4 °C dort belassen. Am nächsten Tag wurden die Organe für je 2 h in einer 30%igen, 50%igen, 70%igen, 96%igen und einer 100%igen Ethanol-Lösung, in einer Xylol-Lösung sowie in einer

Lösung bestehend aus Xylol und flüssigem Paraffin (Verhältnis 1:1) inkubiert. Nach der Einbettung in flüssigem Paraffin über Nacht bei 60 °C erfolgte die Einlagerung der Proben in Paraffin-Blöcke.

An einem Rotationsmikrotom (Microm) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die im Wasserbad (40 °C) geglättet, auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet wurden.

2.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Paraffinschnitte der Nebennieren wurden als erstes in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert (2fach Xylol, 2fach 100%igen Ethanol, 2fach 96%igen Ethanol, 2fach Aqua dest.; jeweils 3 min). Die Färbung erfolgte daraufhin mit Hämatoxylin (5 sec), die Bläuung durch Spülung mit Aqua dest. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in mit konzentrierter Essigsäure (1 ml auf 100 ml Eosin) angesäuerten Eosin Y für 5 sec eingetaucht. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte jeweils für 30 sec in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert (2fach 96%igen Ethanol, 2fach 100%igen Ethanol, 2fach Xylol). Abschließend wurden die Schnitte mit Mounting Medium (Microm) und einem Deckglas bedeckt.

2.8.3 Quantifizierung der Flächen von Nebennierenschnitten

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Leica DMRB in einer 50er Auflösung betrachtet und mit der Kamera Spot Insight QE (Visitron Systems) fotografiert. Um Rückschlüsse auf die Größen der Nebennieren ziehen zu können und das Verhältnis von Rinde zu Mark beurteilen zu können, wurden jeweils vier zentrale Schnittbilder einer Nebenniere von mindestens drei Mäusen eines Genotyps mit dem Programm SpotAdvanced™ Software (Spot, Burroughs) ausgemessen. Hierbei wurde zum einen die Schnittfläche der gesamten Nebenniere und zum anderen die Schnittfläche von Nebennierenmark und –rinde bestimmt und das Verhältnis von Rinde zu Mark berechnet.

2.8.4 Quantifizierung der zellulären Hypertrophie bzw. Hypertrophie

Um eine Quantifizierung auf zellulärer Ebene zu ermöglichen, wurden die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte mit dem Mikroskop Leica DMRB in einer 400er Auflösung betrachtet und mit der Kamera Spot Insight QE (Visitron Systems) fotografiert. Auf je drei 16,26 cm x 21,68 cm großen Bildern eines Schnittes wurden in dem äußeren Bereich der Nebennierenrinde, was der Zona glomerulosa entspricht, und dem inneren

Teil der Nebennierenrinde, entsprechend der Zona fasciculata, drei 3 cm x 3 cm große Ausschnitte ausgewählt und dort die Kerne gezählt – diese drei Ausschnitte wurden zusammen als ein Highpowerfield bezeichnet. Aus den drei Highpowerfields pro Schnitt wurde jeweils der Mittelwert mit der Einheit nuclei per Highpowerfield (ncl/hpf) ermittelt. Zu bemerken ist, dass eine erhöhte Zellkernzahl pro Highpowerfield einer zellulären Hypotrophie und eine erniedrigte einer zellulären Hypertrophie des Gewebes entspricht, da die Menge der extrazellulären Matrix zwischen den Schnitten vergleichbar ist. In der Nebennierenrinde wird eine Verringerung des Zytoplasmas als ein Indikator für eine verringerte funktionale Aktivität der Zellen gewertet.

2.8.5 PCNA-Färbung

Um die Proliferationsrate der Nebennieren beurteilen zu können, wurde neben der quantitativen Beurteilung mit Hilfe der Messung des Expressionslevel für Cyclin D1 (s.u.) eine PCNA-Färbung durchgeführt, um die Proliferation auch qualitativ darstellen zu können. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden rehydriert. Zur Demaskierung von Epitopen wurden die Schnitte für 15 min auf 100 °C in 10 mM Citratpuffer (pH=6,0) in der Mikrowelle erhitzt. Durch die anschließende Behandlung in einer Methanol-Lösung mit 0,3% H₂O₂ für 10 min werden endogene Peroxidasen blockiert, die zu einer erhöhten Hintergrundfärbung führen können. Zur Verringerung der benötigten Inkubationslösung wurden die Nebennierenschnitte auf dem Objektträger mit einem speziellen Fettstift eingekreist. Diese Bereiche wurden in Blocking Buffer Lösung für 15 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit dem auf 1:100 in Blocking Solution verdünnten PCNA-Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer behandelt. Am nächsten Tag erfolgte nach Waschen mit PBS für 15 min die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Kaninchen-IgG für 30 min, der zuvor in Blocking Buffer 1:200 verdünnt wurde. Um die Immunfärbung sichtbar zu machen, wurde das Vectastain Elite ABC Kit, das auf der Avidin-Biotin-Komplex-Methode beruht, nach Anweisungen des Herstellers verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde für 5 min hinzugegeben, dann wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt. Nach Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung erfolgte die Einbettung mit einem Kunstharz.

2.9 Molekularbiologische Untersuchungen

2.9.1 RNA Extraktion

Aus den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Maus-Nebennieren wurde die gesamte zelluläre RNA extrahiert. Um eine ausreichende Menge an mRNA zu bekommen, wurden meist jeweils die beiden Nebennieren einer Maus vor der Extraktion gepoolt und noch in gefrorenem Zustand mit einem Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde mit dem Promega SV Isolation System nach den Anweisungen des Herstellers gearbeitet. Die Bestimmung der Konzentration der mit nukleasefreiem Wasser verdünnten RNA erfolgte mittels photometrischen Messungen (NanoDrop). Die Integrität der extrahierten RNA wurde mit Hilfe der Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. $2\text{ }\mu\text{l}$ RNA von jeder Probe wurden mit $8\text{ }\mu\text{l}$ Aqua dest. verdünnt und mit $3\text{ }\mu\text{l}$ des Ladepuffers vermischt. Dies wurde – neben $3\text{ }\mu\text{l}$ DNA-Leiter – jeweils in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Nach 40 min bei 110 V konnten die RNA-Banden unter einer UV-Kamera (254 nm) betrachtet werden. Bei intakter RNA erscheinen zwei deutlich getrennte und abgrenzbare Banden, die die ribosomale RNA 28S und 18S darstellen.

2.9.2 cDNA Synthese

Die isolierte Einzelstrang-RNA wurde mittels einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. 500 ng der Gesamt-RNA ($12\text{ }\mu\text{l}$) wurde 5 min mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Oligo-dT-Primer (Promega) bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend auf Eis (10 min) gelegt. Daraufhin wurden zu jeder Probe $1,25\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs (Promega), $1\text{ }\mu\text{l}$ RNase Inhibitor RNAsin (Promega), $5\text{ }\mu\text{l}$ mitgelieferter Reaktionspuffer (Promega), $1\text{ }\mu\text{l}$ MML-V (Promega) sowie $3,75\text{ }\mu\text{l}$ Wasser hinzugefügt. Diese Mischung wurde bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min erhitzt, bei $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 50 min und zuletzt bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min.

2.9.3 Real-time PCR

Die Quantifizierung der mRNA-Level von StAR (steroidogenic acute regulatory protein), Cyp11a1 (cholesterol side-chain cleavage enzyme) und Cyp11b2 (Aldosteronsynthase) zusammen mit β -actin als housekeeping-Gen erfolgte für die Ucn KO Mäuse mit dem LightCycler (Roche) Real Time PCR Maschine. Als Kit wurde FastStart DNA Master SYBR Green I verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers gearbeitet. Die Präinkubation erfolgte bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min, gefolgt von der Amplifikation mit 40 Zyklen bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 sec, der Primer-abhängigen Annealing Temperatur (s. Tab. 4) für 5 sec sowie der Extension bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Extensionszeit wurde über die Länge des

PCR Produkts (bp) dividiert durch 25 kalkuliert. Für die Schmelzkurve erfolgte ein Temperaturanstieg von 0,1 °C pro sec im Bereich 65 °C bis 95 °C.

Die Expression von Cyp11b1 (11 β -Hydroxylase), Th (Tyrosinhydroxylase), Pnmt (Phenylethanolamin N-Methyltransferase), CcnD (CyclinD) sowie β -actin in den Ucn KO Mäusen wurde mit Hilfe des Fast EVA Green Supermix (Biorad Laboratories Berkley, CA) in der Mx3000P QPCR System Maschine (Stratagene, La Jolla, CA) gemessen. Ebenso erfolgte die Quantifizierung der Expressionslevel von Ucn2 sowie aller bereits genannten Gene in den Ucn2 OE Mäusen mit diesem System. Auch hier erfolgte die Präinkubation bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 10 sec, bei Annealing Temperatur für 30 sec (siehe Tab. 4) sowie bei 72 °C für 30 sec. Die Schmelzkurve wurde auch hier zwischen 65 °C und 95 °C aufgezeichnet mit einem Temperaturanstieg von 0,1 °C pro sec. Bei den Genen Hsd3b sowie Cyp11b1 wurde eine two-step PCR unter Auslassung des 72 °C Schrittes durchgeführt.

Gene		Primersequenzen	Annealing-Temperatur (°C)
b-actin¹	Fwd	TCATGAAGTGACGTGGACATCC	56 °C
	Rev	CCTAGAAGCATTGCGGTGGACGATG	
b-actin²	Fwd	ACCCGCGAGCACAGCTTCTT	60 °C
	Rev	TCTGGGCCTCGTCACCCACATA	
StAR	Fwd	GACCTTGAAAGGCTCAGGAAGAAC	60 °C
	Rev	TAGCTGAAGATGGACAGACTTGC	
Cyp11a1	Fwd	AGGACTTTCCCTGCGCT	53 °C
	Rev	GCATCTCGGTAATGTTGG	
Cyp11b2	Fwd	CAGGGCCAAGAAAACCTACA	63 °C
	Rev	ACGAGCATTGGAAGCACCT	
Cyp11b1	Fwd	GGTCGTCCACAGTCCTGGAGT	63 °C
	Rev	ACCAACAGGATAGAGCCTCAAGGT	
Hsd3b	Fwd	AAGGAGGAATTCTCCAAGCTG	60 °C
	Rev	GAGCTGCAGAAGATGAAGGC	
Th	Fwd	TGCAGGGCTGCTGTCTTCCTAT	60 °C
	Rev	TTCACAGAGAATGGGCGCTGGA	
Pnmt	Fwd	GTGAAGCGAGTCCTGCCTATC	60 °C
	Rev	AAGATGCCTTTGACATCATCTACC	
Ccnd1	Fwd	AGCAGACCATCCGCAAGCAT	60 °C
	Rev	AAGTGCGTTGTGCGGTAGCA	

Ucn2	Fwd	GTGGGCACTGGTGGTGTTCGT	60 °C
	Rev	GGCGGCCAACATGGGCTAGT	

¹ verwendete Primer für das housekeeping-Gen β -actin in Ucn KO Mäusen

² verwendete Primer für das housekeeping-Gen β -actin in Ucn2 OE Mäusen

Tab. 4: Sequenzen der verwendeten Primer

2.10 Messung von Hormonkonzentrationen im Plasma

2.10.1 Corticosteron

Die Messung der Hormonkonzentrationen von Corticosteron im Serum erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Kits „Corticosterone HS EIA“ von IDS. Dieser verwendet das Prinzip eines kompetitiven Immunoassays. An den auf der Mikrotiterplatte befestigten Anti-Corticosteron-Antikörper versuchen konkurrierend die Corticosteron-Moleküle der Serumproben bzw. der Standardproben und ein hinzugegebenes biotinyliertes Corticosteron zu binden. Nach Waschen und Hinzufügen von HRP (horseradish peroxidase)-markiertem Streptavidin sowie des Substrats TMB (Tetramethylbenzidin) kann über die Intensität der Farbe und einer Standardkurve indirekt die Konzentration von Corticosteron der Serumprobe ermittelt werden. Die Konzentration verhält sich hierbei indirekt proportional zur Farbintensität. Vor der Messung wurden die Serumproben jeweils 1:30 mit Aqua dest. verdünnt. Ansonsten wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die jeweils erforderlichen Waschschrte wurden mit dem Mikroplattenwascher der Firma Tecan (Crailsheim) durchgeführt. Das abschließende Auslesen erfolgte im SPECTRA Mikroplattenreader der Firma Tecan (Crailsheim).

2.10.2 ACTH

Zur Messung von ACTH wurde der Kit ACTH ELISA von Biomerica verwendet. Hierfür wurden die EDTA-Plasmaproben 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, um in den messbaren Konzentrationsbereich zu gelangen. Der Kit basiert auf einem two-site ELISA, d. h. es wird ein biotinylierter Antikörper gegen das C-terminale ACTH verwendet und ein HRP (horseradish peroxidase)-konjugierter Antikörper gegen das N-terminale ACTH. Auf einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte ergeben sich also folgende Bindungen: Streptavidin \leftarrow biotinylierter Anti-ACTH-Antikörper \leftarrow ACTH \leftarrow HRP-konjugierter Anti-ACTH-Antikörper. Bei Zugabe des Substrats TMB (Tetramethylbenzidin) steigt die Intensität der gelben Farbe folglich proportional mit der Konzentration des ACTH. Über

Kalibratoren lässt sich die ACTH-Konzentration der Serumproben damit berechnen. Es wurde genauestens nach den Anweisungen des Herstellers gearbeitet.

2.10.3 Ucn2

Um die Hormonkonzentrationen von Ucn2 zu bestimmen, wurde ebenso ein kommerzielles Kit von BioVendor verwendet, basierend auf einem kompetitiven Immunoassay. Auch hier mussten die Serumproben 1:5 verdünnt werden. Das Prinzip verläuft ähnlich wie bei der Messung von Corticosteron. Lediglich als Substrat wird OPD (alpha-Phenylendiamindihydrochlorid) anstatt TMD verwendet. Auch hier kann wieder über die Intensität der Farbe indirekt die Konzentration von Ucn2 der Serumprobe ermittelt werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Excel (Microsoft Office 2010) durchgeführt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem t-Test überprüft, wobei das Signifikanzniveau mit 5 % definiert wurde. Signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden in den Graphiken mit * markiert, falls $p < 0,01$ mit ** und falls $p < 0,001$ mit ***. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kontrollen 100 % gesetzt und die Proben hierzu in Relation. In den Graphiken ist der Mittelwert \pm Standardfehler eingezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Urocortin Knock-out Mäuse (Ucn KO)

Die Ergebnisse sind nach den jeweiligen Genotypen geordnet und werden mit den entsprechenden Wildtyp Mäusen verglichen (s. Abb. 10 und Abb. 11).

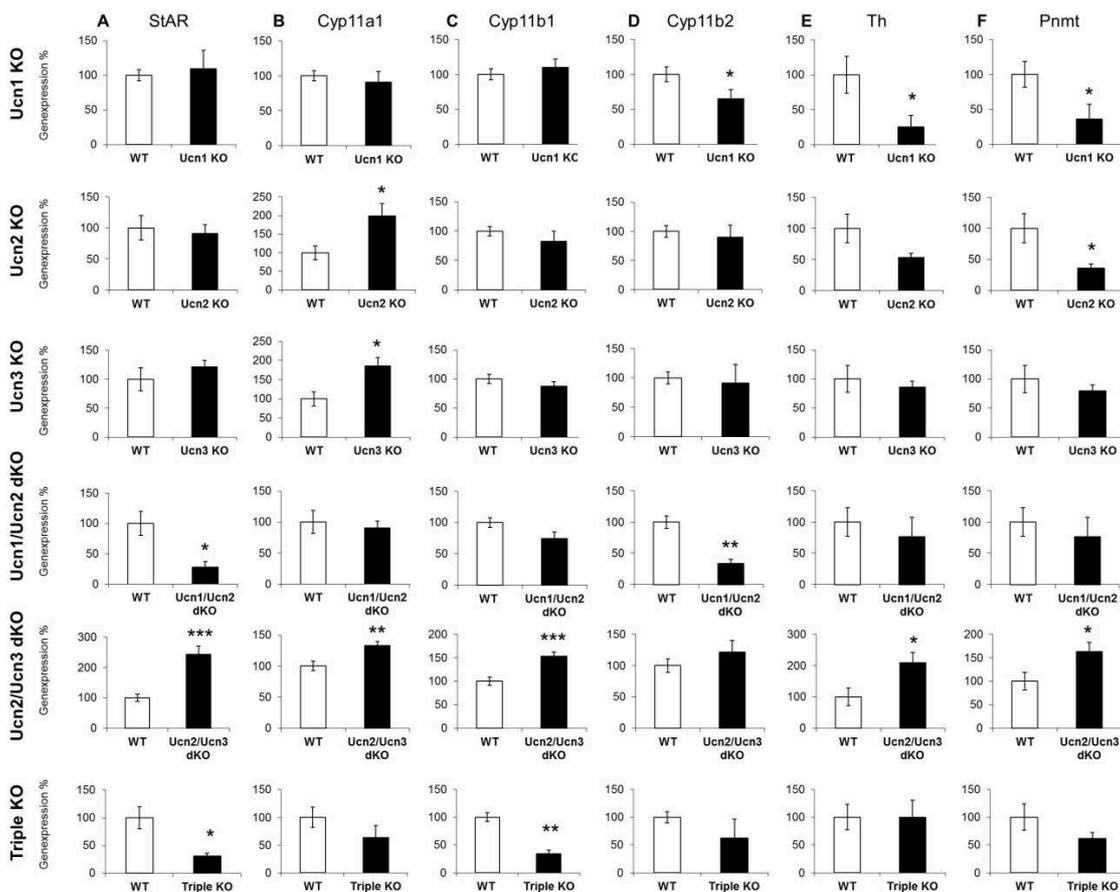


Abb. 10: Vergleich der Expression der Enzyme der Steroidbiosynthese und Katecholaminsynthese in der Nebenniere zwischen WT Mäusen und den verschiedenen KO Mäusen

Messung der Expression der Enzyme der Steroidbiosynthese mit StAR (A), Cyp11a1 (B), Cyp11b1 (C) und Cyp11b2 (D) sowie der Katecholaminsynthese mit Th (E) und Pnmt (F).

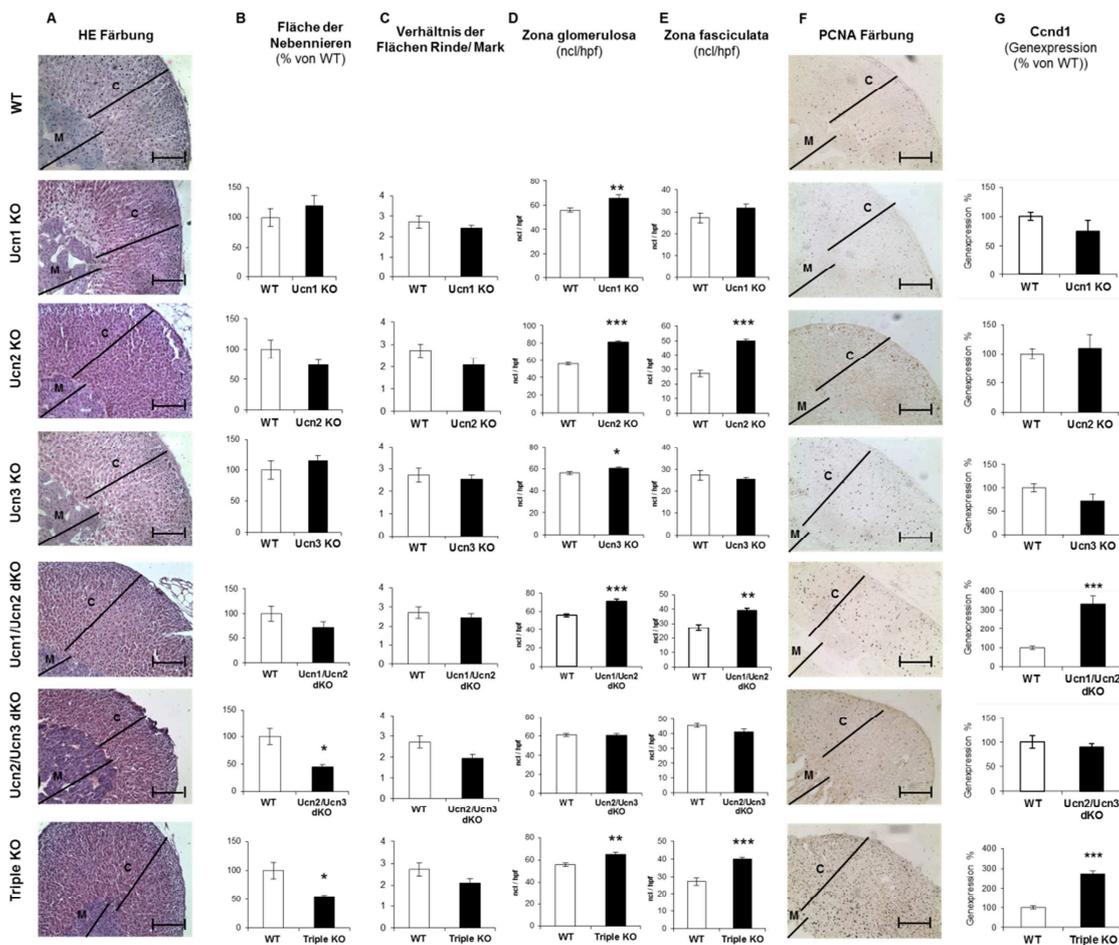


Abb. 11: Morphometrische Daten der UcnKO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen

A: Repräsentative HE-Färbungen aus der Mitte der Nebennieren von allen untersuchten Genotypen. **B, C:** Fläche der Nebenniere sowie das Verhältnis der Fläche Rinde zu Mark. **D, E:** Zellen pro Highpowerfield (ncl/hpf) der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata. **F:** Repräsentative PCNA-Färbungen aus zentralen Schnitten der Nebenniere. **G:** Vergleich der Expression von Cyclin D (Ccnd1) zwischen UcnKO Mäusen und WT Mäusen (entsprechen 100%).

(M: Nebennierenmark, C: Nebennierenrinde, Skalierungsbalken entspricht 50 µm)

3.1.1 Ucn1 KO Mäuse

Die Fläche von zentralen Schnitten der Nebenniere von Ucn1 KO Mäusen und das Verhältnis der Fläche von Rinde zu Mark wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den WT Mäusen auf (Fläche: $119,8 \pm 16,6$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p=0,82$; Rinde/Mark: $2,42 \pm 0,13$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p=0,46$). Morphometrische Untersuchungen der Zona glomerulosa zeigten hingegen eine signifikante Erhöhung der Zellkernzahl pro

Highpowerfield (ncl/hpf) in Ucn1 KO Mäusen ($65,6 \pm 2,6$ ncl/hpf; $p < 0,001$) im Vergleich zu altersentsprechenden WT ($55,9 \pm 1,5$ ncl/hpf), was einer zellulären Hypotrophie entspricht. In der Zona fasciculata konnten keine strukturellen Unterschiede im Vergleich zu WT Tieren beobachtet werden ($31,9 \pm 5,3$ ncl/hpf vs. $27,2 \pm 2,2$ ncl/hpf; $p = 0,12$). Auf molekularer Ebene wiesen Ucn1 KO Mäuse einen signifikanten Abfall der Cyp11b2 Expression ($65,1 \pm 13,5$ % vs. $100,0 \pm 10,7$ %; $p < 0,05$) auf, aber unterschieden sich in der Expression von StAR ($109,0 \pm 26,7$ vs. $100,0 \pm 7,9$; $p = 0,75$), Cyp11a1 ($91,2 \pm 15,2$ % vs. $100,0 \pm 7,3$ %; $p = 0,61$) und Cyp11b1 ($110,2 \pm 4,6$ % vs. $100,0 \pm 7,9$ %; $p = 0,35$) nicht von den WT Mäusen. Untersuchungen der Expressionslevel für Enzyme, die im Nebennierenmark für die Katecholaminsynthese verantwortlich sind, zeigten signifikant niedrigere Expressionswerte für Th ($25,2 \pm 16,7$ % vs. $100,0 \pm 26,4$ %; $p < 0,05$) und Pnmt ($35,9 \pm 21,3$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p < 0,05$) der Ucn1 KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen. Bezüglich der Zellproliferation, die durch immunohistochemische Färbungen mit einem PCNA-Antikörper untersucht wurde, unterschieden sich die zwei Gruppen nicht. Auch in der Aktivität im Zellzyklus, gemessen durch die Ccnd1 Expression, konnten keine Unterschiede beobachtet werden ($74,3 \pm 19,1$ % vs. $100,0 \pm 6,6$ %; $p = 0,14$).

3.1.2 Ucn2 KO Mäuse

Ucn2 KO Mäuse hatten im Vergleich zu WT Tieren eine signifikant höhere Zellzahl pro hpf in beiden Zonen der Nebennierenrinde (Zona glomerulosa: $81,3 \pm 1,1$ ncl/hpf vs. $55,9 \pm 1,5$ ncl/hpf; $p < 0,001$; Zona fasciculata: $49,8 \pm 1,2$ ncl/hpf vs. $27,2 \pm 2,2$ ncl/hpf; $p < 0,001$). Im Gegensatz zu dieser zellulären Hypotrophie zeigten sich keine Unterschiede in der Fläche der Nebenniere ($74,0 \pm 8,0$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p = 0,11$) und dem Verhältnis von Rinde zu Mark ($2,05 \pm 0,30$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p = 0,19$) zwischen Ucn2 KO Tieren und den Kontrollen. Auf molekularer Ebene konnte ein beachtlicher Anstieg der Cyp11a1 Expression in Ucn2 KO Tieren beobachtet werden ($198,6 \pm 33,4$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Veränderung in den Expressionsleveln von StAR ($91,0 \pm 14,2$ % vs. $100,0 \pm 19,8$ %; $p = 0,74$), Cyp11b1 ($82,7 \pm 17,3$ % vs. $100,0 \pm 7,9$ %; $p = 0,37$) und Cyp11b2 ($89,6 \pm 21,1$ % vs. $100,0 \pm 10,1$ %; $p = 0,65$). Bezüglich des Nebennierenmarks fand sich eine signifikant erniedrigte Pnmt Expression in Ucn2 KO Mäusen ($35,7 \pm 6,8$ % vs. $100,0 \pm 23,4$ %; $p < 0,05$), wobei sich in der Expression von Th keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zeigten ($53,1 \pm 6,9$ % vs. $100,0 \pm 23,1$ %; $p = 0,13$), jedoch der gleiche Trend. Ebenso konnte keine Veränderung der Ccnd1 Expression in den Ucn2 KO im Vergleich zu WT Mäusen beobachtet werden ($109,6 \pm 23,3$ % vs. $100,0 \pm 8,4$ %; $p = 0,67$).

3.1.3 Ucn3 KO Mäuse

Strukturelle Analysen der Nebennierenrinde von Ucn3 KO Mäusen zeigten eine höhere Zellkernzahl pro hpf in der Zona glomerulosa im Vergleich zu WT Tieren ($60,5 \pm 1,2$ ncl/hpf vs. $55,9 \pm 1,5$ ncl/hpf; $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu war die Zellzahl in der Zona fasciculata ($25,5 \pm 0,8$ ncl/hpf vs. $27,2 \pm 2,2$ ncl/hpf; $p = 0,47$) sowie die Größe der Nebenniere ($114,4 \pm 8,5$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p = 0,98$) und das Verhältnis Rinde zu Mark ($2,54 \pm 0,16$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p = 0,66$) zwischen den beiden Gruppen vergleichbar. Ebenso unterschieden sich die Expressionslevel von StAR ($121,3 \pm 11,0$ % vs. $100,0 \pm 19,8$ %; $p = 0,41$), Cyp11b1 ($87,4 \pm 8,4$ % vs. $100,0 \pm 7,9$ %; $p = 0,33$) und Cyp11b2 ($91,1 \pm 31,4$ % vs. $100,0 \pm 10,1$ %; $p = 0,77$) nicht zwischen Ucn3 KO und WT Mäusen. Jedoch konnte eine erhöhte Cyp11a1 Expression in Ucn3 KO Tieren beobachtet werden ($185,1 \pm 22,1$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p < 0,05$). Th ($86,0 \pm 10,3$ % vs. $100,0 \pm 23,1$ %; $p = 0,64$) und Pnmt ($79,1 \pm 10,6$ % vs. $100,0 \pm 23,4$ %; $p = 0,50$) zeigten keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen. Allerdings fand sich ein Trend zu niedrigeren Werten von Ccnd1 ($71,5 \pm 14,9$ % vs. $100,0 \pm 8,4$ %; $p = 0,07$) in Ucn3 KO Mäusen, aber keine Veränderungen in der Proliferationsrate bei der Auswertung der PCNA-Färbung.

3.1.4 Ucn1/Ucn2 dKO Mäuse

Ucn1/Ucn2 dKO Mäuse unterschieden sich in der Größe der Nebenniere ($72,3 \pm 12,0$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p = 0,10$) und dem Verhältnis von Nebennierenrinde zu -mark ($2,44 \pm 0,21$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p = 0,47$) nicht von den WT-Mäusen. Im Gegensatz dazu hatten Ucn1/Ucn2 dKO Mäuse eine signifikant erhöhte Zellzahl pro hpf sowohl in der Zona glomerulosa ($71,2 \pm 2,1$ ncl/hpf vs. $55,9 \pm 1,5$ ncl/hpf; $p < 0,001$) als auch in der Zona fasciculata ($39,1 \pm 1,5$ ncl/hpf vs. $27,2 \pm 2,2$ ncl/hpf; $p < 0,01$), was auf eine zelluläre Hypotrophie der gesamten Nebennierenrinde hindeutet. Außerdem zeigten sich signifikant verringerte Expressionslevel von StAR ($28,1 \pm 9,0$ % vs. $100,0 \pm 19,8$ %; $p < 0,05$) und Cyp11b2 ($33,5 \pm 7,0$ % vs. $100,0 \pm 10,1$ %; $p < 0,01$), wohingegen in der Expression von Cyp11a1 ($90,5 \pm 11,0$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p = 0,70$) und Cyp11b1 ($74,0 \pm 10,8$ % vs. $100,0 \pm 7,9$ %; $p = 0,10$) keine Unterschiede zwischen Ucn1/Ucn2 dKO Tieren und den entsprechenden WT Mäusen zu sehen waren. Auch die Expressionslevel von Th ($76,4 \pm 31,0$ % vs. $100,0 \pm 23,1$ %; $p = 0,57$) und Pnmt ($60,7 \pm 13,9$ % vs. $100,0 \pm 23,4$ %; $p = 0,31$) blieben bei Ucn1/Ucn2 dKO unverändert. Bei den Ucn1/Ucn2 dKO Mäusen konnte eine gesteigerte Zellproliferation mit erhöhtem Ccnd1 ($333,4 \pm 42,2$ % vs. $100,0 \pm 8,4$ %; $p < 0,001$) und einer intensivierten PCNA-Färbung in der gesamten Nebenniere beobachtet werden.

3.1.5 Ucn2/Ucn3 dKO Mäuse

Mäuse mit fehlendem Ucn2 und Ucn3 zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mikroskopischen Struktur sowohl in der Zona glomerulosa ($60,9 \pm 2,0$ ncl/hpf vs. $61,3 \pm 1,4$ ncl/hpf; $p=0,85$) als auch in der Zona fasciculata ($40,9 \pm 2,1$ ncl/hpf vs. $45,4 \pm 1,3$ ncl/hpf; $p=0,10$). Allerdings fanden sich kleinere Nebennieren ($45,2 \pm 4,5$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p < 0,05$) mit einem unveränderten Rinde/Mark-Verhältnis ($1,93 \pm 0,19$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p=0,10$). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant erhöhte Expression von StAR ($242,7 \pm 28,4$ % vs. $100,0 \pm 12,7$ %; $p < 0,001$), Cyp11a1 ($132,7 \pm 6,7$ % vs. $100,0 \pm 7,3$ %; $p < 0,01$) und Cyp11b1 ($153,6 \pm 8,1$ % vs. $100,0 \pm 8,6$ %; $p < 0,001$) beobachtet werden. Cyp11b2 Werte unterschieden sich nicht zwischen Ucn2/Ucn3 dKO Mäusen und WT Kontrollen ($121,3 \pm 18,8$ % vs. $100,0 \pm 10,7$ %; $p=0,37$). Ucn2/Ucn3 dKO Mäuse zeigten eine gesteigerte Expression der Enzyme Th ($209,1 \pm 32,3$ % vs. $100,0 \pm 28,5$ %; $p < 0,05$) und Pnmt ($162,6 \pm 19,8$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p < 0,05$). Sowohl bei der Quantifizierung der Ccnd1 mRNA ($89,4 \pm 7,0$ % vs. $100,0 \pm 13,3$ %; $p=0,52$) als auch bei der PCNA-Färbung konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden.

3.1.6 Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO Mäuse

Morphometrische Untersuchungen zufolge hatten Nebennieren der untersuchten Triple KO Mäuse eine signifikant erhöhte Zellzahl pro hpf in der Zona glomerulosa ($64,8 \pm 1,9$ ncl/hpf vs. $55,9 \pm 1,5$ ncl/hpf; $p < 0,01$) und in der Zona fasciculata ($40,0 \pm 0,9$ ncl/hpf vs. $27,2 \pm 2,2$ ncl/hpf; $p < 0,001$). Neben der zellulären Hypotrophie konnte ebenso eine kleinere Schnittfläche bei Nebennieren der Triple KO Tieren festgestellt werden ($55,4 \pm 1,9$ vs. $100,0 \pm 14,7$; $p < 0,05$), wobei das Verhältnis von Rinde zu Mark konstant blieb ($2,09 \pm 0,20$ vs. $2,72 \pm 0,30$; $p=0,13$). Ebenso konnte eine signifikant verminderte Expression von StAR ($31,3 \pm 4,6$ % vs. $100,0 \pm 19,8$ %; $p < 0,05$) und Cyp11b1 ($33,9 \pm 6,8$ % vs. $100,0 \pm 7,9$ %; $p < 0,01$) in Triple KO Tieren beobachtet werden; die Expression von Cyp11b2 ($62,0 \pm 34,2$ % vs. $100,0 \pm 10,1$ %; $p=0,23$) und Cyp11a1 ($63,0 \pm 22,7$ % vs. $100,0 \pm 18,6$ %; $p=0,29$) zeigten den gleichen Trend, verfehlten aber das statistische Signifikanzniveau. Bei den Enzymen Th und Pnmt des Nebennierenmarks unterschieden sich die Expressionslevel zwischen Triple KO und WT Mäusen nicht (Th: $99,53 \pm 30,75$ % vs. $100,0 \pm 23,09$ %; $p=0,99$; Pnmt: $61,5 \pm 11,2$ % vs. $100,0 \pm 23,4$ %; $p=0,38$). In den Triple KO Mäusen konnte eine deutlich gesteigerte Expression des Zellzyklusprotein Ccnd1 ($272,6 \pm 14,3$ % vs. $100,0 \pm 8,4$ %; $p < 0,001$) ebenso wie eine gesteigerte PCNA-Färbung beobachtet werden.

3.2 Urocortin2 überexprimierende Mäuse (Ucn2 OE)

Die Ergebnisse werden getrennt nach den drei verschiedenen Konditionen (Basal-Bedingungen, nach ACTH-Stimulationstest und nach Restraint-Stress-Test) beschrieben.

3.2.1 Nachweis der Ucn2 Überexpression

Die Bestätigung der Ucn2 Überexpression in Ucn OE Mäusen beider Geschlechter erfolgte in drei Schritten.

Als Voraussetzung einer Ucn2 Überexpression erfolgte zuerst der Nachweis der Deletion der Stopp-Sequenz mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese aus cDNA der Nebennieren. Bei Ucn2 OE Tieren zeigte sich bei Kombination der Primer ROSA-1 und ROSA-5 eine Bande bei 505 bp und somit der Hinweis auf die Deletion der Stopp-Sequenz vor der Ucn2-Sequenz durch die Cre-Rekombinase. Bei Kontrollmäusen war die Bande bei 505 bp nicht zu sehen, was einer fehlenden Deletion entspricht (s. Abb. 12).

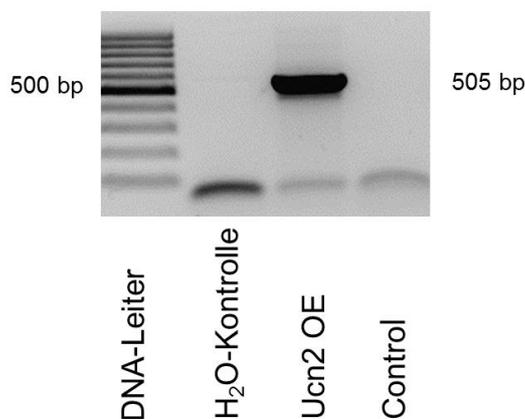


Abb. 12: cDNA aus der Nebenniere einer Ucn2 OE Maus und einer Control-Maus PCR mit dem Primerpaar ROSA-1 und ROSA-5 und anschließende Gelelektrophorese. Bei der cDNA aus der Nebenniere einer Ucn2 OE Maus (R26+/stopUcn2 SF1-Cre+/-) zeigt sich im Gegensatz zu einer Control-Maus (R26+/stopUcn2 SF1-Cre-/-) ein PCR Produkt bei 505 bp.

Als zweiter Schritt erfolgte die Quantifizierung der Ucn2 mRNA aus cDNA der Nebennieren mittels rtPCR. Hier zeigte sich eine hochsignifikante Überexpression von Ucn2 bei Mäusen unter Basal-Bedingungen ($w: 2355,7 \pm 306,4 \%$ vs. $100,0 \pm 16,2 \%$;

Ergebnisse

$p < 0,001$; $m: 2436,0 \pm 240,5 \%$ vs. $100,0 \pm 14,0 \%$; $p < 0,001$), nach ACTH-Stimulationstest ($w: 2466,8 \pm 298,1 \%$ vs. $100,0 \pm 23,1 \%$; $p < 0,001$; $m: 1804,4 \pm 160,1 \%$ vs. $100,0 \pm 13,1 \%$; $p < 0,001$) und nach Restraint-Stress-Test ($w: 2828,8 \pm 255,9 \%$ vs. $100,0 \pm 13,8 \%$; $p < 0,001$; $m: 2038,5 \pm 170,7 \%$ vs. $100,0 \pm 19,9 \%$; $p < 0,001$).

Als dritter Schritt wurden die Ucn2-Konzentrationen im Plasma von Mäusen unter Basal-Bedingungen sowie nach ACTH-Test gemessen (s. Abb. 13). Unter Basal-Bedingungen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Ucn2-Konzentration im Plasma bei Ucn2 OE Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren ($w: 6,7 \pm 0,9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ vs. $1,5 \pm 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $p < 0,001$; $m: 4,8 \pm 0,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ vs. $2,0 \pm 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $p < 0,001$). Dagegen war bei den durch ACTH-Test stimulierten Tieren nur bei weiblichen Ucn2 OE Mäusen die Konzentration von Ucn2 im Plasma signifikant erhöht ($w: 3,8 \pm 1,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ vs. $1,9 \pm 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $p = 0,07$; $m: 5,2 \pm 0,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ vs. $2,4 \pm 0,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $p < 0,01$).

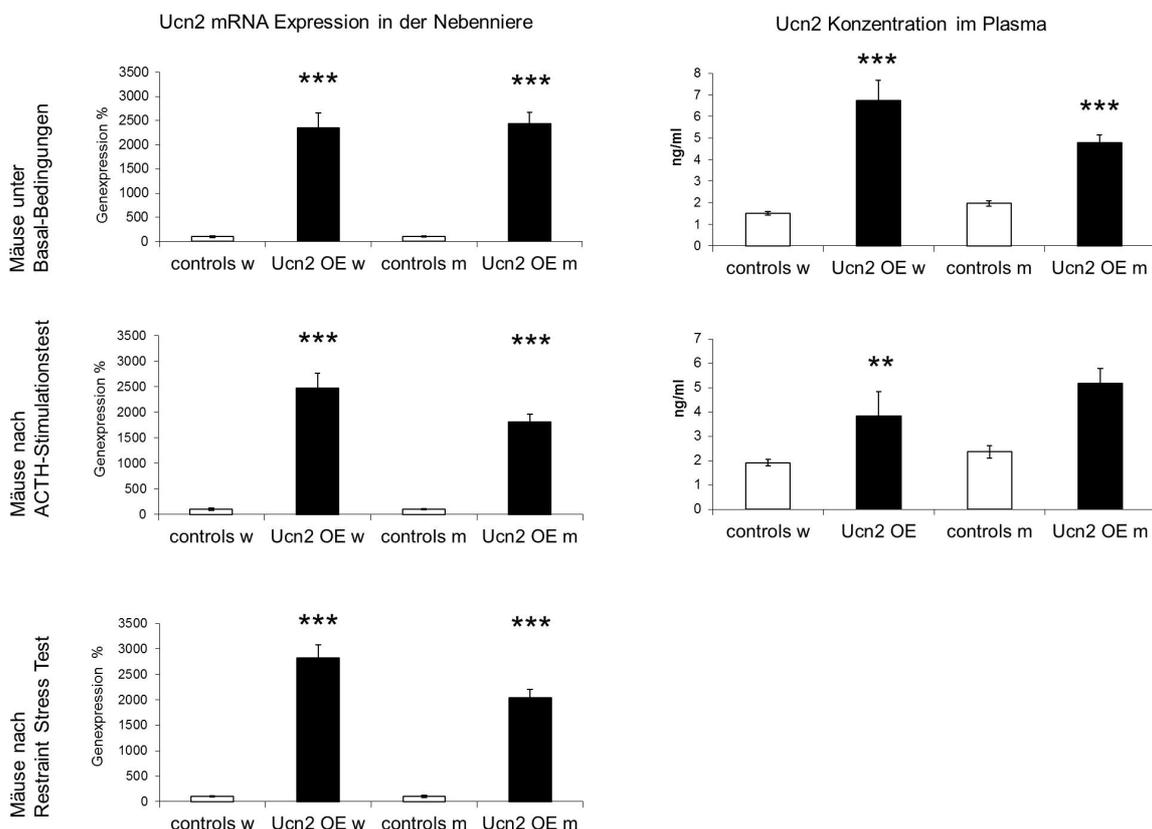


Abb. 13: Nachweis der Expression von Ucn2 mRNA in der Nebenniere und Ucn2-Konzentration im Plasma

In den Ucn2 OE Mäusen zeigten sich sowohl hoch signifikant erhöhte Werte für die Expression von Ucn2 mRNA in den Nebennieren als auch gesteigerte Konzentrationslevel von Ucn2 im Plasma.

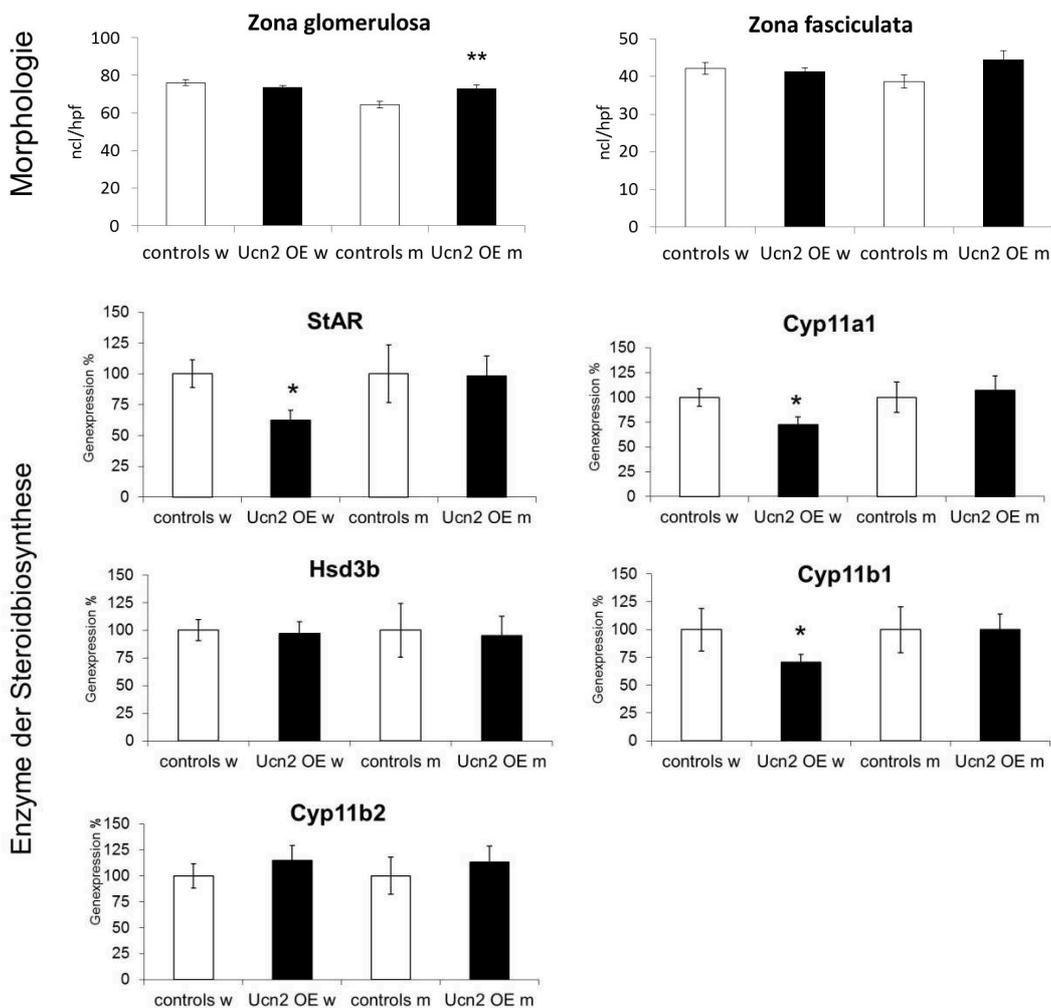
3.2.2 Ucn2 OE Mäuse unter Basal-Bedingungen

Je Geschlecht wurden acht Kontrolltiere sowie acht Ucn2 OE Mäuse unter Basal-Bedingungen im Alter von zwei Monaten untersucht. Um die Effekte der Ucn2 Überexpression auf die Steroidbiosynthese zu messen, wurden real-time PCRs mit folgenden Enzymen durchgeführt: StAR, Cyp11a1, Hsd3b, Cyp11b1 und Cyp11b2. Interessanterweise konnte hierbei ein Unterschied der phänotypischen Ausprägung in Abhängigkeit vom Geschlecht ermittelt werden (s. Abb. 14). So wurden bei Männchen keine Änderungen zwischen Kontrolltieren und Ucn2 OE Mäusen gefunden (StAR: $98,2 \pm 16,4$ % vs. $100,0 \pm 23,4$ %; $p=0,95$; Cyp11a1: $107,0 \pm 14,9$ % vs. $100,0 \pm 15,4$ %; $p=0,75$; Hsd3b: $95,0 \pm 17,6$ % vs. $100,0 \pm 24,5$ %; $p=0,87$; Cyp11b1: $100,0,2 \pm 13,7$ % vs. $100,0 \pm 30,7$ %; $p=0,99$), dagegen fand sich bei weiblichen Ucn2 OE Mäusen eine niedrige Expression von StAR ($62,3 \pm 8,1$ % vs. $100,0 \pm 11,3$ %; $p<0,05$), Cyp11a1 ($72,5 \pm 7,9$ % vs. $100,0 \pm 8,9$ %; $p<0,05$) und Cyp11b1 ($71,0 \pm 6,7$ % vs. $100,0 \pm 19,1$ % $p<0,05$), wobei Hsd3b ($97,0 \pm 10,9$ % vs. $100,0 \pm 9,5$ %; $p=0,87$) vergleichbar blieb. Bei beiden Geschlechtern fand sich kein Unterschied zwischen Kontrolltieren und Ucn2 OE Tieren bei der mRNA Expression von Cyp11b2, der Aldosteronsynthese (w: $114,6 \pm 14,5$ % vs. $100,0 \pm 11,7$ %; $p=0,47$; m: $113,0 \pm 15,5$ % vs. $100,0 \pm 18,0$ %; $p=0,59$). Neben Enzymen der Steroidbiosynthese wurden zwei Enzyme (Th und Pnmt), die entscheidend für die Katecholaminsynthese des Nebennierenmarks sind, quantifiziert. Auch hier ergaben sich bezüglich der Genexpression keine Differenzen zwischen Kontrolltieren und Ucn2 OE Mäusen in beiden Geschlechtern (Th: w: $94,8 \pm 11,8$ % vs. $100,0 \pm 19,8$ %; $p=0,82$, m: $97,4 \pm 18,7$ % vs. $100,0 \pm 18,7$ %; $p=0,93$; Pnmt: w: $62,6 \pm 6,2$ % vs. $100,0 \pm 25,4$ %; $p=0,15$, m: $144,9 \pm 28,9$ % vs. $100,0 \pm 7,8$ %; $p=0,19$).

Neben den Genen der Steroidbiosynthese wurden die Auswirkungen von der Ucn2 Überexpression auf die Hormonspiegel im Plasma mittels EIA bzw. ELISA analysiert. Dabei konnten für die Corticosteron-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (w: $245,4 \pm 36,2$ ng/ml vs. $171,3 \pm 37,4$ ng/ml; $p=0,37$, m: $133,0 \pm 26,3$ ng/ml vs. $106,8 \pm 20,9$ ng/ml; $p=0,10$). Auch die ACTH-Konzentrationen waren bei weiblichen Tieren vergleichbar ($51,6 \pm 7,9$ pg/ml vs. $48,2 \pm 15,8$ pg/ml; $p=0,83$), bei Männchen fand sich dagegen eine signifikant erhöhte Konzentration ($251,8 \pm 42,1$ pg/ml vs. $113,7 \pm 36,8$ pg/ml; $p<0,05$). Der erniedrigte Corticosteron/ACTH-Index, der sowohl bei Weibchen ($3,22 \pm 0,67$ vs. $7,78 \pm 2,61$; $p<0,05$) und als auch bei Männchen ($0,46 \pm 0,18$ vs. $4,65 \pm 1,61$; $p<0,05$) festgestellt werden konnte, ist ein Zeichen dafür, dass eine erhöhte ACTH-Konzentration gebraucht wird, um dieselben Corticosteron-Werte zu erreichen oder/und dass bei gleichen ACTH-Konzentrationen weniger Corticosteron produziert werden kann. Ein

erniedrigter Corticosteron/ACTH-Index kann damit als Hinweis für eine latente primäre Nebennierenrindeninsuffizienz gesehen werden.

Des Weiteren wurden die Zellkernzahl pro Highpowerfield in der Zona glomerulosa und in der Zona fasciculata ermittelt, um morphologische Auswirkungen einer Ucn2 Überexpression in der Nebenniere zu ermitteln. Hierbei zeigten sich bei den weiblichen Ucn2 OE Mäusen sowohl in der Zona glomerulosa ($73,6 \pm 2,5$ ncl/hpf vs. $76,0 \pm 1,7$ ncl/hpf; $p=0,44$) als auch in der Zona fasciculata ($41,3 \pm 1,0$ ncl/hpf vs. $42,1 \pm 1,6$ ncl/hpf; $p=0,65$) keine Veränderungen im Vergleich zu den WT Mäusen. In der Zona glomerulosa der männlichen Ucn2 OE Mäusen ergab sich eine erhöhte Zellkernzahl pro Highpowerfield, was einer zellulären Hypertrophie entspricht ($72,7 \pm 2,1$ ncl/hpf vs. $64,3 \pm 1,4$ ncl/hpf; $p < 0,01$), in der Zona fasciculata fanden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zu WT Mäusen ($44,4 \pm 2,4$ ncl/hpf vs. $38,7 \pm 1,8$ ncl/hpf; $p=0,07$).



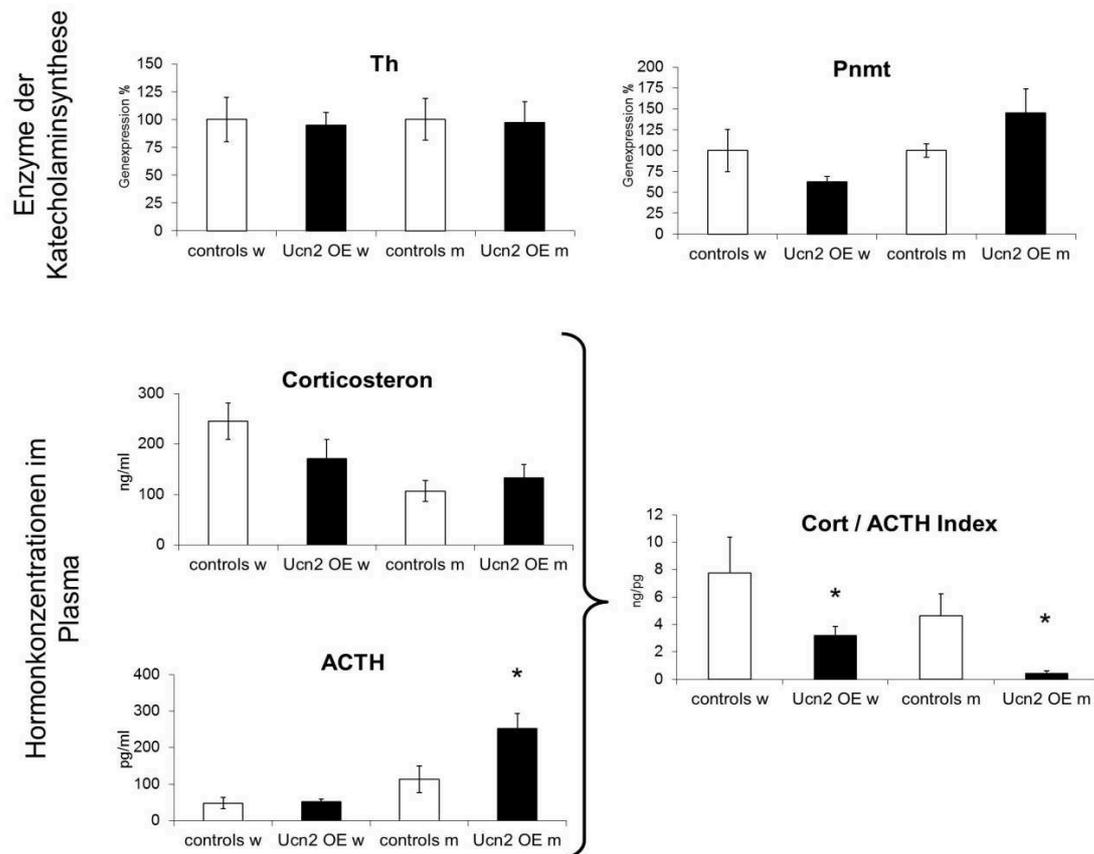


Abb. 14: Ucn2 OE Mäuse unter Basal-Bedingungen

Vergleich der Ucn2 OE Mäuse unter Basal-Bedingungen mit Kontrollmäusen bezüglich morphologischer Aspekte, der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und Katecholaminsynthese sowie der Hormonkonzentrationen.

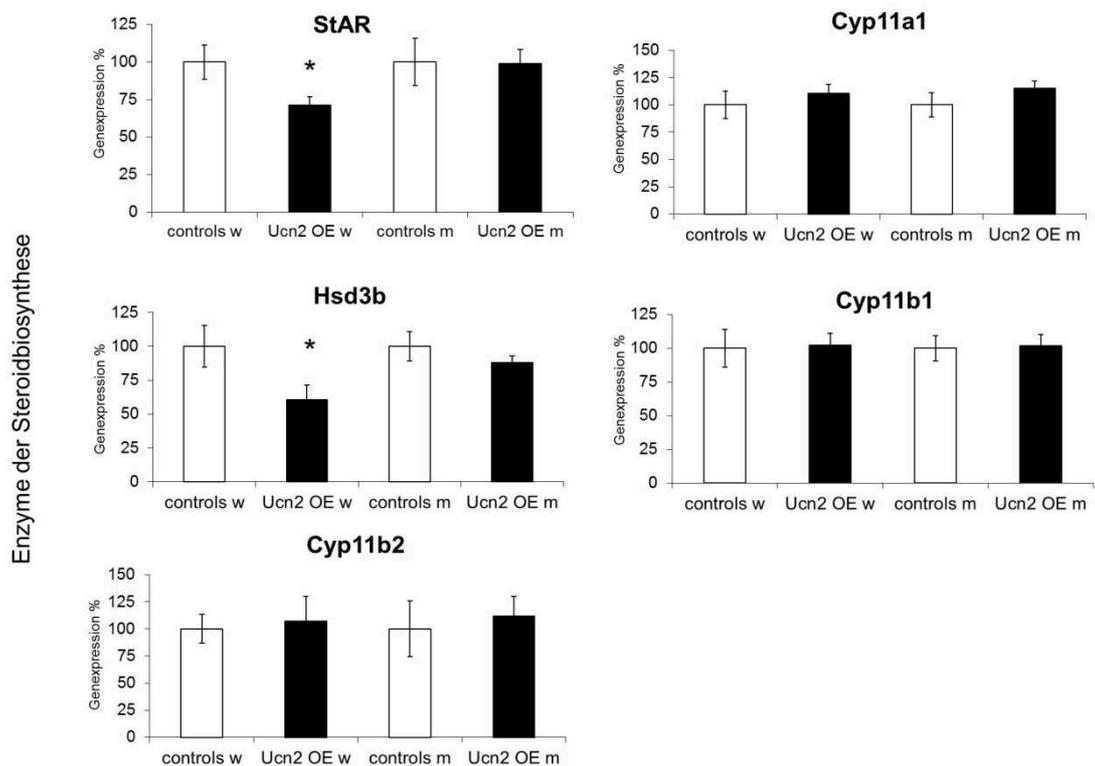
3.2.3 Ucn2 OE Mäuse nach ACTH-Stimulationstest

Neben den Tieren, die unter Basal-Bedingungen charakterisiert wurden, wurden jeweils sieben Kontrolltiere und Ucn2 OE Mäuse, weiblich sowie männlich, einem ACTH-Stimulationstest unterzogen. Aus der RNA der Nebennieren wurde die Genexpression von Enzymen der Steroidbiosynthese mittels real-time PCR bestimmt (s. Abb. 15). Bei weiblichen Ucn2 OE Mäusen fand sich demnach eine niedrigere Expression von StAR ($71,3 \pm 5,6$ % vs. $100,0 \pm 11,4$ %; $p < 0,05$) und Hsd3b ($60,7 \pm 10,5$ % vs. $100,0 \pm 15,4$ %; $p < 0,05$), wobei die Expression von Cyp11a1 ($110,6 \pm 8,4$ % vs. $100,0 \pm 12,5$ %; $p < 0,05$), Cyp11b1 ($102,2 \pm 8,9$ % vs. $100,0 \pm 14,0$ %; $p = 0,90$) und Cyp11b2 ($106,9 \pm 22,8$ % vs. $100,0 \pm 67,9$ %; $p = 0,80$) keinen Unterschied zwischen den weiblichen Tieren ergab. Bei männlichen Mäusen unterschieden sich keine der untersuchten Enzyme in ihrer Genexpressionen (StAR: $99,0 \pm 9,3$ % vs. $100,0 \pm 15,7$ %;

Ergebnisse

$p=0,96$; Cyp11a1: $115,1\pm 6,5\%$ vs. $100,0\pm 10,9\%$; $p=0,26$; Hsd3b: $87,9\pm 5,2\%$ vs. $100,0\pm 10,9\%$; $p=0,33$; Cyp11b1: $101,7\pm 8,5\%$ vs. $100,0\pm 9,3\%$; $p=0,90$; Cyp11b2: $112,0\pm 18,2\%$ vs. $100,0\pm 25,7\%$; $p=0,71$). Ebenso ergaben die real-time PCRs keinen Unterschied zwischen den Gruppen in den Expressionsleveln für Th und Pnmt (w: Th: $90,1\pm 10,3\%$ vs. $100,0\pm 29,2\%$; $p=0,75$; Pnmt: $99,8\pm 12,3\%$ vs. $100,0\pm 28,5\%$; $p=0,99$; m: Th: $84,0\pm 10,3\%$ vs. $100,0\pm 10,7\%$; $p=0,30$; Pnmt $86,6\pm 12,0\%$ vs. $100,0\pm 26,6\%$; $p=0,65$).

Auch nach ACTH Stimulationstest wurden die Corticosteron-Konzentrationen im Plasma ermittelt. Bei den Corticosteron-Werten wurden keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Ucn2 OE Tieren gesehen (w: $685,1\pm 34,8$ pg/ml vs. $652,6\pm 33,8$ pg/ml; $p=0,53$, m: $455,2\pm 117,4$ pg/ml vs. $557,2\pm 96,1$ pg/ml; $p=0,53$), im Vergleich zu den Tieren unter Basal-Bedingungen stiegen jedoch die Corticosteron-Werte, was auf eine adäquate Antwort auf die ACTH Stimulation gewertet werden kann.



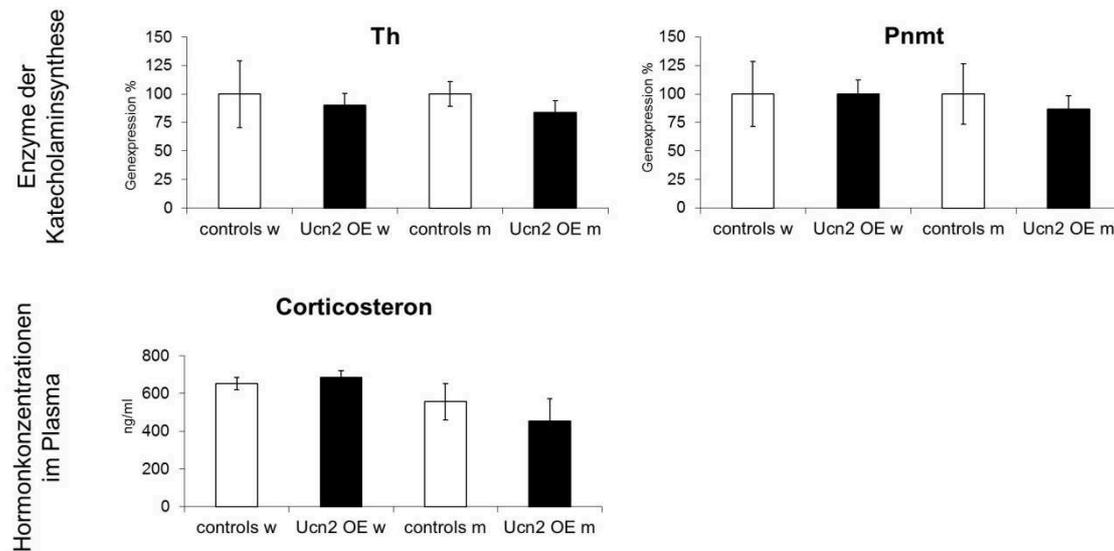


Abb. 15: Ucn2 OE Mäuse nach ACTH-Stimulationstest

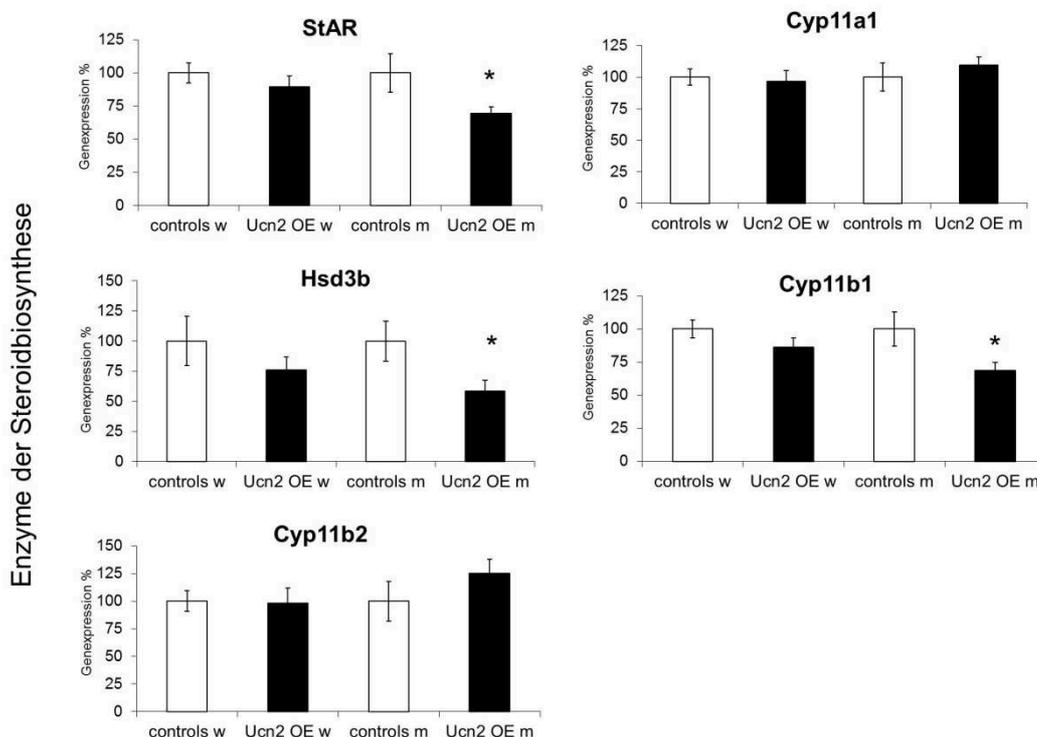
Vergleich der Ucn2 OE Mäuse nach ACTH-Stimulationstest mit Kontrollmäusen bezüglich der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und Katecholaminsynthese sowie der Corticosteron-Konzentrationen im Plasma.

3.2.4 Ucn2 OE Mäuse nach Restraint-Stress-Test

Neben dem ACTH-Stimulationstest, im Rahmen dessen die Nebenniere durch exogenes ACTH stimuliert wird, wurden je acht Tiere der vier verschiedenen Gruppen einem Restraint-Stress-Test unterzogen (s. Abb. 16). Dies entspricht einer endogenen Stressreaktion, in der verschiedene Areale des Gehirns stimuliert werden und die Nebenniere neben anderen Organen/Systemen reagiert. Bei Weibchen konnte nach Restraint-Stress-Test kein Unterschied mehr bezüglich der Expression der Steroidbiosyntheseenzyme zwischen den Gruppen gesehen werden (StAR: $89,6 \pm 8,0$ % vs. $100,0 \pm 5$ %; $p=0,47$; Cyp11a1: $96,8 \pm 8,6$ % vs. $100,0 \pm 6,3$ %; $p=0,79$; Hsd3b: $76,1 \pm 10,6$ % vs. $100,0 \pm 20,6$ %; $p=0,21$; Cyp11b1: $86,4 \pm 6,6$ % vs. $100,0 \pm 6,4$ %; $p=0,19$; Cyp11b2: $98,1 \pm 13,8$ % vs. $100,0 \pm 9,4$ %; $p=0,92$). Dagegen fanden sich hier bei den Männchen eine Herunterregulierung der Expression der Enzyme StAR ($69,4 \pm 4,8$ % vs. $100,0 \pm 14,7$ %; $p < 0,05$), Hsd3b ($58,3 \pm 9,2$ % vs. $100,0 \pm 16,7$ %; $p < 0,05$) und Cyp11b1 ($68,8 \pm 5,9$ % vs. $100,0 \pm 13,0$ %; $p < 0,05$), wohingegen Cyp11a1 ($109,6 \pm 6,4$ % vs. $100,0 \pm 11,1$ %; $p=0,46$) und Cyp11b2 ($124,8 \pm 13,0$ % vs. $100,0 \pm 17,9$ %; $p=0,27$) konstant blieben. Ebenso zeigten die Ergebnisse für Th und Pnmt eine niedrigere Expression bei männlichen Ucn2 OE Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (Th: $58,6 \pm 8,2$ % vs. $100,0 \pm 17,9$ %; $p < 0,05$; Pnmt: $59,5 \pm 11,2$ % vs.

100,0±15,5 %; $p < 0,05$), bei weiblichen änderte sich die Expression für Th nicht signifikant (102,1±9,4 % vs. 100,0±8,0 %; $p = 0,87$). Dagegen fand sich eine erhöhte Expression von Pnmt (133,8±10,0 % vs. 100,0±7,9 %; $p < 0,05$).

Auf Hormonebene waren die Corticosteron-Konzentrationen der weiblichen Ucn2 OE Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt (w: 443,3±12,7 pg/ml vs. 597,3±72,1 pg/ml; $p < 0,05$), bei den Corticosteron-Werten der Männchen (304,3±16,5 pg/ml vs. 288,8±12,3 pg/ml; $p = 0,48$) ebenso wie bei den ACTH-Konzentrationen beiderlei Geschlechts (w: 707,4±175,4 pg/ml vs. 423,3±99,7 pg/ml; $p = 0,37$, m: 676,8±140,6 pg/ml vs. 577,6±101,5 pg/ml; $p = 0,65$) fanden sich allerdings keine Differenzen zwischen Ucn2 OE Mäusen und Kontrolltieren. Auch hier konnte aber durch erhöhte Corticosteron- und ACTH-Werte im Vergleich zu den Mäusen unter Basal-Bedingungen gezeigt werden, dass der Restraint-Stress-Test erfolgreich war. Bei der Berechnung des Corticosteron/ACTH-Index zeigte sich bei weiblichen Ucn2 OE Tieren eine Tendenz zu niedrigeren Werten (w: 0,91±0,26 vs. 1,86±0,55; $p = 0,19$), männliche unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe (0,59±0,20 vs. 0,59±0,12; $p = 0,73$).



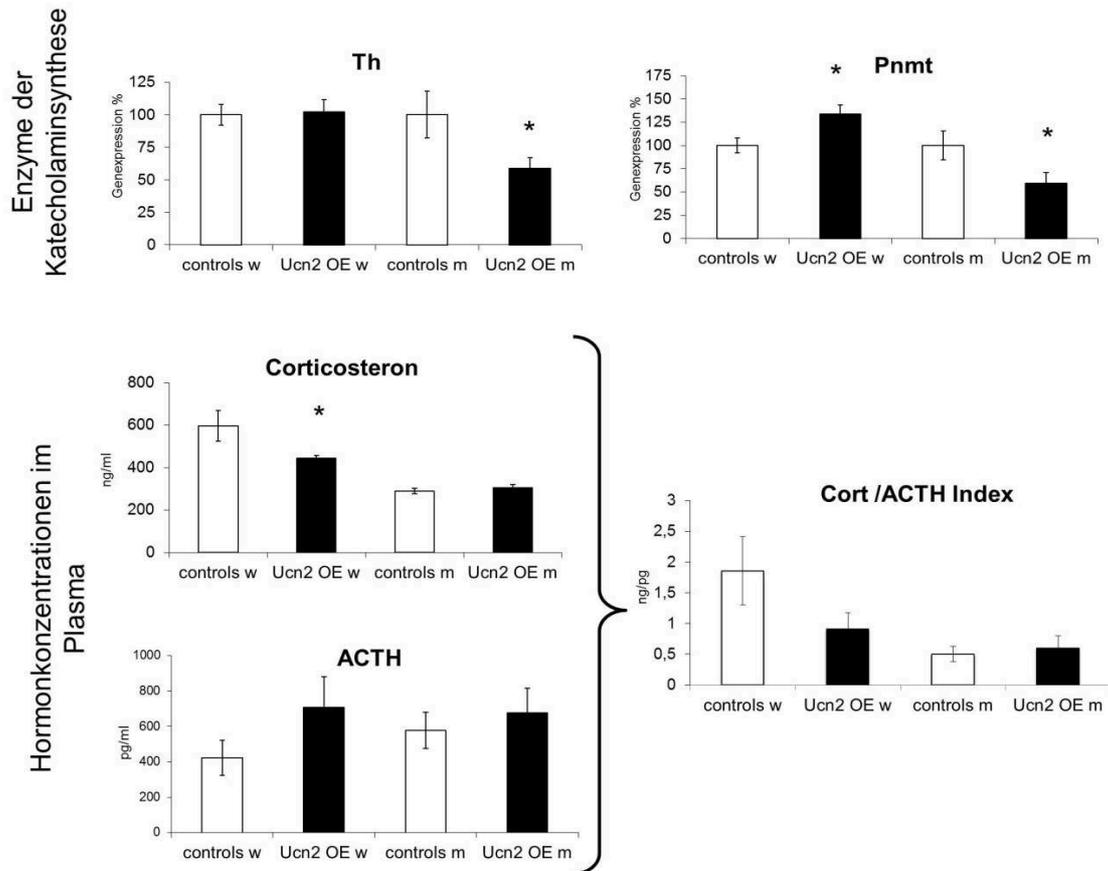


Abb. 16: Ucn2 OE Mäuse nach Restraint-Stress-Test

Vergleich der Ucn2 OE Mäuse nach Restraint-Stress-Test mit Kontrollmäusen bezüglich der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und Katecholaminsynthese sowie der Hormonkonzentrationen im Plasma.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der Urocortine in der Nebenniere

Dass Urocortine allein aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur CRF-Familie eine Rolle in der Modulation der Stressantwort spielen, liegt nahe. Die Expression und die Effekte von Urocortinen im Gehirn wurden und werden immer noch eingehend untersucht. Neben anderen Gehirnarealen ist vor allem die Expression und Funktion von Urocortinen im Hypothalamus und in der Hypophyse Ziel der Forschung. Um die HPA-Achse zu vervollständigen, richteten wir nun in diesen *in vivo* Studien das Augenmerk auf die Nebennieren. Da eine Expression aller drei Urocortine sowie deren Rezeptoren in der Nebenniere beschrieben wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das Urocortin-System auch dort eine Funktion innehat. So postulierten Tsatsanis et al. eine intraadrenale Regulationsschleife, die somit schnell und auf kürzestem Wege zu einer Modulation der Stressantwort führen könnte (Tsatsanis et al. 2007).

Übereinstimmend mit diesen Überlegungen wurde eine periphere und organspezifische Wirkung von Urocortinen bereits in diversen anderen Organen und Strukturen wie der Skelettmuskulatur, den Gefäßen und der Gebärmutter nachgewiesen (Chen et al. 2004; Florio et al. 2004; Emoto et al. 2011).

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit getrennt nach den zwei verwendeten Tiermodellen und im Vergleich zu Daten aus der Literatur diskutiert werden.

4.2 Ergebnisse der Experimente an Urocortin Knock-out Mäusen

4.2.1 Besonderheiten, Vorteile und Einschränkungen dieses Mausmodells

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle der drei verschiedenen Urocortine in der Nebenniere mit sechs verschiedenen Knock-out Mausmodellen – sowohl unter morphologischen als auch unter funktionellen Gesichtspunkten – untersucht. Es wurde offensichtlich, dass das Fehlen eines oder mehrerer Urocortine zu komplexen Änderungen führt, was ohne diese Experimente nicht voraussagbar gewesen wäre.

Allerdings liegt es in der Natur eines *in vivo* Modells, dass beim Vergleich der Ergebnisse verschiedene Aspekte berücksichtigt werden müssen:

Zum einen wurden nur männliche Mäuse im Alter von ca. drei Monaten mit einem bestimmten genetischen Background (C57BL/6 x 129) verwendet. Aus Praktikabilitätsgründen konnte nur ein Geschlecht gewählt werden – die Wahl fiel auf Männchen, um mögliche Einflüsse des weiblichen Zyklus auszuschließen, da Mäuse im Alter von drei Monaten bereits einige Zeit lang geschlechtsreif sind. Es wird allerdings in mehreren Publikationen beschrieben, dass Urocortine ihre Wirkung durchaus geschlechtsabhängig entfalten (Chen et al. 2006; Brey et al. 2012).

Erschwerend kommt bei der Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich der Nebenniere hinzu, dass bei den KO Modellen nicht differenziert werden kann, ob die Auswirkungen auf den Phänotyp aufgrund des Fehlens der Urocortine in der Nebenniere oder auf einer anderen Ebene der HPA-Achse zustande kommt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die HPA-Achse möglicherweise adaptiert und Effekte damit verloren gehen. Zudem zeigen Urocortine eine unterschiedliche Affinität zu den zwei CRF-Rezeptoren, was zu sogenannten Rescue-Phänomenen führen kann: das Fehlen von Ucn2 könnte zum Beispiel durch eine verstärkte Expression von Ucn3 kompensiert werden, da sie an den gleichen Rezeptor mit ähnlicher Affinität binden.

4.2.2 Vergleich der Ergebnisse mit Daten der Literatur

Es wurde gezeigt, dass Ucn1 und Ucn2 in der Modulation des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt sind und Einfluss auf die kardiale Funktion bei einer Herzinsuffizienz haben. So führt die Gabe von Ucn1 in einem Schafmodell mit akuter Herzinsuffizienz zu einer Reduktion von Vasopressin, Renin-Aktivität, Aldosteron und Atrialelem Natriuretischen Peptid (ANP), was assoziiert ist mit einem verzögerten Beginn der Herzinsuffizienz (Rademaker et al. 2002; Rademaker et al. 2007). Rademaker et al. konnten außerdem zeigen, dass eine kombinierte Gabe von Ucn2 und Furosemid bei experimenteller Herzinsuffizienz die Aldosteron- und Vasopressinspiegel weiter reduzieren kann (Rademaker et al. 2009). Während bei diesen Effekten mehrere funktionale Systeme beteiligt sind, gibt es für die Urocortin-abhängige Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde nur sehr wenige Informationen. Interessanterweise konnten *in vitro* Studien zeigen, dass die Stimulation von humanen adrenocorticalen NCIh295 Zellen mit Ucn1 zu einer Steigerung der Aldosteronsynthese (Cyp11b2) sowie zu einer gesteigerten Aldosteronsekretion führt (Kageyama et al. 2010). Passend zu diesen Ergebnissen wurde in den hier verwendeten KO Modellen, in denen Ucn1 oder/und Ucn2 fehlen, eine zelluläre Hypotrophie der Zona glomerulosa

und niedrigere Expressionslevel für die Aldosteronsynthase (Cyp11b2) gefunden. Anhand dieser Ergebnisse kann folglich ein direkter Effekt auf die Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde und damit ein möglicher Einfluss auf die Langzeiteffekte von Urocortinen nicht ausgeschlossen werden, obwohl in den interventionellen Studien eine Reduktion der volumensteigernden Hormone des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gesehen wurde.

In früheren Studien wurde beschrieben, dass Ucn1 KO Mäuse eine normale hormonelle Stressantwort auf akuten Stress zeigen – sowohl bezogen auf das Nebennierenmark als auch auf die Nebennierenrinde (Vetter et al. 2002; Wang et al. 2002). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in unseren Ucn1 KO Mäusen beobachtet werden, dass die Struktur der Zona fasciculata sowie die Expressionslevel der für die Corticosteron- und Katecholaminsynthese wichtigen Enzyme keine Änderungen zeigten. In Crfr1 KO Mäusen wurde jedoch eine Atrophie des Nebennierenmarks mit niedrigeren Adrenalinkonzentrationen im Plasma festgestellt (Yoshida-Hiroi et al. 2002). In unseren Ucn1 KO Tieren fanden sich keine signifikanten Änderungen der Expressionslevel von Th und Pnmt, was sich mit der funktionellen Redundanz des Crfr1 erklären lassen könnte, da auch das noch vorhandene CRF an diesen Rezeptor mit hoher Affinität binden kann.

In früheren Experimenten mit Ucn2 KO Mäusen beiderlei Geschlechts konnte gezeigt werden, dass weibliche, nicht aber männliche Tiere einen erhöhten basalen ACTH- und Corticosteron-Spiegel aufweisen (Chen et al. 2006). Eine neu publizierte Studie beschreibt hingegen keinen Einfluss eines Ucn2 Knock-outs auf die HPA-Achse, lediglich ein reduziertes aggressives Verhalten männlicher Tiere (Breu et al. 2012). Diese Untersuchungen konnte in unseren aktuellen Studien bestätigt werden, da die Abwesenheit von Ucn2 bei männlichen Tieren lediglich eine zelluläre Hypotrophie der Nebennierenrinde und leichte Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Enzyme zeigte.

Ebenso konnten in Ucn3 KO Tieren nur kleine Unterschiede bezüglich der Nebennierenstruktur, der Steroidbiosynthese und der Katecholaminproduktion entdeckt werden. Dies lässt sich gut in Einklang bringen mit bereits publizierten Daten, die eine normale Corticosteron-Konzentration in Ucn3 KO Tieren zeigen (Deussing et al. 2010). Vergleichbar mit der Situation in Ucn1 KO Tieren wäre es vorstellbar, dass das Fehlen einer der beiden Liganden des Crfr2 durch den jeweils andern kompensiert wird, was zu einem milden Phänotyp der Ucn2 und der Ucn3 KO Maus beitragen könnte. Passend hierzu zeigen die Daten für Mäuse, denen sowohl Ucn2 als auch Ucn3 fehlt, eine deutliche Steigerung der Expressionslevel der untersuchten Enzyme der Steroid-

sowie der Katecholaminsynthese. Außerdem besitzen diese Mäuse kleinere Nebennieren, jedoch ohne strukturelle Veränderungen auf zellulärer Ebene. Dementsprechend kann die Erhöhung der StAR Expression in den Ucn2/Ucn3 dKO Tieren mit dem Überwiegen des „Stress-Phänotyps“ durch die Dominanz des Ucn1 Peptids in diesem Modell erklärt werden. Ebenso ist sowohl in den Ucn2 und Ucn3 Single KO Mäusen und noch eindrucksvoller in den Ucn2/Ucn3 dKO Mäusen die Dominanz des Ucn1 Peptids mit dem Anstieg des Cyp11a1 assoziiert. Für Cyp11b1 konnte zwar keine signifikante Erhöhung des Expressionslevel in den Ucn2 KO und Ucn3 KO Tieren beobachtet werden, dafür jedoch auf der einen Seite ein Anstieg bei den Ucn2/Ucn3 dKO Mäusen und auf der anderen Seite eine signifikante Verringerung der Cyp11b1 Expression in Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO Mäusen. Zusammengefasst kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass Ucn1, welches ebenso mit großer Affinität an beide CRF-Rezeptoren bindet, nicht zur Unterstützung des Stress-Coping-Mechanismus beiträgt, der über den Crfr2 vermittelt wird. Bereits in früheren Studien wurde beschrieben, dass Crfr2 KO Mäuse eine normale basale ACTH- und Corticosteron-Konzentration aufweisen, aber sensitiver gegenüber Stress sind (Bale et al. 2000; Coste et al. 2000; Coste et al. 2006), was die These untermauert, dass die Stimulation von Crfr2 zu einer Reduktion von Angstverhalten führt und eher Stress-Coping-Mechanismen unterstützt (Hsu et al. 2001).

In Triple KO Mäusen zeigte sich eine zelluläre Hypotrophie der Nebennierenrinde, eine erhöhte Proliferationsmarke und eine erniedrigte Kapazität für die Produktion von Steroidhormonen. Dies deutet daraufhin, dass die Effekte eines Fehlens von Ucn1 die Auswirkungen der Abwesenheit von Ucn2 und Ucn3 übertreffen. Annähernd vergleichbar mit diesem Phänotyp ist das Crfr1/2 KO Modell, das eine Atrophie der Zona fasciculata sowie einen Phänotyp der Glucocorticoid-Insuffizienz aufweist (Preil et al. 2001). Offensichtlich führt die Abwesenheit aller drei Urocortine oder beider CRF-Rezeptoren zu einem vergleichbaren Phänotyp in der Struktur der Nebennierenrinde. Übereinstimmend mit den beschriebenen Daten konnte in Triple KO Mäusen eine Tendenz zu niedrigeren basalen Corticosteron-Konzentrationen dokumentiert werden (Neufeld-Cohen et al. 2010), auch wenn die Nebenniereninsuffizienz im Triple KO Modell nicht so ausgeprägt war wie im Crfr1/2 KO Modell.

Die größten Unterschiede zu Wildtyp Mäusen zeigten sich in unserem Ucn1/Ucn2 dKO Modell. Hier wurden deutlich erniedrigte Expressionslevel der Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese zusammen mit einer signifikanten zellulären Hypotrophie der Nebennierenrinde und einer erhöhten Proliferationsrate gefunden. Diese Untersuchungen stimmen nicht vollständig mit veröffentlichten Daten älterer

Ucn1/Ucn2 dKO Tiere überein (Neufeld-Cohen et al. 2010). Ein möglicher Erklärungsansatz könnte eine Altersabhängigkeit der Effekte von Urocortinen sein. Während bereits gezeigt wurde, dass sich eine Reihe von Parametern in der Formation und Zonierung der Nebennieren von Wildtyp Mäusen altersabhängig darstellen (Bielohuby et al. 2007; HersHKovitz et al. 2007), stehen Experimente über die zeitlich abhängigen Effekte von Urocortinen noch aus. Die relativ ähnlichen Phänotypen der Ucn1/Ucn2 dKO und der Triple KO Mäuse sowie die milden Auswirkungen eines Ucn3 Knock-outs weisen auf eine untergeordnete strukturelle und funktionelle Rolle von Ucn3 auf die Nebenniere hin. Da nur Ucn2 KO, Ucn1/Ucn2 dKO und Ucn1/Ucn2/Ucn3 tKO Tiere eine zelluläre Hypotrophie der Nebennierenrinde aufwiesen, könnten potentielle Effekte von Ucn2 auf die Entwicklung und Struktur der Nebenniere vermutet werden.

Zusammenfassend kann aus den Studien der sechs verschiedenen Ucn KO Mäusen der Schluss gezogen werden, dass die Abwesenheit der Urocortine Effekte sowohl auf die Rinde als auch auf das Mark der Nebenniere hat. Allerdings zeigt das Fehlen von nur einem Urocortin relativ milde Effekte auf den Phänotyp, was vermuten lässt, dass die Regulation der Struktur und Funktion der Nebenniere auf der Balance aller Urocortine und deren Rezeptoren aufbaut.

4.3 Ergebnisse der Ucn2 transgener Mäuse

4.3.1 Besonderheiten, Vorteile und Einschränkungen dieses Mausmodells

Um die komplexen Systeme und Interaktionen zwischen dem Urocortin-System und der Nebennierenfunktion weiter aufzuschlüsseln, wurden Versuche an einem zusätzlichen Mausmodell durchgeführt, an welchem organspezifische Effekte von Ucn2 untersucht werden konnten. Neben der Verfügbarkeit einer geflochtenen Ucn2 Maus durch die Arbeitsgruppe von Dr. Jan Deussing untersuchten wir gezielt die Überexpression von Ucn2 wegen des relativ ausgeprägten Phänotyps in den Mäusen, in denen Ucn2 deletiert worden war. Ein weiterer Grund, warum Ucn2 in das Blickfeld unserer Untersuchungen geriet, war, dass inzwischen erfolgversprechende klinische Untersuchungen mit Ucn2 an Patienten mit Herzinsuffizienz durchgeführt werden. Hier zeigte sich nach der intravenösen Gabe von Ucn2 eine verbesserte linksventrikuläre Funktion sowie eine verbesserte Nierenfunktion (Rademaker et al. 2011; Ikeda et al. 2012). Vor einem möglichen erweiterten klinischen Einsatz von Ucn2 ist es daher von

besonderem Interesse zu wissen, was eine systemische Applikation für Auswirkungen auf die Nebenniere hat.

Im Gegensatz zu den KO Mäusen, bei denen nur Nebennieren zur Verfügung standen, konnten bei den Ucn2 OE Mäusen neben der deskriptiven Beschreibung der Nebennieren und Messung der basalen Plasmahormonspiegel auch funktionelle Stresstests durchgeführt werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil, da gerade die Nebenniere als endokrines Organ in ein komplexes regulatorisches System eingebettet ist und kurzfristig auf Änderungen zum Beispiel mit Produktion von Glucocorticoiden oder Katecholaminen reagieren muss. So wurden die Tiere zweierlei Stresstests unterzogen: Zum einen wurde einer Gruppe von Mäusen intraperitoneal eine supraphysiologische Menge an ACTH gespritzt. Durch die Injektion von ACTH wird spezifisch und direkt die Nebenniere stimuliert. Ein ähnlich durchgeführter ACTH-Stimulationstest wird auch in der klinischen Praxis bei Patienten eingesetzt, bei denen der Verdacht auf eine Nebenniereninsuffizienz besteht. Als zweiten Stresstest wurden die Mäuse durch einen Restraint-Stress-Test einer relativ physiologischen Art von Stress unterzogen. Es kommt hierbei zu einer endogenen Stimulation der Nebenniere: Unter anderem über den Sympathikus, der primär das Nebennierenmark zur Ausschüttung von Katecholaminen anregt, und zum anderen über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, wodurch vor allem über CRF und ACTH letztendlich die Nebennierenrinde angeregt wird.

In unserem Mausmodell ist zu beachten, dass Ucn2 abhängig vom SF1-Promoter exprimiert wird. Von Bingham et al. wird beschrieben, dass dieser in der Nebennierenrinde, dem ventromedullären Teil des Hypothalamus, den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens, der Milz sowie in den Gonaden aktiv ist (Bingham et al. 2006). Mögliche Einflüsse dieser transgenen Überexpression sollen nun im Folgenden diskutiert werden:

Der VMH hat vor allem Einfluss auf das Essverhalten und die Blutglucoseregulierung. Es konnte bisher keine endogene Expression von Ucn2 im VMH gezeigt werden, dagegen sehr wohl eine starke Expression von Crfr2 und CRF (Chalmers et al. 1995; Reul et al. 2002). Außerdem wurden afferente Ucn3 Nervenfasern im VMH identifiziert (Li et al. 2002; Chen et al. 2011), weshalb spekuliert wurde, dass Ucn3 über die Bindung an den Crfr2 im VMH wirksam ist. Es wurde daher eine bilaterale Injektion von Ucn3 in den VMH von Ratten durchgeführt, wobei man keine Auswirkungen auf die HPA Achse, allerdings erhöhte Glucose- und Insulinspiegel sowie eine reduzierte Nahrungsaufnahme nachweisen konnte (Chen et al. 2010). Da sich Ucn2 bezüglich der Affinität zum Crfr2 ähnlich wie Ucn3 verhält, ist davon auszugehen, dass auch eine

Überexpression von Ucn2 dort nur geringe Auswirkungen auf die HPA-Achse hat. Neben dem VMH findet man einen aktiven SF1-Promotor in den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens, in welchen LH und FSH produziert wird. In der Adenohypophyse konnte lediglich eine Expression des Crfr1 nachgewiesen werden, alle anderen Mitglieder der CRF-Familie sowie Crfr2 werden dort nicht exprimiert (Reul et al. 2002). Ein möglicher Effekt des dort exprimierten Ucn2, das dort damit keinen adäquaten Rezeptor hat, erscheint unwahrscheinlich. Des Weiteren erwarteten wir in dem generierten Mausmodell eine Überexpression von Ucn2 in den Gonaden. Für die Ovarien der Ucn2 OE Mäusen konnte dies in unserer Arbeitsgruppe auch nachgewiesen werden. In den Hoden war zwar der SF1- Promotor aktiv, es konnte jedoch keine Überexpression von Ucn2 gesehen werden (Daten nicht gezeigt), was noch weiterer Untersuchungen bedarf. Vorläufige Ergebnisse zeigen eine Reduktion von Cyp17 sowie Cyp 19, der Aromatase, die den letzten Schritt zu Östrogen in den Ovarien katalysiert, jedoch einen Anstieg der ovariellen Expressionslevel von StAR und Cyp11a1. Es ist bekannt, dass erhöhte Östrogen-Konzentrationen im Plasma Glucocorticoid-Konzentrationen beeinflussen können. So konnte in Experimenten mit Ucn2 KO Mäusen gezeigt werden, dass eine Ovariectomie eine Reduktion des Corticosteron-Spiegels zur Folge hat (Chen et al. 2006) und damit zu einer Angleichung an die Werte männlicher Tiere führt, die normalerweise deutlich niedrigere Corticosteron-Spiegel haben. Die Auswirkungen einer Überexpression von Ucn2 in den Ovarien bedürfen daher noch einer näheren Untersuchung, insbesondere der Messung der Östrogen-Konzentrationen, um die Auswirkungen auf die hier gezeigten Ergebnisse beurteilen zu können.

4.3.2 Vergleich der Ergebnisse mit Daten der Literatur

Wie bereits beschrieben, konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass die Corticosteron-Spiegel in der Maus wesentliche geschlechtsspezifische Unterschiede aufzeigen (Bielohuby et al. 2007). Wie zu erwarten war, wiesen auch die weiblichen Versuchstiere in unseren Untersuchungen im Vergleich zu den Männchen erhöhte Corticosteron-Konzentrationen auf. Chen et al. konnten in weiblichen Ucn2 KO Mäusen eine gesteigerte Produktion von Corticosteron im Vergleich zu Wildtyp Mäusen finden, dagegen bei männlichen Tieren keine Unterschiede nachweisen (Chen et al. 2006). Bei unseren organspezifisch Ucn2 überexprimierenden Mäusen zeigte sich unter Basal-Bedingungen ein korrelierendes Bild: Es fanden sich niedrigere Corticosteron-Konzentrationen in Ucn2 OE Weibchen im Vergleich zu den Kontrollen, allerdings keine Unterschiede bei den Männchen. Passend dazu blieben auch bei den

männlichen Ucn2 KO Mäusen bis auf ein erhöhtes Cyp11a1 die Expressionslevel der anderen untersuchten Enzyme unverändert. Im Gegensatz zu der in den Ucn2 KO Mäusen eindrücklich imponierenden zellulären Hypotrophie der gesamten Nebennierenrinde, konnten bei den Ucn2 OE Mäusen keinerlei morphologische Auswirkungen auf die Nebenniere gezeigt werden. Gegebenenfalls könnte dies durch die lediglich organspezifische Überexpression von Ucn2 und durch eine Kompensation durch höhere Zentren (Hypophyse und Hypothalamus) erklärt werden.

Nach der Stimulation mit ACTH zeigten sich keine Unterschiede auf hormonaler Ebene beim Vergleich von Ucn2 OE und WT Mäusen, lediglich auf molekularer Ebene eine Reduktion der mRNA-Level von StAR und Hsd3b bei den Weibchen. Am ehesten sind diese Ergebnisse durch die supraphysiologische Stimulation zu interpretieren, wodurch bei den zu maximaler Leistung angeregten Nebennieren keine Unterschiede zwischen den Genotypen mehr gefunden werden können.

Interessanterweise zeigten sich nach dem Restraint-Stress-Test erstmals Veränderungen zwischen männlichen Ucn2 OE und WT Mäusen in reduzierten Expressionsleveln von StAR, Hsd3b und Cyp11b1, während bei weiblichen Mäusen keine Unterschiede feststellbar waren. Passend dazu konnte in weiblichen Ucn2 KO Mäusen gezeigt werden, dass die unter Basal-Bedingungen vorhandenen Veränderungen zwischen den Genotypen nach RST nicht mehr feststellbar waren. Chen et al. haben aufgrund seiner Experimente die Vermutung geäußert, dass Östrogen zwar zur Erhöhung des basalen Corticosteron-Spiegels beiträgt, allerdings nicht zu einer Stress-induzierten Freisetzung von Glucocorticoiden (Chen et al. 2006). Im Gegensatz dazu führt das Fehlen des Rezeptors für Ucn2 in weiblichen und männlichen Crfr2 KO Mäusen zu unveränderten basalen Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen, allerdings unter Stress zu deutlich erhöhten Corticosteron- und ACTH-Werten im Vergleich zu WT Mäusen (Coste et al. 2000). Korrelierend führte eine Ucn2 Überexpression zu einer Reduktion der Corticosteron-Spiegeln unter Stressbedingungen – allerdings nur bei weiblichen Tieren.

Sowohl unter Basal- als auch unter Stressbedingungen ließen sich keine Unterschiede zwischen Ucn2 OE und WT Mäusen bezüglich der Expressionslevel der Enzyme, die für die Katecholamin-Synthese verantwortlich sind, nachweisen. Dabei ist zu bemerken, dass in unserem Mausmodell im Gegensatz zur Nebennierenrinde innerhalb des Nebennierenmarks Ucn2 nicht überexprimiert wurde. Auch physiologischerweise werden sowohl Ucn2 als auch Crfr2 nur in geringem Maße im Nebennierenmark exprimiert (Fukuda et al. 2005; Dermitzaki et al. 2007). Passend zu den fehlenden Veränderungen in den Ucn2 OE Mäusen, hatten sich auch bei den von

uns untersuchten Ucn KO Mäusen keine wesentlichen Unterschiede ergeben. Im Gegensatz dazu konnte von Gu et al. gezeigt werden, dass eine systemische Gabe von Ucn2 zu erniedrigten Katecholamin-Konzentrationen sowie reduzierten Expressionsleveln von Th führt (Gu et al. 2010). Auch fanden sich *in vitro* erhöhte Expressionlevel von Th und erhöhte Katecholamin-Konzentrationen nach Ucn2 Administration (Nemoto et al. 2005; Dermitzaki et al. 2007). Da in unserem transgenen Mausmodell deutlich erhöhte Ucn2-Plasmaspiegel detektierbar waren, wären unterschiedliche Wirkungen auf die Katecholaminsynthese durch akute (systemische Gabe) gegenüber chronischer (transgenes Modell) Ucn2-Erhöpfung denkbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Überexpression von Ucn2 in weiblichen Mäusen zu einer erniedrigten basalen Glucocorticoidsekretion sowie zu einer reduzierten Stressantwort nach ACTH-Stimulation führt. Unter anderem deutet dies auch der erniedrigte Corticosteron/ACTH-Index im Plasma an, welcher als Ausdruck einer partiellen Nebenniereninsuffizienz interpretiert wird. Wie bereits in Voruntersuchungen gezeigt, sind in der Wirkung von Ucn2 auf die Nebenniere geschlechtsspezifische Unterschiede zu beachten. So hatte Ucn2 unter Basal-Bedingungen keinen Einfluss auf Nebennieren männlicher Tiere, dagegen zeigte sich nach einem Restraint-Stress-Test eine reduzierte Stressantwort. Insgesamt passen unsere Ergebnisse zum generellen Modell, das Ucn2 als Modulator der adrenalen Stressantwort einordnen lässt.

5 Zusammenfassung

Urocortine (Ucn) gehören zur Familie des Corticotropin-Releasing-Hormons und sind wichtige Modulatoren der Stressantwort, der Angstkontrolle und der assoziierten Erkrankungen, wie z. B. der Depression. Während Ucn1 mit gleicher Affinität an den CRF₁- und CRF₂-Rezeptor bindet, sind Ucn2 und Ucn3 spezifische Liganden für den CRF₂-Rezeptor. Zusätzlich zum Zentralen Nervensystem sind Urocortine in verschiedenen peripheren Organen exprimiert – so auch in der Nebenniere. Mit Hilfe sechs verschiedener Knock-out Modelle, in denen Urocortine in unterschiedlichen Kombinationen deletiert wurden, wurden potentielle Urocortin-abhängige Effekte auf die Nebenniere der Maus untersucht. Dabei wurde mit Hilfe von HE-Färbungen die Struktur, mit Färbungen gegen PCNA als Proliferationsmarker die Zellteilungen und mit RT-PCR die Expressionslevel wichtiger Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese und der Katecholaminsynthese ermittelt. Während in Single KO Mäusen nur geringe Effekte detektierbar waren, zeigten sich in Double und Triple KO Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen ausgeprägte Änderungen der untersuchten Parameter, so dass eine funktionelle Redundanz innerhalb der Urocortine vermutet werden kann. Um die spezifische Wirkung einer organspezifischen Überexpression von Ucn2 zu untersuchen, wurden Mäuse auf der Basis des Cre-Lox-Systems gezüchtet, die abhängig vom Promotor des Steroidogenic Factor 1-Gens (SF1), d. h. vor allem in der Nebenniere und in den Gonaden, Ucn2 überexprimieren (Ucn2 OE Mäuse mit dem Genotyp R26^{+/stopUcn2} SF1-Cre^{+/+}). Zusätzlich zu den oben genannten Messungen wurden Hormonkonzentrationen im Plasma unter Basal-Bedingungen, nach einem ACTH-Stimulationstest und nach einem Restraint-Stress-Test bestimmt. Es zeigte sich, dass die Überexpression von Ucn2 mit einer erniedrigten Steroidbiosynthese in der Nebenniere assoziiert ist. Zudem konnten geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden – so zeigten weibliche Ucn2 OE Mäuse vor allem Änderungen unter Basal-Bedingungen und nach ACTH-Stimulation, wobei bei männlichen Tieren nur nach Restraint-Stress eine reduzierte Stressantwort im Vergleich zu den Kontrolltieren auftrat.

Zusammenfassend kann aus diesen *in vivo* Studien der Schluss gezogen werden, dass ein intraadrenales Regulationssystem existiert, das durch die Balance aller Urocortine und deren Rezeptoren geschlechtsspezifisch die Struktur und Funktion der Nebenniere beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

- Arnold J (1866). "Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren." (1): 64-107.
- Baigent SM und Lowry PJ (2000). "mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues." *J Mol Endocrinol* 25(1): 43-52.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW und Lee KF (2000). "Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress." *Nat Genet* 24(4): 410-414.
- Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P und Vale WW (1995). "Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides." *Front Neuroendocrinol* 16(4): 362-382.
- Beuschlein F, Keegan CE, Bavers DL, Mutch C, Hutz JE, Shah S, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Jeffs B, Jameson JL und Hammer GD (2002). "SF-1, DAX-1, and acd: molecular determinants of adrenocortical growth and steroidogenesis." *Endocr Res* 28(4): 597-607.
- Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E und Hoeflich A (2007). "Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(1): E139-146.
- Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF und Parker KL (2006). "Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line." *Genesis* 44(9): 419-424.
- Bornstein SR und Ehrhart-Bornstein M (2000). "Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis." *Z Rheumatol* 59 Suppl 2: II/12-17.
- Breu J, Touma C, Holter SM, Knapman A, Wurst W und Deussing JM (2012). "Urocortin 2 modulates aspects of social behaviour in mice." *Behav Brain Res* 233(2): 331-336.
- Chalmers DT, Lovenberg TW und De Souza EB (1995). "Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression." *J Neurosci* 15(10): 6340-6350.
- Chatzaki E, Margioris AN und Gravanis A (2002). "Expression and regulation of corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals." *J Neurochem* 80(1): 81-90.

- Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B und Vale W (2004). "Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids." *Endocrinology* 145(5): 2445-2457.
- Chen A, Zorrilla E, Smith S, Rousso D, Levy C, Vaughan J, Donaldson C, Roberts A, Lee KF und Vale W (2006). "Urocortin 2-deficient mice exhibit gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior." *J Neurosci* 26(20): 5500-5510.
- Chen P, Lin D, Giesler J und Li C (2011). "Identification of urocortin 3 afferent projection to the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rat brain." *J Comp Neurol* 519(10): 2023-2042.
- Chen P, Vaughan J, Donaldson C, Vale W und Li C (2010). "Injection of Urocortin 3 into the ventromedial hypothalamus modulates feeding, blood glucose levels, and hypothalamic POMC gene expression but not the HPA axis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(2): E337-345.
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH und Vale WW (1993). "Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8967-8971.
- Combs CE, Fuller K, Kumar H, Albert AP, Pirianov G, McCormick J, Locke IC, Chambers TJ und Lawrence KM (2012). "Urocortin is a novel regulator of osteoclast differentiation and function through inhibition of a canonical transient receptor potential 1-like cation channel." *J Endocrinol* 212(2): 187-197.
- Coste SC, Heard AD, Phillips TJ und Stenzel-Poore MP (2006). "Corticotropin-releasing factor receptor type 2-deficient mice display impaired coping behaviors during stress." *Genes Brain Behav* 5(2): 131-138.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P und Stenzel-Poore MP (2000). "Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2." *Nat Genet* 24(4): 403-409.
- Davidson SM, Rybka AE und Townsend PA (2009). "The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family." *Biochem Pharmacol* 77(2): 141-150.
- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Minas V, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Venihaki M, Androulidaki A, Lambropoulou M, Spiess J, Michalodimitrakis E, Gravanis A und Margioris AN (2007). "Corticotropin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals, in a CRF receptor type-specific manner." *Endocrinology* 148(4): 1524-1538.

- Deussing JM, Breu J, Kuhne C, Kallnik M, Bunck M, Glasl L, Yen YC, Schmidt MV, Zurmuhlen R, Vogl AM, Gailus-Durner V, Fuchs H, Holter SM, Wotjak CT, Landgraf R, de Angelis MH, Holsboer F und Wurst W (2010). "Urocortin 3 modulates social discrimination abilities via corticotropin-releasing hormone receptor type 2." *J Neurosci* 30(27): 9103-9116.
- Dickerman Z, Grant DR, Faiman C und Winter JS (1984). "Intraadrenal steroid concentrations in man: zonal differences and developmental changes." *J Clin Endocrinol Metab* 59(6): 1031-1036.
- Eberwine JH, Jonassen JA, Evinger MJ und Roberts JL (1987). "Complex transcriptional regulation by glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone of proopiomelanocortin gene expression in rat pituitary cultures." *DNA* 6(5): 483-492.
- Emeto TI, Moxon JV, Rush C, Woodward L und Golledge J (2011). "Relevance of urocortins to cardiovascular disease." *J Mol Cell Cardiol* 51(3): 299-307.
- Fekete EM und Zorrilla EP (2007). "Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs." *Front Neuroendocrinol* 28(1): 1-27.
- Florio P, Vale W und Petraglia F (2004). "Urocortins in human reproduction." *Peptides* 25(10): 1751-1757.
- Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T und Sasano H (2005). "Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders." *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4671-4678.
- Gravanis A und Margioris AN (2005). "The corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in inflammation: potential therapeutic applications." *Curr Med Chem* 12(13): 1503-1512.
- Gu Y, Zhang K, Biswas N, Friese RS, Lin DH, Mahata SK, Hoshijima M, O'Connor DT, Peterson KL und Brar BK (2010). "Urocortin 2 lowers blood pressure and reduces plasma catecholamine levels in mice with hyperadrenergic activity." *Endocrinology* 151(10): 4820-4829.
- Hammer GD, Parker KL und Schimmer BP (2005). "Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development." *Endocrinology* 146(3): 1018-1024.
- Hao Z, Huang Y, Cleman J, Jovin IS, Vale WW, Bale TL und Giordano FJ (2008). "Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10): 3939-3944.
- Hershkovitz L, Beuschlein F, Klammer S, Krup M und Weinstein Y (2007). "Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone

and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone." *Endocrinology* 148(3): 976-988.

Hsu SY und Hsueh AJ (2001). "Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor." *Nat Med* 7(5): 605-611.

Huang Y, Yao XQ, Lau CW, Chan YC, Tsang SY und Chan FL (2004). "Urocortin and cardiovascular protection." *Acta Pharmacol Sin* 25(3): 257-265.

Ikeda K, Fujioka K, Manome Y und Tojo K (2012). "Clinical perspectives of urocortin and related agents for the treatment of cardiovascular disease." *Int J Endocrinol* 2012: 198628.

Kageyama K, Hanada K und Suda T (2010). "Differential regulation and roles of urocortins in human adrenal H295R cells." *Regul Pept* 162(1-3): 18-25.

Keegan CE und Hammer GD (2002). "Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex." *Trends Endocrinol Metab* 13(5): 200-208.

Klinke R (2005). "Physiologie". Stuttgart, *Thieme*.

Kuperman Y und Chen A (2008). "Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives." *Trends Endocrinol Metab* 19(4): 122-129.

Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE und Vale WW (2001). "Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7570-7575.

Li C, Chen P, Vaughan J, Lee KF und Vale W (2007). "Urocortin 3 regulates glucose-stimulated insulin secretion and energy homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 4206-4211.

Li C, Vaughan J, Sawchenko PE und Vale WW (2002). "Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression." *J Neurosci* 22(3): 991-1001.

Liew HK, Hsu CW, Wang MJ, Kuo JS, Li TY, Peng HF, Wang JY und Pang CY (2012). "Therapeutic benefit of urocortin in rats with intracerebral hemorrhage." *J Neurosurg* 116(1): 193-200.

Liew HK, Pang CY, Hsu CW, Wang MJ, Li TY, Peng HF, Kuo JS und Wang JY (2012). "Systemic administration of urocortin after intracerebral hemorrhage reduces neurological deficits and neuroinflammation in rats." *J Neuroinflammation* 9: 13.

- Lin EJ (2012). "Neuropeptides as therapeutic targets in anxiety disorders." *Curr Pharm Des*.
- Löffler G (2007). "Biochemie und Pathobiochemie". Heidelberg, *Springer*.
- Lüllmann-Rauch R (2009). "Taschenlehrbuch Histologie". Stuttgart, *Thieme*.
- Martinez V, Wang L, Million M, Rivier J und Tache Y (2004). "Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain." *Peptides* 25(10): 1733-1744.
- Nemoto T, Mano-Otagiri A und Shibasaki T (2005). "Urocortin 2 induces tyrosine hydroxylase phosphorylation in PC12 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 330(3): 821-831.
- Neufeld-Cohen A, Evans AK, Getselter D, Spyroglou A, Hill A, Gil S, Tsoory M, Beuschlein F, Lowry CA, Vale W und Chen A (2010). "Urocortin-1 and -2 double-deficient mice show robust anxiolytic phenotype and modified serotonergic activity in anxiety circuits." *Mol Psychiatry* 15(4): 426-441, 339.
- Neufeld-Cohen A, Tsoory MM, Evans AK, Getselter D, Gil S, Lowry CA, Vale WW und Chen A (2010). "A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(44): 19020-19025.
- Nussdorfer GG (1986). "Cytophysiology of the adrenal cortex." *Int Rev Cytol* 98: 1-405.
- Perkins LM und Payne AH (1988). "Quantification of P450_{scc}, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice." *Endocrinology* 123(6): 2675-2682.
- Plotsky PM (1988). "Hypophysiotropic regulation of stress-induced ACTH secretion." *Adv Exp Med Biol* 245: 65-81.
- Preil J, Muller MB, Gesing A, Reul JM, Sillaber I, van Gaalen MM, Landgrebe J, Holsboer F, Stenzel-Poore M und Wurst W (2001). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2." *Endocrinology* 142(11): 4946-4955.
- Rademaker MT, Charles CJ, Ellmers LJ, Lewis LK, Nicholls MG und Richards AM (2011). "Prolonged urocortin 2 administration in experimental heart failure: sustained hemodynamic, endocrine, and renal effects." *Hypertension* 57(6): 1136-1144.
- Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, Fisher S, Frampton CM, Kirkpatrick CM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM und Vale WW (2002). "Beneficial hemodynamic, endocrine, and renal effects of urocortin in experimental heart failure: comparison with normal sheep." *J Am Coll Cardiol* 40(8): 1495-1505.

- Rademaker MT, Charles CJ, Nicholls MG und Richards AM (2009). "Urocortin 2 inhibits furosemide-induced activation of renin and enhances renal function and diuretic responsiveness in experimental heart failure." *Circ Heart Fail* 2(6): 532-540.
- Rademaker MT, Charles CJ und Richards AM (2007). "Urocortin 1 administration from onset of rapid left ventricular pacing represses progression to overt heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1536-1544.
- Reul JM und Holsboer F (2002). "Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression." *Curr Opin Pharmacol* 2(1): 23-33.
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW und Sawchenko PE (2001). "Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2843-2848.
- Rhode J (2007). "Generierung und Charakterisierung einer konditionalen Urocortin 2 überexprimierenden Mauslinie." *Dissertation, Technische Universität München*.
- Selye H (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agents." *Nature*.
- Soriano P (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nat Genet* 21(1): 70-71.
- Stocco DM und Clark BJ (1996). "Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis." *Biochem Pharmacol* 51(3): 197-205.
- Suda T, Kageyama K, Sakihara S und Nigawara T (2004). "Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors." *Peptides* 25(10): 1689-1701.
- Takahashi K (2012). "Distribution of urocortins and corticotropin-releasing factor receptors in the cardiovascular system." *Int J Endocrinol* 2012: 395284.
- Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, Chatzaki E, Minas V, Gravanis A und Margioris AN (2007). "The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function." *Cell Mol Life Sci* 64(13): 1638-1655.
- Vale W, Spiess J, Rivier C und Rivier J (1981). "Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin." *Science* 213(4514): 1394-1397.
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C und et al. (1995). "Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor." *Nature* 378(6554): 287-292.

- Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W und Lee KF (2002). "Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior." *Nat Genet* 31(4): 363-369.
- Wan DC und Livett BG (1989). "Induction of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression by glucocorticoids in cultured bovine adrenal chromaffin cells." *Eur J Pharmacol* 172(2): 107-115.
- Wang X, Su H, Copenhagen LD, Vaishnav S, Pieri F, Shope CD, Brownell WE, De Biasi M, Paylor R und Bradley A (2002). "Urocortin-deficient mice display normal stress-induced anxiety behavior and autonomic control but an impaired acoustic startle response." *Mol Cell Biol* 22(18): 6605-6610.
- Wolkersdorfer GW und Bornstein SR (1998). "Tissue remodelling in the adrenal gland." *Biochem Pharmacol* 56(2): 163-171.
- Yakabi K, Noguchi M, Ohno S, Ro S, Onouchi T, Ochiai M, Takabayashi H, Takayama K, Harada Y, Sadakane C und Hattori T (2011). "Urocortin 1 reduces food intake and ghrelin secretion via CRF(2) receptors." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(1): E72-82.
- Yamauchi N, Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Oono H, Kato I, Yanaihara C und Shibasaki T (2005). "Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat." *J Neuroendocrinol* 17(10): 656-663.
- Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, Hartwig HG, Scherbaum WA und Bornstein SR (2002). "Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice." *Mol Psychiatry* 7(9): 967-974.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG und Soriano P (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3789-3794.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
Cre	Causes recombination
CRF	Corticotropin Releasing Hormon (<i>corticotropin releasing faktor</i>)
CRF-BP	CRF-Binding Protein
Crr1	CRF1-Rezeptor Typ
Crr2	CRF2-Rezeptor Typ
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Cyp11a1	Cholesterin-Desmolase (<i>cytochrom P450 side chain cleavage enzyme, P450SCC</i>)
Cyp11b1	11β-Hydroxylase
Cyp11b2	Aldosteronsynthase
Cyp17	17α-Hydroxylase
Cyp21	21-Hydroxylase
d. h.	das heißt
dKO	double Knock-out
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleid acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere (<i>et alii</i>)

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HE	Hämotoxylin-Eosin
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse (<i>hypothalamus-pituitary-adrenal axis</i>)
hpf	Gesichtsfeld (<i>high power field</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsd3b	3 β -Hydroxydehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
KO	Knock-out
l	Liter
LDL	low-density Lipoproteinen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
ncl	Zellkern (<i>nucleus</i>)
ng	Nanogramm
OE	Überexpression (<i>overexpression</i>)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
Pnmt	Phenylethanolamin-N-methyltransferase
R26	ROSA26
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RST	Restraint-Stress-Test
RT-PCR	Real-time PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SF1	Steroidogenic Factor 1
StAR	Steroidogenic Active Regulatory Protein

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TBE	Tris Borat EDTA
Th	Tyrosinhydroxylase
tKO	triple Knock-out
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Ucn	Urocortin
V	Volt
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Felix Beuschlein für die spannende Aufgabenstellung und engagierte Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit. Insbesondere möchte ich ihm danken für die Motivation und die Begeisterung, die er mir sowohl an der Endokrinologie als auch am wissenschaftlichen Denken und Arbeiten vermittelt hat. Außerdem hat er mir die Teilnahme an verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen sowie ein Forschungspraktikum bei Herrn Dr. Alon Chen am Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, ermöglicht – vielen Dank!

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Ariadni Spyroglou, die mich über die gesamte Zeit und in allen Belangen meiner Promotion mit sehr großem Einsatz und auf hervorragende Weise wissenschaftlich betreut hat und auch über die Labortätigkeit hinaus immer für mich da war.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Reincke, der mir ermöglichte die Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchzuführen.

Ich danke darüber hinaus unseren Kooperationspartnern Herrn Dr. Alon Chen und Frau Dr. Adi Neufeld-Cohen vom Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, sowie Herrn Dr. Jan Deussing vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München für die sehr gute Zusammenarbeit, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Für das ausgezeichnete Einlernen in die verschiedenen Methoden und die technische Unterstützung danke ich ganz besonders Frau Brigitte Mauracher und Herrn Igor Shapiro. Außerdem gilt mein Dank auch den Tierpflegern Herrn Robert Weinberger und Herrn Klaus Weinberger für deren großartige Hilfe im Tierstall. Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Kollegen für die tolle gemeinsame Zeit im Labor, die aufmunternden Worte und die tatkräftige Hilfe bedanken – bei Frau Dr. Constanze Hantel insbesondere für die Unterstützung bei der Vorbereitung von Vorträgen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mir meinen bisherigen Werdegang ermöglicht und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, sowie meinem Mann Martin, der den Weg zu meiner Approbation und Promotion liebevoll und stets Zuversicht schenkend mit mir gegangen ist. Bei meiner Mutter und bei meiner Schwägerin Johanna bedanke ich mich zudem für die Durchsicht des Manuskriptes.

9 Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht (weitere Publikationen s. S. 74):

Riester A, Spyroglou A, Neufeld-Cohen A, Chen A, Beuschlein F

Urocortin-dependent effects on adrenal morphology, growth, and expression of steroidogenic enzymes *in vivo*. *J Mol Endocrinol*. 2012 Apr;48(2):159-67.

Neufeld-Cohen A, Evans AK, Getselter D, Spyroglou A, **Hill A**, Gil S, Tsoory M, Beuschlein F, Lowry CA, Vale W, Chen A

Urocortin-1 and -2 double-deficient mice show robust anxiolytic phenotype and modified serotonergic activity in anxiety circuits. *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):426-41, 339.

9.2 Vorträge

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen als Vorträge vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht:

Müller-Peltzer K, Spyroglou A, **Hill A**, Deussing J, Beuschlein F

In vivo effects of SF-1 dependent Urocortin2 overexpression on the gonads
13th Young Active Research in Endocrinology, 10/2011, Stockholm

Spyroglou A, **Hill A**, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F

Site specific overexpression of urocortin 2 results in modulation of steroidogenesis *in vivo*

European Congress of Endocrinology, 05/2011, Rotterdam

Spyroglou A, **Hill A**, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F

Site specific overexpression of Urocortin 2 results in modulation of steroidogenesis *in vivo*

54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 04/2011, Hamburg

Hill A, Spyroglou A, Deussing J, Beuschlein F

Effects of Steroidogenic Factor 1 dependent overexpression of Urocortin II on adrenal function *in vivo*

12th Young Active Research in Endocrinology, 10/2010, Düsseldorf

Hill A, Spyroglou A, Neufeld A, Chen A, Beuschlein F

Urocortin dependent effects on adrenal structure and function *in vivo*

11th Young Active Research in Endocrinology, 10/2009, München

9.3 Poster

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen als Poster vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht:

Müller-Peltzer K, Spyroglou A, **Riester A**, Deussing J, Beuschlein F

In vivo effects of SF-1 dependent Urocortin2 overexpression on gonadal morphology and function

55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 03/2012, Mannheim

Spyroglou A, **Hill A**, Mueller-Peltzer K, Deussing J, Beuschlein F

Site-Specific Overexpression of Urocortin 2 Results in Modulation of Steroidogenesis *In Vivo*

ENDO 2011 – The 93rd Annual Meeting of The Endocrine Society, 06/2011, Boston

Hill A, Spyroglou A, Neufeld A, Chen A, Beuschlein F

Urocortin-Dependent Effects on Adrenal Structure and Function *In Vivo*

ENDO 2011 – The 93rd Annual Meeting of The Endocrine Society, 06/2011, Boston

Hill A, Spyroglou A, Neufeld A, Chen A, Beuschlein F

Urocortin dependent effects on adrenal structure and function *in vivo*

54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 04/2011, Hamburg

Hill A, Spyroglou A, Neufeld A, Chen A, Beuschlein F

Urocortin dependent effects on adrenal structure and function *in vivo*

53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 03/2010, Leipzig

10 Lebenslauf

Anna Riester

geb. Hill

12. März 1986 in Lindenberg i. Allgäu

SCHULBILDUNG, STUDIUM UND WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Schulbildung

1992 – 1996

Grundschule Lindenberg

1996 – 2005

Gymnasium Lindenberg, Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin

2005 – 2007

Vorklinischer Studienabschnitt, Ludwig-Maximilians-Universität München und Technische Universität München

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, September 2007

2007 – 2012

Klinischer Studienabschnitt, Ludwig-Maximilians-Universität München

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Juni 2012

Approbation, Juli 2012

Promotionsstudiengang „Systembiologische Medizin“

2008 – 2010

im Rahmen des „Förderprogramms für Forschung und Lehre“ der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Forschungsstipendium:

10/2010 – 12/2010

MicroRNAs als endogene Regulatoren der Nebenniere

Dr. Alon Chen, Institut für Neurobiologie, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

PRAKTISCHES JAHR

12/2010 – 04/2011

Chirurgie: Krankenhaus Agatharied

04/2011 – 07/2011

Neurologie: Klinikum der Universität München

08/2011 – 12/2011

Innere Medizin: Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz

STIPENDIEN UND AUSZEICHNUNGEN

2008 – 2012 Stipendium der Hanns-Seidel-Stiftung
2010 Forschungsstipendium des Weizmann Institute of Science, Israel
04/2011, 10/2011 Travel Grant der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

10/2012 – heute Assistenzärztin
Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN (siehe auch Veröffentlichungen S. 71f)

Originalarbeit:

Riester A, Issler O, Spyroglou A, Rodrig SH, Chen A, Beuschlein F
ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland.
Endocrinology. 2012 Jan;153(1):212-22.

Vorträge:

Riester A, Issler O, Spyroglou A, Haramati S, Chen A, Beuschlein F
MicroRNAs as endogenous modulators of Glucocorticoid Receptor expression in the adrenal gland after ACTH stimulation test
13th Young Active Research in Endocrinology, 10/2011, Stockholm

Hill A, Issler O, Spyroglou A, Haramati S, Chen A, Beuschlein F
MicroRNAs as endogenous modulators of Glucocorticoid Receptor expression in the adrenal gland after ACTH stimulation test
54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 04/2011, Hamburg

Poster:

Hill A, Issler O, Spyroglou A, Haramati S, Chen A, Beuschlein F
MicroRNAs as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland after ACTH stimulation test
European Congress of Endocrinology, 05/2011, Rotterdam
