Aus der Klinik Kardiologie und Pneumologie

(Prof. Dr. G. Hasenfuß)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Entwicklung und Validierung eines neuen Schnellmessverfahrens für Adrenalin im Blutserum

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Uta Carina Geibel (geb. Krieger)

aus

Göttingen

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. rer. nat. V. O. Nikolaev
Ko-Referent/in:	PD Dr. rer. nat. M. Niebert
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med dent. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 17.10.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **IV**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Die Bedeutung der Adrenalinbestimmung 1

1.2 Adrenalin und seine Wirkung im menschlichen Körper 2

1.2.1 Synthese von Adrenalin 2

1.2.2 Adrenozeptoren 3

1.2.3 Alternative Messverfahren von Adrenalin 8

1.3 Intrazelluläre Messung von cAMP 10

1.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer 12

1.5 Intrazelluläre Messung von Calcium 14

1.6 Zielsetzung der Arbeit 16

2 Material und Methoden **19**

2.1 Materialien 19

2.1.1 Zellen 19

2.1.2 Plasmid 19

2.1.3 cDNA 19

2.1.4 Medien, Lösungen, Substanzen für die Zellkultur 19

2.1.5 Chemikalien 20

2.1.6 Puffer 20

2.1.7 Geräte 21

2.1.8 Software 21

2.1.9 Herkunft des Blutserums 21

2.2 Methoden 22

2.2.1 Zellkultur 22

2.2.2 Aufbewahrung 22

2.2.3 Transfektion, Selektion und Klonierung der HEK 293-Zellen 23

2.2.4 Zellvorbereitung zur Messung am Mikroskop 24

2.2.5 Messung von cAMP mittels FRET-Ratio 24

2.2.6 Messung von intrazellulärem Ca^{2+} mit Fura-2 26

2.2.7 Vorbereitung der Zellen für die Adrenalinbestimmung an der Flex Station 3 28

2.2.8 Ca^{2+}-Messung mit dem FlexStation® 3 Microplate Reader 28

2.2.9 Adrenalinextraktion 30

2.2.10 FRET- und Fura-2-Messung an extrahierten Adrenalinproben 30

2.2.11 FRET- und Fura-2-Messung an Serumproben 31

2.3 Statistik 31

3 Ergebnisse 32

3.1 Nachweis von Adrenalin durch intrazelluläre cAMP-Messung 32

3.1.1 Testung von HEK 293 Epac1-camps-Zellen 32

3.1.2 Erstellung einer Dosiswirkungskurve für die HEK 293 Epac1-camps-Zellen 34

3.2 Nachweis von Adrenalin durch intrazelluläre Ca^{2+}-Messung 35

3.2.1 Testung von HEK 293 α_{1B}-Zellen 36

3.2.2 Erstellung einer Dosiswirkungskurve für HEK 293 α_{1B}-Zellen 37

3.3 Adrenalinextraktion 38

3.3.1 Nachweis von extrahiertem Adrenalin durch cAMP-Messung 39

3.3.2 Nachweis von extrahiertem Adrenalin durch Ca^{2+}-Messung 40

3.4 Messung von Patientenseren 41

3.4.1 Messzeiten 41

3.4.2 cAMP- Bestimmung in Patientenseren 42

3.4.3 Ca^{2+}-Bestimmung in Patientenseren 45

3.5 Direkter Vergleich der Messverfahren 48

4 Diskussion 50

4.1 Testung von transfizierten Zelllinien 50

4.2 Erstellung der Dosiswirkungskurven 51

4.3 Adrenalinextraktion 52

4.4 Vergleich der Nachweisgrenzen des entwickelten Verfahrens mit alternativen Messverfahren 52

4.5 Vergleich der Prozesszeiten des entwickelten Verfahrens mit alternativen Messverfahren 53

4.6 Adrenalinbestimmung in Patientenseren 55

5 Zusammenfassung 56

6 Literaturverzeichnis 58

6.1 Internetquellen 63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthese von Noradrenalin und Adrenalin im Nebennierenmark 3

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch α_1- und β_2-Adrenozeptoren 5

Abbildung 3: Funktionsprinzip des cAMP-FRET Sensors Epac1-camps 11

Abbildung 4: Jablonski-Diagramm 12

Abbildung 5: Absorptions- und Emissionsspektra von CFP und YFP 13

Abbildung 6: Exzitationsspektrum von Fura-2 15

Abbildung 7: Strategien zur Entwicklung eines neuen Schnellmessverfahrens 18

Abbildung 8: Aufnahme YFP Kanal und CFP Kanal 25

Abbildung 9: Aufbau eines FRET-Mikroskops 26

Abbildung 10: Aufnahme von mit Fura-2-gelabelten HEK 293 α_{1B}-Zellen 27

Abbildung 11: FlexStation® 3 Reader der Firma Molecular Devices 29

Abbildung 12: Testung von HEK 293 Epac1-camps-Zellen (Klon 3) 33

Abbildung 13: Beispielspur der Messung einer HEK 293 Epac1-camps-Zelle 34

Abbildung 14: FRET-Dosiswirkungskurve für Adrenalin 35

Abbildung 15: Testung HEK 293 α_{1B}-Zelle Klon A 36

Abbildung 16: Testung einer HEK 293 α_{1B}-Zelle Klon B 37

Abbildung 17: Fura-2-Dosiswirkungskurve für Adrenalin 38

Abbildung 18: Dosiswirkungskurve für extrahiertes Adrenalin (FRET) 39

Abbildung 19: Dosiswirkungskurve für extrahiertes Adrenalin (Fura-2) 40

Abbildung 20: Messzeiten für cAMP- und Calciumbestimmungen 42

Abbildung 21: Darstellung der FRET-Ratio nach Zugabe von Adrenalinextrakt und 1 µM Adrenalinverdünnung 43

Abbildung 22: *Paired-t*-Test der cAMP-FRET-Signale der gemessenen Patientenseren 44

Abbildung 23: *Paired-t*-Test der Adrenalinkonzentration in Patientenseren 45

Abbildung 24: Veränderung der Ratio F340/F380 nach Zugabe von Extrakten aus verschiedenen Patientenseren 46

Abbildung 25: *Paired-t*-Test der Fura-2-Signale der gemessenen Patientenseren 47

Abbildung 26: *Paired-t*-Test der Adrenalinkonzentrationen in den Patientenseren 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktion und Signalwege von Adrenozeptoren 6

Tabelle 2: Nachweisgrenzen und Probenvolumina verschiedener Nachweismethoden 9

Tabelle 3: FRET-Puffer 20

Tabelle 4: TRIS/EDTA-Puffer 20

Tabelle 5: Protokoll Adrenalinextraktion 30

Tabelle 6: Maximale Signale und Adrenalinkonzentrationen von Patientenseren 49

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyklase
A. dest	destilliertes Wasser
α-AR	α-Adrenozeptor
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-AR	β-Adrenozeptor
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
camps	cAMP-Sensor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CNBD	Zyklische Nukleotid-bindende Domäne (c*yclic nucleotide-binding domain)*
CNGC	Zyklonukleotid-gesteuerter Ionenkanal *(cyclic nucleotide-gated ion channel)*
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium *(Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung *(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)*

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest *(enzyme-linked immunosorbent assay)*
Epac	Austauschprotein, das direkt durch cAMP aktiviert wird *(exchange protein directly activated by cAMP)*
eR	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum *(fetal calf serum)*
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G418	Geneticin
G_i	inhibitorisches G-protein
G_s	stimulierendes G-protein
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen *(Human Embryonic Kidney cells)*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleitstungsflüssigkeitschromatographie
M	mol/l
Mg^{2+}	Magnesium
Na^{+}	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	nmol/l
NNK	Nebennierenvenenkatheter
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C

PKC	Proteinkinase C
PR	peripher entnommene Probe
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
YFP	gelb fluoreszierendes Protein *(yellow fluorescent protein)*
zR	Nebennierenvenenkatheterserum

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Adrenalinbestimmung

Nachdem das zu den Katecholaminen gehörende Adrenalin Ende des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal Erwähnung in der Literatur gefunden hat (Abel 1899), folgten darauf die ersten Versuche, es in verschiedenen Materialien, wie z.B. Urin oder Plasma, nachzuweisen (Lund 1949; Lund 1950). Bis heute ist die Weiterentwicklung der Nachweismethoden Gegenstand der Forschung, um diese im Hinblick auf Sensitivität und Schnelligkeit zu verbessern. Der Nachweis von Katecholaminen bzw. seinen Metaboliten hat in der Diagnostik endokrinologischer Erkrankungen einen wichtigen Stellenwert. Veränderte Plasmakonzentrationen der Katecholamine bzw. der Metaboliten sind beispielsweise bei Erkrankungen, wie dem Phäochromozytom, essentieller Hypertonie oder Morbus Addison, nachzuweisen (Rosano et al. 1991; Bornstein et al. 1995; Goldstein et al. 2003).

An der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie am Universitätsklinikum Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Schott, AG Dr. Holger Willenberg, erfolgt im Rahmen der Diagnostik des Primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) die Nebennierenvenenkatheterisierung zur Differenzierung zwischen ein- und beidseitigen Erkrankungen (Diederich et al. 2007; Vonend et al. 2011). Vor diesem Hintergrund ist es allgemein notwendig, die richtige Katheterlage in den Nebennieren zu bestätigen. Dies kann über die Bestimmung eines Konzentrationsunterschiedes von Cortisol im Blut aus dem Katheter im Vergleich zu peripher entnommenem Blut erfolgen. Aber auch über die Messung von Adrenalin, welches ebenfalls in der Nebenniere gebildet wird, kann ein Konzentrationsunterschied die Bestätigung für die korrekte Katheterlage sein. In diesem Zusammenhang werden Schnellmessverfahren benötigt, um in kurzer Zeit niedrige Adrenalinkonzentrationen nachweisen zu können. Im Rahmen der Zusammenarbeit zwischen der AG von Dr. Willenberg und der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Gerd Hasenfuß, AG Dr. Viacheslav Nikolaev (mittlerweile Prof. Dr. Nikolaev am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg), wurde diese Thematik aufgegriffen und die Entwicklung eines Schnellmessverfahrens begonnen.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Entwicklung eines solchen Schnellmessverfahrens für Adrenalin im Serum.

Im Folgenden werden zunächst die Grundlagen und die zum Verständnis des Messverfahrens notwendigen Komponenten erläutert, bevor im Kap. 1.6 auf das genaue Vorgehen eingegangen wird.

1.2 Adrenalin und seine Wirkung im menschlichen Körper

Adrenalin (griechisch: Epinephrin) kommt als Stresshormon im Blut vor. Zu den ersten Entdeckern gehören neben John Jacob Abel, dem es als erstem gelang, Adrenalin aus dem Nebennierenmark zu isolieren, Jōkichi Takamine und Thomas Bell Aldrich (Carmichael und Rochester 1989). Während Takamine den isolierten Stoff Adrenalin nannte, verwendete Aldrich das griechische Wort Epinephrin (Peaston und Weinkove 2004).

Neben Noradrenalin und Dopamin zählt Adrenalin zu den Katecholaminen. Diese sind chemisch gesehen Monoamine, die aus einem Benzolring mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen bestehen. Daneben ist der Ring über eine Ethylengruppe mit einer Aminogruppe verbunden. Allen drei Katecholaminen ist ihre Funktion als Neurotransmitter im sympathischen Nervensystem gemein. Adrenalin bewirkt über die Stimulation von Adrenozeptoren sowohl kardiovaskuläre als auch metabolische Effekte (Ellis 1956). Im Detail wird auf die Wirkung von Adrenalin im Rahmen der Adrenozeptoren in Abschnitt 1.2.2 eingegangen.

1.2.1 Synthese von Adrenalin

Die Synthese von Adrenalin beinhaltet verschiedene enzymatisch gesteuerte Reaktionen (Abbildung 1). Ausgangssubstanz ist die Aminosäure Tyrosin, welche über die Zwischenprodukte L-DOPA und Dopamin zu Noradrenalin umgewandelt wird. Mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase entsteht in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks das Hormon Adrenalin durch die Anlagerung einer Methylgruppe (Axelrod 1962; Verhofstad 1993).

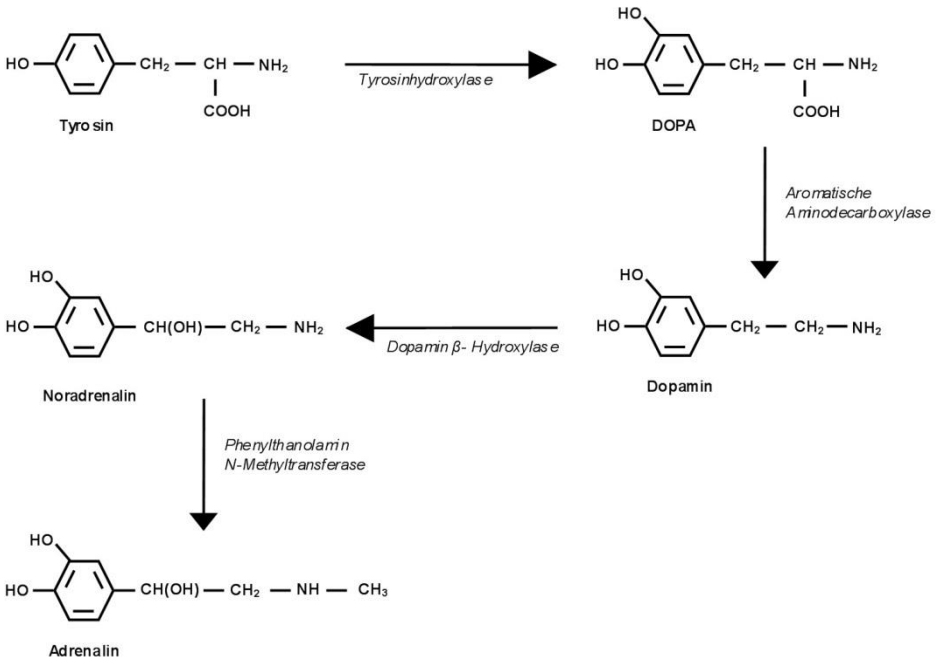

Abbildung 1: Synthese von Noradrenalin und Adrenalin im Nebennierenmark

Die Aminosäure Tyrosin wird von der Tyrosinhydroxylase zu DOPA hydroxyliert. Von der Zwischensubstanz DOPA wird mit Hilfe der Aromatischen Aminodecarboxylase eine Carboxylgruppe abgespalten, und es entsteht das Katecholamin Dopamin. Durch Hydroxylierung mit der Dopamin β-Hydroxylase entsteht Noradrenalin, an welches über die Phenylethanolamin N-Methyltransferase eine Methylgruppe gebunden wird. Das Endprodukt ist Adrenalin.

Das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus der Hypophyse fördert die Glukokortikoidsynthese in der Nebennierenrinde. Die Steroide wiederum erhöhen die Aktivität der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und fördern dadurch die Adrenalinsynthese (Wurtman und Axelrod 1966).

Ein weiterer Syntheseort für Adrenalin sind Neurone im Gehirn, welche selbst Adrenalin produzieren und als Neurotransmitter verwenden (Fuller 1982).

1.2.2 Adrenozeptoren

Der Neurotransmitter Adrenalin vermittelt seine Wirkung über sogenannte Adrenozeptoren, die in α- und β-Adrenozeptoren (α-AR/ β-AR) unterschieden werden (Ahlquist RP 1948). Diese wiederum weisen folgende Subtypen auf: α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, α_{2A}, α_{2B},

α_{2C}, β_1, β_2 und β_3 (Bylund et al. 1992; Hieble et al. 1995) . Die Adrenozeptoren gehören in die Gruppe der heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Die durch die Bindung von Adrenalin eingeleitete intrazellulär ablaufende Reaktion ist abhängig von der Art des G-Proteins (Small et al. 2003). Ein G-Protein ist aus 3 Untereinheiten aufgebaut: α-, β- und γ- Untereinheit (Kaziro et al. 1991; Neer 1994). Der Adrenozeptor kann an $G_s/G_i/G_q$-Proteine koppeln (Hamm 1998). Die unterschiedlichen G-Proteine zeichnen sich durch voneinander abweichende intrazelluläre Effekte aus. Während stimulatorische (G_s) Proteine die Adenylatcyclase (AC) aktivieren und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen, haben G_i-Proteine einen inhibierenden Effekt auf die AC und bewirken damit ein Absinken der zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat-Konzentration (cAMP). Einen anderen Mechanismus weisen die G_q-Proteine auf, die über die Aktivierung von Phospholipase Cβ (PLC) die intrazelluläre Calcium-Konzentration (Ca^{2+}) erhöhen (Hamm und Gilchrist 1996; Heinrich et al. 2014).

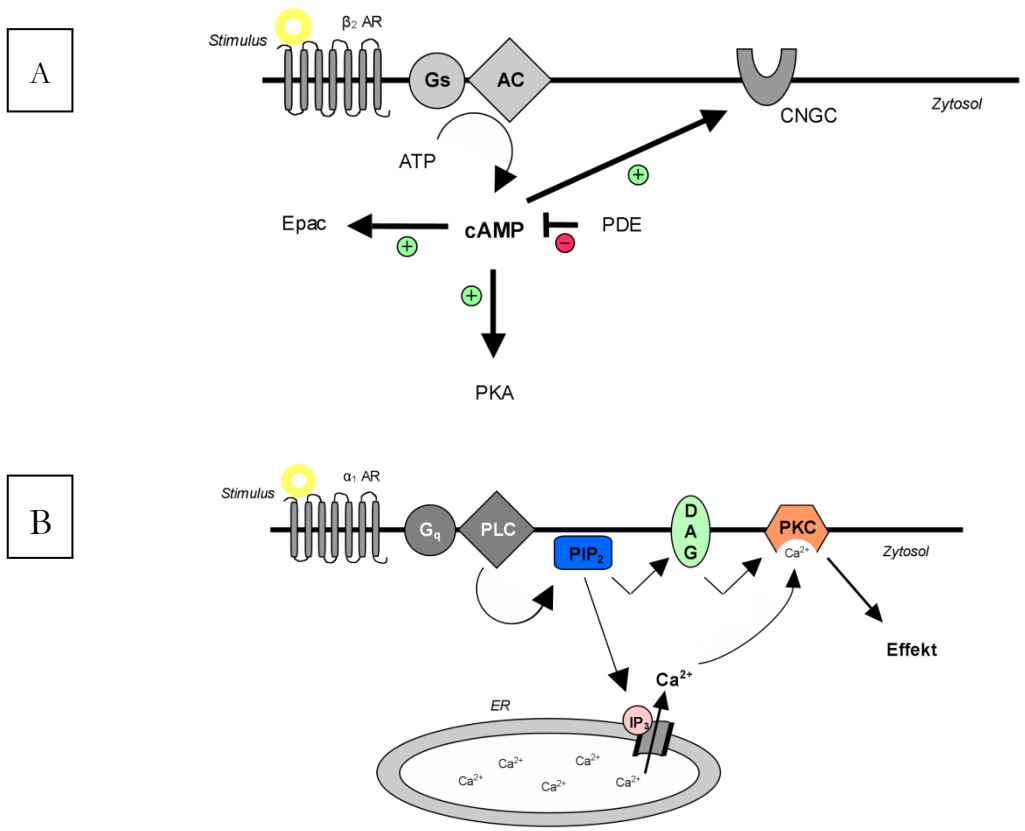

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch α_1- und β_2-Adrenozeptoren

Abbildung A zeigt die Freisetzung von cAMP nach Stimulation des β-ARs und der daraus aktivierten Signalübertragung über das G_s-Protein und die AC. Ebenfalls werden weitere Wirkungen von cAMP dargestellt.

Abbildung B zeigt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (eR) nach Stimulation des α-ARs. Die Signalübertragungskette über das aktivierte G_q-Protein und die PLC ist ebenfalls dargestellt, außerdem die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) durch Ca^{2+} und Diacylglycerin (DAG).

Adrenozeptoren besitzen physiologische Funktionen, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Rezeptor	Signaltransduktion	Intrazelluläres Signalmolekül	Effekt
α_1	G_q-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase Cβ	Inositoltrisphosphat; Diacylglycerin; Ca^{2+}-Freisetzung	Steigerung von Glykogenolyse und Glukoneogenese; Vasokonstriktion (glatte Muskulatur)
α_2	G_i- Protein-vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase	Senkung des cAMP-Gehaltes	Hemmung der Lipolyse, Hemmung der Insulinsekretion
β_1	G_s-Protein-vermittelte Stimulierung der Adenylatcyclase	Steigerung des cAMP-Gehaltes	Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens
β_2	G_s-Protein-vermittelte Stimulierung der Adenylatcyclase	Steigerung des cAMP-Gehaltes	Steigerung der Glykogenolyse, Glukoneogenese und Lipolyse; Relaxation glatter Muskulatur (Vaso- , Bronchodilatation)
β_3	G_s-Protein-vermittelte Stimulierung der Adenylatcyclase	Steigerung des cAMP-Gehaltes	Steigerung der Lipolyse und Thermogenese im braunen Fettgewebe

Tabelle 1: Funktion und Signalwege von Adrenozeptoren

Tabelle 1 zeigt die α- und β-AR nach Einteilung in ihre Subtypen. In der Tabelle werden die jeweiligen Signaltransduktionswege mit dem intrazellulären Signalmolekül dargestellt. Des Weiteren werden die jeweiligen Effekte, die über den jeweiligen Rezeptor vermittelt werden aufgelistet. (Heinrich et al. 2014).

Neben der Wirkung über die Adrenozeptoren wirkt Adrenalin auch an spezifischen Neuronen, die das Enzym Phenylethanolamin-N-methyltransferase bilden, als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Fuller 1982).

1.2.2.1 α-Adrenozeptoren

Die α-AR kommen in verschiedenen Organen vor und lassen sich neben der Einteilung in α_1 und α_2 noch in weitere Subtypen untergliedern (Docherty 1998).

α_1-AR werden in α_{1A} (Schwinn et al. 1990), α_{1B} (Cotecchia et al. 1988) und α_{1D} (Perez et al. 1991) eingeteilt. Sie kommen in verschiedenen Organen wie z.B. Herz, Aorta, Leber, Prostata und Urethra vor (Civantos Calzada und Aleixandre de Artiñano 2001). Alle Untergruppen bewirken über die G_q-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase Cβ, die Freisetzung von Ca^{2+} (Zhong und Minneman 1999). Ein Unterschied zwischen α_{1A}- und α_{1B}-AR ist die Mobilisation von Ca^{2+} nach Rezeptoraktivierung (Han et al. 1987). α_{1B} mobilisiert Ca^{2+} über den Inositoltrisphosphat-abhängigen Weg aus intrazellulären Reserven, wohingegen α_{1A} Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum über spezifische Ca^{2+}-Kanäle bereitstellt (Tsujimoto et al. 1989).

α_2-AR erfahren ebenfalls eine Einteilung in Untergruppen: α_{2A}, α_{2B} und α_{2C} (Regan et al. 1988; Weinshank et al. 1990). Sie vermitteln über G_i-Proteine die Hemmung der AC und bewirken damit eine Hemmung der cAMP-Synthese (Aantaa et al. 1995). Diese Rezeptoren kommen ebenfalls in unterschiedlichen Organen u.a. in der Großhirnrinde, im Hirnstamm, in der Niere, im Gastrointestinaltrakt und im Myometrium des Uterus vor (Aantaa et al. 1995; Kable et al. 2000).

1.2.2.2 β-Adrenozeptoren

Auch bei den β-AR wird zwischen den drei Subtypen β_1 und β_2 (Lands et al. 1967b; Lands et al. 1967a) sowie β_3 (Strosberg 1997) unterschieden. Die β_1-AR kommen vorwiegend im Herzen, aber auch in der Niere und im Fettgewebe vor (Lohmann et al. 1990).

β_2-AR wurden in den Bronchien, im Uterus, in der Skelettmuskulatur und im Pankreas nachgewiesen. Dort spielen sie bei der Vasodilatation bzw. Bronchodilatation eine große Rolle. In der Skelettmuskulatur, sowie im Pankreas sind sie an Stoffwechselprozessen, wie der Glykogenolyse und der Insulinsekretion beteiligt (Lohmann et al. 1990).

β_3-AR kommen insbesondere im brauen Fettgewebe bei der Lipolyse und der Wärmegewinnung zum Einsatz (Lipworth 1996).

1.2.3 Alternative Messverfahren von Adrenalin

In der Literatur werden verschiedene Methoden zum Nachweis von Katecholaminen und somit auch von Adrenalin erwähnt. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich des Reaktionsmechanismus zur Adrenalin-Bestimmung, der Empfindlichkeit, des verwendeten Probenmaterials und des Probenvolumens.

Zu den älteren Methoden gehört die Fluorimetrie, bei der Adrenalin (nach Extraktion aus Serum/Plasma mit Aluminiumoxid und Säure) in ein fluoreszierendes Derivat umgewandelt und mittels Spektralphotometrie gemessen wird. Lund beschreibt eine solche fluorimetrische Methode, bei der Adrenalin in das fluoreszierende Trihydroxyindol (= Adrenolutin) umgewandelt wird (Lund 1949; Lund 1950). Des Weiteren wird eine Methode beschrieben, bei der die Oxidation von Adrenalin in ein fluoreszierendes Derivat mit Ethylendiamin erfolgt (Malherbe und Bone 1953).

Peuler und Johnson beschreiben eine modifizierte Methode des Radioenzym Assays nach Axelrod (Axelrod 1957; Peuler und Johnson 1977). Die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin werden mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase und einer radioaktiven Methylgruppe des S-Adenosylmethionin in ein radioaktives O-Methyl-Katecholamin-Derivat umgewandelt. Dabei handelt es sich um ^{3}H-Normetaneprhin, ^{3}H-Metanephrin und ^{3}H-3-Methoxytyramin. Die radioaktiven Derivate werden durch Dünnschichtchromatografie aufgetrennt und anschließend im Szintillationszähler detektiert.

Mit Hilfe von chromatographischen Verfahren ist es ebenfalls möglich, Katecholamine nachzuweisen. Dabei wird insbesondere zwischen Gaschromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unterschieden. Eine Weiterentwicklung der HPLC stellt die Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) dar.

Die gaschromatographischen Verfahren transportieren die Messsubstanz entlang eines Trägergases und verwenden zum Nachweis am Ende der Auftrennung Flammenionisationsdetektoren oder Massenspektrometrie (Lovelady und Foster 1975; Ehrhardt und Schwartz 1978).

Im Gegensatz zur Gaschromatographie wird bei der HPLC die Messsubstanz von einer mobilen flüssigen Phase entlang einer stationären festen Phase aufgetrennt. Die zur Katecholaminbestimmung beschriebenen Verfahren setzen fluoreszenz- oder elektrochemische Detektoren zum Nachweis der aufgetrennten Katecholamine ein (Hallman et al. 1978; Mitsui et al. 1985). Dazu müssen die Katecholamine in einen fluoreszierenden Stoff umgewandelt werden bzw. oxidierbar/ reduzierbar sein, um von den genannten Detektoren erfasst werden zu können.

Zu den neuesten Entwicklungen gehört die UPLC, bei der es zu einer Erhöhung der Analysegeschwindigkeit durch größeren Druck kommt (Dunand et al. 2013).

Literatur	**Methode**	**Nachweisgrenze laut Autor**	**Nachweis-grenze in nM**	**Proben-volumen (Plasma)**
(Lund 1949)	Fluorimetrie	1 µg/l	5,5 nM (5500 pM)	10 ml (Serum)
(Engelman et al. 1970)	Radioenzymassay	0,05 µg/l (+/- 0,03)	0,275 nM (275 pM)	5-10 ml
(Peuler und Johnson 1977)	Radioenzymassay	20 pg/ml	0,11 nM (109 pM)	50 µl
(Lovelady und Foster 1975)	Gaschromato-graphie	0,386 ng/ml	2,1 nM (2110 pM)	5 ml Vollblut
(Hallman et al. 1978)	Hochleistungs-chromatographie	0,1 nM	0,1 nM (100 pM)	0,75 ml
(Mitsui et al. 1985)	Hochleistungs-chromatographie	2 fmol/100 µl	0,02 nM (20 pM)	0,5 ml
(Dunand et al. 2013)	Ultrahochleistungs-chromatographie	0,05 nM	0,05 nM (50 pM)	50-250 µl
(Ji et al. 2010)	Ultrahochleistungs-chromatographie	0,27 nM	0,27 nM (2170 pM)	25 µl

Tabelle 2: Nachweisgrenzen und Probenvolumina verschiedener Nachweismethoden

Die Tabelle zeigt die in Abschnitt 1.2.3 erwähnten Nachweismethoden mit den dort beschriebenen Nachweismethoden, Nachweisgrenzen (in pmol/ bzw. nmol/l) sowie dem verwendeten Probenmaterial und dessen Menge.

Zur vereinfachten Übersicht wurden die Nachweisgrenzen sowie die eingesetzten Probenvolumina in Tabelle 2 dargestellt.

1.3 Intrazelluläre Messung von cAMP

cAMP ist ein intrazellulär vorkommender sekundärer Botenstoff. Er ist an der Signaltransduktion beteiligt und leitet dabei ein extrazellulär ankommendes Signal ins Innere der Zelle weiter. Zu den Funktionen des cAMP, die sich je nach Zelle unterscheiden, gehören neben der Regulation der Genexpression (Kolb et al. 1993; Altarejos und Montminy 2011), Insulinsekretion in den β-Zellen des Pankreas (Holz 2004; Ashcroft und Rorsman 2012), Immunabwehrfunktion (Bodor et al. 2012; Giese und Mizuno 2013), Lern- und Gedächtnisprozesse (Bailey et al. 1996; Giese und Mizuno 2013) die stimulierenden Effekte der β-AR im Herzen (Fischmeister et al. 2006). Bindet ein primärer Botenstoff an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird das Enzym AC aktiviert, welches Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP umwandelt. Man unterscheidet stimulierende G-Proteine (G_s) von inhibierenden G-Proteinen (G_i). G_s-Proteine stimulieren die cAMP Synthese durch die AC, wohingegen G_i-Proteine diese hemmen. Der Abbau von cAMP erfolgt über Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysieren.

In der Zelle erfüllt cAMP als Second Messenger durch die Bindung an Proteine unterschiedliche Aufgaben. Dazu gehört die Bindung an Zyklonukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNGC) (Zimmerman 1995; Craven und Zagotta 2006), Proteinkinase A (PKA) (Taylor et al. 1990; Taskén und Aandahl 2004) und am *exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) (Bos 2003; Gloerich und Bos 2010).

Bei einigen Methoden muss, um cAMP in lebenden Zellen nachzuweisen zu können, die Zelle lysiert werden. Hierbei verwendete Methoden sind z.B. Radioimmunoassays oder *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) (Harper und Brooker 1974; Williams 2004).

Ein weiteres Verfahren cAMP zu bestimmen, nutzt den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und fluoreszierende Proteine, die mit der cAMP-Bindedomäne des Epac gekoppelt sind (Ponsioen et al. 2004). Vorteil bei dieser Methode ist, dass cAMP in Echtzeit und ohne Zelllyse bestimmt werden kann. Der sogenannte Epac1-camps-Sensor (Nikolaev et al. 2004; Börner et al. 2011) nutzt dazu die korrespondierenden Proteine *cyan*

fluorescent protein (CFP) und das *yellow fluorescent protein* (YFP) (siehe 1.4), die mit Epac fusioniert wurden. Bindet cAMP an die Bindedomäne, kommt es zu einer Konformationsänderung des Epac und damit zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen den CFP und YFP (Nikolaev und Lohse 2006). Die Energieübertragung zwischen den Proteinen nimmt ab und damit auch das Verhältnis der Fluoreszenz zwischen den Farbstoffen CFP und YFP. Das Ansteigen der cAMP-Konzentration führt also zu einer Verringerung der Energieübertragung und damit zu einer Änderung des FRET-Signals (Abbildung 3).

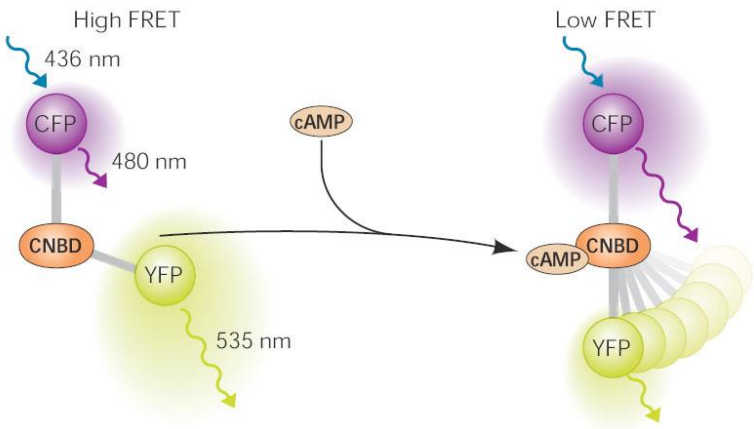

Abbildung 3: Funktionsprinzip des cAMP-FRET Sensors Epac1-camps

Die Abbildung zeigt FRET zwischen dem Donor (CFP) und dem Akzeptor (YFP). Bei Abwesenheit von cAMP an der zyklisches Nukleotid-bindendenden Domäne (CNBD), kommt es auf Grund der Nähe der Fluorophore zu einem hohen FRET und somit zu einer vermehrten Emission von Licht der Wellenlänge 535 nm durch YFP. Bei Anwesenheit von cAMP hingegen erfährt der Sensor bei Bindung von cAMP an der CNBD eine Konformationsänderung und die beiden Fluorophore vergrößern ihren Abstand zueinander. Daraus resultiert ein geringerer Energietransfer mit einer vermehrten Lichtemission von CFP und einer verringerten von YFP. Aus Nikolaev und Lohse 2006, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des APS Journals.

Wie in 1.2.2 beschrieben kommt es durch die Bindung von Adrenalin an β_2-AR über einen G_s-Protein-gekoppelten Prozess zur intrazellulären Freisetzung von cAMP. Durch den Anstieg von cAMP lassen sich also Rückschlüsse auf die Adrenalinkonzentration ziehen (Nikolaev und Lohse 2006).

1.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Bei dem von Förster in 1948 (Förster 1948) entdeckten Fluoreszenz (Förster)-Resonanz-Energietransfer (FRET) kommt es zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen zur Übertragung von Energie. Es handelt sich um einen strahlungsfreien Energietransfer, bei dem ein angeregter Donor Licht einer bestimmten Wellenlänge abstrahlt und die Emissionsenergie auf einen Akzeptor überträgt. Die Intensität der Donor-Fluoreszenz nimmt daraufhin ab, wohingegen die Akzeptor-Fluoreszenz zunimmt. Eine hohe FRET-Effizienz wird bei einem Abstand von 1-10 nm zwischen den Fluorophoren erreicht. Außerdem sollte sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen (Wu und Brand 1994).

Mit Hilfe des Jablonski-Diagramms lässt sich der Übergang der Anregungszustände der Elektronen erklären (Jabłoński 1933) (Abbildung 4: Jablonski-Diagramm).

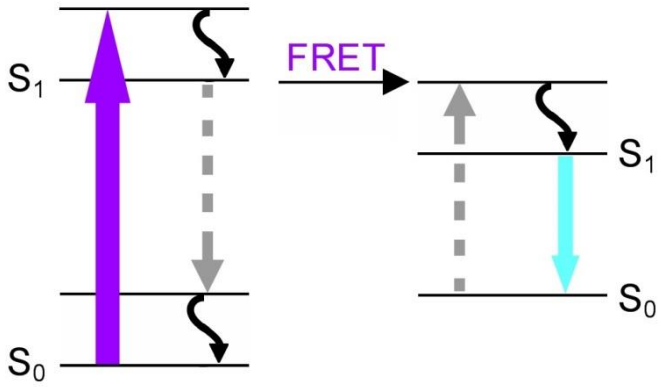

Abbildung 4: Jablonski-Diagramm

Diese Abbildung zeigt das Jablonski-Diagramm, anhand dessen der Mechanismus des FRET erklärt werden kann. Wird ein Donor-Fluorophor angeregt, so bewirkt die absorbierte Energie die Anhebung von Elektronen aus dem Grundzustand S_0 in den höheren Anregungszustand S_1. Sobald das Elektron wieder in den S_0 Zustand zurück fällt, wird erneut Energie frei. Diese wird auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen (FRET) und bringt die Elektronen in den S_1 Zustand. Fallen diese Elektronen ebenfalls in den Grundzustand, kommt es zur Emission von Fluoreszenz.

Durch die Absorption von Energie werden Elektronen aus einem Grundzustand S_0 in einen höheren, angeregten Zustand S_1 gebracht. Fällt das Elektron wieder in den Grundzustand zurück wird Energie frei, die vom Akzeptor absorbiert wird und Akzeptor-Elektronen in einen höheren Energiezustand S_1 bringt. Gelangen die Elektronen des Akzeptors wieder in den Grundzustand S_0 kommt es zur Aussendung von Fluoreszenz.

Ein bekannter Fluoreszenzfarbstoff ist das *green fluorescent protein* (GFP). Als Varianten des GFP kommen das CFP und das YFP vor (Tsien 1998). Die Emissions- und Anregungsspektren von CFP und YFP überlappen sich und machen somit den FRET möglich (Piston und Kremers 2007) (Abbildung 5).

Das FRET-Signal wird ermittelt, indem die Emissionsintensitäten vom Donor CFP und dem Akzeptor YFP gemessen werden und das Verhältnis zwischen YFP/CFP bestimmt wird. Die damit ermittelte Ratio entspricht dem FRET-Signal.

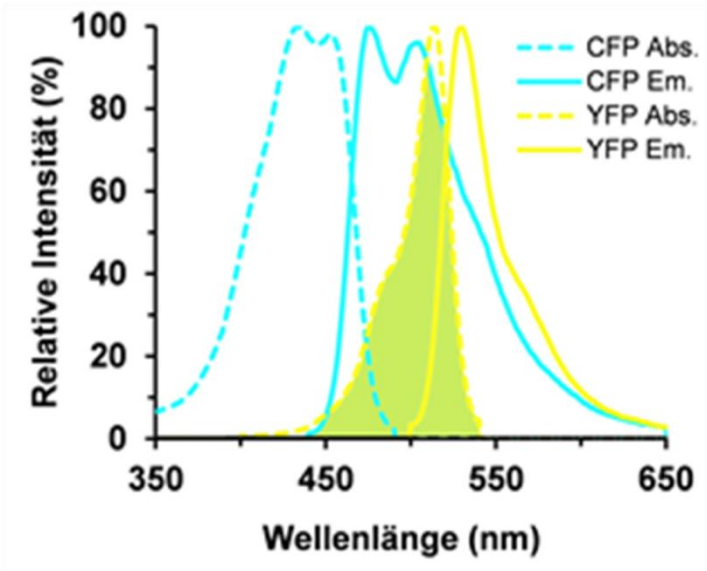

Abbildung 5: Absorptions- und Emissionsspektra von CFP und YFP

Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP. Der spektrale Überlappungsbereich (grün) zwischen dem Emissionsspektrum von CFP (cyan) und dem Absorptions-spektrum von YFP (gelb) ermöglicht somit den FRET. Abbildung erstellt über „Fluorescence SpectraViewer" der Firma ThermoFisher Scientific.

Die beschriebene Technik des FRET hat zur Weiterentwicklung von verschiedenen Methoden zum Nachweis von cAMP geführt (Sprenger und Nikolaev 2013).

1.5 Intrazelluläre Messung von Calcium

Neben seinem Vorkommen als Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen ist Ca^{2+} als Calciumion intra- und extrazellulär in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden. Zu den wichtigen Prozessen an denen Ca^{2+} beteiligt ist, gehören die Muskelkontraktion, die Erregungsleitung, die Signaltransduktion sowie verschiedene Stoffwechselleistungen (Rasmussen und Barrett 1984; Cheung et al. 1986; Carafoli 1987).

Über α_1-AR (s.1.2.2.1) wird nach Bindung von Adrenalin Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt, welches die PKC aktiviert. PKC ist ein wichtiges Enzym für die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung (Asaoka et al. 1992; Nishizuka 1992). Es wird angenommen, dass Ca^{2+} als Second Messenger an einem Großteil der Zellfunktionen beteiligt ist (Carafoli 1987; Wier 1990).

Zur Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} wurde eine Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen entwickelt, wie z.B. Quin-2, Fura-2 und Indo-1, welche mittels Veränderungen der Fluoreszenz bei bestimmten Wellenlängen nach Bindung von Ca^{2+}, dieses quantitativ in lebenden Zellen messen können (Grynkiewicz et al. 1985; Cobbold und Rink 1987). Eine weitere Möglichkeit bieten Ca^{2+}-empfindliche Mikroelektroden, die allerdings eine langsamere Antwort auf schnelle Änderungen der Konzentrationen bieten, als Fluoreszenzfarbstoffe (Hayashi und Miyata 1994).

Fura-2 dient auf Grund seiner vielfältigen Möglichkeiten, besonders im direkten Vergleich mit Quin-2, zur genaueren Bestimmung von Ca^{2+}. Beispielsweise zeigt Fura-2 im Vergleich zu Quin-2 eine stärkere Fluoreszenz, eine Änderung der Wellenlänge bei Bindung von Ca^{2+} und eine höhere Selektivität für Ca^{2+} gegenüber Magnesium (Mg^{2+}) (Grynkiewicz et al. 1985). Fura-2 wurde 1985 von der Arbeitsgruppe um Tsien entwickelt (Williams et al. 1985). Der Fluoreszenzfarbstoff geht mit Ca^{2+} einen Chelatkomplex ein. Bei einer Anregung des Farbstoffes im Wellenlängenbereich von 340 und 380 nm lässt sich eine Emission bei ca. 510 nm messen. Hat Fura-2 Ca^{2+} gebunden, so wird es bei 340 nm Anregung stärker fluoreszieren, freies Fura-2 hingegen nur bei 380 nm Anregung (Tsien und Poenie 1986; Cobbold und Rink 1987).

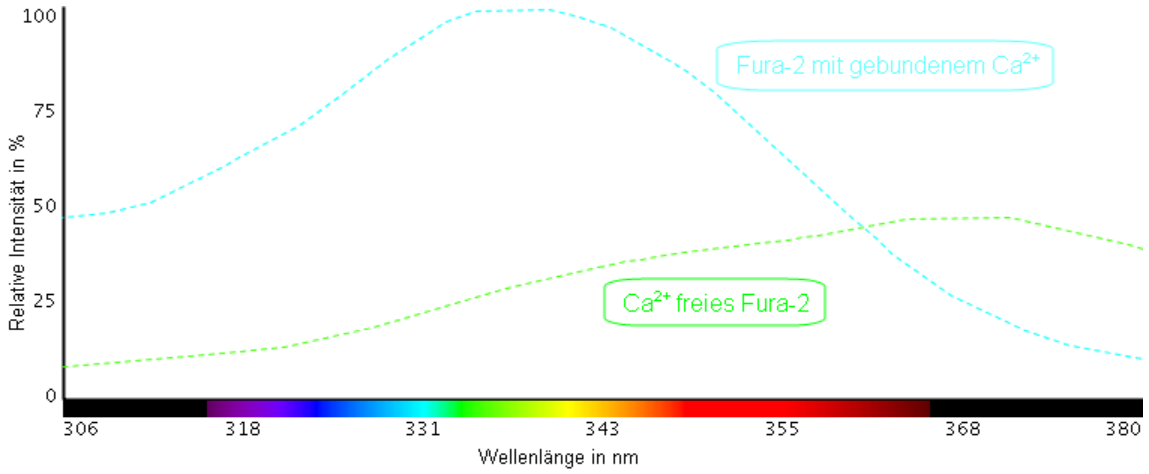

Abbildung 6: Exzitationsspektrum von Fura-2

Gezeigt wird sowohl das Absorptionsspektrum von Fura-2 in Anwesenheit von Ca^{2+}, als auch in Abwesenheit von Ca^{2+}. Abbildung erstellt über „Fluorescence SpectraViewer“ der Firma ThermoFisher Scientific.

Damit die membranimpermeable Substanz Fura-2 in lebende Zellen diffundieren kann, wurde es mit Acetoxymethylester (AM) gekoppelt zu Fura-2 AM (Tsien 1981). Das lipidlösliche AM hilft bei der passiven Diffusion in die Zellen und wird intrazellulär mit Hilfe von Esterasen hydrolysiert. Dadurch wird gleichzeitig eine Diffusion von Fura-2 aus der Zelle verhindert.

Soll nun die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} mit Hilfe von Fura-2 bestimmt werden, so kann anhand der unterschiedlichen Anregungsspektren von Fura-2 mit und ohne gebundenes Ca^{2+} eine Ratio ermittelt werden. In Anwesenheit von Ca^{2+} steigt die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 340 nm und sinkt bei 380 nm. Die Ratio lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Ratio} = F_{340}/F_{380}$$

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Schnellmessverfahren für Adrenalin entwickelt werden.

Vor dem Hintergrund, dass die neue Methode beispielsweise während einer Nebennierenvenenkatheteruntersuchung, wobei es sich um einen invasiven Eingriff handelt, durchgeführt werden soll, wird klar warum eine solche Methode schnell zu sicheren Ergebnissen führen muss. Anhand der vorliegenden Literatur über andere Messverfahren für Adrenalin wird ersichtlich, dass Methoden auf Grund verschiedener Fragestellungen entwickelt wurden (Nyyssönen und Parviainen 1988; Rosano et al. 1991; Merke et al. 2000; Grouzmann und Lamine 2013).

Ziel dieser Arbeit sollte insbesondere sein, dass das Verfahren schnell und einfach durchzuführen ist und geringe Adrenalinkonzentrationen nachgewiesen werden können.

Die Überlegungen hinsichtlich einer neuen Nachweismethode gehen in die biochemische Ebene der Signaltransduktion von menschlichen Zellen. Durch die Kenntnis, dass Adrenalin nach der Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Adrenozeptor intrazellulär zu der Freisetzung von cAMP bzw. Ca^{2+} führt, entstand die Idee, Adrenalin indirekt über diese freigesetzten sekundären Botenstoffe zu bestimmen.

cAMP kann mit Hilfe des Epac1-camps in menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Nikolaev und Lohse 2005). Vereinfacht dargestellt bindet freigesetztes cAMP an die Bindungsstelle des Epac1-camps und bewirkt eine Veränderung des FRET-Signals im Sinne einer verringerten Emissions-Ratio der Fluoreszenzfarbstoffe CFP und YFP. Diese Änderung kann über ein geeignetes Fluoreszenzmikroskop gemessen werden.

Ca^{2+} hingegen kann über seine Bindung an dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 nachgewiesen werden. Dieser weist im gebundenen Zustand ein anderes Emissionsspektrum auf als im ungebundenen Zustand, so dass hier die Exzitations-Ratio zwischen den Wellenlängen 340 und 380 nm errechnet werden kann (Tsien et al. 1985).

Stimuliert man mit Adrenalin eine entsprechende Zelle, so kommt es zum Anstieg von intrazellulärem cAMP bzw. Ca^{2+}. Daraufhin wird eine Änderung der FRET- bzw. Fura-2-Ratio erwartet. Vergleicht man die Signale vor und nach Stimulation, so sollte eine

Differenz erkennbar sein, welche wiederum Rückschlüsse zur zugegebenen Menge Adrenalin erlauben könnte.

Ziel war es, auf Basis dieser beiden Theorien zwei stabile Zelllinien zu entwickeln, die zum einen den cAMP-Sensor Epac1-camps für FRET-Messungen und zum anderen den α_{1B}-Adrenozeptor für Fura-2-Messungen enthalten.

Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurden HEK 293-Zellen verwendet, die einerseits endogen den β_2-AR (Krupinski et al. 1992; Premont et al. 1992) und andererseits nur geringe Menge an endogenen α_1- und β_1-AR exprimieren (Theroux et al. 1996; Sumi et al. 2010). Zur Messung von intrazellulärem cAMP nach Bindung von Adrenalin am β_2-AR eignen sich die HEK 293-Zellen sehr gut, da sie ausreichende Mengen des Rezeptors exprimieren. Um eine Ca^{2+}-Freisetzung zu erzielen, benötigt die HEK 293-Zelle einen α_{1B}-AR. Um eine ausreichende Rezeptordichte zu erzielen, wurden die Zellen mit Hilfe eines für den α_{1B}-AR codierenden Plasmids transfiziert.

Voraussetzung für die Entwicklung des Verfahrens war zunächst, stabile Zelllinien zu entwickeln, die auf der einen Seite den Epac1-camps-Sensor und auf der anderen Seite den α_{1B}-AR exprimieren. Nach erfolgreicher Transfektion der HEK 293-Zellen gehörte zu den nächsten Versuchen die Testung der beiden beschriebenen Zellkonstrukte auf ihre Reaktion nach der Zugabe von Adrenalin. Die Zellklone mit den stärksten Signalen wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Um Rückschlüsse von den verschiedenen Signalen auf die Adrenalinkonzentration ziehen zu können, ist es notwendig eine Dosiswirkungskurve zu erstellen. Diese wurde im zweiten Teil der Versuchsreihe über die Messung definierter Adrenalinlösungen erzielt.

Den abschließenden Teil der Versuchsreihe stellte die Testung des Verfahrens an menschlichen Serumproben dar. Diese Proben wurden von der Universitätsmedizin Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Um einen Vergleich zwischen Nebennierenvenen-katheterblut und peripher entnommenem Blut erkennen zu können, wurden die Ergebnisse der Proben von den genannten Entnahmestellen miteinander verglichen.

Das entwickelte Verfahren soll zukünftig seinen Einsatz auch in Routinelabors finden. Hier fallen oft hohe Mengen an Proben an, so dass die Verwendung eines Hochdurchsatz-Plattengeräts statt des Messens jeder Probe einzeln am Mikroskop vorteilhaft sein könnte.

Daher wurde die Messung der Fura-2-Testseren an einem Hochdurchsatz Plattengerät durchgeführt.

Mit Hilfe der Ergebnisse beider Messverfahren sollen diese abschließend miteinander verglichen werden.

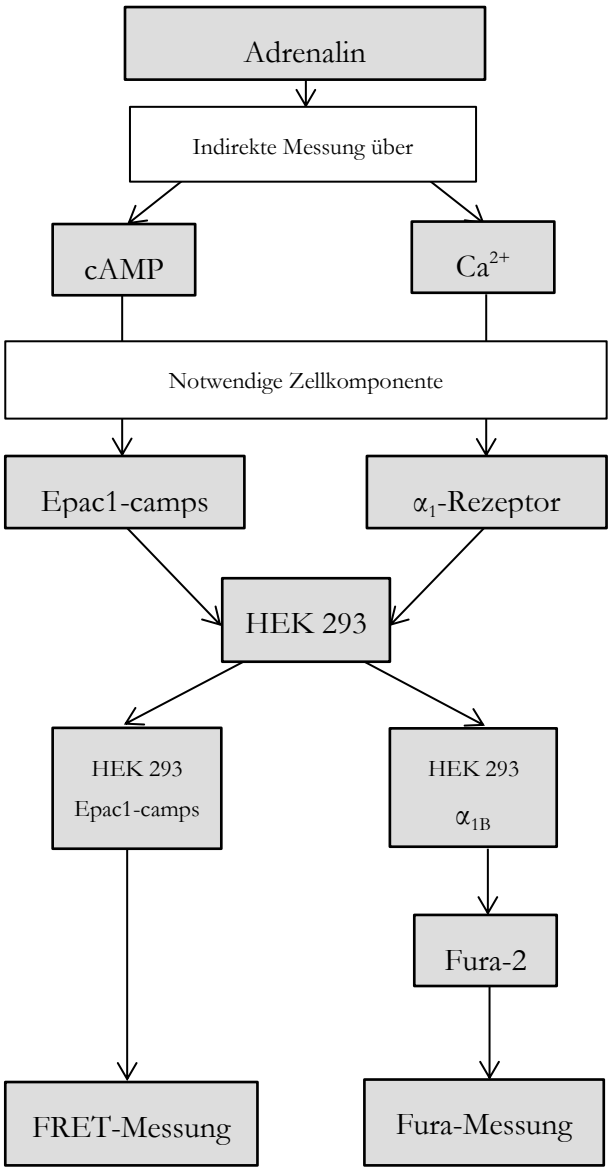

Abbildung 7: Strategien zur Entwicklung eines neuen Schnellmessverfahrens

Die Abbildung veranschaulicht die Strategien zur Entwicklung des Schnellmessverfahrens für Adrenalin. In dieser Arbeit wurden Assays entwickelt, welche Adrenalin im Schnellmessverfahren indirekt über cAMP- oder Ca^{2+}-Freisetzung nachweisen können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

HEK-293 (human embryonic kidney)	CLS – cell line service # 300192

2.1.2 Plasmid

Epac1-camps	Nikolaev JBC 2004 (Nikolaev et al. 2004)

2.1.3 cDNA

α_{1B}-AR im pcDNA3.1 Vektor	cdna.org # AR0A1B0000

2.1.4 Medien, Lösungen, Substanzen für die Zellkultur

DPBS (ohne Mg^{2+}; ohne Ca^{2+})		Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline Biochrom # L1825
DMEM		Dulbeco's Modifiziertes Eagle Medium Biochrom # F0445
DMSO		Dimethyl Sulphoxide Sigma # D2650
FCS		FBS Superior Biochrom # S0615
L-Glutamine	200 mM	Biochrom # K0283
Lipofectamin		Lipofectamine 2000 Reagent Life Technologies # 11668-027
Penicillin/ Streptomycin	10000 U bzw. µg/ml	Biochrom # A2213
Trypsin/ EDTA Solution	0,05 %/ 0,02 %	Biochrom # L2143
Hygromycin D in PBS	50 mg/ml	Life Technologies # HY661-L13
G418	50 mg/ml	Geneticin Gibco # 1510088
10-cm-Schalen		100 x 20 mm Sarstedt # 831802
6-Well-Platten		Cyto One # CC7682-7506
12-Well-Platten		Cyto One # CC7682-7512
96-Well-Platten		Corning # 3904
Kryocups		Cryogenic Vials, Nunc Thermo Scientific # 5000-0012
Deckgläser (Ø 25mm)		VWR # 2935-819
Kleine Zellkulturflasche		Tissue Culture Flask 75 m² Sarstedt # 83.1813.002

Poly-D-Lysine hydrobromide		Sigma # P6407-5MG

2.1.5 Chemikalien

Activated Alumina A		Edwards # H02600055
Adrenalin		(-)Epinephrine, Sigma # E4250
Ampuwa® Wasser		Fresenius Kabi Deutschland GmbH
$CaCl_2$	1 M	Merck # 1.023.821.000
DMSO		Dimethylsulfoxide AppliChem, # A3672
EDTA		Roth # 8040.3
Essigsäure	100%	Merck # 1.00063.250
HCl	37 %	Roth # 4625.3
HEPES		N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonicacid) Sigma # H4034
Fura-2 AM		Life Technologies, # F1221
KCl	1 M	Merck # 104.936.500
NaCl		Sodium Chloride Sigma # 5886
$MgCl_2$	1 M	Merck # 39291
Tris-HCl		Roth #4855.3

2.1.6 Puffer

Tabelle 3: FRET-Puffer

2 mM FRET-Puffer	**Mit 10 N NaOH auf ~ pH 7,3 eingestellt**
A. dest	
$CaCl_2$	2 mM
HEPES	10 mM
KCl	5,4 mM
$MgCl_2$	1 mM
NaCl	144 mM

Tabelle 4: TRIS/EDTA-Puffer

TRIS/ EDTA Puffer	**pH=8,6**
A. dest	
EDTA	10 mM
TRIS	2 mM

2.1.7 Geräte

Attofluor®-Zellkammer	Life Technologies CFP/YFP Filter-Set Chroma Technology
CoolSnap HQ2	Visitron Systems
Feinwaage	Sartorius BP 300S
FlexStation®-Benchtop	Molecular Devices Multi-Mode Microplate Reader
Fura-2-Filter	Chroma Technology
Inkubator	Sanyo CO_2 Inkubator MCO- 5 AC
Mikroskop	AxioObserver A1 Epifluoreszenz- Carl Zeiss MicroImaging
Mikroskop	Zeiss Primo Vert
Ölimmersion 40x FLUAR-Objektiv	Carl Zeiss MicroImaging
Ölimmersion 63x PlanNeofluar-Objektiv	Carl Zeiss MicroImaging
pH Meter	WTW, inoLab pH Level 1
Polychrome-V-Lichtquelle	TILL Photonics
QuadView QV2	Photometrics
Sterilbank	Clean air DIN 12950. BS 5726, NSF 49
Ultracentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810 R
Vortex	Scientific Industries, Vortex-Genie 2
Waage	KERN PCB, max. 1000g
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Thermo Scientific

2.1.8 Software

Imaging Software	Axio Vision software Carl Zeiss MicroImaging
Office 2010	Microsoft Inc.
Origin Pro 8.5 Software	OriginLab Corporation
VisiView	Visitron Systems
Zotero (Literaturverwaltung)	Center of History and New Media, Mason University, USA

2.1.9 Herkunft des Blutserums

Die anonymisierten Patientenseren wurden durch die Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Düsseldorf; Prof. Dr. Matthias Schott, AG Dr. Holger Willenberg, zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um zeitgleiche Blutentnahmen aus Nebennierenvenenkathetern und aus Venenpunktion beim selben Patienten. Das Blut wurde am Universitätsklinikum Düsseldorf abgesert und eingefroren, so dass für die Versuchsreihe eingefrorenes Serum zur Verfügung stand. Während der Versuchsreihe wurden die Patientenproben mit fortlaufenden Nummern anonymisiert.

Eine entsprechende Genehmigung der Ethikkommission Düsseldorf liegt vor und wurde durch die Ethikkommission der Universität Göttingen (Antragsnr. 13/3/15An) bestätigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Das für die Zellkultur verwendete Medium wurde aus DMEM-Zellkulturmedium unter Zugabe von 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin hergestellt.

Die HEK 293-Zellen wurden mit diesem Zellkulturmedium auf 10 cm Zellkulturschalen im Inkubator mit bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen, nach vorsichtigem Spülen mit 5 ml PBS, mit Hilfe von 1 ml Trypsin/EDTA und leichtem Klopfen, von der Zellkulturschale gelöst. Daraufhin wurden sie mit 4 ml DMEM-Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1: 5 auf neue sterile Zellkulturschalen verteilt. Die Zelldichte sollte eine Konfluenz von ca. 80 % nicht übersteigen. Bevor die Zellen gesplittet wurden, erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Zelldichte und auf eine mögliche Kontamination mit Pilzen oder Bakterien. Die Zellsuspension wurde so hergestellt, dass ein zweimaliges Splitten pro Woche ausreichend war.

Jegliche Arbeiten mit der Zellkultur wurden an der Laminar Flow-Werkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2 Aufbewahrung

Um die Zellen dauerhaft zu lagern und auch zu einem späteren Zeitpunkt wieder verwenden zu können wurden von jeder stabilen Zelllinie Klone eingefroren. Zum Aufbewahren der HEK 293-Zellen sowie der stabilen Zelllinien (s. 2.2.3) wurden sie, wie unter 2.2.1. beschrieben, von der Zellkulturschale abgelöst und in DMEM-Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zum Einfrieren wurde das Zellpellet mit FCS und DMSO gelöst und in 1-ml-Kryocups abgefüllt und bei -80 °C aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen wurden nach dem Auftauen im Wasserbad aus den Kryocups mit DMEM-Zellkulturmedium ausgespült. Das Resuspendat wurde anschließend in ein 50-ml-Falcon überführt. Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Zellpellet mit 12 ml DMEM-Medium in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

2.2.3 Transfektion, Selektion und Klonierung der HEK 293-Zellen

Um stabile Zelllinien zu gewinnen, wurden HEK 293-Zellen mit zwei verschiedenen Plasmiden transfiziert (s. 2.1.2). Die entstandenen Zelllinien wurden HEK 293 Epac1-camps (exprimiert Epac1-camps) und HEK 293 α_{1B} (exprimiert α_{1B}-AR) benannt. Zur Herstellung von stabilen HEK 293-Zellklonen wurden die Zellen wie gewohnt auf 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät (s. 2.2.1). Sobald sie zu ca. 80 % konfluent angewachsen waren, wurde der Transfektionsansatz, bestehend aus 300 µl DMEM, 3 µg cDNA (s. 2.1.2) und 7 µl Lipofectamin (nach 20 min Inkubationszeit) auf die Zellen gegeben. Um die erfolgreich transfizierten Zellen von nicht-transfizierten Zellen zu selektieren, wurden die hergestellten Zelllinien mit einem geeigneten Antibiotikum behandelt. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem Resistenzgen auf der/dem verwendeten cDNA/Plasmid. Den HEK 293 Epac1-camps-Zellen wurde 4 µl/ml Hygromycin D und den HEK 293 α_{1B}-Zellen 4 µl/ml G 418 zugegeben.

Nachdem sich ausreichend große, makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet hatten, wurden die fluoreszierenden Zellen auf der Zellkulturschale markiert. Markierte Zellen wurden mit Hilfe einer sterilisierten Pasteurpipette und eines desinfizierten Gummischlauchs angesaugt und in eine mit 1 ml DMEM-Zellkulturmedium (inkl. 10% FCS; 1% P/S; 1% L-Glutamin)/ Well gefüllte 12-Well-Platte übertragen.

Ein Mediumwechsel erfolgte täglich und die Antibiotikazugabe erst einen Tag nach dem Picken der Zellen, da eine verfrühte Zugabe des Antibiotikums zum Absterben der Zellen führen kann.

Waren die Zellen ausreichend angewachsen wurden sie auf 6-Well-Platten übertragen und bei ausreichendem Wachstum schließlich auf eine 10-cm-Schale umgesetzt.

2.2.4 Zellvorbereitung zur Messung am Mikroskop

Damit die transfizierten Zellen am Mikroskop eingesetzt werden konnten, wurden sie auf 24 mm Ø Deckgläser ausgesät. Mit Hilfe der speziellen Attofluor® Zellkammer konnten die Deckgläser in der Haltevorrichtung des Mikroskops befestigt werden.

Zum Aussäen wurden die sterilen Deckgläser mit einem Tropfen PBS auf dem Boden einer 6-Well-Platte zu Halten gebracht. Anschließend wurden 2 ml Zellsuspension (1:12 in DMEM) auf die Deckgläschen pipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 waren ausreichend Zellen angewachsen, die dann für die jeweilige Messung verwendet wurden.

2.2.5 Messung von cAMP mittels FRET-Ratio

Im Folgenden wird beschrieben wie im Allgemeinen die Messung der FRET-Ratio durchgeführt wird. Dieses Vorgehen wurde bei der Testung der transfizierten HEK 293 Epac1-camps-Zellklone sowie bei der indirekten Adrenalinbestimmung über cAMP und bei der Testung der Patientenseren angewendet. Für alle diese Versuche wurden die HEK 293 Epac1-camps-Zellen verwendet.

Die mit den HEK 293 Epac1-camps-Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in eine Attofluor®-Zellkammer eingebracht und einmal mit 400 µl 2 mM FRET-Puffer gespült. Anschließend wurde 400 µl 2 mM FRET-Puffer in die Zellkammer gegeben und diese in die Haltevorrichtung des AxioObserver A1 Mikroskops eingebracht. Für die FRET-Messung wurde ein 63 x Ölimmersions-Objektiv verwendet.

Eine spezielle Software ermöglicht die gezielte Einstellung der Anregungssprektren, der Belichtungszeiten sowie der Aufnahmezeitpunkte. Es wurde eine Belichtungszeit von 10 ms eingestellt und alle 5 s eine Aufnahme der CFP und YFP Emission gemacht. Mit Hilfe eines Monochromators, welcher Einzel-Wellenlängen aussenden kann, wurde der Donor CFP bei 440 nm angeregt. Die von der gemessenen Probe ausgehenden Signale von CFP und YFP wurden mit einem sogenannten DualView-Strahlenteiler in den Akzeptor(YFP)- und Donor(CFP)-Kanal aufgespalten und mit einer CoolSnap HQ2 Kamera aufgenommen (Börner et al. 2011).

Die Auswahl einer für die Messung geeigneten Zelle (oder auch mehrerer Zellen) erfolgte mit aktivem Fluoreszenzlicht. Sobald eine Zelle ausgesucht wurde, sollte das Licht sofort ausgeschaltet werden, um ein Photobleichen der Zellen zu vermeiden. Es wurde eine Belichtungszeit von 10 ms eingestellt, was ebenfalls das Photobleichen reduzieren soll. Alle 5 s erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten von CFP und YFP.

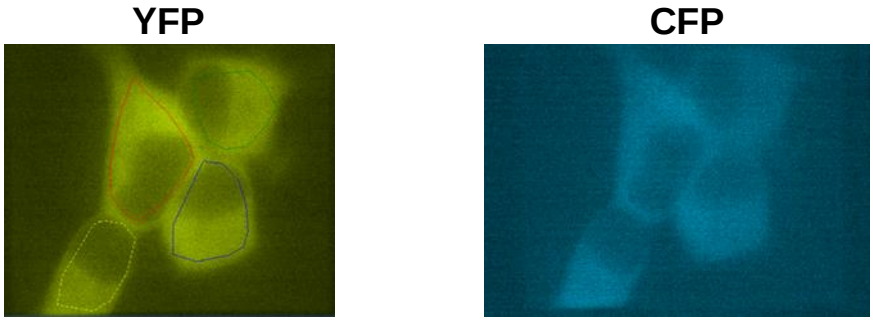

Abbildung 8: Aufnahme YFP Kanal und CFP Kanal

Die Abbildung zeigt die Aufnahme HEK 293-Epac1-camps-Zellen einmal mit dem YFP Kanal (links) und dem CFP Kanal (rechts). Die Zellen auf dem linken Bild wurden markiert, um sie für die Messung auszuwählen.

Sobald alle wichtigen Parameter eingestellt, geeignete Zellen ausgewählt und markiert worden waren, konnte mit der Messung begonnen werden. Hat die FRET-Ratio eine stabile Grundlinie erreicht, wurden die 400 µl der Testlösung (Adrenalinverdünnung oder Adrenalinextrakt) auf die Zellkammer pipettiert und die Veränderung der FRET-Ratio gemessen. Die Messung konnte beendet werden, wenn nach Zugabe der Testlösung eine stabile Ratio zu erkennen war.

Die einzelnen CFP und YFP Intensitäten wurden in Excel überführt, um die FRET-Ratio (YFP/CFP) berechnen zu können. Zur Rauschkorrektur wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Ratio} = (\text{YFP} - \text{B} \times \text{CFP}) / \text{CFP}$$

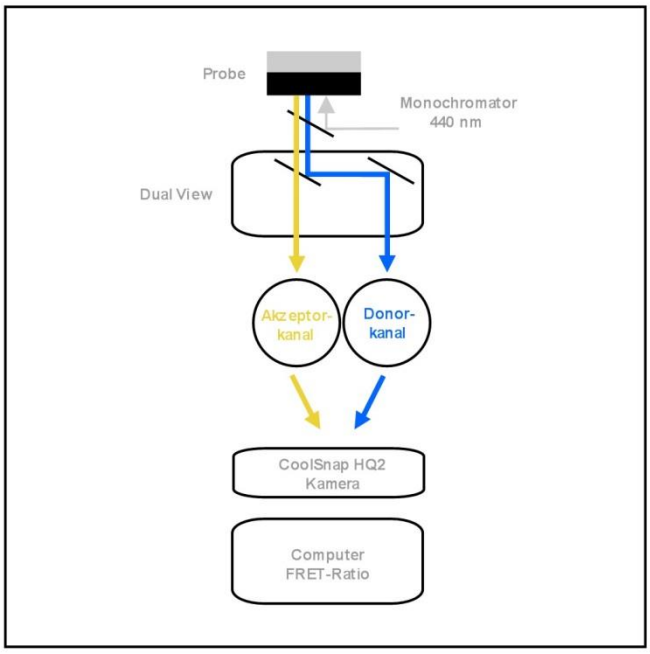

Abbildung 9: Aufbau eines FRET-Mikroskops

Die Abbildung zeigt den Aufbau der Versuchsapparatur zur FRET-Messung. Das Deckgläschen mit den darauf befindlichen Zellen wurde in eine Haltevorrichtung eingespannt (Probe) und von unten mit Licht der Wellenlänge 440 nm beleuchtet. Emittierte Fluoreszenz (cyan und gelber Strahl), wurde von dem DualView Strahlenteiler in Akzeptor(YFP)- bzw. Donor(CFP)-Kanal gespalten und von der Kamera erfasst. Das Computersystem misst die Intensitäten und ermittelt die FRET-Ratio.

Der Bleedthrough-Koeffizient B (B=1,0) spiegelt die Durchblutung vom CFP- in den YFP-Kanal wider (Börner et al. 2011). Mit Hilfe der errechneten Ratio konnten die Veränderungen nach Zugabe der Testlösung mit der Ausgangsratio vor Zugabe verglichen werden. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten in Origin überführt und graphisch ausgewertet.

2.2.6 Messung von intrazellulärem Ca^{2+} mit Fura-2

Für die Adrenalinbestimmung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 wurden HEK 293 α_{1B}-Zellen in 6-Well-Platten auf 24 mm Ø Deckgläsern ausgesät. Am Folgetag waren ausreichend Zellen zur Messung vorhanden. Nach einmaligem Waschen der Deckgläser mit 100 µl FRET-Puffer, wurden die Zellen mit Fura-2 AM inkubiert. Das in getrockneter Form gelieferte Fura-2 AM (0,5 mg) wurde in 49 µl DMSO aufgeschwemmt, um eine 1 mM Stammlösung zu erhalten. Diese Stammlösung kann bei -20 °C unter Lichtabschluss aufbewahrt werden. Anschließend wurde mit FRET-Puffer eine 1:1000 fache Verdünnung

hergestellt und davon wurden 100 µl auf jedes Deckgläschen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10-15 min bei 37 °C und 5 % CO_2 unter Lichtabschluss waren die Zellen einsatzbereit.

Die Vorgehensweise zur Messung mittels Fura-2 entspricht größtenteils der FRET-Messung. Sie unterscheidet sich darin, dass hierbei ein 40x FLUAR-Objektiv (Zeiss) mit besonders guter Transmission im UV-Bereich verwendet wird. Außerdem erfolgte die Anregung der Zellen bei 340 nm (mit Ca^{2+} beladenes Fura-2) und bei 380 nm (freies Fura-2). Belichtungs- und Aufnahmezeiten entsprechen der FRET-Messung (10 ms, ein Bild pro Sekunde).

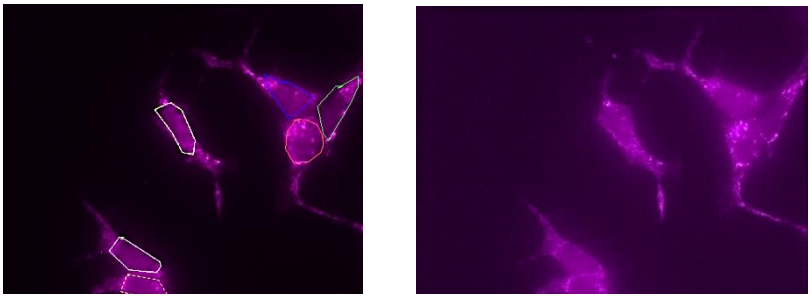

Abbildung 10: Aufnahme von mit Fura-2-gelabelten HEK 293 α_{1B}-Zellen

Die Abbildung zeigt mit Fura-2-gelabelte HEK 293 α_{1B}-Zellen. Links 340 nm Kanal mit markierten HEK 293 α_{1B}-Zellen und rechts 380 nm Kanal mit nicht markierten HEK 293 α_{1B}-Zellen.

Auch für diesen Versuch wurden die HEK 293 α_{1B}-Zellen mit 400 µl 2mM FRET-Puffer gewaschen und daraufhin mit der Zellkammer in das Mikroskop eingebracht. Nach Erreichen einer stabilen Ratio wurden 400 µl Puffer vorsichtig entnommen und 400 µl Testsubstanz zugegeben. Hatte die Kurve nach der Zugabe wieder eine gleichmäßige Linie erreicht, konnte die Messung beendet werden.

Aus den gemessenen Intensitäten lässt sich die Ratio folgendermaßen berechnen:

$$\text{Ratio} = F_{340nm}/F_{380nm}$$

Wie bereits bei der FRET-Messung erwähnt, werden auch bei diesem Messverfahren die Daten in Excel überführt und dort mit Hilfe der o.g. Formel die Ratio errechnet und anschließend mit Origin graphisch ausgewertet.

2.2.7 Vorbereitung der Zellen für die Adrenalinbestimmung an der Flex Station 3

Von den insgesamt 5 ml Zellsuspension die beim Splitten entstehen (s. 2.2.1) wurden 4 ml für die Plattenvorbereitung verwendet. Diese 4 ml wurden auf 5 ml mit DMEM-Zellkulturmedium aufgefüllt und mit einer 1:5 Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Je nach Zelldichte wurde erneut eine Verdünnung hergestellt, um eine Zelldichte von 200.000 Zellen pro Well zu erzielen. Die Verdünnung wurde anhand der gezählten Zellzahl errechnet.

Die Zellsuspension wurde in eine schwarze 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden dispendiert. Die Platte wurde im Vorhinein mit 10 µl Poly-D-Lysine pro Well vorbereitet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Poly-D-Lysine wurde vor Eingeben der Zellsuspension abgesaugt und konnte erneut verwendet werden.

Die 96-Well-Platte wurde für 24 h bei 37 °C und 5% CO^2 im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag, wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen, konnten die Messungen durchgeführt werden.

2.2.8 Ca^{2+}-Messung mit dem FlexStation® 3 Microplate Reader

Zur Messung des intrazellulären Ca^{2+} wurden die (wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben) vorbereiteten HEK α_{1B}-Zellen 100 µl FRET-Puffer gewaschen und anschließend mit Fura-2 (1:1000 im FRET-Puffer verdünnt) für 10-15 min bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank unter Lichtabschluss inkubiert.

Die Messung erfolgte anschließend an einem FlexStation® 3 Microplate Reader. Mit Hilfe dieses Gerätes ist es möglich, viele Proben (bis zu 96 bzw. 384 Proben, abhängig von eingelegter Platte) gleichzeitig zu messen. Das Gerät kann eigenständig pipettieren und die

emittierte Fluoreszenz vor und nach dem Pipettieren messen.

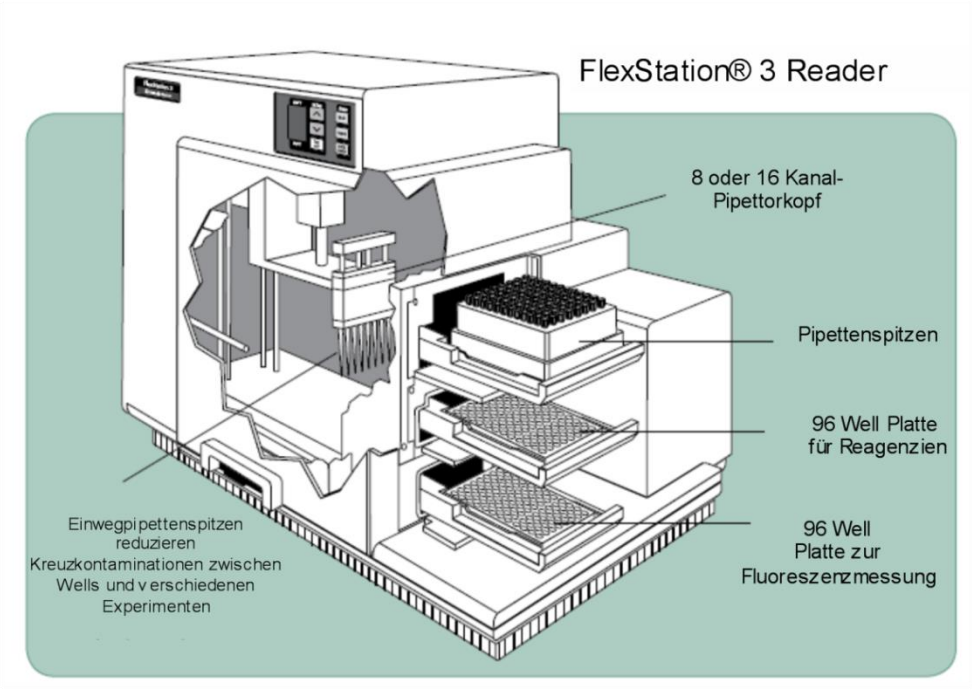

Abbildung 11: FlexStation® 3 Reader der Firma Molecular Devices

Dieses Bild zeigt den Aufbau eines FlexStation® 3 Readers. Es zeigt die drei Beladungsstationen für 2 Mikrotiterplatten und einem Pipettenspitzenrack. Im Inneren ist der Pipettor zu erkennen, der entweder als 8 oder als 16 Kanal Pipettor eingesetzt werden kann. Abbildung nach http://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000618/equip/flexstation/information-flex/Equipement.pdf

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine mit Zellen vorbereitete schwarze 96-Well-Platte (2.2.7), eine durchsichtige 96-Well-Platte mit den Adrenalinverdünnungen 1 – 1000 nM (verdünnt in FRET-Puffer) sowie die geeigneten Pipettenspitzen in das Gerät geladen. Die SoftMaxPro Software (Molecular Devices) ermöglicht eine geeignete automatische Einstellung für die Messung von Ca^{2+} mit Fura-2.

Die Anregung der Proben erfolgt mit Licht der Wellenlängen 355/9 nm und 375/9 nm (Bandpass) mit Hilfe eines Dichroitischen Spiegels (455 nm). Emittiertes Licht wird bei 505 nm beobachtet und die Ratio aus den Strahlungsintensitäten von 340 bzw. 380 nm errechnet (Leech et al. 2010; Clardy-James et al. 2013).

Auch hier kann anschließend zwischen der Ratio vor und nach Zugabe von Adrenalin verglichen und ausgewertet werden.

2.2.9 Adrenalinextraktion

Adrenalin wurde aus dem Blutserum extrahiert, um Artefakte, die vom Serum ausgehend die Messung stören könnten, zu verhindern. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe von Alumina, welches das in der Probe enthaltene Adrenalin unter Zugabe eines TRIS/EDTA Puffers bindet. Nach zweimaligem Waschen des Testansatzes mit A. dest wurde das Adrenalin mit 0,1 M Essigsäure aus dem Aluminiumpulver extrahiert. Um das Adrenalinextrakt auf pH 7,4 zu neutralisieren, wurde 0,1 N Natriumhydroxid (NaOH) zugegeben. Das NaOH wurde anstatt in A. dest in modifiziertem FRET-Puffer (ohne $MgCl_2$; ohne $CaCl_2$, ohne HEPES) angesetzt. Vor Zugabe des NaOH wurde 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) separat zu dem Extrakt pipettiert.

Die Mengen der hier benötigten Lösungen errechnen sich an folgendem Standardprotokoll und sind abhängig von der verfügbaren Serummenge.

Tabelle 5: Protokoll Adrenalinextraktion

Standardprotokoll Adrenalinextraktion

10 mg	Alumina	
1000 µl	Serum	
400 µl	Tris/EDTA Puffer	
1000 µl	A. dest	2 x Waschen; Zentrifugation 3 min 3000 rpm
1000 µl	Essigsäure	0,2 N mit anschließender Zentrifugation 3 min bei 3000 rpm
30 µl	HEPES	1 M
~ 1,7 ml	NaOH	0,1 N in modifiziertem FRET-Puffer (ohne $CaCl_2$; ohne $MgCl_2$; ohne HEPES) auf *pH 7,4* einstellen

2.2.10 FRET- und Fura-2-Messung an extrahierten Adrenalinproben

Um festzustellen, ob die Adrenalinextraktion funktioniert, wurden erneut Adrenalin-lösungen in den Konzentrationen 1- 1000 nM hergestellt. Adrenalin wurde aus diesen „Proben“ mit dem in 2.2.8 beschriebenen Verfahren extrahiert und der Erfolg im Rahmen der FRET- und Fura-2-Messung (2.2.5 und 2.2.6) kontrolliert. Diese Versuchsreihe war notwendig, bevor die Messung von Patientenseren durchgeführt werden konnte.

2.2.11 FRET- und Fura-2-Messung an Serumproben

Die letzte Versuchsreihe beinhaltete die Messung von Adrenalin in den Serumproben, die von der Universitätsmedizin Düsseldorf zur Verfügung gestellt worden waren. Im Vergleich wurden immer Proben aus dem Nebennierenvenenkatheter und Proben aus Venenpunktion gemessen. Es erfolgte sowohl die Messung von cAMP mittels FRET als auch die Messung von Ca^{2+} mit Fura-2. Nach Extraktion von Adrenalin, wie in 2.2.9 beschrieben, erfolgte die indirekte Adrenalinbestimmung über die Messung von cAMP (siehe 2.2.5) und über die Messung von Ca^{2+} (siehe 2.2.6).

2.3 Statistik

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel sowie der OriginLab Software. Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben (falls nicht anders vermerkt).

Zur Unterscheidung zwischen Patientenproben aus der Nebenniere und Patientenproben aus peripherer Entnahme wurde ein *paired-t*-Test durchgeführt, um die Signifikanz zwischen den Proben zu erfassen.

3 Ergebnisse

Zur Entwicklung des Messverfahrens wurden 2 stabile Zelllinien etabliert, die auf ihre Funktionalität im Sinne von Fluoreszenzintensität nach Zugabe eines Stimulus untersucht wurden. Beide Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Reaktion auf Adrenalin beobachtet. Mit Hilfe der gemessenen Daten wurde für jede Zelllinie eine Dosiswirkungskurve (DWK) erstellt, an der die Sensitivität des jeweiligen Messverfahrens abgelesen werden kann. Des Weiteren wurden abschließend Testseren (2.1.9) mit den etablierten Testverfahren (2 verschiedene Zelllinien) gemessen, um die Sensitivität, Zuverlässigkeit und Praktikabilität des Messverfahrens in Routinelabors zu überprüfen.

3.1 Nachweis von Adrenalin durch intrazelluläre cAMP-Messung

Um Adrenalin indirekt über durch Stimulation der Zellen gebildetes cAMP nachzuweisen, wurden HEK 293-Zellen mit dem cAMP-Sensor Epac1-camps stabil transfiziert. HEK 293-Zellen exprimieren endogen nur den β_2-AR (Krupinski et al. 1992; Premont et al. 1992) und keine bzw. geringe nachweisbare Mengen an β_1-, α_1-AR (Theroux et al. 1996; Sumi et al. 2010). Eine Reaktion der Zelle auf die Zugabe von Adrenalin kann also durch seine Bindung an den β_2-AR erwartet werden.

3.1.1 Testung von HEK 293 Epac1-camps-Zellen

Im ersten Experiment wurden die Zellklone HEK 293 Epac1-camps getestet, welche nach der stabilen Transfektion selektiert und gepickt wurden. Sie wurden hinsichtlich ihres FRET-Signals nach der Zugabe von 1 µM Adrenalin untersucht. Die Zugabe von Adrenalin bewirkt über die Bindung am auf den HEK 293-Zellen endogen exprimierten β_2-AR eine intrazelluläre Freisetzung von cAMP. Dieses bindet an den stabil transfizierten Epac1-camps, welcher dadurch die in 1.3 beschriebene Konformationsänderung erfährt und ein Absinken des FRET-Signals zur Folge hat.

Ziel dieser ersten Versuchsreihe war es, Zellklone mit einem deutlichen Signal ausfindig zu machen. Der Graph stellt exemplarisch eine mikroskopische Messung von cAMP mit Zellen des ausgewählten Klons (Klon 3) nach einer Stimulation mit 1 µM Adrenalin dar.

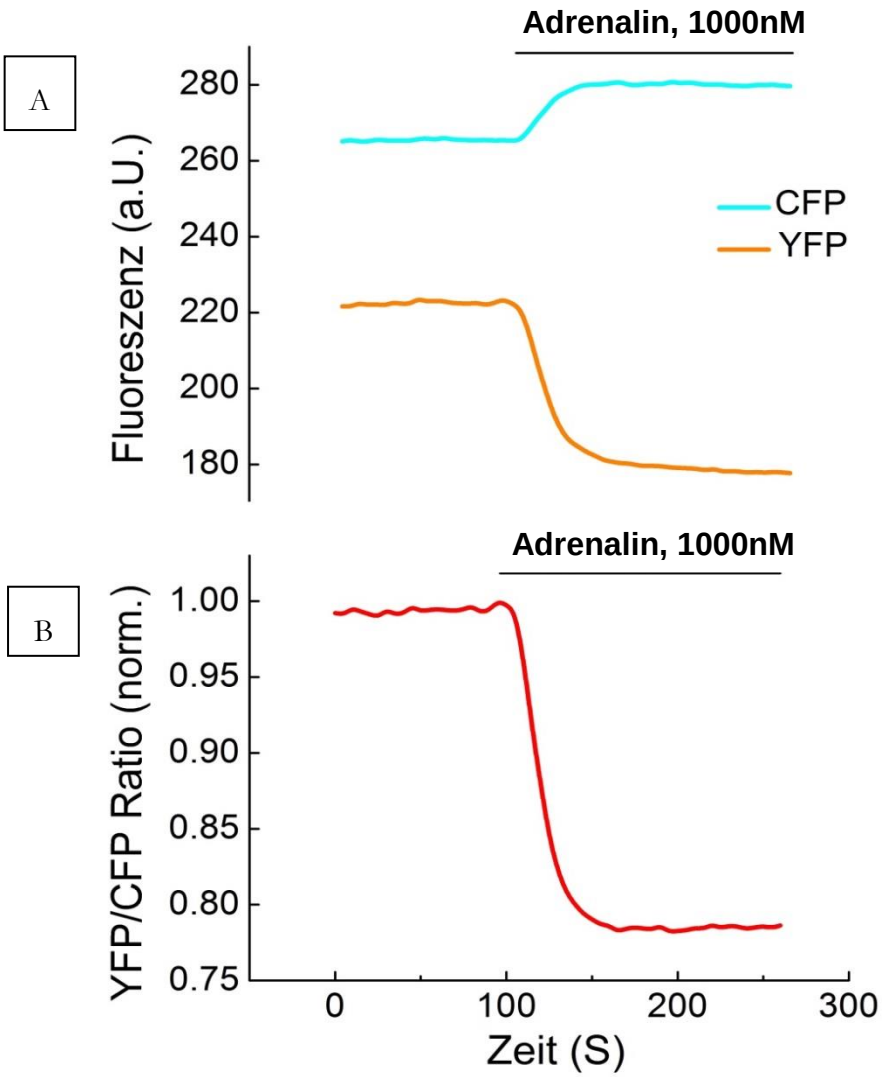

Abbildung 12: Testung von HEK 293 Epac1-camps-Zellen (Klon 3)

Der Graph stellt unter A die Zunahme der Fluoreszenz von CFP (cyan) und die Abnahme der Fluoreszenz von YFP (orange) nach Zugabe von 1 µM Adrenalin dar.

Unter B ist die errechnete Ratio (aus dem Mittelwert von n=10 Zellen) graphisch in Abhängigkeit von der Zeit zu sehen (rot).

Die Zellen aus diesem Klon hatten mit einer sehr robusten FRET-Abnahme auf Adrenalin reagiert und wurden für weitere Experimente eingesetzt.

3.1.2 Erstellung einer Dosiswirkungskurve für die HEK 293 Epac1-camps-Zellen

Nach der Auswahl eines geeigneten Zellklons konnten die weiteren Versuche zur Erstellung einer DWK durchgeführt werden. Dazu wurden die FRET-Signale nach Zugabe von Adrenalinlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,1 - 1000 nM gemessen. Durch das Mitteln der FRET-Signale von mehreren Zellen (n=7) des gleichen Klons konnte eine DWK erstellt werden. Abbildung 14 zeigt die Änderung des FRET-Signals auf die Zugabe von verschiedenen Adrenalinverdünnungen. Sie zeigt anschaulich die unterschiedlich ausgeprägte Abnahme der Ratio bei steigenden Adrenalin-Konzentrationen. Um die unterschiedlichen Signalstärken, die abhängig von der Adrenalinkonzentration gemessen werden konnten, vergleichend darstellen zu können, wurden die Messwerte von 7 Messungen gemittelt und in einer DWK (Abbildung 14) dargestellt.

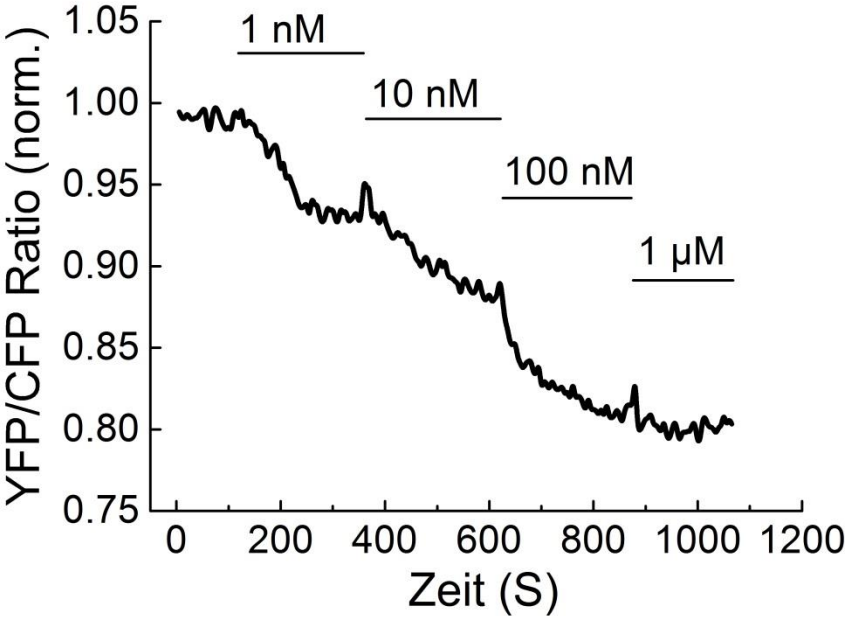

Abbildung 13: Beispielspur der Messung einer HEK 293 Epac1-camps-Zelle

Auf dieser Abbildung ist die Spur einer HEK 293-Epac1-camps zu sehen, deren Reaktion, im Sinne der FRET-Ratio, auf die Zugabe von Adrenalin (1 – 1000 nM) bestimmt wurde. Diese Messungen bilden die Grundlage zur Erstellung der DWK.

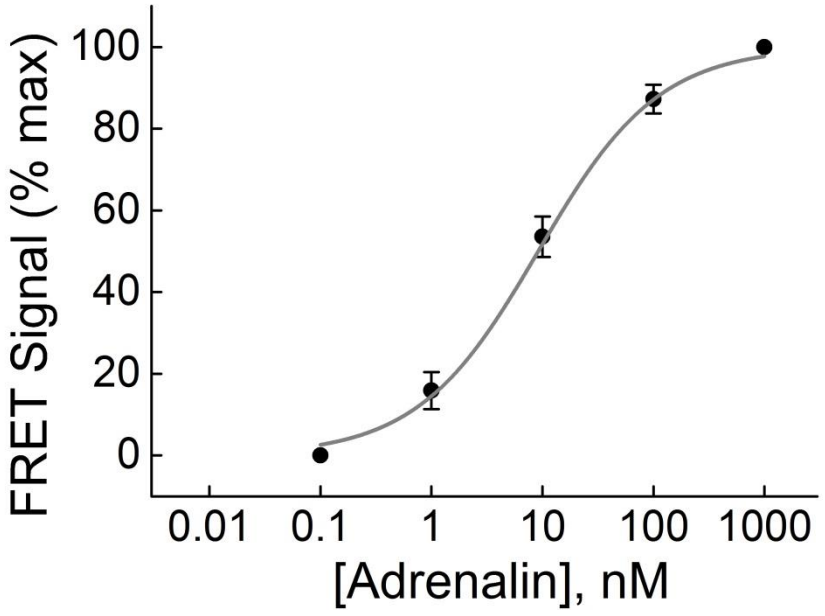

Abbildung 14: FRET-Dosiswirkungskurve für Adrenalin

Diese Abbildung zeigt die mit Hilfe von FRET-Messungen an HEK 293 Epac1-camps-Zellen ermittelten Mittelwerte für die Adrenalinkonzentrationen 0,1 – 1000 nM. Es wurden n=7 Messungen gemittelt. Der EC_{50}-Wert betrug 10,9 ± 2,8 nM (Mittelwert ± Standardfehler).

Ein EC_{50}-Wert konnte anhand dieser DWK errechnet werden und betrug 10,9 ± 2,8 nM (Mittelwert ± Standardfehler).

3.2 Nachweis von Adrenalin durch intrazelluläre Ca^{2+}-Messung

Ein ähnliches Experiment wie in 3.1 wurde mit den HEK 293 α_{1B}-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu, wie in 2.2.6 beschrieben, mit Fura-2 AM beladen. Nach Bindung von Adrenalin an den stabil transfizierten α_{1B}-Rezeptor kam es intrazellulär zu einer Freisetzung von Ca^{2+}, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 bindet. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Fura-2 (bei 340 und 380 nm) im gebundenen und im freien Zustand wurden gemessen, und die ermittelte Ratio (F_{340}/F_{380}) zeigt die Reaktion auf die Zugabe von Adrenalin bzw. die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+}.

3.2.1 Testung von HEK 293 α_{1B}-Zellen

Es erfolgte die Testung der Antwort von HEK 293 α_{1B}-Zellklonen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Adrenalin nach dem Protokoll, wie in 2.2.6 beschrieben. Zur Messung von Ca^{2+} wurde, wie bei der Messung von cAMP, ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die vorliegenden Abbildungen zeigen die Reaktionen der unterschiedlichen Zellklone A und B auf die Zugabe von 100 nM Adrenalin.

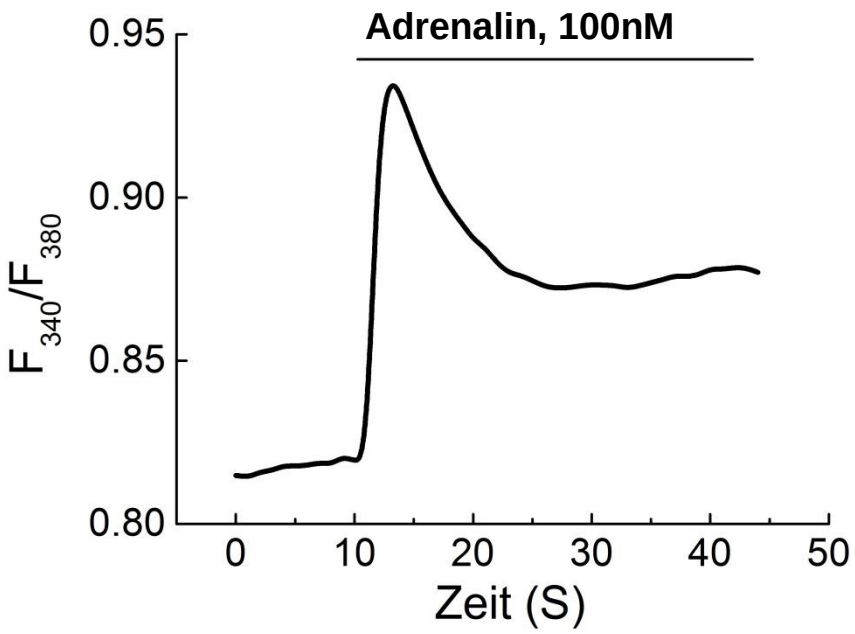

Abbildung 15: Testung HEK 293 α_{1B}-Zelle Klon A

Die Abbildung zeigt die Fura-2-Ratio einer HEK 293 α_{1B}-Zelle, die nach Zugabe einer 100 nM Adrenalinverdünnung einen deutlichen Anstieg der Ratio von > 0,1 zeigt.

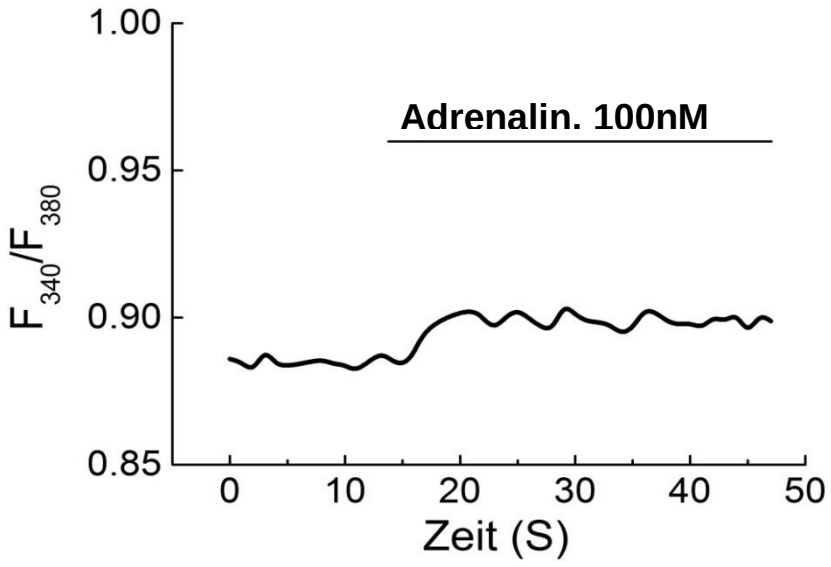

Abbildung 16: Testung einer HEK 293 α_{1B}-Zelle Klon B

Die Abbildung zeigt die Fura-2-Ratio einer HEK 293 α_{1B}-Zelle nach Zugabe von einer 100 nM Adrenalinverdünnung. Sie zeigt eine geringe Zunahme der Ratio von < 0,02.

Abbildung 15 zeigt die ermittelte Ratio der HEK 293 α_{1B}-Zelle (Klon A), die eine deutliche Zunahme des Signals von > 0,1 nach Zugabe von Adrenalin aufweist. Klon B zeigt ein weniger starkes Signal auf die Zugabe von Adrenalin derselben Konzentration. Dies könnte auf eine geringere Expression des α_{1B}-AR zurückzuführen sein.

Für weitere Versuche wurde der Klon A der HEK 293 α_{1B}-Zellen verwendet.

3.2.2 Erstellung einer Dosiswirkungskurve für HEK 293 α_{1B}-Zellen

Wie für die FRET-Messung von cAMP wurde auch für die Ca^{2+}-Messung mit Fura-2 eine DWK erstellt. Statt eines Mikroskops wurde hier der FlexStation® 3 Microplate Reader verwendet, um festzustellen, ob die Ca^{2+}-Messung mit der HEK 293 α_{1B}-Zelllinie auch an einem Hochdurchsatz-Plattengerät funktioniert.

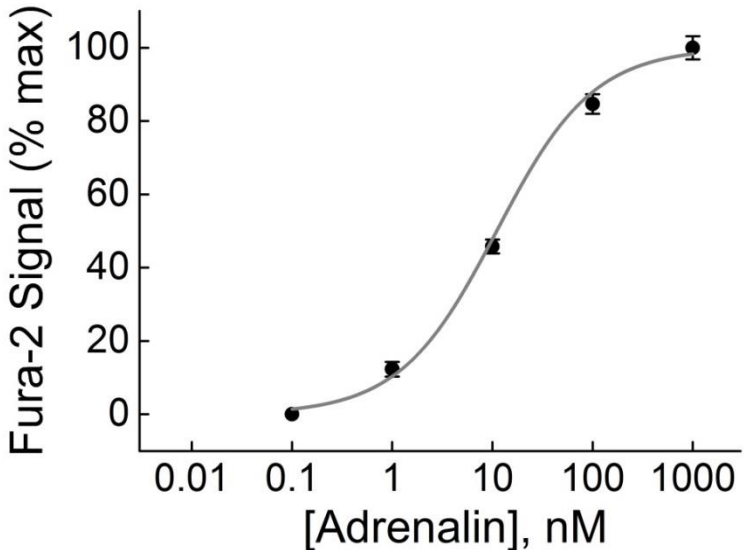

Abbildung 17: Fura-2-Dosiswirkungskurve für Adrenalin

Diese Abbildung zeigt die mit Hilfe von mehreren Fura-2-Messungen an HEK 293 α_{1B}-Zellen ermittelten Mittelwerte für die Adrenalinkonzentrationen 1 – 1000 nM. Es wurden n=6-8 Messungen pro Konzentration gemittelt. Der EC_{50}-Wert betrug 13,6 ± 1,5 nM (Mittelwert ± Standardfehler).

Für diese DWK wurde ein EC_{50}-Wert von 13,6 ± 1,5 nM (Mittelwert ± Standardfehler) errechnet.

3.3 Adrenalinextraktion

Um Fehlmessungen bzw. fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, welche durch die Autofluoreszenz von Serumbestandteilen (Wolfbeis und Leiner 1985) hervorgerufen werden können, ist eine Extraktion von Adrenalin aus dem Serum erforderlich. Die bislang beschriebenen Ergebnisse beschränkten sich auf die Messung an Adrenalinverdünnungen. Bevor die beiden Messverfahren an Patientenseren getestet werden konnten, wurde die Adrenalinextraktion aus Adrenalinverdünnungen erprobt und die Messung an den HEK-Zelllinien ausprobiert.

Das Hormon wurde über seine Bindung an Aluminiumoxid aus der Adrenalinverdünnung bzw. dem Serum extrahiert und nach Zentrifugation mittels Salzsäure aus dieser Verbindung herausgelöst. Um das extrahierte Adrenalin in den Messverfahren einsetzen zu können, musste eine pH-Wert Einstellung auf 7,4 erfolgen.

3.3.1 Nachweis von extrahiertem Adrenalin durch cAMP-Messung

Um festzustellen, ob die Extraktion erfolgreich war, wurde die Reaktion der HEK 293 Epac1-camps-Zellen auf das Adrenalinextrakt getestet. Die Messung wurde wie in den bereits beschriebenen Ergebnissen zur cAMP-Bestimmung durchgeführt.

Aus 3 Messungen wurden schließlich für die Konzentrationen 1-1000 nM Adrenalin, Mittelwerte ermittelt und graphisch als DWK dargestellt. Mit der allgemeinen Hill-Gleichung kann die gefittete DWK beschrieben werden:

$$y = V_{max} \frac{x^n}{x^n + k^n}$$

Wobei hier n der Steigung entspricht [1,2] und k den EC_{50}-Wert [5,4] beschreibt.

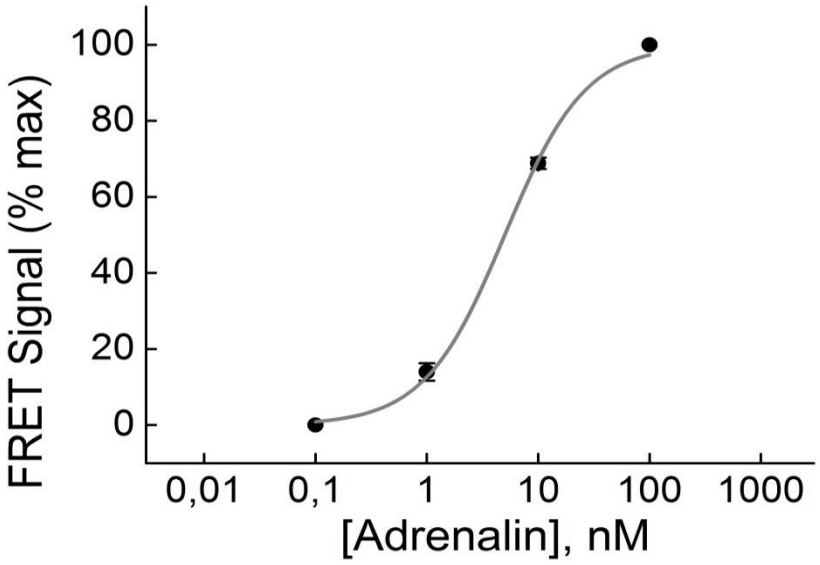

Abbildung 18: Dosiswirkungskurve für extrahiertes Adrenalin (FRET)

Anhand mehrerer Messungen (n=3) von intrazellulärem cAMP in HEK 293 Epac1-camps- Zellen mit FRET wurde eine DWK erstellt mit einem EC_{50}.Wert von 5,4 ± 0,2 nM (Mittelwert ± Standardfehler).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Messung von intrazellulärem cAMP nach Zugabe von extrahiertem Adrenalin erfolgreich durchführen lässt und dass unterschiedlich starke FRET-Signale auf die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen Adrenalin nachweisbar sind.

3.3.2 Nachweis von extrahiertem Adrenalin durch Ca^{2+}-Messung

Ob die Anwendbarkeit des extrahierten Adrenalins auch für die Messmethode mittels Ca^{2+} gilt, wurde in ebenfalls erprobt. Auch hier wurde der Versuchsaufbau verwendet, der zur Testung der Zellen eingesetzt wurde.

Die DWK zeigt die erfolgreiche Messung der Fura-2-Signale auf die Zugabe der Adrenalinextrakte, gemittelt aus 4 Messungen pro Konzentration.

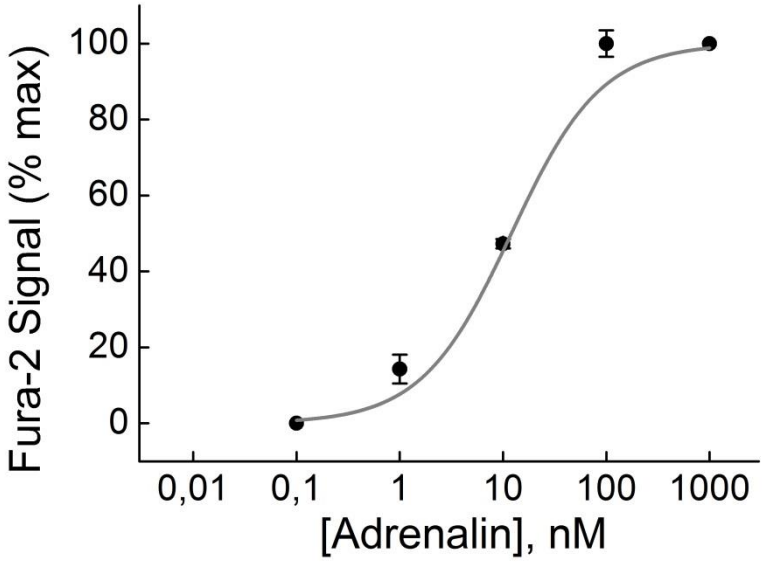

Abbildung 19: Dosiswirkungskurve für extrahiertes Adrenalin (Fura-2)

Zur Erstellung der DWK wurde in n=4 HEK 293 α_{1B}-Zellen indirekt über die Ca^{2+}-Messung Adrenalin nachgewiesen und für jede Konzentration ein Mittelwert gebildet. Der EC_{50}-Wert beträgt: 10,7 ± 3,1 nM (Mittelwert ± Standardfehler).

Für die DWK wurde ein EC_{50}-Wert von 10,7 ± 3,1 nM errechnet (Mittelwert ± Standardfehler). Auch diese DWK wird von der allgemeinen Hill-Gleichung beschrieben.

3.4 Messung von Patientenseren

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war ein Verfahren zu entwickeln, welches an Patientenproben schnell und einfach anwendbar ist. Deshalb wurden, unter Berücksichtigung der bereits erzielten Ergebnisse bei Messung der Adrenalinverdünnungen, beide Verfahren auch mit Patientenseren getestet. Die vorliegenden Proben unterschieden sich hinsichtlich ihres Entnahmeorts und damit der Adrenalinkonzentration. Es handelt sich um Proben, die über einen Nebennierenvenenkatheter aus der Nebenniere bzw. über einen venösen Zugang aus der Armvene entnommen wurden. Eine hohe Adrenalinkonzentration kann in den Proben aus dem Nebennierenvenenkatheter erwartet werden, da im Nebennierenmark produziertes Adrenalin direkt ins Blut abgegeben wird. Von einem vergleichbar niedrigeren Wert ist in einer peripher entnommenen Probe desselben Patienten auszugehen. Von den vorhandenen aus Düsseldorf stammenden anonymisierten Proben mussten 2 wegen ungenügendem Probenvolumen aussortiert werden, alle anderen wurden fortlaufend nummeriert und untersucht. Die Messung der Serumproben erfolgte sowohl für die cAMP- als auch für die Ca^{2+}-Messung am Fluoreszenzmikroskop. Eine Messung an dem Plattenreader FlexStation® 3 war auf Grund des geringen Probenvolumens nicht möglich.

3.4.1 Messzeiten

Neben der einfachen und standardisierbaren Durchführbarkeit beider Verfahren war auch die Optimierung der Messdauer ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit. Es wurden daher neben den Messergebnissen auch die Messzeiten dokumentiert.

Die Dauer der Adrenalinextraktion ist bei beiden Verfahren identisch und wird daher zum Vergleich nicht berücksichtigt. Die Vorbereitung der Zellen am Vortag ist ebenfalls identisch. Der einzige Unterschied ist die Beladung der HEK 293 α_{1B}-Zellen mit Fura-2 am Tag der Messung. Sie nimmt eine Zeit von 10 min Inkubation in Anspruch und wird kurz vor der Messung durchgeführt.

Zum direkten Vergleich beider Verfahren wurde die Zeit von Beginn der Messung bis zum Erreichen einer stabilen Ratio nach Zugabe des extrahierten Adrenalins aus den Serumproben gemessen. Dabei wurde bei beiden Methoden gleich verfahren.

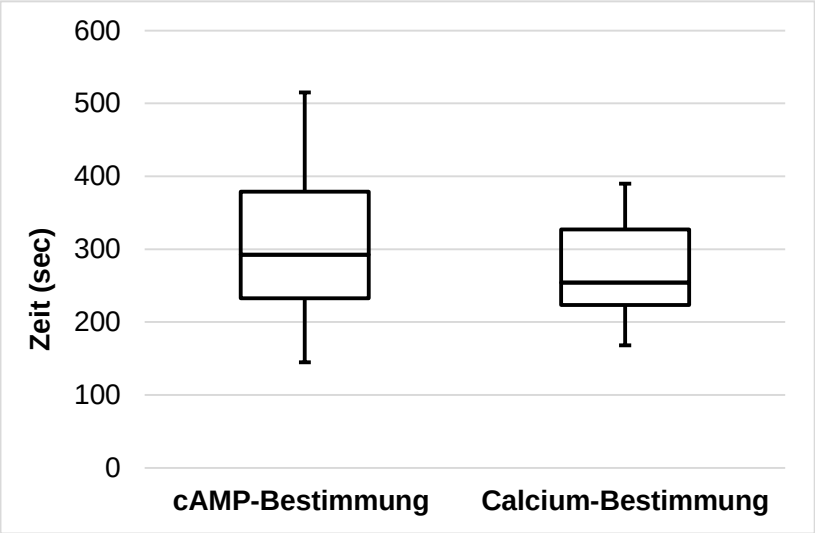

Abbildung 20: Messzeiten für cAMP- und Calciumbestimmungen

Für die cAMP- und die Calciumbestimmung wurde die Zeit für die Dauer der gesamten Messung in Sekunden gestoppt. Im Diagramm dargestellt sind: die Messzeiten, die max. und min. Werte ([cAMP;Ca^{2+}] Minimum 145,0s; 168,0s/ Maximum 515,0s; 390,0s) sowie der Median (292,5s; 254,0s).

Anhand des Diagramms ist eine durchschnittliche Messzeit von 292,5 sec für die Bestimmung von cAMP bzw. 254,0 sec für die Bestimmung von Ca^{2+} ermittelt worden.

3.4.2 cAMP- Bestimmung in Patientenseren

Nachfolgend werden die Graphen dargestellt, welche die Messung des intrazellulären cAMP in HEK 293 Epac1-camps-Zellen nach Zugabe von extrahiertem Adrenalin aus Patientenseren zeigen. Die Messung erfolgte genau wie in den bereits beschriebenen Vorversuchen zur cAMP-Messung an HEK 293 Epac1-camps-Zellen am Fluoreszenz-mikroskop und auch die vorhergehende Extraktion von Adrenalin erfolgte laut dem beschriebenen Extraktionsprotokoll.

Abbildung 21 zeigt die Darstellung zweier FRET-Spuren nach Zugabe von extrahiertem Adrenalin (aus Nebennierenvenenkatheterserum=zR und peripher entnommener

Probe=PR) und von 1 µM Adrenalinverdünnung (Positivkontrolle). Ein deutlicher Unterschied ist zwischen den Spuren beider Extraktionsproben zu sehen. Während die Ratio nach Zugabe des zR-Extrakt eine deutliche Reduktion von ~0,25 zeigt, sinkt die Ratio nach Zugabe von PR-Extrakt nur um ~0,1. Ein weiterer Unterschied ist nach Zugabe der Positivkontrolle: hier sinkt die Ratio der PR-Spur um weitere ~0,15, während die Spur zR-Extraktes nur eine minimale Veränderung der Ratio zeigt.

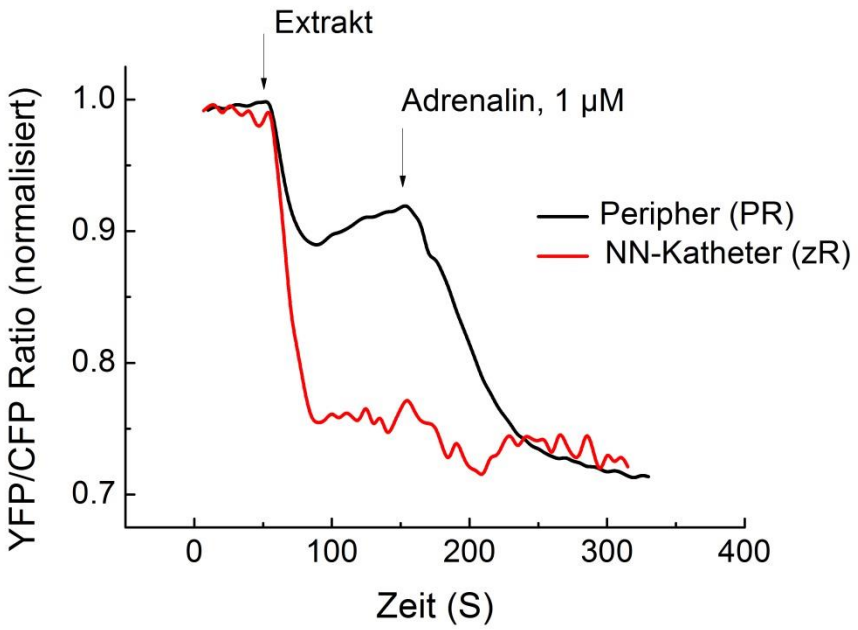

Abbildung 21: Darstellung der FRET-Ratio nach Zugabe von Adrenalinextrakt und 1 µM Adrenalinverdünnung

Der Graph zeigt die Veränderung der YFP/CFP Ratio (normalisiert) einer HEK 293 Epac1-camps-Zelle in Abhängigkeit von der Zeit in sec nach Zugabe des extrahierten Adrenalins aus Patientenproben von peripher gewonnenem Blut (PR - schwarz) und Nebennierenvenenkatheter-Blut (zR - rot). Ebenfalls zeigt es die Beeinflussung der Ratio nach Zugabe von 1 µM Adrenalinverdünnung.

Für alle 7 Patienten wurde die oben beschriebene Messung durchgeführt und anhand der gemessenen Ratio konnte ein cAMP-FRET-Signal (%Max) errechnet werden und in einem *paired-t*-Test (Abbildung 22) dargestellt werden.

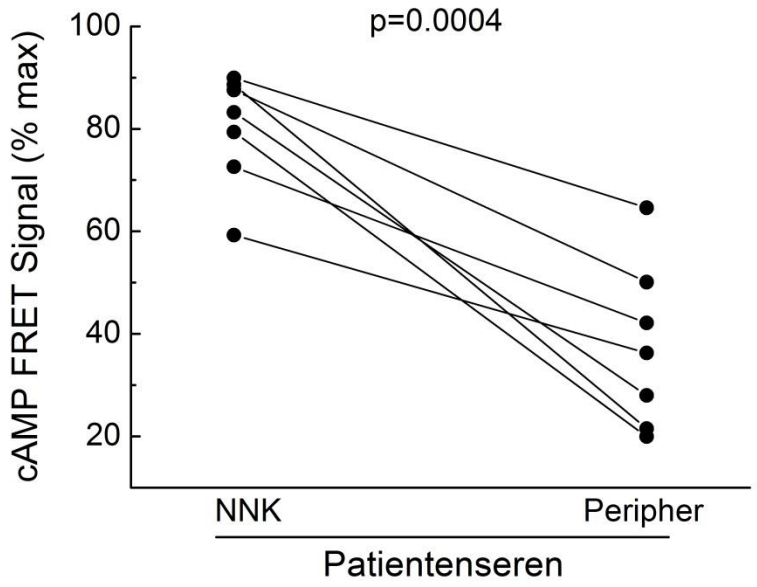

Abbildung 22: *Paired-t*-Test der cAMP-FRET-Signale der gemessenen Patientenseren

Das Diagramm zeigt die cAMP-FRET-Signale in %max von 7 Patientenseren (peripher und Nebennierenvenenkatheter=NNK). Ein signifikanter p-Wert von 0,0004 wurde bestimmt.

Beim Vergleich der Signale nach Zugabe von Nebennierenvenenkatheter-Extrakt und Peripher-Extrakt lässt sich feststellen, dass beim Nebennierenvenenkatheter-Extrakt höhere FRET-Signale (in %max) zu messen sind. Der Unterschied wird durch den p-Wert von 0,0004 verdeutlicht.

Die Parameter (n und k) der DWK (Abbildung 18), welche bei der Messung von extrahiertem Adrenalin aus einer Verdünnungsreihe ermittelt wurden, konnten anschließend verwendet werden, um die unbekannte Adrenalinkonzentration aus den Patientenproben zu berechnen. Folgende von der Hill-Gleichung abgeleitete Formel wurde verwendet:

$$c = \sqrt[1,2]{-6.899 * FRET(\%max)/FRET(\%max) - 1)}$$

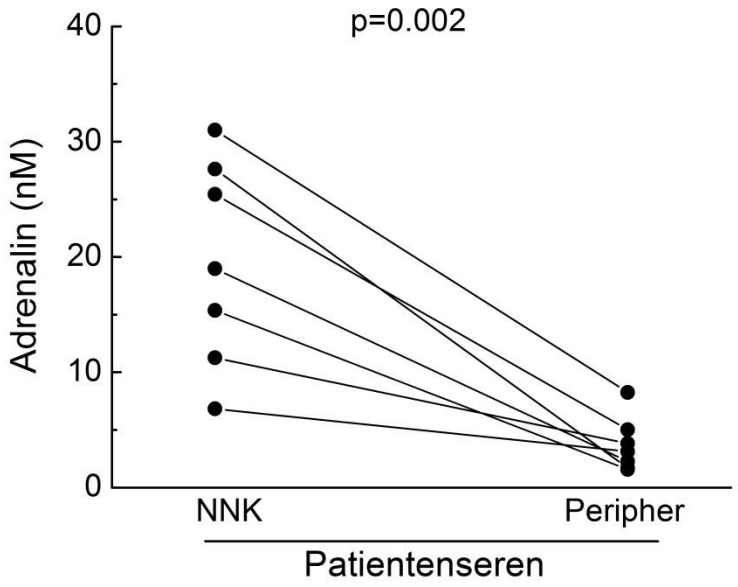

Abbildung 23: *Paired-t*-Test der Adrenalinkonzentration in Patientenseren

Der *paired-t*-Test zeigt vergleichend die Adrenalinkonzentrationen [nM] in den Patientenseren getrennt nach Entnahmestelle (NNK vs. Peripher). Der p-Wert beträgt 0,002.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Adrenalinkonzentrationen in den Patientenseren (NNK vs. Peripher) lässt sich feststellen. In den Proben, welche direkt aus der Nebenniere gewonnen wurden, ist eine höhere Konzentration zu erkennen als bei den Proben aus dem venösen Zugang.

3.4.3 Ca^{2+}-Bestimmung in Patientenseren

Um beide Verfahren weiter miteinander vergleichen zu können, erfolgte auch die Ca^{2+}-Bestimmung in Adrenalinextrakten von Patientenseren zum indirekten Nachweis von Adrenalin.

Auch hier zeigt die erste Darstellung zunächst die Veränderung F_{340}/F_{380} Ratio der HEK 293 α_{1B}-Zellen nach Zugabe der Extrakte (Peripher und Nebennierenvenen-katheter) und nach abschließender Zugabe der 1 µM Adrenalinverdünnung.

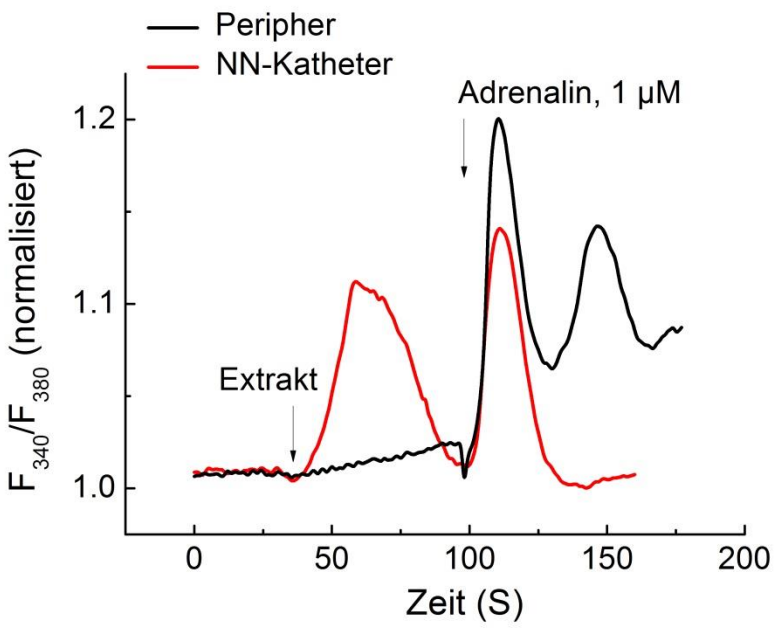

Abbildung 24: Veränderung der Ratio F340/F380 nach Zugabe von Extrakten aus verschiedenen Patientenseren

Erfassung der Ratio F_{340}/F_{380} (normalisiert) nach Zugabe von Extrakten aus 2 verschiedenen Patientenseren (Peripher vs. NN-Katheter) und nach Zugabe von einer 1 µM Adrenalinverdünnung als Positivkontrolle.

Die Darstellung zeigt eine starke Zunahme nach Zugabe des Nebennierenvenenkatheter-Extraktes und eine kaum messbare Zunahme bei dem Peripher-Extrakt. Nach Zugabe von 1 µM Adrenalin hingegen zeigt das Peripher-Extrakt eine eindeutige Zunahme der Ratio und das Nebennierenvenenkatheter-Extrakt hingegen nur eine leicht verstärkte Zunahme im Vergleich zur vorher steigenden Ratio.

Zum besseren Vergleich wurden auch diese Messergebnisse in einem *paired-t*-Test dargestellt.

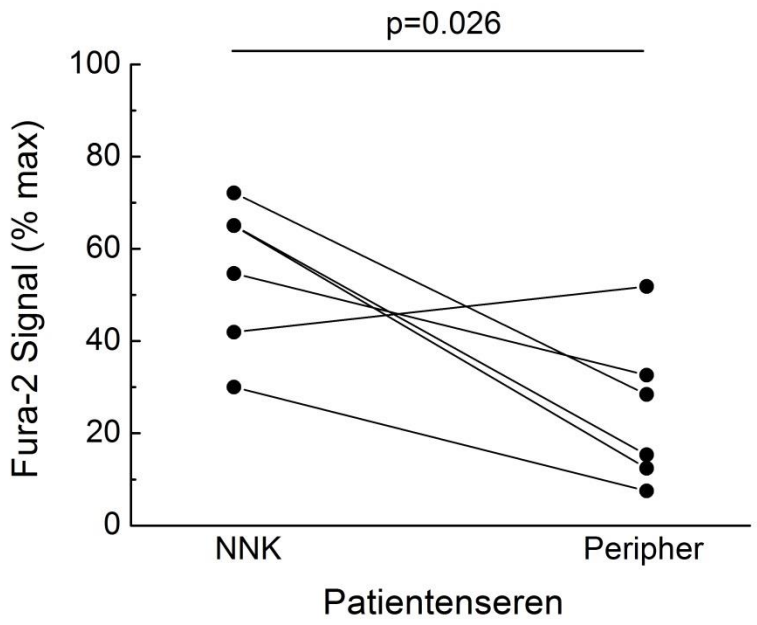

Abbildung 25: *Paired-t*-Test der Fura-2-Signale der gemessenen Patientenseren

Das Diagramm zeigt die Fura-2-Signale in % max von 6 Patientenseren (peripher und NNK). Ein signifikanter p-Wert von 0,026 wurde ermittelt.

Auch diese Methode zeigt einen Unterschied der Signale zwischen NNK und Peripher (p=0,026). Ein Satz der Seren von einem Patienten zeigt eine umgekehrte Tendenz, was auf ein Vertauschen der Probe, eine falsche Lage des Katheters oder einen Messfehler hinweisen könnte. Im Gegensatz zur cAMP-Messung standen zur Auswertung nur 6 Patientenproben auf Grund von unzureichendem Probenvolumen zur Verfügung.

Auch für diese Messreihe kann mit Hilfe der entsprechenden DWK (Abbildung 19) die unbekannte Konzentration der Patientenproben berechnet werden. Es wird die gleiche Formel wie bei der cAMP-Messung eingesetzt:

$$c = \sqrt[1,11]{-8.655 * Fura(\%max)/Fura(\%max) - 1)}$$

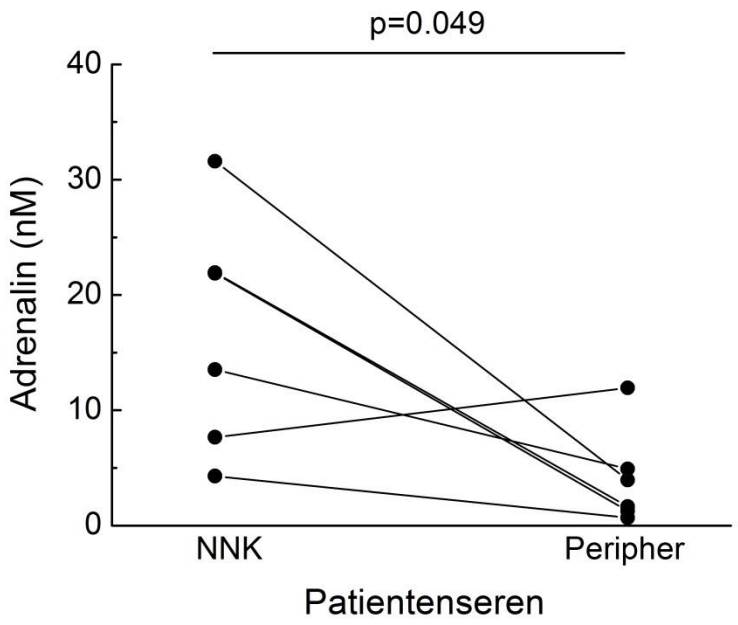

Abbildung 26: *Paired-t*-Test der Adrenalinkonzentrationen in den Patientenseren

Der *paired-t*-Test zeigt vergleichend die Adrenalinkonzentrationen [nM] in den Patientenseren getrennt nach Entnahmestelle (NNK vs. Peripher). Ermittelter p-Wert ist 0,049.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Adrenalinkonzentrationen in den Patientenseren ist auch hier erkennbar. Einzig eine Probe weicht, wie bereits in Abbildung 25 zu sehen, ab und zeigt eine höhere Adrenalinkonzentration im peripheren Blut.

3.5 Direkter Vergleich der Messverfahren

Um die Sensitivität und auch die Konzentrationen, die mit beiden Verfahren ermittelt wurden, gegenüberstellen zu können, wurden alle Werte tabellarisch dargestellt.

Tabelle 6: Maximale Signale und Adrenalinkonzentrationen von Patientenseren

Patient	**FRET % max/100**		**Adrenalinkonz. (nM)**		**Fura-2 % max/100**		**Adrenalinkonz. (nM)**	
	NN	*Peripher*	*NN*	*Peripher*	*NN*	*Peripher*	*NN*	*Peripher*
1	0,89929	0,64583	30,99571	8,24858	0,30028	0,07500	4,2965	0,6747
2	0,88604	0,21492	27,61721	1,69865	0,65052	0,15334	21,9326	1,6477
3	0,79367	0,19940	15,36406	1,57	0,54645	0,32619	13,5274	4,9121
4	0,83221	0,27969	18,98908	2,27301	0,41934	0,51852	7,6604	11,9416
5	0,87568	0,50096	25,43476	5,01595	-- *	-- *	-- *	-- *
6	0,59261	0,36250	6,83268	3,12363	0,65000	0,12418	21,8772	1,2553
7	0,72593	0,42116	11,25841	3,83592	0,72112	0,28413	31,6011	3,9394

(*Keine auswertbaren Ergebnisse/ ungenügend Probenmaterial)

Vergleicht man die ermittelten Adrenalinkonzentrationen miteinander, so fällt auf, dass bei den meisten Patienten mit den verschiedenen Verfahren keine identischen Ergebnisse erzielt werden konnten. Bei den Patienten 2 und 3 konnte zumindest annähernd ähnliche Werte mit beiden Verfahren ermittelt werden. Eindeutig ist bei beiden Verfahren hingegen der Unterschied zwischen Proben Nebennierenvenenkatheter und Peripher, die Nebennierenvenenkatheter-Proben weisen durchgehend eine höhere Konzentration auf, was auf Grund der Lokalisation auch zu erwarten war. Ausnahme bildet die Messung der Probe 4 mittels Fura-2, hier ist möglicherweise eine Probenverwechslung oder eine Fehlmessung erfolgt.

4 Diskussion

Die Bestimmung von Adrenalin im Blutserum wird seit Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt und stellt einen wichtigen diagnostischen Parameter z.B. des Phäochromozytoms und auch der essentiellen Hypertonie dar. Seit diesen Anfängen wurden die Methoden ständig weiterentwickelt und modifiziert. Ein Großteil der Forschung legte den Fokus auf die Verbesserung der Sensitivität. Allerdings ist es bei einigen Eingriffen (siehe 1.1) auch wichtig, ein diagnostisches Schnellverfahren zu haben, um die Adrenalinkonzentration innerhalb von unter einer halben Stunde bestimmen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden entwickelt, mit denen durch die intrazelluläre Messung von cAMP bzw. Ca^{2+} in HEK 293-Zellen die Bestimmung von Adrenalin durchgeführt wurde. Beide Verfahren wurden nach vorausgegangener Testung mit Hilfe von Testseren auch bei menschlichen Serumproben angewendet. Besonderes Augenmerk wurde auf die schnelle und einfache Anwendbarkeit der Messverfahren an Serumproben im Routinelabor sowie auf eine geringe Nachweisgrenze gelegt.

4.1 Testung von transfizierten Zelllinien

Nachdem die HEK 293-Zellen mit den erforderlichen Plasmiden (Epac1-camps bzw. α_{1B}-AR) transfiziert und selektioniert wurden, erfolgte die Testung der generierten Zellklone. Zur Transfektion wurden mehrere Klone eingesetzt, um eine möglichst hohe Anzahl gut exprimierender Zellen zu erhalten. Alle Zellen, die erfolgreich kultiviert werden konnten, wurden getestet. Die Testung beinhaltete die Messung von intrazellulärem cAMP bzw. Ca^{2+} in den HEK 293-Zellklonen Epac1-camps und α_{1B} nach Zugabe von Adrenalin in unterschiedlichen Konzentrationen. In Abschnitt 3.1.1 ist das Ergebnis der Testung der HEK 293 Epac1-camps-Zellen beschrieben. Anhand der abnehmenden Fluoreszenz von CFP und der zunehmenden Fluoreszenz von YFP konnte mit Hilfe der Formel (Ratio= (YFP - B x CFP) / CFP) die FRET-Ratio errechnet und graphisch dargestellt werden. Die für den ausgewählten Klon 3 dargestellte Kurve (Abbildung 12) lässt deutlich erkennen, dass es durch die Zugabe von Adrenalin (1 µM) zu einer Veränderung der Ratio gekommen ist. Anhand dessen kann von einer intrazellulären Zunahme von cAMP ausgegangen werden als Resultat auf die Stimulation des β_2-AR und der damit aktivierten

Signaltransduktionskette. Die Amplitude der Ratioveränderung von ca. 20 % entspricht einem optimal für den Sensor Epac1-camps gemessenen Signal (Nikolaev et al. 2004).

Außerdem erfolgte die Testung der HEK 293 α_{1B}-Zellen mittels Ca^{2+}-Messungen, die Auswertung der Testung ist in Abschnitt 3.2.1. zu finden. Auch hier konnte eine Ratio der gemessenen Fluoreszenzen bei 340 nm und 380 nm mit Hilfe einer Formel (Ratio= F 340 nm/F380 nm) errechnet und graphisch dargestellt werden. Sie zeigt den Zellklon A mit der stärksten gemessenen Veränderung der Fura-Ratio unter Adrenalingabe und den Zellklon B mit der niedrigsten Veränderung der gemessenen Fura-Ratio. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass die Stimulation des α_{1B}-AR durch Adrenalin eine intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} zur Folge hat und die Veränderung der Ratio erklärt. Es ist anzunehmen, dass Zellen, die eine starke Ratio zeigen, eine hohe Dichte an α_{1B}-AR aufweisen und somit nach Stimulation eine Freisetzung hoher Mengen Ca^{2+} bewirken. Die Zellen mit einer niedrigen Ratio weisen hingegen eine geringere Rezeptordichte auf und sind für die Versuchsreihe ungeeignet. Der Zellklon A (Abbildung 15) wurde daher ausgewählt und für die weiteren Versuche eingesetzt.

4.2 Erstellung der Dosiswirkungskurven

Die entwickelten Methoden weisen Adrenalin indirekt über die Messung von cAMP und Ca^{2+} nach, daher ist die Darstellung der Ergebnisse in einer DWK erforderlich. Anhand dieser Auswertung konnte jeweils ein EC_{50}-Wert ermittelt werden, welcher die Konzentration widerspiegelt, bei der die Reaktion die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht. Über die DWK ist es möglich, unbekannte Adrenalinkonzentrationen in Serumproben zu berechnen sowie die Sensitivität einer Methode abzulesen.

Zur Erstellung wurde von jedem ausgewählten Zellklon, also HEK 293 Epac1-camps und HEK 293 α_{1B}, Messungen mit unterschiedlichen Adrenalinkonzentrationen durchgeführt, um aus mehreren Messungen Mittelwerte für jede Adrenalinkonzentration errechnen zu können.

Eine unterschiedliche Sensitivität für die Messung der FRET-Ratio im Vergleich zur Messung der Fura-2-Ratio lässt sich anhand eines niedrigeren EC_{50}-Wertes (EC_{50} [FRET]=10,9 ± 2,8 nM vs. [Fura-2]=13,6 ± 1,5 nM) erkennen. Allerdings führt der geringe Unterschied nicht zu der Annahme, dass das FRET-Messprotokoll (HEK 293 Epac1-

camps-Zellen) wesentlich sensitiver ist als das Fura-2-Messprotokoll (HEK 293 α_{1B}-Zellen).

4.3 Adrenalinextraktion

Um Adrenalin mit dem entwickelten Verfahren in menschlichem Serum nachweisen zu können, ist die Extraktion desselbigen erforderlich. Die Notwendigkeit für die Extraktion ergibt sich aus der Autofluoreszenz einiger Serumbestandteile wie z.B. Nicotinamidadenindinukleotid (Wolfbeis und Leiner 1985), welche zur Störung der Fluoreszenzmessung beitragen würde.

Um die Effizienz der Extraktion zu überprüfen, wurde Adrenalin aus einer Reihe von Adrenalinverdünnungen extrahiert. Eine exakte Einstellung des pH auf 7,4 ist hier unerlässlich, da ein zu saurer und auch ein zu basischer pH Wert zu einer „Störung" der Fluoreszenzmessung in HEK 293-Zellen bewirkt, wodurch die Ergebnisse nicht verwertbar sind.

Vergleicht man die EC_{50}-Werte der DWK aus Abschnitt 3.1.2 und 3.2.2 mit den DWK aus den Versuchen der Adrenalinextraktion, so ist erkennbar, dass eine Extraktion erfolgreich durchgeführt werden konnte. Auch in dieser Versuchsreihe differieren die EC_{50}-Werte der beiden Methoden geringfügig (EC_{50} [FRET]= 5,4 ± 0,2 nM vs. [Fura-2]= 10,7 ± 3,1 nM). Auch hier ist Unterschied kaum nennenswert, sodass beide Methoden gleichermaßen geeignet erscheinen.

4.4 Vergleich der Nachweisgrenzen des entwickelten Verfahrens mit alternativen Messverfahren

Bei der Entwicklung des Verfahrens wurde eine möglichst hohe Sensitivität angestrebt. Das neue Verfahren sollte ebenfalls eine geringe Nachweisgrenze aufweisen. Im Ergebnisteil zeigt sich, dass Adrenalinkonzentrationen ab 1 nM gemessen werden konnten. Bei Konzentrationen < 0,1 nM war kein FRET- bzw. Fura-2-Signal messbar. Die DWK zeigt die mittlere Signalstärke bei etwa 10 nM sowohl für FRET als auch für Fura-2. Der Unterschied zwischen beiden Verfahren ist kaum nennenswert, so dass man beide Verfahren als ähnlich sensitiv bezeichnen kann.

Vergleicht man die beiden entwickelten Verfahren mit den in 1.2.3 dargestellten Methoden, ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Nachweisgrenzen erkennbar. Besonders die älteren Methoden der Fluorimetrie und die Gaschromatographie liegen mit Nachweisgrenzen zwischen 2,11 nM und 5,5 nM weit von der Nachweisgrenze der beiden neuen Verfahren entfernt (Lund 1949; Lovelady und Foster 1975). Geringere Nachweisgrenzen haben die neuen Verfahren der HPLC und UPLC, Hallman et al. und Ji et al. weisen mit 0,1 nM bzw. 0,27 nM ähnlich nachweisbare Menge Adrenalin nach (Hallman et al. 1978; Ji et al. 2010). Aber auch die Radioenzymassays zeigen eine relativ niedrige Nachweisgrenze von 0,11 nM und 0,275 nM (Engelman et al. 1970; Peuler und Johnson 1977). Einzig Dunand et al. zeigen eine nennenswert niedrigere Nachweisgrenze bei 0,05 nM (Dunand et al. 2013).

Im Vergleich zu den dargestellten Methoden liegen die hier neu entwickelten Methoden etwas unter den hier erwähnten Nachweisgrenzen. Allerdings haben sie den entscheidenden Vorteil, dass sie als Schnellmessverfahren für die Routinediagnostik etabliert werden können (s.u. 4.5). Die Testung der Verfahren an menschlichen Proben zeigt deutlich, dass sie ausreichend ist, Adrenalin im Serum nachweisen zu können.

4.5 Vergleich der Prozesszeiten des entwickelten Verfahrens mit alternativen Messverfahren

Ein Vergleich der Prozesszeiten ist nur mit ungenauen Zeitangaben seitens der alternativen Verfahren möglich, da hier zum Teil keine exakten Angaben gemacht werden. Festzuhalten ist allerdings, dass alle Methoden inklusive Inkubations-, Zentrifugations- und Prozesszeiten eine Dauer von 40 min übersteigen. Bei der Messung von Adrenalin mittels Radioenzymassay nach Engelman et al. wird sogar eine Inkubationszeit über Nacht angegeben (Engelman et al. 1970). Dieses Verfahren kann den Ansprüchen eines Schnellmessverfahrens nicht genügen. Im Rahmen der UPLC werden zwar kurze Laufzeiten von 2 min bei Dunand et al. und 3,5 min bei Ji et al. genannt, jedoch erhöhen Vorbereitungszeiten die Gesamtprozessdauer auf > 40 min (Ji et al. 2010; Dunand et al. 2013).

Die indirekte Adrenalinbestimmung im Serum über die cAMP-Messung benötigt durchschnittlich 5,1 min für die mikroskopische Messung. Die Vorbereitung der Proben zur Extraktion des Adrenalins benötigt 10-15 min. Zur Messung von Ca^{2+} ist eine

durchschnittliche Messdauer von 4,5 min am Mikroskop notwendig. Die Messzeit richtet sich danach, wie schnell sich eine gleichmäßige Ratio zu Beginn der Messung einstellt. Davon hängt ab wie schnell eine Probe zugegeben werden kann. Ebenso entscheidend für die Länge der Messung ist die Einstellung der stabilen Ratio nach Zugabe der Probe. Allerdings können diese Faktoren unter Verwendung der hier entwickelten stabilen Zelllinien sehr gut standardisiert bzw. vereinheitlicht werden. Die Vorbereitungszeit für die Fura-2-Messung verlängert sich im Vergleich zur cAMP-Messung um 10 min auf insgesamt 20-25 min, da die Zellen vor der Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 inkubiert werden müssen. Daraus lässt sich folgern, dass die Messung der FRET-Ratio (inklusive Probenvorbereitung) ein schnelleres Verfahren darstellt, als die Messung der Fura-2-Ratio.

Bei den Messungen der Fura-2-Ratio der Adrenalinverdünnungen an der FlexStation® liegt eine Messdauer pro Probe von 120 sec vor, eine Extraktionsdauer von 10-15 min und eine Inkubationszeit von 10 min für Fura-2. Daraus ergibt sich eine Gesamtmessdauer pro Probe von 22-27 min.

Die Vorbereitungszeit für die HEK 293-Zellen wurde nicht in die Prozessdauer eingerechnet. Die Kultivierung der Zellen ist für beide Methoden gleich, und es wird davon ausgegangen, dass die Zellen wie andere Materialien vorrätig sind. Sie wurde daher nicht in die Berechnung der Gesamtmessdauer mit einbezogen.

Vergleicht man nun die Methoden miteinander, bringt die Messung der FRET-Ratio einen Zeitvorteil von 10 min. Einen weiteren zeitlichen Vorteil bringt die Messung der Proben an der Flex Station®, da hier die direkte Messzeit auf 120 sec pro Probe reduziert werden kann.

Der Vergleich der Messzeiten der Serumproben in 3.4.1 zeigt, dass sich beide Methoden kaum im Median unterscheiden. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Verfahren ist hinsichtlich der Messdauer nicht zu erkennen.

Zukünftig sollte die Messung von Serumproben auch an der FlexStation® erfolgen, um beide Methoden auf ein diagnostisch freundliches Plattenreaderformat zu übertragen. Hier können innerhalb kürzester Zeit viele Proben gleichzeitig und automatisch gemessen werden. Ein großer Vorteil der automatisierten Messung wäre in jedem Fall die Arbeitsersparnis für das technische Personal, da hier keine Anwesenheit während der Messung notwendig ist. Anders ist es beim Mikroskop: hier ist die gesamte Messdauer zu

begleiten. Die geringe Menge an vorhandenem Serummaterial hat eine parallele Testung der Methoden an dem Plattenreader in dieser Arbeit ausgeschlossen. Die Messungen mit Adrenalinverdünnungen (Abb. 17) zeigen, dass diese auch mit Patientenseren an der FlexStation® 3 möglich sein sollten.

4.6 Adrenalinbestimmung in Patientenseren

Die abschließende Versuchsreihe bildete die Testung der beiden entwickelten Verfahren an Patientenseren.

Von den 9 verfügbaren Proben eigneten sich nur 7 (bzw. 6 bei der Ca^{2+}-Messung) zur Verwendung bei den Testverfahren, da hier ausreichend Probenvolumen vorhanden war.

Die Ergebnisse zeigen eine messbare Reaktion der Zellen auf die Zugabe von extrahiertem Adrenalin aus den Seren. Betrachtet man die Signale nach Zugabe des Adrenalinextraktes, so zeigen beide Methoden einen Unterschied in der Signalstärke bei Proben aus dem Nebennierenvenenkatheter und Proben aus peripherer Blutentnahme. Die unterschiedlich starke Reaktion ist auf den Entnahmeort zurückzuführen, da in der Nebenniere Adrenalin direkt produziert wird und daher ein höheres Signal und damit eine höhere Adrenalinkonzentration plausibel sind.

Vergleicht man nun beide Verfahren miteinander, so wurde bei den Fura-2-Messungen der Patientenseren mehr Streuung festgestellt, wodurch auch gemessene Spuren nicht für die Auswertung verwendet werden konnten. Die Messung von cAMP hat stabilere Spuren mit weniger Streuung gezeigt. Auch der Vergleich aller Messungen der Patientenseren in Tabelle 6 zeigt, dass die FRET-Messung stabilere Werte geliefert hat als die Messung mit Fura-2.

Fazit aus den gewonnenen Daten ist daher, dass eine Messung von Adrenalin-konzentrationen über die Messung von cAMP über die FRET-Ratio stabilere Ergebnisse zeigt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei neue Schnellmessverfahren für Adrenalin etabliert. Beide Messverfahren verwenden HEK 293-Zellen, aus denen zwei stabile Zelllinien entwickelt wurden, die zum einen den sog. Epac1-camps-Sensor für cAMP (HEK 293 Epac1-camps) enthalten und zum anderen einen α_{1B}-AR (HEK 293 α_{1B}) exprimieren. Nach Stimulation der Zellen mit Adrenalin erfolgte die Messung der hieraus resultierenden intrazellulären Freisetzung von cAMP bzw. Ca^{2+}, welche indirekt eine Adrenalinbestimmung ermöglicht.

Die Bindung des Adrenalins an die β_2-AR der HEK 293 Epac1-camps-Zellen bewirkt eine G_s-Protein-gesteuerte Kaskade, welche zur Freisetzung von cAMP führt. Bindet Adrenalin hingegen an den α_{1B}-AR (HEK 293 α_{1B}), wird Ca^{2+} über die nun ablaufende Signaltransduktionskette freigesetzt. Die Messung von cAMP erfolgt über die Bindung am stabil transfizierten Epac1-camps-Sensor in den gleichnamigen HEK 293-Zellen. Bindet cAMP, kommt es zu einer Veränderung der FRET-Ratio, welche mikroskopisch gemessen und ausgewertet werden kann. Um Ca^{2+} messen zu können, müssen die HEK 293 α_{1B}-Zellen vor der Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen werden. Das freigesetzte Ca^{2+} bildet mit Fura-2 einen Chelatkomplex und weist eine andere Fluoreszenzintensität auf als freies Fura-2. Auch diese Veränderung kann mikroskopisch gemessen und ausgewertet werden.

Mit Hilfe dieser beiden Verfahren ist es möglich, Adrenalin indirekt zu bestimmen. Nach Testung der transfizierten Zellen und Herstellung von DWK für jedes Verfahren zum Ablesen der Sensitivität und zum Auswerten von unbekannten Adrenalinproben wurden beide Verfahren an menschlichen Patientenseren angewendet. Anhand der Daten zeigt sich, dass die Bestimmung einer unbekannten Adrenalinkonzentration im Serum mit beiden Methoden möglich ist und dass sie zuverlässig höhere Adrenalinkonzentrationen im Nebennierenkatheterblut im Vergleich zu peripherem Blut nachweisen kann. Im Vergleich mit anderen Methoden und der Verfahren untereinander lässt sich feststellen, dass insbesondere die cAMP-Messung einen zeitlichen Vorteil bringt. Sie ist der Ca^{2+}-Messung, wenn auch in geringem Maß, in der Sensitivität und Stabilität überlegen.

Diese Erkenntnisse bilden eine interessante Grundlage, um insbesondere die cAMP-Messung weiter zu untersuchen und zu standardisieren. Unter dem Einsatz des FlexStation® 3 Mikrotiterplattengeräts könnte eine weitere Verkürzung der Messzeiten erzielt werden, sie stellt somit die mögliche Grundlage weiterer Forschung dar. Da die intrazelluläre Freisetzung von cAMP oder Ca^{2+} in der Singaltransduktion nicht nur durch Adrenalin hervorgerufen werden kann, könnte dieses Verfahren für die Diagnostik anderer Moleküle außer Adrenalin mit geringen Modifikationen genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

Aantaa R, Marjamäki A, Scheinin M (1995): Molecular Pharmacology of α2-adrenoceptor Subtypes. Ann Med 27, 439–449

Abel JJ (1899): Ueber den blutdruckerregenden Bestandtheil der Nebenniere, das Epinephrin. Z Physiol Chem 28, 318–362

Ahlquist RP (1948): A Study of the Adrenotropic Receptors. Am J Physiol 153, 586–600

Altarejos JY, Montminy M (2011): CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 141–151

Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y (1992): Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. Trends Biochem Sci 17, 414–417

Ashcroft FM, Rorsman P (2012): Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years. Cell 148, 1160–1171

Axelrod J (1957): O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols in vitro and in vivo. Science 126, 400–401

Axelrod J (1962): Purification and Properties of Phenylethanolamine-N-methyl Transferase. J Biol Chem 237, 1657–1660

Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996): Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci 93, 13445–13452

Bodor J, Bopp T, Vaeth M, Klein M, Serfling E, Hünig T, Becker C, Schild H, Schmitt E (2012): Cyclic AMP underpins suppression by regulatory T cells. Eur J Immunol 42, 1375–1384

Börner S, Schwede F, Schlipp A, Berisha F, Calebiro D, Lohse MJ, Nikolaev VO (2011): FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. Nat Protoc 6, 427–438

Bornstein SR, Breldert M, Ehrhart-Bornstein M, Kloos B, Scherbaum WA (1995): Plasma catecholamines in patients with Addison's disease. Clin Endocrinol (Oxf) 42, 215–218

Bos JL (2003): Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 733–738

Bylund DB, Blaxall HS, Iversen LJ, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lomasney JW (1992): Pharmacological characteristics of alpha 2-adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning. Mol Pharmacol 42, 1–5

Carafoli E (1987): Intracellular Calcium Homeostasis. Annu Rev Biochem 56, 395–433

Carmichael SW, Rochester (1989): The history of the adrenal medulla. Rev Neurosci 2, 83–100

Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A (1986): Calcium and Ischemic Injury. N Engl J Med 314, 1670–1676

Civantos Calzada B, Aleixandre de Artiñano A (2001): Alpha-adrenoceptor subtypes. Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc 44, 195–208

Clardy-James S, Chepurny OG, Leech CA, Holz GG, Doyle RP (2013): Synthesis, Characterization and Pharmacodynamics of Vitamin-B12-Conjugated Glucagon-Like Peptide-1. ChemMedChem 8, 582–586

Cobbold PH, Rink TJ (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. Biochem J 248, 313–328

Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, Kobilka BK (1988): Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci 85, 7159–7163

Craven KB, Zagotta WN (2006): CNG and HCN channels: Two Peas, One Pod. Annu Rev Physiol 68, 375–401

Diederich S, Bidlingmaier M, Quinkler M, Reincke M (2007): Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus*. Med Klin 102, 16–21

Docherty JR (1998): Subtypes of functional α1- and α2-adrenoceptors. Eur J Pharmacol 361, 1–15

Dunand M, Gubian D, Stauffer M, Abid K, Grouzmann E (2013): High-throughput and sensitive quantitation of plasma catecholamines by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a solid phase microwell extraction plate. Anal Chem 85, 3539–3544

Ehrhardt J-D, Schwartz J (1978): A gas chromatography-mass spectrometry assay of human plasma catecholamines. Clin Chim Acta 88, 71–79

Ellis S (1956): The metabolic effects of epinephrine and related amines. Pharmacol Rev 8, 485–565

Engelman K, Portnoy B, Hurley N (1970): A Sensitive Double-Isotope Derivative Assay for Norepinephrine and Epinephrine normal resting human plasma levels. Circ Res 26, 53–57

Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006): Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. Circ Res 99, 816–828

Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann Phys 437, 55–75

Fuller RW (1982): Pharmacology of Brain Epinephrine Neurons. Annu Rev Pharmacol Toxicol 22, 31–55

Giese KP, Mizuno K (2013): The roles of protein kinases in learning and memory. Learn Mem 20, 540–552

Gloerich M, Bos JL (2010): Epac: Defining a New Mechanism for cAMP Action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 50, 355–375

Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ (2003): Sources and Significance of Plasma Levels of Catechols and Their Metabolites in Humans. J Pharmacol Exp Ther 305, 800–811

Grouzmann E, Lamine F (2013): Determination of catecholamines in plasma and urine. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 27, 713–723

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260, 3440–3450

Hallman H, Farnebo L-O, Hamberger B, Jonsson G (1978): A sensitive method for the determination of plasma catecholamines using liquid chromatography with electrochemical detection. Life Sci 23, 1049–1052

Hamm HE (1998): The Many Faces of G Protein Signaling. J Biol Chem 273, 669–672

Hamm HE, Gilchrist A (1996): Heterotrimeric G proteins. Curr Opin Cell Biol 8, 189–196

Han C, Abel PW, Minneman KP (1987): α1Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca2+ in smooth muscle. Nature 329, 333–335

Harper JF, Brooker G (1974): Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. J Cyclic Nucleotide Res 1, 207–218

Hayashi H, Miyata H (1994): Fluorescence imaging of intracellular Ca2+. J Pharmacol Toxicol Methods 31, 1–10

Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg.): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. (Springer-Lehrbuch), 6. Auflage; Springer Berlin Heidelberg 2014

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR (1995): International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. Pharmacol Rev 47, 267–270

Holz GG (2004): Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β-Cell. Diabetes 53, 5–13

Jabłoński A (1933): Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. Nature 131, 839–840

Ji C, Walton J, Su Y, Tella M (2010): Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS. Anal Chim Acta 670, 84–91

Kable JW, Murrin LC, Bylund DB (2000): In Vivo Gene Modification Elucidates Subtype-Specific Functions of α2-Adrenergic Receptors. J Pharmacol Exp Ther 293, 1–7

Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991): Structure and Function of Signal-Transducing GTP-Binding Proteins. Annu Rev Biochem 60, 349–400

Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, Adhya S (1993): Transcriptional Regulation by cAMP and its Receptor Protein. Annu Rev Biochem 62, 749–797

Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA (1992): Molecular diversity in the adenylylcyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. J Biol Chem 267, 24858–24862

Lands AM, Arnold A, Mcauliff JP, Luduena FP, Brown TG (1967a): Differentiation of Receptor Systems activated by Sympathomimetic Amines. Nature 214, 597–598

Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ (1967b): Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. Life Sci 6, 2241–2249

Leech CA, Dzhura I, Chepurny OG, Schwede F, Genieser H-G, Holz GG (2010): Facilitation of β-cell KATP channel sulfonylurea sensitivity by a cAMP analog selective for the cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor Epac. Islets 2, 72–81

Lipworth BJ (1996): Clinical pharmacology of beta 3-adrenoceptors. Br J Clin Pharmacol 42, 291–300

Lohmann FW, Loesment WA, Kaehler H (1990): Beta-receptor blockade, physical activity, and metabolism. J Cardiovasc Pharmacol 16 Suppl 5, S45-52

Lovelady HG, Foster LL (1975): Quantitative determination of epinephrine and norepinephrine in the picogram range by flame ionization gas-liquid chromatography. J Chromatogr 108, 43–52

Lund A (1949): Fluorimetric Determination of Adrenaline in Blood. II. The Chemical Constitution of Adrenolutine (the Fluorescent Oxidation Product of Adrenaline). Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 5, 121–128

Lund A (1950): Simultaneous Fluorimetric Determinations of Adrenaline and Noradrenaline in Blood. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 6, 137–146

Malherbe HW, Bone AD (1953): The adrenergic amines of human blood. Lancet 261, 974–977

Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, Weise M, Keil MF, Rogol AD, Van Wyk JJ, Bornstein SR (2000): Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. N Engl J Med 343, 1362–1368

Mitsui A, Nohta H, Ohkura Y (1985): High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. J Chromatogr 344, 61–70

Neer EJ (1994): G proteins: critical control points for transmembrane signals. Protein Sci Publ Protein Soc 3, 3–14

Nikolaev VO, Lohse MJ (2005): Visualisierung von cAMP in lebenden Zellen. Biospektrum-Heidelb- 11, 724–726

Nikolaev VO, Lohse MJ (2006): Monitoring of cAMP Synthesis and Degradation in Living Cells. Physiology 21, 86–92

Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004): Novel Single Chain cAMP Sensors for Receptor-induced Signal Propagation. J Biol Chem 279, 37215–37218

Nishizuka Y (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258, 607–614

Nyyssönen K, Parviainen MT (1988): Plasma catecholamines: laboratory aspects. Crit Rev Clin Lab Sci 27, 211–236

Peaston RT, Weinkove C (2004): Measurement of catecholamines and their metabolites. Ann Clin Biochem 41, 17–38

Perez DM, Piascik MT, Graham RM (1991): Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. Mol Pharmacol 40, 876–883

Peuler JD, Johnson GA (1977): Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. Life Sci 21, 625–636

Piston DW, Kremers G-J (2007): Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Trends Biochem Sci 32, 407–414

Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkruis F, van der Krogt G, Zaccolo M, Moolenaar WH, Bos JL, Jalink K (2004): Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. EMBO Rep 5, 1176–1180

Premont RT, Chen J, Ma HW, Ponnapalli M, Iyengar R (1992): Two members of a widely expressed subfamily of hormone-stimulated adenylyl cyclases. Proc Natl Acad Sci USA 89, 9809–9813

Rasmussen H, Barrett PQ (1984): Calcium messenger system: an integrated view. Physiol Rev 64, 938–984

Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1988): Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. Proc Natl Acad Sci 85, 6301–6305

Rosano TG, Swift TA, Hayes LW (1991): Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma. Clin Chem 37, 1854–1867

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Cotecchia S (1990): Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. J Biol Chem 265, 8183–8189

Small KM, McGraw DW, Liggett SB (2003): Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. Annu Rev Pharmacol Toxicol 43, 381–411

Sprenger JU, Nikolaev VO (2013): Biophysical Techniques for Detection of cAMP and cGMP in Living Cells. Int J Mol Sci 14, 8025–8046

Strosberg AD (1997): Structure and function of the β3-adrenergic receptor. Annu Rev Pharmacol Toxicol 37, 421–450

Sumi Y, Woehrle T, Chen Y, Yao Y, Li A, Junger WG (2010): Adrenergic receptor activation involves ATP release and feedback through purinergic receptors. Am J Physiol - Cell Physiol 299, C1118–C1126

Taskén K, Aandahl EM (2004): Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. Physiol Rev 84, 137–167

Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990): cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. Annu Rev Biochem 59, 971–1005

Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD, Minneman KP (1996): Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. Mol Pharmacol 50, 1376–1387

Tsien RY (1981): A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature 290, 527–528

Tsien RY (1998): The Green Fluorescent Protein. Annu Rev Biochem 67, 509–544

Tsien RY, Poenie M (1986): Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. Trends Biochem Sci 11, 450–455

Tsien RY, Rink TJ, Poenie M (1985): Measurement of cytosolic free Ca2+ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. Cell Calcium 6, 145–157

Tsujimoto G, Tsujimoto A, Suzuki E, Hashimoto K (1989): Glycogen phosphorylase activation by two different alpha 1-adrenergic receptor subtypes: methoxamine selectively stimulates a

putative alpha 1-adrenergic receptor subtype (alpha 1a) that couples with Ca2+ influx. Mol Pharmacol 36, 166–176

Verhofstad AA (1993): Kinetics of adrenal medullary cells. J Anat 183, 315–326

Vonend O, Ockenfels N, Gao X, Allolio B, Lang K, Mai K, Quack I, Saleh A, Degenhart C, Seufert J, et al. (2011): Adrenal Venous Sampling Evaluation of the German Conn's Registry. Hypertension 57, 990–995

Weinshank RL, Zgombick JM, Macchi M, Adham N, Lichtblau H, Branchek TA, Hartig PR (1990): Cloning, expression, and pharmacological characterization of a human alpha 2B-adrenergic receptor. Mol Pharmacol 38, 681–688

Wier WG (1990): Cytoplasmic [Ca2+] in Mammalian Ventricle: Dynamic Control by Cellular Processes. Annu Rev Physiol 52, 467–481

Williams C (2004): cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest. Nat Rev Drug Discov 3, 125–135

Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY, Fay FS (1985): Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. Nature 318, 558–561

Wolfbeis OS, Leiner M (1985): Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. Anal Chim Acta 167, 203–215

Wu PG, Brand L (1994): Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. Anal Biochem 218, 1–13

Wurtman RJ, Axelrod J (1966): Control of Enzymatic Synthesis of Adrenaline in the Adrenal Medulla by Adrenal Cortical Steroids. J Biol Chem 241, 2301–2305

Zhong H, Minneman KP (1999): Alpha1-adrenoceptor subtypes. Eur J Pharmacol 375, 261–276

Zimmerman AL (1995): Cyclic nucleotide gated channels. Curr Opin Neurobiol 5, 296–303

6.1 Internetquellen

http://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000618/equip/flexstation/information-flex/Equipement.pdf, Zugriff am 16.09.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev für die Überlassung des Themas und für die umfassende Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Holger Willenberg und seinen Patienten für die Bereitstellung der Patientenseren.

Ein großer Dank geht an die MTA Karina Zimmermann für die Unterstützung im Rahmen der Zellkultur und für die vielen Ratschläge in allen Laborbelangen.

Allen weiteren Mitarbeitern der ehemaligen AG Nikolaev danke ich ebenfalls für die Beantwortung aller Fragen und die stets gute Zusammenarbeit.