

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Pleiotrope Effekte von Etomidat und dessen
Imidazolderivaten auf adrenokortikale Zellen *in vitro* –
Hinweise auf intraadrenale Regulationsmechanismen der
adrenalen Steroidogenese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sarah Cochran-Bührmann
aus Frankfurt

Wiesbaden, Dezember 2014



Referentin: Priv. - Doz. Dr. med. S. Hahner

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Buck

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2014

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Nebenniere und ihre Regulation	1
1.2	Biosynthese der Steroidhormone	7
1.2.1	Mineralokortikoide	12
1.2.2	Glukokortikoide	12
1.2.3	Adrenale Androgene	13
1.3	Neoplasien der Nebennierenrinde	14
1.3.1	Adrenale Inzidentalome (AI)	14
1.3.2	Nebennierenrindenadenom	18
1.3.3	Nebennierenrindenkarzinom (ACC)	20
1.4	Therapie der NNR-Neoplasien	21
1.4.1.	Adrenostatika	22
1.4.1.1	Etomidat (ETO)	22
1.4.1.2	Metomidat (MTO)	23
1.4.1.3	Iodmetomidat (IMTO) und Fluoretomidat (FETO)	24
1.5	Bildgebung der NNR-Neoplasien	24
1.5.1.	Nuklearmedizinische Bildgebung der NNR-Neoplasien	25
1.6	Fragestellung dieser Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODIK	29
2.1	Material	29

2.2	Synthese von Iodmetomidat und Fluoretomidat	30
2.3	Zellkultur	30
2.3.1	NCI-h295 Zellen	30
2.3.2	Y-1 Zellen	31
2.3.3	SW-13 Zellen	32
2.3.4	MCF-7 Zellen und HT-29 Zellen	32
2.4	Zellproliferationsanalysen	32
2.4.1	Wachstumskurven	32
2.4.2.	MTT Test	33
2.5	Das Western Blot Verfahren	34
2.5.1.	Proteinprobenaufbereitung	34
2.5.2	SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis)	35
2.5.3.	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	37
2.5.4.	Immunodetektion und Chemolumineszenz	38
2.6	Hormonanalyse	39
2.6.1	Radioimmunoassay (RIA)	39
2.7	Bestimmung der RNA-Expression	40
2.7.1	RNA-Extraktion	40
2.7.2	cDNA-Herstellung für Realtime-PCR	41
2.7.3	Realtime PCR-Verfahren	42
2.8	Promoteranalysen mittels des Dual-Luciferase Reporter Assay-Kit (Promega)	45
2.9	Statistische Auswertungen	46

3	ERGEBNISSE	47
3.1	Wirkung von Etomidat und dessen Derivaten auf die Steroidogenese	47
3.1.1	Ergebnisse der Hormonanalysen	47
3.1.2	Wirkung auf die Proteinexpression der Steroidbiosyntheseenzyme	51
3.1.3	Einfluss auf die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren SF-1 und DAX-1	54
3.1.4	Wirkung auf die mRNA-Expression der Steroidbiosyntheseenzyme, des StAR-Proteins und des ACTH-Rezeptor (MC2R)	55
3.2	Wirkung von Etomidat und dessen Derivaten auf das Zellwachstum	58
3.2.1	Wirkung der Adrenostatika in den Wachstumskurven	58
3.2.2	Bestätigung der antiproliferativen Wirkung der Adrenostatika mittels des MTT-Tests	59
3.2.3	Wirkung der Adrenostatika auf an der Zellproliferation beteiligte Signaltransduktionsprozesse	60
4	DISKUSSION	63
4.1	Steroidogenese	63
4.1.1	Effekte von ETO, MTO, IMTO und FETO auf die Regulation der P450-Enzyme, StAR- und ACTH-R-Expression	63
4.2	Effekte der Adrenostatika auf das Wachstumsverhalten	68
4.3	Etomidat und seine Derivate als Tracer in der adrenalen Bildgebung	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	72

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae/Arterien
ACC	adrenokortikales Karzinom bzw. Nebennierenrindenzarzinom
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon bzw. Adrenocorticotropin
ACTH-R bzw. MC2R	ACTH-Rezeptor
1-24 ACTH	Synacthen
AHRQ	The Agency for Healthcare Research and Quality
AI	adrenales Inzidentalom
Ang II	Angiotensin II
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
CA2+	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
C-Atom	Kohlenstoffatom
CBG	Corticosteroid-binding globulin
Cl-	Chlorid
CREB	cAMP response-element binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CT	Computertomographie
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
dNTP	Deoxyribonucleosidtriphosphate
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm

ERK	Extrazellular signal-regulated kinase
ETO	Etomidat
FCS	fetales Rinderserum
18F-FDG	[¹⁸ F]-Fluorodeoxyglucose
FETO	Fluoretomidat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FSK	Forskolin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GATA-4	GATA binding protein 4
GR	Glukokortikoidrezeptoren
HC	Hydrocortison
HDL	High-density Lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse
HRP	Horse Radisch peroxidase bzw. Meerrettichperoxidase
3β-HSD	3-β-Hydroxysteroiddehydrogenase
HU	Hounsfield Units
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF-I/II	Insulin-like growth factor 1 bzw. 2
IL	Interleukine
IMTO	Jodmetomidat
IP 3	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Kalium
LDL	Low-density Lipoprotein
LH	Luteinsierendes Hormon
LIF	Leukemia inhibitor factor
LOH	Loss of heterozygosity
11p15LOH	Loss of heterozygosity am Locus 11p15
LXR-α	Liver X receptor alpha Transcriptionsfaktor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK-Kinase

MKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphate 1
MRT	Magnetresonanztomographie bzw. Kernspintomographie
MTO	Metomidat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCI-h295	humane Nebennierenkarzinomzelllinie 295
NCI-h295-R	adhärente NCI-h295-Zellen
NCI-h295-S	Suspensionszellen der NCI-h295
NIH	National Institutes of Health Sciences, USA
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NN	Nebenniere
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
NP-59	[¹³⁵ I]-Iodomethyl-Norcholesterol
OH	Sauerstoffgruppe
p39MAPK	P38-mitogen-activated protein kinase
P450scc	P450 side chain cleavage
PBS-Tween	Phosphatgepufferte Salzlösung-Tween-Gemisch
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PG	Propylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Passive Lysis buffer
POMC	Proopiomelanocortin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Riverse Transkriptase

S.D.	Standardabweichung
SAGH	subklinische autonome Glukokortikoidhypersekretion
SAPK	Stress-activated phospho kinase
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SF-1	Steroidgenic factor-1
StAR	Steroid acute regulatory protein
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TMF	Testicular macrophage derived factor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNM-Klassifikation	Tumor-Lymphknoten-Metastasen Klassifikation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Nebenniere und ihre Regulation

Die paarigen Nebennieren sitzen retroperitoneal den oberen Polen der Nieren auf. Sie werden von der Fettkapsel der Niere umschlossen und von den Aa. suprarenales superiores aus den Aa. phrenicae inferiores, Aa. suprarenales mediales aus der Aorta und den Aa. suprarenales inferiores aus den Aa. renales versorgt (1).

Die Nebennieren bestehen aus zwei verschiedenen Anteilen mit unterschiedlicher Entstehung, Funktion und Struktur: dem Nebennierenmark (NNM) und der Nebennierenrinde (NNR).

Die Nebenniere gehört zu den endokrinen Drüsen und ist durch die Sekretion von Steroidhormonen und Katecholaminen an der Regulation vieler Stoffwechselprozesse beteiligt und produziert lebenswichtige Hormone (1, 2).

Die NNR ist mesodermalen Ursprungs. Sie macht mehr als 90% des gesamten Organs aus und umgibt das Nebennierenmark. Beim Erwachsenen wird sie in drei verschiedene Schichten aufgeteilt, die sich sowohl in ihrer endokrinen Funktion als auch in ihrer Gewebearbeit unterscheiden. Während der fetalen Entwicklungsphase ist noch eine zusätzliche vierte bzw. fetale Schicht vorhanden. Die Zona glomerulosa liegt subkapsulär und macht 10-15% des Gewebevolumens der NNR aus. Diese äußere Schicht synthetisiert und sezerniert vor allem Mineralokortikoide. Aldosteron ist beim Menschen der wichtigste Vertreter der Mineralokortikoide. Die mittlere Schicht (Zona fasciculata) macht ca. 80% des Gewebevolumens der NNR aus. Die Zona fasciculata synthetisiert hauptsächlich Glukokortikoide mit Kortisol als Hauptvertreter und zu einem geringen Anteil Androgene. Die marknahe Zona reticularis macht 5-10% des Gewebevolumens der NNR aus und ist Hauptursprungsort der Androgenvorläufer. Hier werden vor allem Dehydroepiandrosteron [DHEA] und Androstendion als Ausgangssubstanzen für Sexualhormone in andere Gewebe exportiert. Zudem werden zu einem weit geringeren Anteil Glukokortikoide synthetisiert (3).

Die Zonae fasciculata und reticularis werden als funktionelle Einheit angesehen. Beiden ist die Glukokortikoid- und Androgenproduktion gemeinsam (4). Die Zona fasciculata dient hierbei der Akutreaktion mit schnell erhöhter Cortisolproduktion auf ACTH

[Adrenocorticotropes Hormon]-Stimulation, wohingegen die Zellen der Zona reticularis für den Erhalt der basalen Glukokortikoidsekretion verantwortlich gemacht werden (4, 5). Die Regulation der Aldosteronsekretion erfolgt über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System [RAAS]. Dieses Regulationssystem ist von der ACTH-Stimulation weitgehend unabhängig. Die Regulation der Zonae fasciculata und reticularis erfolgt entlang der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [HPA-Achse] (3).

Das Nebennierenmark ist ein Abkömmling der Sympathikuszellen und entsteht aus dem Neuroektoderm. Die Neuroblasten differenzieren im NNM zu chromaffinen bzw. phäochromen Zellen, Ganglienzellen und zu extraadrenalen paraganglionären Zellen. In den chromaffinen Zellen werden aus L-Tyrosin sowohl Adrenalin (zu ca. 80%) als auch Noradrenalin (zu ca. 20%) gebildet und bei Bedarf direkt an das Blut abgegeben (3).

Die Regulation der Hormonbiosynthese in der Nebenniere ist sehr komplex und ist bis dato nur teilweise verstanden. Der Hauptregulator im Regelkreis der adrenalen Glukokortikoidsynthese ist das aus dem Hypophysenvorderlappen [HVL] stammende ACTH. Seine Wirkung wird über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, den ACTH-Rezeptor bzw. Melanocortin-2-[MC2]-Rezeptor, vermittelt (6-8). Durch die Interaktion mit dem MC2R wird ein ACTH-induzierter cAMP-[cyclisches Adenosinmonophosphat]-Anstieg beobachtet, der mit einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A [PKA] mit nachfolgend erhöhter steroidogener Gentranskriptionsrate einhergeht (9). Die Regulation der ACTH-Sekretion erfolgt durch den Hypothalamus vor allem durch das Corticotropin-Releasing Hormon [CRH]. Weitere Substanzen wie atriales natriuretisches Peptid [ANP] (10), Oxytocin (11), Epinephrin, Angiotensin II [AngII] (12), vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) (13-15), Zytokine (16) und Glukokortikoide selbst wie auch Stress weisen ebenfalls teils stimulierende teils hemmende Effekte auf die ACTH-Sekretion auf.

ACTH ist ein unverzweigtes Peptidhormon aus 39 Aminosäuren und ist Bestandteil des größeren Vorläufermoleküls POMC [Proopiomelanocortin], aus dem die Hormone β -Lipotropin, β -Endorphin, β -Melanotropin sowie ACTH enzymatisch abgespalten werden (3). In der Nebenniere wirkt ACTH vor allem stimulierend auf die adrenale Steroidbiosynthese bzw. -sekretion, RNA [Ribonukleinsäure]- und Proteinsynthese. Desweiteren ist eine ACTH-Stimulation mit einer Größenzunahme der Nebenniere

assoziiert. Die Größenzunahme scheint eher auf einer Hypertrophie der Zellen als auf einer erhöhten Mitoserate der Zellen zu basieren (17). Einige Studien wiesen ACTH zudem eine antimitogene bzw. antiproliferative Eigenschaft zu (18-21). Demnach sind andere POMC-Abkömmlinge für das adrenale Wachstum verantwortlich (17, 20, 22, 23). In einer Arbeit von *Fassnacht et al.* (22) konnte das humane 1-28 N-terminale POMC [N-POMC] als mitogener Faktor des adrenalen Wachstums dargestellt werden. Ferner führte N-POMC zur Inhibition der adrenalen Steroidbiosynthese. Aufgrund ihrer entgegengesetzten Wirkung sind N-POMC und ACTH an der Regulation des Wachstums und der Steroidbiosynthese der Nebenniere beteiligt(22).

Die Hormonbiosynthese in steroidogenen Zellen wird v.a. durch die ACTH-induzierte Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges reguliert (24, 25). Infolge der aktivierten PKA wird die Phosphorylierung zahlreicher Proteine (wie die Cholesterolester-Hydrolase) wie auch Transkriptionsfaktoren (wie *steroidogenic factor-1* [SF-1], GATA-4 [*GATA binding protein 4*] und *cAMP response-element binding protein* [CREB]) aktiviert, die wiederum die Induktion an der Steroidbiosynthese beteiligter Gene inklusive dem steroid acute regulatory [StAR] - Gen zur Folge hat (26-28). Die Korrelation zwischen gewebespezifischer Expression des StAR-Gens und der Fähigkeit der Hormonproduktion indiziert die spezifische Rolle des StAR-Proteins in der Steroidbiosynthese (27, 29). Eine Inhibition der StAR-Proteinexpression auf transkriptionaler bzw. translationaler Ebene führt zu einer dramatischen Reduktion der Hormonsynthese (30). In ca. 10-15% d. F. wird die Hormonsynthese durch StAR-unabhängige Mechanismen vermittelt (31, 32).

In der Literatur existieren zahlreiche Hinweise auf andere Signalwege, die an der Regulation der adrenalen Steroidbiosynthese beteiligt sind. In manchen Fällen agieren diese Kaskaden cAMP/PKA-unabhängig (33) und in anderen Fällen besitzen sie einen synergetischen Effekt zur PKA. Allen ist die Regulation der Steroidhormonbiosynthese und z.T. der StAR-Proteinexpression gemeinsam. Allerdings im Vergleich zur cAMP/PKA-Antwort wird durch die cAMP-unabhängige Induktion weniger als 1% der PKA-induzierten Steroidbiosynthese erreicht (34).

Zahlreiche Studien demonstrierten, dass einige Wachstumsfaktoren - besonders *basic fibroblast growth factor* [bFGF], *epidermal growth factor* [EGF], *transforming growth factor- β 1* [TGF- β 1] wie auch *insulin-like growth factor-1 / -2* [IGF-I/II] - in der intraadrenalen Regulierung von Mitogenese und Steroidgenese wie auch StAR-Expression in murinen Leydig-Zellen (35, 36) und adrenocorticalen Zellen (26, 37-39) beteiligt sind.

Hierbei vermitteln EGF und IGF-1 ihre stimulierende Wirkung über den *mitogen-activated protein kinase* [MAPK] / *extracellular signal-regulated kinase* [ERK]-Signalweg. Bereits in früheren Studien wurde die Beteiligung dieser MAPK/ERK-Kaskade in der Steroidbiosynthese und StAR-Expression dargestellt (26, 40-43). TGF- β 1 hingegen wirkt proliferationshemmend (44).

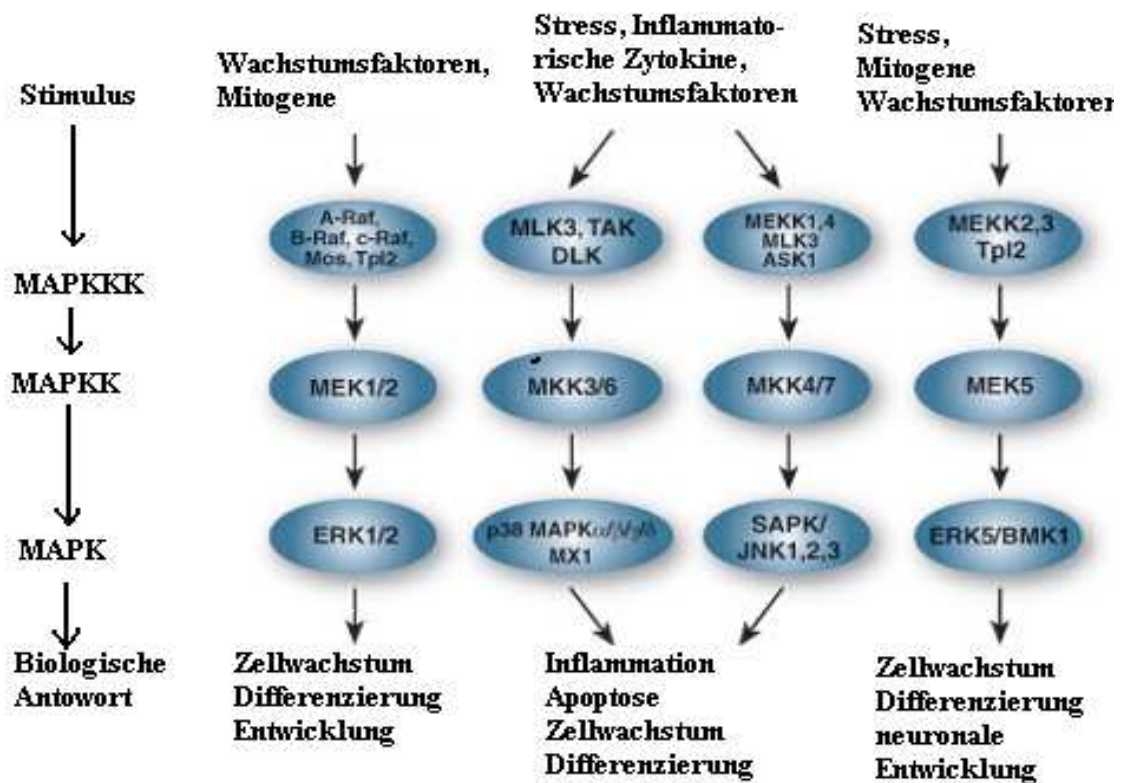
In jüngsten Untersuchungen zeigte sich, dass der Proteinkinase-C [PKC]-Signalweg eine wesentliche Rolle in der IGF-1 vermittelten StAR-Expression und Hormonsynthese spielt.

Die PKC kann sowohl hemmende (45) als auch stimulierende (oder keine) Wirkungen auf die Steroidbiosynthese aufweisen (26, 34).

Zudem aktiviert die induzierte PKC eine nachgeschaltete MAPK-Kinase [MEK]/ERK1/2-Kaskade mit Folge der Phosphorylierung von CREB und einer verminderten Expression von DAX-1 [*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X-chromosome, gene-1*] (34). DAX-1 ist ein genereller Repressor der adrenalen Steroidbiosynthese durch die Inhibition der SF-1-abhängigen Expression multipler steroidogener Enzyme (46). Durch die Beteiligung an der Genexpression von StAR und durch die verminderte DAX-1-Proteinexpression coreguliert der PKC-Signalweg demnach die intraadrenale Steroidogenese (47, 48).

Abbildung 1:

Übersicht des MAPK-Signaltransduktionsweg (49)



Übersicht über die 3 Hauptwege der MAPK-Kaskade ERK, p38 und JNK. Die Aktivierung erfolgt über eine Kaskade einzelner Kinasen im Schneeballsystem und führt über Phosphorylierungen zur Zellantwort.

Weitere Studien belegen die Interaktion zwischen Immunsystem und Nebenniere. Zahlreiche Zytokine wirken auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, indem sie die Sekretion von CRH bzw. ACTH oder die adrenale Funktion direkt beeinflussen.

Testicular macrophage derived factors [TMFs], Interleukine IL-1, -3 und -6 und das proinflammatorische Zytokin *leukemia inhibitor factor* [LIF] zeigten stimulierende Effekte auf die adrenale Steroidbiosynthese (26, 50-52). *Tumor necrosis factor α* [TNF- α] hatte sowohl stimulierende wie auch hemmende Wirkungen. Auf hypothalamisch-hypophysärer Ebene ist TNF- α ein potenter Induktor der ACTH-Sekretion, auf

adrenaler Ebene hingegen hemmt TNF- α die ACTH-induzierte Steroidbiosynthese und IGF-II-Expression (38, 50).

Ferner wird die Beteiligung von Elektrolyten wie Chlorid [Cl⁻], Calcium [Ca²⁺] und Kalium [K⁺] in der intraadrenalen Steroidogenese gonadaler und adrenaler Zellen beschrieben. In steroidogenen Zellen wird eine Alteration intrazellulärer cAMP- und Ca²⁺-Konzentrationen beobachtet. Die Bedeutung des mitochondrialen Ca²⁺ in der Angiotensin-II [AngII]- bzw. K⁺-stimulierten Steroidbiosynthese wurde bereits in bovinen adrenalen Glomerulosazellen demonstriert. Die AngII-induzierte Stimulation ging mit einer Aktivierung der Phospholipase C einher mit Folge der Inositoltriphosphat [IP₃]-Freisetzung und Mobilisation von Ca²⁺ (53).

Ähnlich dem Ca²⁺ wird K⁺ als ein wichtiger physiologischer Regulator adrenaler Steroidbiosynthese betrachtet. Zum einen wirkt K⁺ in der AngII-induzierten Aldosteronsekretion mit, zum anderen ist eine durch K⁺ bedingte Depolarisation mit Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle und somit erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration assoziiert (26).

In einer Arbeit von *Choi et al.* (54) konnte ebenfalls durch eine Mutation des Kalium (K⁽⁺⁾)-Kanal, KCNJ5, eine gesteigerte Aldosteronproduktion und Zellproliferation beschrieben werden. Durch die Mutation des Kaliumkanals kam es zu einer gesteigerten Natrium [Na⁺]-Leitfähigkeit sowie vermehrten Zelldepolarisierung, welche wiederum mit einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration einherging. Infolge dieser kam es zur gesteigerten Aldosteronproduktion und Zellproliferation.

Zusammenfassend wird anhand der oben dargestellten Studien die wesentliche Rolle multipler Signalwege in der intraadrenalen Regulation demonstriert. Obwohl sehr komplex vom Verständnis, ist die Interaktion dieser Signalwege in der Regulation der Steroidbiosynthese und meist auch in der Induktion bzw. Inhibition der steroidogenen Schlüsselproteine wie der StAR-Expression von essentieller Bedeutung.

1.2 Biosynthese der Steroidhormone

In der adrenalen Steroidbiosynthese wird das Ausgangsmolekül Cholesterin enzymatisch in die 3 Steroidklassen Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Androgene umgewandelt (55). Cholesterin entsteht v.a. in der Leber über mehrere Zwischenstufen aus Acetyl-Coenzym A [Acetyl-CoA] und wird durch Lipoproteine im Blut zu den endokrinen Drüsen transportiert. Die Nebenniere kann das Cholesterin über Low-density-Lipoprotein [LDL]-Rezeptoren (ca. 80% des Cholesterins) aufnehmen oder de novo (ca. 20% des Cholesterins) synthetisieren. In neueren Studien wird demonstriert, dass die Cholesterinaufnahme zusätzlich über High-density-Lipoprotein [HDL]-Rezeptoren erfolgt (56). Die Steroidhormone werden nur in geringer Menge an ihren jeweiligen Produktionsorten (NNR, Ovar, Hoden, Plazenta) gespeichert, sodass sie bei Bedarf zuerst aus dem zellulären Cholesterinvorrat hergestellt werden müssen.

Cholesterin enthält 27 Kohlenstoff [C]-Atome. Über mehrere Zwischenstufen entsteht die Ausgangssubstanz der Steroidhormone, Pregnenolon mit 21 C-Atomen. Aus Pregnenolon wird Progesteron enzymatisch gebildet, das selbst ein wirksames Hormon ist und zum anderen als Vorläufer weiterer Steroidhormone dient: 1. die Hormone der NNR mit 21 C-Atomen (Endprodukt: Cortisol und Aldosteron), 2. die männlichen Sexualhormone (Androgene) mit 19 C-Atomen im Hoden, im Ovar und in der NNR (Endprodukt: Testosteron und Dihydrotestosteron) und 3. weitere weibliche Sexualhormone (Östrogene) mit 18 C-Atomen im Ovar (Endprodukt: Östradiol). Hierbei ist die Steroidbiosynthese einerseits von den vorhandenen Rezeptoren für die übergeordneten Steuerhormone (ACTH, FSH, LH, AngII etc.) und andererseits von der Dominanz der einzelnen Enzyme für die Veränderung des Steroidmolekülgerüsts in der jeweiligen Hormondrüsenzelle abhängig (57).

Für die Biosynthese der Steroidhormone werden sechs verschiedene Cytochrom P450-Enzyme und zwei Hydroxysteroid-Dehydrogenasen in den verschiedenen endokrinen Geweben benötigt (58). Die P450-Enzyme sind Monooxygenasen, die sowohl in der mitochondrialen Membran (P450_{scc}, P450_{c11}) als auch im endoplasmatischen Retikulum (P450_{c17}, P450_{c21}) lokalisiert sind. Sie katalysieren positions- und substratspezifische Hydroxylierungsschritte wie auch oxidative Spaltungen von

C-C-Bindungen. Die NNR enthält 17-, 21- und 11-Hydroxylasen, die eine OH-Gruppe am entsprechenden C-Atom des Steroids einführen (57). Als einziges Enzym der Steroidbiosynthesekette ist die 3- β -Hydroxysteroiddehydrogenase [3 β -HSD] der P450-Familie nicht zugehörig. Dieser Enzymkomplex ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (59).

Bis dato sind zwei geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Steroidbiosynthese bekannt: zum einem die *de novo*-Synthese von StAR-Protein und zum anderen die Transkription der steroidogenen Gene der P450-Enzyme. Beiden ist die Regulation durch ACTH gemeinsam. Zudem regt ACTH die Interaktion von Cholesterin mit dem P450_{scc} [side-chain cleavage]-Enzym an. StAR dient als Transportprotein und ermöglicht hierbei den Cholesteroltransfer von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran. Hier ist der P450_{scc}-Enzymkomplex lokalisiert, der den ersten limitierenden Schritt der Steroidbiosynthese von Cholesterin zu Pregnenolon katalysiert (60, 61). Im Folgenden werden die einzelnen enzymatischen Schritte der Steroidbiosynthese von Cortisol, Dehydroepiandrosteron [DHEA], Androstendion und Aldosteron genauer dargestellt.

Nach Bindung von ACTH an seinen Rezeptor wird als erster Schritt eine cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert, die eine Cholesterinesterhydrolyse phosphoryliert und damit aktiviert (62). Dadurch wird das in zytosolischen Lipidtröpfchen gespeicherte Cholesterin freigesetzt und gebunden an ein Trägerprotein [*sterol transfer protein*] in das Mitochondrium transportiert, wo der erste Schritt der Steroidbiosynthese stattfindet. Nach C20- und C22-Hydroxylierung wird in den Mitochondrien die Seitenkette am C20 abgespalten, hierdurch entsteht aus dem Cholesterin (27 C-Atomen) das Folgeprodukt Pregnenolon (21 C-Atomen). Katalysiert wird dieses durch das P450_{scc}-Enzym, auch als 20,22-Hydroxylase bzw. 20,22-Desmolase bekannt. Dieses Enzym kommt in allen drei Zonen der NNR vor und ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Nach Transport des Pregnenolons vom Mitochondrium zum glatten endoplasmatischen Retikulum findet der nächste Schritt der Cortisol- bzw. Aldosteronsynthese statt. Hier wird Pregnenolon entweder zu Progesteron oder zu 17 α -Hydroxypregnenolon konvertiert (56). Die Dehydrogenierung von Pregnenolon zu Progesteron wird durch die 3 β -HSD [Hydroxysteroiddehydrogenase] reguliert. Nach drei weiteren subsequenten Hydroxylierungen an den C-Atomen 17, 21 und 11 entstehen aus Progesteron die

Mineralkortikoide Corticosteron und schließlich Aldosteron. Parallel hierzu wird 17 α -Hydroxypregnenolon zu Cortisol konvertiert. Ferner können unter Umgehung des Progesterons Glukokortikoide und 17-Ketosteroide aus 17- α -OH-Pregnenolon gebildet werden (57). Die letzten enzymatischen Schritte am C11-Atom werden durch den P450c11-Enzymkomplex aus 11-beta-Hydroxylase, 18-Hydroxylase und 18-Aldehyd-Synthethase katalysiert, welcher in der inneren Mitochondrienmembran der *Zonae fasciculata und reticularis* lokalisiert ist.

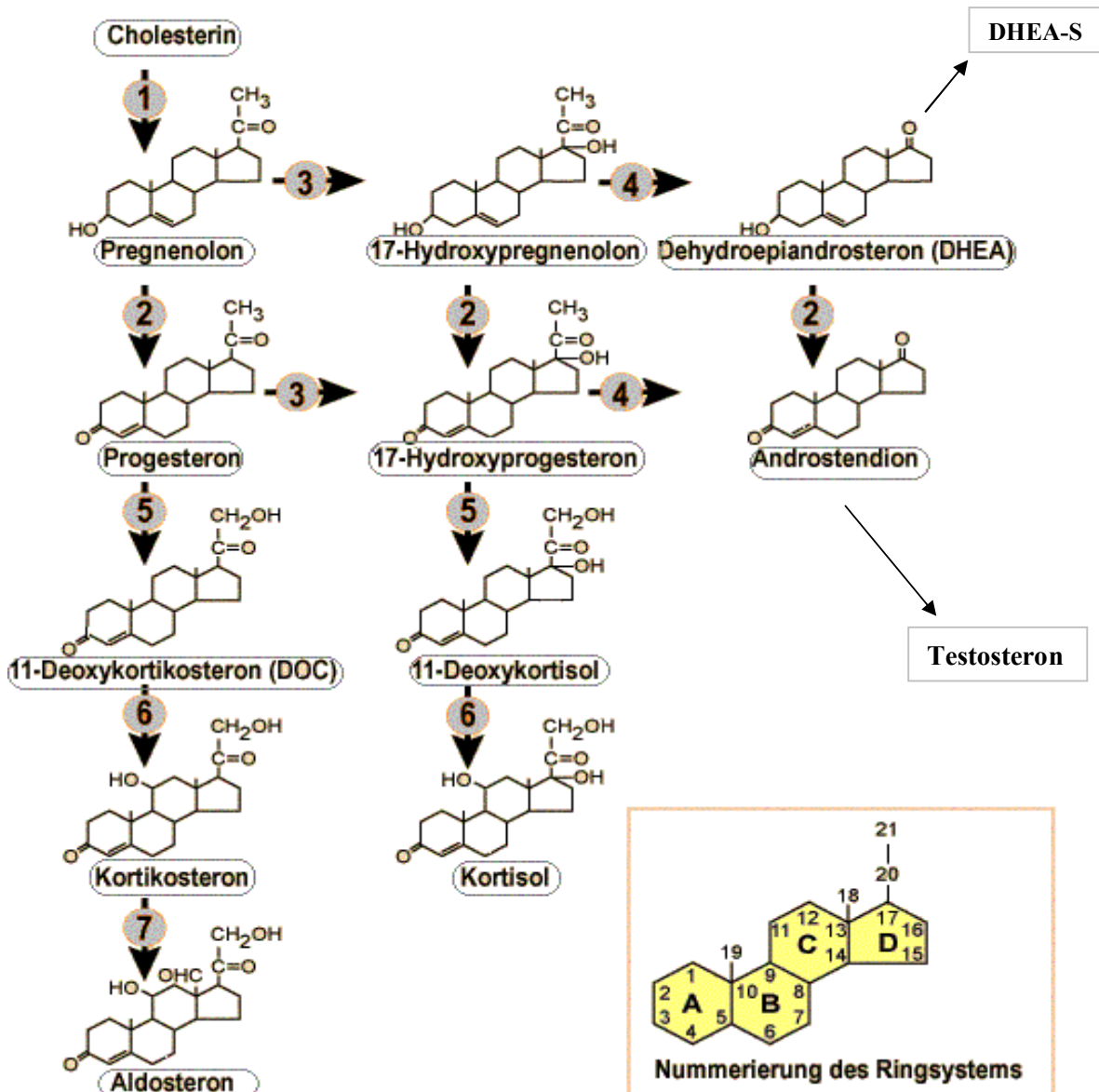
Für die Cortisol-und Androgensynthese ist eine C-17 Hydroxylierung des Pregnenolon bzw. Progesteron erforderlich (56, 63). Der im glatten endoplasmatischen Retikulum der Zellen der *Zonae fasciculata und reticularis* vorkommende p450c17-Enzymkomplex aus 17-Hydroxylase und 17,20-Desmolase katalysiert diese Reaktion. Durch die nachfolgende Abspaltung der C-C-Seitenkette am C17-Atom entsteht DHEA. Androstendion entsteht durch die anschließende Katalysierung der 3- β -HSD aus DHEA. Somit ist die Androgensynthese in der NNR abgeschlossen. Erst im peripheren Gewebe erfolgt die Konversion von Androstendion zu Testosteron (63).

Der weitaus größere Anteil der Androgene, vor allem Testosteron als wirksamstes Androgen, wird aber in den Leydig-Zellen des Hodens bzw. in den interstitiellen Theka- und Hiluszellen des Ovarialstromas gebildet (3).

Im Gegensatz zur Androgenproduktion wird für die Synthese von Cortisol neben der C17-Hydroxylierung von Pregnenolon auch die Hydroxylierungsschritte an den C-Atomen 21 und 11 benötigt (56). Durch das P450c21-Enzym wird das Progesteron in Richtung Aldosteron und das 17-OH-Progesteron in Richtung Cortisol hydroxyliert. Die p450c21-Hydroxylase ist ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum der Zellen der *Zonae fasciculata und glomerulosa* lokalisiert (63).

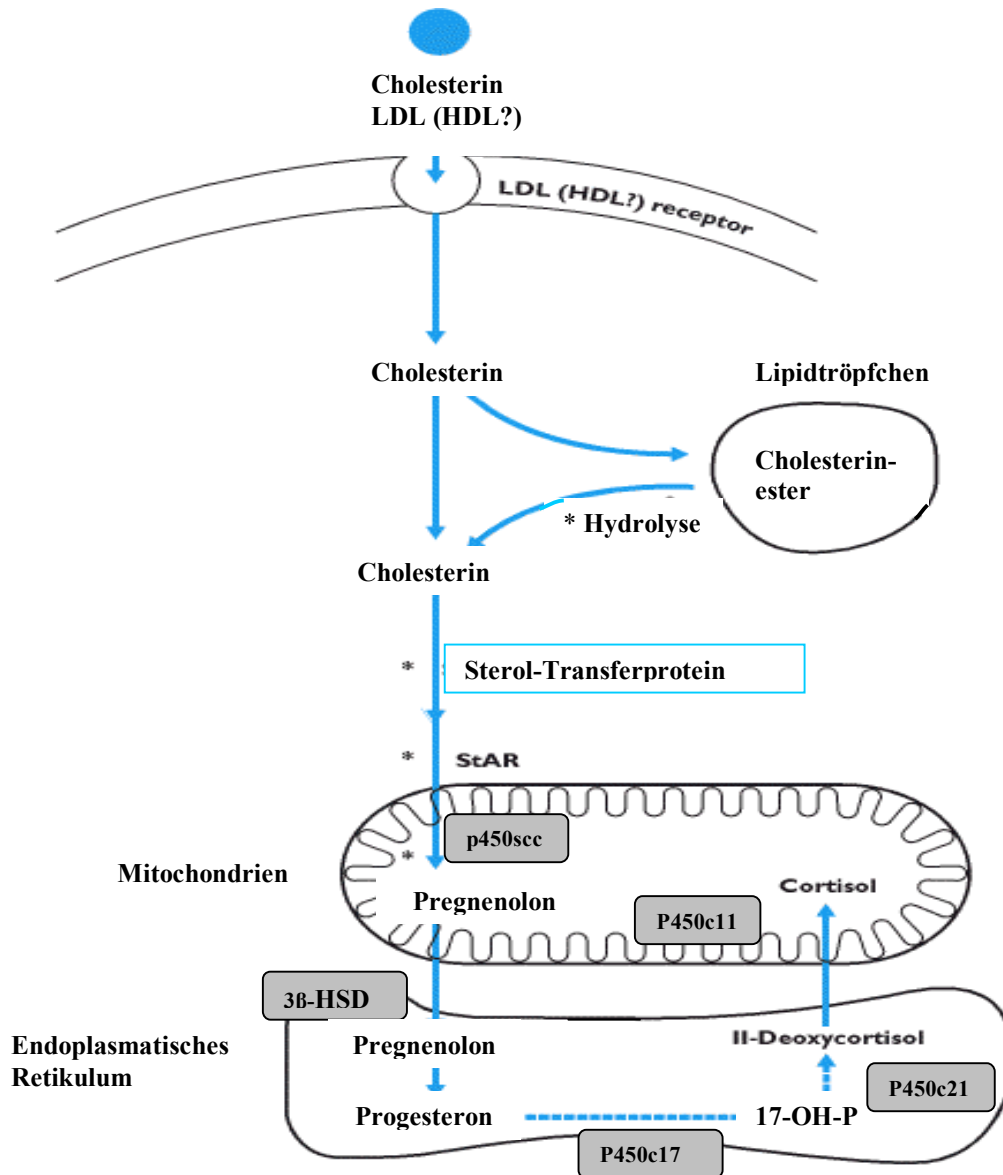
Eine Übersicht über die adrenale Steroidbiosynthese und die Lokalisation der einzelnen Steroidbiosyntheseenzyme geben Abbildung 2 und 3.

Abbildung 2: Übersicht über die adrenale Steroidbiosynthese (64)



- ① **P450_{sc}**: 20,22-Hydroxylase bzw. 20,22-Desmolase [CYP11A1]
- ② **3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase** (Δ^4 - Δ^5 -Isomerase)
- ③ **P450_{c17}**: 17-Hydroxylase [CYP17]
- ④ **P450_{c17}**: 17,20-Desmolase [CYP17]
- ⑤ **P450_{c21}**: 21-Hydroxylase [CYP21]
- ⑥ **P450_{c11}**: 11 β -Hydroxylase [CYP11B1]
- ⑦ **P450_{c11}**: 18-Hydroxylase und 18-Oxidase \rightarrow Aldosteron-Synthase [CYP11B2]

Abbildung 3: Halbschematische Darstellung des Cholesterintransfers und der Lokalisation der Steroidbiosyntheseenzyme (56)



* Regulation durch ACTH

Der erste Schritt in der Steroidbiosynthese ist die Hydrolyse von Cholesterinestern und der aktive Transfer von freiem Cholesterin zur äußeren Mitochondrienmembran durch ein Sterol-Transferprotein. Mittels des StAR wird das lipophile Cholesterin anschließend zur inneren Mitochondrienmembran transportiert, wo die ersten enzymatischen Prozesse stattfinden. An der Steroidbiosynthese sind mehrere P450-Enzyme beteiligt, die zum einem in den Mitochondrien zum anderen im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

1.2.1 Mineralokortikoide

Das wichtigste Mineralokortikoid ist das Aldosteron (65). Aldosteron wirkt vor allem auf die Niere. Es reguliert den Elektrolyt- und Wasserhaushalt im Körper. Das Hormon bewirkt Retention von Natrium, Exkretion von Kalium (durch Stimulation des Natrium-Kalium-Austausches im distalen Nierentubulus) und damit Erhöhung des Blutdrucks und Expansion der Extrazellulärflüssigkeit durch Wasserretention (65). So hat Aldosteron auch Einfluss auf die Regulation des Blutvolumens und des Blutdrucks. Ähnlich wirkt Aldosteron auf den Wasser- und Ionentransport im Darm sowie in Schweiß- und Speicheldrüsen.

Aldosteron wird vor allem vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Kaliumspiegel reguliert. Im Gegensatz zu den Glukokortikoiden spielt die Stimulierung durch ACTH eine untergeordnete Rolle (55, 66).

1.2.2 Glukokortikoide

Glukokortikoide wirken regulierend auf den Fett- Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel (67). Diese Reaktion ist bei der Bewältigung von Stresssituationen besonders wichtig. Deshalb werden Glukokortikoide auch oft als Stresshormone bezeichnet (67).

Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Cortisol (68). Die Cortisolsekretion unterliegt einem typischen Tagesrhythmus. Die Glukokortikoide besitzen ihren maximalen Blutspiegel zwischen 6 und 9 Uhr und ihren Minimalspiegel gegen Mitternacht (→ 24-Stunden-Rhythmus) (57, 59).

Im Blut bindet Cortisol zu 80% an ein spezifisches Transportprotein, das *corticosteroid-binding globulin* [CBG bzw. Transcortin], und zu 20% an Albumin (56). Transcortin weist eine hohe Affinität für Glukokortikoide auf. CBG-gebundenes Cortisol diffundiert in die Zielzelle und bindet dort an spezifische, im Cytosol lokalisierte Glukokortikoidrezeptoren (GRs). Diese Cortisol-GR-Interaktion induziert subsequeente Phosphorylierungen am GR, so dass die Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern ermöglicht wird. Im Nukleus werden nun Transkriptionsprozesse und damit die einhergehende Proteinsynthese initiiert (56).

Cortisol hemmt die Proteinsynthese, bewirkt einen Anstieg der freien Fettsäuren im Blut durch Stimulation der Lipolyse und stimuliert die Glukoneogenese in der Leber durch Mobilisation von Glykogen und Aminosäuren aus Knochen, Muskeln und Bindegewebe. Ferner hemmt Cortisol die antibakterielle Wirkungen von Phagozyten und Immunsystem sowie die endotheliale Adhäsion und Diapedese von T-Lymphozyten. Durch diese Hemmung wirkt Cortisol antientzündlich und antiallergisch. Zudem hat eine Hemmung der Entwicklung von Epithel und Bindegewebe eine verlangsamte Wundheilung und somit Förderung der Ulcuseinstellung zur Folge (3, 56, 57).

Die Hormonkonzentration der Glukokortikoide unterliegt der Kontrolle des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises sowie dem zirkadianen Rhythmus (24-Stunden-Rhythmus) (57, 59). Nimmt die Konzentration des freien Cortisols ab, wird im Hypothalamus das Corticotropin-Releasing-Hormon ausgeschüttet, welches über das venöse Pfortadersystem zum Hypophysenvorderlappen gelangt. Im HVL bewirkt das CRH die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons. ACTH führt zur gesteigerten Ausschüttung der Glukokortikoide. Die Ausschüttung von CRH und ACTH erfolgt pulsatil (69). Die peripheren Glukokortikoide wirken hemmend sowohl auf das ACTH als auch auf das CRH (doppeltes negatives Feedback).

1.2.3 Adrenale Androgene

Androgene werden in der Nebenniere in reichlichem Ausmaß synthetisiert, insbesondere die Androgenvorläufer DHEA und sein Sulfat DHEA-S sowie Androstendion (56, 57). Bei der Frau tragen sie zu weit mehr als 50% zum Gesamtandrogenpool bei. Der verbleibende Rest wird ovariell produziert. Beim Mann spielen die adrenalen Androgene im Vergleich zu den in den Leydig-Zellen des Hodens produzierten Androgenen, v.a. Testosteron, eine geringere Rolle. Ihre biologische Aktivität macht nur 20% der Gesamtandrogene aus (55).

Die Androgenvorläufer DHEA und Androstendion binden selbst nicht an den Androgenrezeptor. DHEA bindet direkt an zentrale GABA- [γ -Aminobuttersäure] sowie NMDA-[N-Methyl-D-Aspartat] und Sigmarezeptoren und vermittelt hierdurch neurosteroidale Wirkungen. Durch Konversion in die aktiven Androgene wirkt DHEA nur indirekt androgen (70).

Androgene sind anabol wirksam. Sie beschleunigen den Aufbau von körpereigenem Eiweiß, d.h. sie fördern das Knochen- und Muskelwachstum (67). Sie wirken ebenfalls als schwach wirksame männliche Sexualhormone. Der Grund dafür ist, dass sie enzymatisch sowohl in Testosteron als auch in Östron und Östradiol, Vorstufen von Östrogen, umgewandelt werden (57). Beide Hormone kommen bei Mann und Frau vor. Die Androgene sind geschlechtsspezifisch wirksam, indem sie die Geschlechtsdifferenzierung der männlichen Fortpflanzungsorgane fördern. Sie bewirken eine Verstärkung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale wie z.B. Bartwuchs, Körperbehaarung und Stimmbruch. Die Steuerung der NNR-Androgene erfolgt über ACTH (55).

1.3 Neoplasien der Nebennierenrinde

1.3.1 Adrenale Inzidentalome (AI)

Seit der Einführung der Computertomographie (CT) in den frühen 80er Jahren werden NN-Raumforderungen in ungefähr 5% der CT-Untersuchungen des Abdomens (71, 72) sowie in 8,7% der Autopsien (73) als Zufallsbefund entdeckt. Dabei kann es sich um endokrin aktive und inaktive Adenome bzw. Karzinome, Phäochromozytome, Zysten, Lipome oder Metastasen handeln (74) (s. Tabelle 1).

Die meisten Läsionen haben keine klinische Bedeutung, müssen jedoch von denen unterschieden werden, die operativ reseziert werden sollten (v.a. das NNR-Karzinom).

Vor 20 Jahren beschrieben *Geelhoed et al.* (75) erstmals die Neuentdeckung dieser sogenannten adrenalen Inzidentalome [AI].

In der Arbeit von *Kloos et al.* wurde eine ansteigende Prävalenz von Nebenniereninzidentalomen von 3 auf 10% bei älteren Menschen gezeigt (76). Mit der zunehmenden Alterung der Bevölkerung hat die Therapie des klinisch unscheinbaren adrenalen Inzidentaloms demnach eine gesteigerte Bedeutung im Gesundheitswesen. Das diagnostische Vorgehen ist nicht immer eindeutig. Es gibt einige Merkmale in der Bildgebung, die für ein benignes Adenom sprechen wie zum Beispiel der Nachweis

eines hohen Fettgehaltes anhand der Dichtewerte bzw. Hounsfield-Units [HU] und ein rasches „wash-out“ nach Kontrastmittel-Gabe (77).

Die regelrechte Abklärung und Behandlung der Inzidentalome wird kontrovers diskutiert, insbesondere bei milder endokriner Aktivität.

Entsprechend der Einteilung von *Mansmann et al.* werden Nebenniereninzidentalome nach ihrer Dignität (Benignität vs. Malignität), ihrer endokrinen Aktivität und ihres zellulären Ursprungs unterschieden (78).

Die gängige funktionelle Abklärung umfasst die Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus, des Hypercortisolismus und des Phäochromozytoms. Eine Hypersezernierung von Glukokortikoiden, Mineralkortikoiden, Androgenen und Katecholaminen kann mit klinischen Symptomen einhergehen, die mit einer erhöhten Morbidität bzw. vorzeitigen Mortalität assoziiert sind (78, 79).

Bei klinischen Symptomen wie Hirsutismus und Virilisierung (v.a. bei der Frau) oder bei Verdacht auf das Vorliegen eines Nebennierenkarzinoms werden zusätzlich die Androgene bestimmt (57, 66).

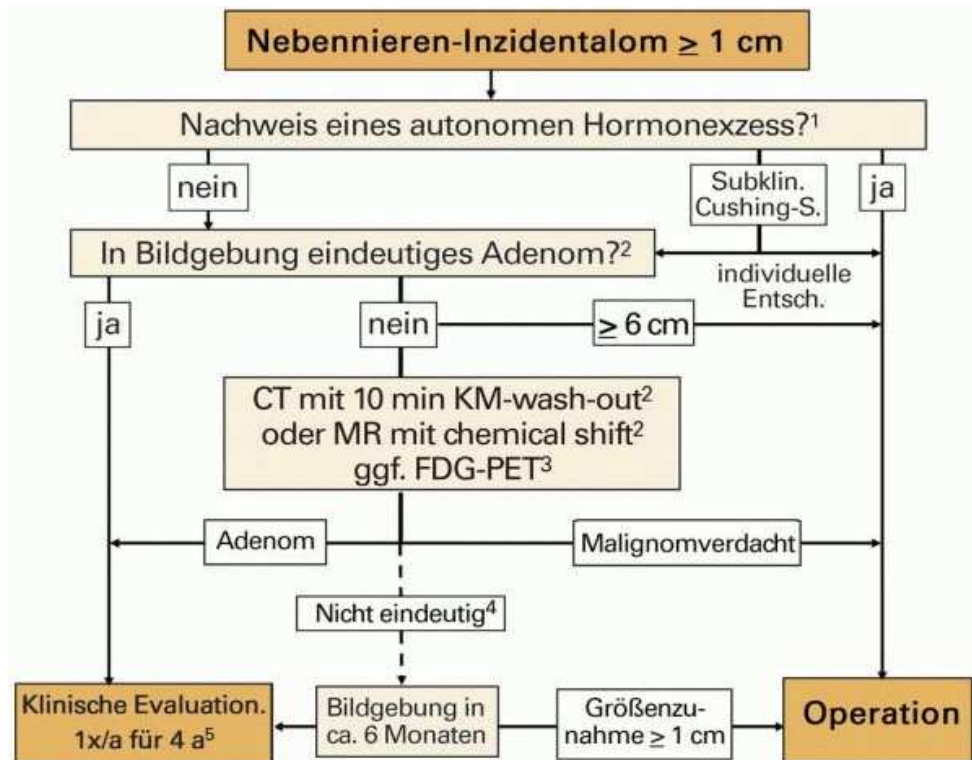
Aufgrund der Komplexität in der Diagnostik und Therapie wurde demzufolge in der Arbeit von *Fassnacht et al.* (80) das klinische Management bei Patienten mit einem Nebennieren-Inzidentalom zusammengefasst (s. Abbildung 4).

Tabelle 1: Differentialdiagnose der adrenalen Inzidentalome nach Aron DC und Kievit J , 2003 (74)

Tumorart	Häufigkeit
Adrenokortikale Tumore	
Adenom*	41 %
Karzinom*	10 %
Noduläre Hyperplasie*	
Adrenomedulläre Tumore	
Phäochromozytom*	8 %
Ganglioneurom/Neuroblastom*	
Andere adrenale Tumore	
Myelolipom	9 %
Metastasen	19 %
Mesenchymale Tumore	
Infektionen, Granulome und Infiltrationen	
Abszess	
Amyloidose	
Pilzerkrankungen, e.g. Histoplasmose, Coccidiomykose, Blastomykose	
TBC und Sarkoidose	
CMV	
Zysten und Pseudozysten	
Parasitär	
Endothelial	
Degeneratives Adenom	
Kongenitale adrenal Hyperplasie*	
Pseudoadrenale Raumforderungen	
Milz-, Pankreas- und Nierenläsionen	
Gefäßläsionen (insbesondere Aneurysmen und Torsionen)	
Technische Artefakte	

* mögliche endokrine Aktivität.

Abbildung 4: Zusammenfassung des klinischen Managements bei Patienten mit Nebennieren-Inzidentalomen nach Fassnacht 2010 (80)



¹ siehe Tabelle 1

² Kriterien für ein Adenom:

- CT nativ: Hounsfield-Units (HU < 10)
- CT mit Kontrastmittel (KM) und "wash-out" nach 10 bzw. 15 min:
 - absoluter KM-wash-out
($= 100 \times [HU_{max}/60'' - HU_{10min}] / [HU_{max}/60'' - HU_{nativ}] > 60\%$)
 - relativer KM-wash-out ($100 \times [HU_{max}/60'' - HU_{10min}] / [HU_{max}/60''] > 40\%$)
- MR: Signalverlust „in opposed phase“ > 30% + niedriges T2-Signal

³ FDG-PET: „standardized uptake value“ (SUV) adrenal/SUV Leber > 1,45 → Verdacht auf Malignom

⁴ bei unklarer Bildgebung sprechen unter anderem folgende Kriterien für ein konservatives Vorgehen:

- Raumforderungen < 3cm
- Hohes Operationsrisiko

⁵ Nur bei klinischen Verdacht bzw. vorbestehendem Glukokortikoid-Exzess gezielte Hormondiagnostik

1.3.2 Nebennierenrindenadenom

Unter den neoplastischen Läsionen sind die NNR-Adenome am häufigsten (→ je nach Patientenkollektiv entsprechen sie ca. 41% der klinisch inapparenten Inzidentalome) (78). NNR-Adenome sind benigne, meist gut abgegrenzte Tumoren. Sie gehen aus den verschiedenen adrenokortikalen Zelltypen hervor. Demgegenüber sind mesenchymale NNR-Tumore selten.

NNR-Adenome kommen in jedem Lebensalter vor, wobei ein Neuauftreten vor dem 30. Lebensjahr eher unwahrscheinlich ist. Die NNR-Adenome sind in 80% der Fälle hormonell inaktiv (81). Bei den endokrin-aktiven Tumoren wird zwischen Cortisol-, Aldosteron- und selten Androgen-produzierenden Tumoren differenziert (82). Auf die zwei häufigsten und klinisch relevantesten NNR-Adenome wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

Der Aldosteron-produzierende Tumor (Aldosteronom oder Conn-Adenom)

Unter den endokrin-aktiven NNR-Adenomen ist der Aldosteron-produzierende Tumor – auch als Aldosteronom bzw. Conn-Adenom bezeichnet – die häufigste Untergruppe (83). Aldosteronome werden bei 1,6 - 3,8 % der Patienten mit einem adrenalen Inzidentalom gefunden. Eine maligne Entartung ist selten (84). Die Klinik ist vor allem durch Hypertonie und Hypokaliämie (i.e. Muskelschwäche, Obstipation, Polyurie und -dipsie, metabolische Alkalose mit Parästhesien und EKG-Veränderungen) geprägt (85). Laborchemisch werden das Kalium im Serum sowie das Verhältnis der Aldosteronkonzentration zur Plasmareninaktivität mittels des Captopril-Hemmtest bestimmt. Nach oraler Gabe von 25 mg Captopril werden die Aldosteronkonzentration und Plasmareninaktivität nach 0 und 120 min gemessen. Eine Aldosteronkonzentration nach 120 min < 150 ng/l sowie ein Plasmareninaktivitäts-Anstieg nach 120 min >150% wird als normal gewertet (86).

Der Cortisol-produzierende Tumor

Eine subklinische autonome Glukokortikoidhypersekretion (SAGH) zeigt sich in 5 – 47 % der Patienten mit einem AI. Die große Spannweite der Prozentzahl ergibt sich aus den verschiedenen Studien (78, 83, 87-91). Das Screening erfolgt primär mittels eines

1 mg Dexamethason-Hemmtests. Eine Cortisol-Serumkonzentration < 1,8 µg/dl am Morgen nach abendlicher Dexamethasoneinnahme wird als normal gewertet (89).

Beim subklinisch Cortisol-produzierenden Tumor fehlen die Symptome eines Cushing-Syndroms (siehe Tabelle 3) weitgehend. Im Laufe der Erkrankung wird selten eine Progression zum klinisch manifesten Cushing-Syndrom beobachtet (89, 92).

Tabelle 2: Ätiologie des nicht-iatrogenen Cushing-Syndroms (Hyperkortisolismus) (55)

ACTH-abhängig (85 %)
hypothalamisch-hypophysäres Adenom (= M. Cushing) 70 % d. F. ektoper ACTH-Sekretion (v.a. paraneoplastisch durch kleinzelliges Bronchialkarzinom) ektoper CRH-Sekretion
ACTH-unabhängig (15 %)
NNR-Adenom 7,5 % d. F. NNR-Karzinom 7,5 % d.F. noduläre adrenale Hyperplasie

Tabelle 3: Symptome des klinisch manifesten Cushing-Syndroms (57)

Klinik	Häufigkeit
Adipositas	88 %
Hypertonie	85 %
Psychische Störungen	80 %
Impotenz, Libidoverlust	80 %
Osteoporose	80 %
Hirsutismus	75 %
Diabetes mellitus/ Glukoseintoleranz	75 %
Hyperlipidämie	75 %
Plethora	70 %
Menstruationsstörungen	70 %
Muskelschwäche	65 %
Striae	50 %
Akne	35 %
Hämatomneigung	35 %

1.3.3 Nebennierenrindenzarzinom (ACC)

Das Nebennierenrindenzarzinom oder adrenokortikales Karzinom [ACC] ist eine sehr seltene maligne Tumorerkrankung des Menschen mit einer jährlichen Inzidenz von 0,7 - 2,0 pro Millionen Einwohner und tritt bei Frauen ca. doppelt so häufig auf wie bei Männern (93-95). Eine bimodale Altersverteilung mit bevorzugtem Auftreten um das 10. und um das 40. - 50. Lebensjahr wird beschrieben (96). Ferner kann das ACC von allen adenombildenden Zelltypen ausgehen. Histologisch wird in ca. 12 % der zufällig entdeckten Inzidentalome ein ACC nachgewiesen; je größer der Tumor desto wahrscheinlicher ist ein Malignom. Bezüglich der Hormonbiosynthese kann das ACC klinisch in einen endokrin-aktiven (ca. 75 % d. F.) und einen endokrin-inaktiven (ca. 25 % d. F.) Tumor unterteilt werden (78). Der Verlauf beim ACC ist sehr variabel. Das ACC weist meist eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von <50 % (97) auf. Beim ACC ist das entscheidende Prognosekriterium das Tumorstadium. Das ACC wird anhand der durch das ENS@T (*European Network for the Study of Adrenal Tumours*) erstellten TNM-[Tumor-Lymphknoten-Metastasen]-Klassifikation eingeteilt (98). Hiernach ist beim Stadium I und II eine lokale Tumorausdehnung mit einer Größe von \leq bzw. \geq 5cm zu sehen. Stadium III beschreibt ein infiltratives Tumorstadium der benachbarten Organe und Stadium IV weist Fernmetastasen auf. In 50 % d. F. wird das ACC erst aufgrund der Metastasen bzw. der abdominalen Beschwerden infolge des lokalen Tumorstadiums diagnostiziert (99, 100).

In jüngsten Studien wurden Fortschritte im Grundverständnis der adrenokortikalen Tumorgenese erzielt. Genetische Alterationen wie kompletter bzw. teilweiser Chromosomenverlust konnten bei Patienten mit einem ACC nachgewiesen werden (101, 102). Ferner sind Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen an der Entstehung des ACC beteiligt. Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 (103, 104) sind häufig, insbesondere bei Kindern, nachweisbar. Häufig finden sich zudem ein *loss of heterozygosity* (LOH) am Locus 11p15 [11p15LOH] (105) (i.e. Lokalisation der Tumorsuppressorgene H19 und p57kip2 und des Oncogens IGF-2), der mit einer Überexpression des IGF-II (106) einhergeht. Infolge der Überexpression von IGF-II kommt es zur gesteigerten, unkontrollierten Zellproliferation.

Zusammenfassend sind die molekulare Pathogenese- und Regulationsmechanismen des NNR-Karzinoms sehr komplex und bedürfen noch weiterer Evaluationen.

1.4 Therapie der NNR-Neoplasien

Anhand der vorhandenen wissenschaftlichen Studien wurde in Februar 2002 durch die *National Institutes of Health, USA* [NIH] in Zusammenarbeit mit der *State-of-the-Science Conferences* eine einheitliche Empfehlung für die Diagnostik und Therapie des klinisch unscheinbaren adrenalen Inzidentaloms erarbeitet (107). Aufgrund der hohen Korrelation zwischen Größe und Malignität empfiehlt die NIH, alle Raumforderungen ab einem Durchmesser von 6cm zu reseziieren. Ist eine endokrine Aktivität nicht nachzuweisen und der Tumor <6cm, kann auf eine Operation vorerst verzichtet und das Wachstumsverhalten der Läsion nach 3-6 Monaten nochmals kontrolliert werden (90).

Die bisherige Therapie des NNR-Karzinoms besteht in einer Resektion des Tumors (108-112) oder bei fehlender Resektabilität in einer Polychemotherapie (113, 114).

Bis zur Entwicklung der Laporoskopie wurden die adrenalen Neoplasien nur mit Hilfe der offenen Adrenalektomie reseziert. 1992 führten *Gagner et al.* erstmals die laparoskopische Adrenalektomie ein (115). Die laparoskopische Adrenalektomie ist die Therapie der Wahl bei gutartigen, hormonell-aktiven wie auch inaktiven Nebennierentumoren unter 6 cm Durchmesser (108). Mittlerweile wird zunehmend auch das Nebennierenkarzinom laparoskopisch operiert (116, 117).

Patienten mit inoperablen sowie nicht komplett resezierbaren (Rx/R1) bzw. metastasierenden NNR-Karzinomen werden in der Regel primär mit dem Adrenolytikum Mitotane behandelt (118-120). Als weitere Therapieoptionen steht zum Beispiel eine Polychemotherapie aus Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin zur Verfügung (100, 121, 122). Andere Chemotherapieregimes wie zum Beispiel die Behandlung mit Gemcitabine oder der Einsatz zielgerichteter Therapien, sogenannter *targeted therapies*, werden in aktuellen Studien noch evaluiert (112).

1.4.1 Adrenostatika

Aufgrund der autonomen Steroidproduktion der NNR-Neoplasien ist hin und wieder eine adrenostatische Behandlung notwendig, falls nicht zeitnah operativ vorgegangen werden kann (48, 123-125). Bis dato haben adrenostatische Substanzen eine essentielle Rolle in der Therapie von Patienten mit einem endogenen Hyperkortisolismus (Cushing Syndrom), indem sie ein oder mehrere Enzyme der Steroidogenese direkt blockieren (61, 106, 126-130). In einzelnen Fällen dienen sie der Therapie bei anderweitig schlecht kontrolliertem Morbus Cushing. Die am häufigsten verwendeten Adrenostatika sind Metyrapon und Ketokonazol (130, 131), beide sind oral verabreichbar (37, 130, 131). In Situationen, in denen ein massiver Hyperkortikolismus rasch kontrolliert werden muss, wurde auch Etomidat in nicht-hypnotischen Dosen als kontinuierliche intravenöse Infusion erfolgreich eingesetzt (124, 132). Im Vergleich zu Etomidat sind Metyrapon und Ketokonazol deutlich weniger potent in der Behandlung des Cushing Syndroms (131).

1.4.1.1 Etomidat (ETO)

Etomidat [*(R)-(+)-1-(1-Phenylethyl)-1H-Imidazol-5-Carboxylsäure*] ist ein karboxyliertes Imidazolderivat und ist als kurzwirksames intravenöses Hypnotikum für die Induktion der Narkose bekannt (133). Es gibt zwei Isomere von ETO, wobei das (+)-Isomer hypnotisch aktiv ist (134). Seine hypnotische Wirkung wird teilweise über einen GABA-ergen Mechanismus in der *Formatio reticularis* vermittelt (135). Im Vergleich zu anderen i.v. Hypnotika (wie Thiopental) werden kardiovaskuläre und respiratorische Depressionen durch ETO nur minimal beobachtet (133).

Bis 1983 wurde ETO auch für die Langzeitsedierung bei Patienten auf der Intensivstation eingesetzt. Damals wurde erstmalig eine gesteigerte Mortalität bei Intensivpatienten nach Langzeitsedierung mit ETO beschrieben (136). Die anschließend durchgeführten Untersuchungen zeigten eine signifikante Suppression der basalen bzw. ACTH-induzierten Synthese von Cortisol, Progesteron, 17 α -OH-Progesteron und Corticosteron bei gleichzeitig erhöhter Deoxycorticosteronproduktion und Plasma-ACTH-Konzentration (124, 130, 137, 138).

In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*- Untersuchungen konnte eine Hemmung der Kortisol synthese bereits in nicht-hypnotischer Dosis beobachtet werden (126, 129). Mit hoher Affinität bindet Etomidat an die mitochondrialen Cytochrom-P450-Enzyme mit Folge einer Inhibition der adrenalen 11 β -Hydroxylase [P450c11] und auch der Aldosteron-Synthase [P450c11aldo] sowie bei höherer Konzentration des *side-chain cleavage* Enzyms [P450scc]. Eine schwach inhibitorische Wirkung auf die 17,20-Desmolase [P450c17] konnte auch festgestellt werden (131). Niedrig konzentriert ist Etomidat folglich für eine kurzzeitige Therapie der endogenen Kortisolüberproduktion (Cushing Syndrom) geeignet (124, 132, 137, 139).

1.4.1.2 Metomidat (MTO)

MTO [(R)-(+)-Methyl 1-(1-Phenylethyl)-1H-Imidazol-5-Carboxylsäure] ist seit den 70er Jahren in der Veterinärmedizin bekannt und wird vor allem als i.v.-Anästhetikum von u.a. Pferden (140), Vögeln (141), (142), (143) und Schweinen (144) eingesetzt. Insbesondere bei Schweinen konnten erstmals adrenostatische Eigenschaften von MTO nebenbefundlich demonstriert werden (145).

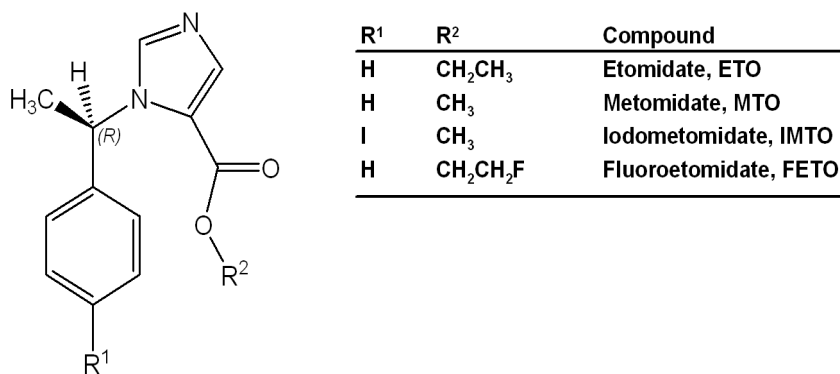
Infolge der Aktivierung des GABA_A-Rezeptors (135) wirkt MTO ähnlich wie ETO und Barbiturate dämpfend auf die Formatio reticularis im ZNS (146). MTO ist ein Hypnotikum mit muskelrelaxierenden Eigenschaften, seine analgetische Wirkung ist jedoch minimal. Wie ETO beeinflusst MTO das kardiovaskuläre und respiratorische System nur minimal (147). Einen adrenostatischen Effekt infolge Inhibition der P450-Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 also 11- β -Hydroxylase und Aldosynthase sowie P450scc (CYP11A1) wird bei MTO ebenfalls beobachtet. Aufgrund seiner Methylgruppe weist MTO im Vergleich zum ETO pharmakokinetisch verbesserte Eigenschaften auf, insbesondere schneller Wirkungseintritt und kurze Wirkungsdauer (146).

1988 haben *Bergström et al.* (36) erstmals radioaktiv markiertes Metomidat [¹¹C-MTO] als einen neuen adrenokortikalen Tracer für die Nebennieren-Bildgebung eingeführt.

1.4.1.3 Iodmetomidat (IMTO) und Fluoretomidat (FETO)

Iodmetomidat [IMTO] und Fluoretomidat [FETO] sind ebenfalls Analoga von Etomidat. Sie wurden kürzlich für die Nebennierenbildung entwickelt (148-150). Es werden ähnliche adrenostatische Effekte auf die humane Nebenniere infolge der Inhibition der P450-Enzyme vermutet.

Abbildung 5: Chemische Formel der Imidazolderivate (151)



1.5 Bildung der NNR-Neoplasien

Typischerweise werden adrenale Inzidentalome [AI] bei sonographischen bzw. computertomographischen [CT] oder kernspintomographischen [MRT] Untersuchungen detektiert. In den seltensten Fällen sind keine weiteren diagnostischen Untersuchung nötig (152). Aufgrund kontinuierlich verbesserter Darstellungsmethodiken steigt die jährliche Inzidenz des adrenalen Inzidentaloms, was dazu führt, dass die Patienten aufwendigen wie auch kosten- und zeitintensiven Untersuchungen unterzogen werden. Darunter zählen u.a. weiterführende radiologische Untersuchungen, hormonelles Screening und histopathologische Befunde (75, 78, 91, 107, 125, 152-156).

Im Folgenden wird näher auf die nicht-invasive Bildgebung der NN-Neoplasien eingegangen.

Bis dato zählen Ultraschall, Computertomographie und Kernspintomographie zu den Standardverfahren der NN-Darstellung. Die Sonographie hingegen hat einen untergeordneten Stellenwert (2).

Aufgrund ihrer besseren Auflösung ist bei klinisch bzw. sonographisch erhärtetem Verdacht auf Vorliegen eines NN-Tumors ein CT oder MRT indiziert (77). Selbst Tumore mit einem Durchmesser von 5-8 mm können im CT bereits detektiert werden. Demzufolge wird die Computertomographie heute als die Methode der Wahl für die Routinelokalisationsdiagnostik angesehen (157). Die Kernspintomographie ist aber grundsätzlich als gleichwertig zu betrachten. Im Nativ-CT werden Adenome anhand intrazytoplasmatischer Lipide von bösartigen Tumoren unterschieden. Ein Schwellenwert von ca. 10 HU [Hounsfield Units] weist auf einen adenomtypisch hohen Lipidgehalt hin. Ein Schwellenwert von >35 HU ist charakteristisch für maligne Tumoren (77) (siehe Berechnungsformel von Legende von Abbildung 4).

Bei der Kernspintomographie können differenzierende Aussagen bezüglich der NN-Raumforderung getroffen werden. Das MRT „identifiziert“ Adenome mittels dynamischer Gadolinium- bzw. chemical-shift-Analysen. In der Arbeit von *Krestin et al.* (158) wurden Unterschiede in der Signalintensität der Tumore im Verhältnis zum Fettgewebe demonstriert. Dabei wiesen inaktive Adenome, Cushing-Adenome und Aldosteronome eine relative Signalintensität von 1,2 auf, während sie bei Phäochromozytomen, Karzinomen sowie Metastasen etwa bei 2,8 liegt. Allerdings zeigt die Gadolinium-angereicherte MRT-Bildgebung beachtliche Überschneidungen in den Charakteristika benigner und maligner Tumoren, so dass der klinische Gebrauch auf die Differenzierung von adenomatösen von non-adenomatösen Läsionen in der NNR begrenzt ist (159). Ferner bietet das NMR keine spezifischen Kriterien für die Darstellung maligner NNR-Neoplasien.

1.5.1. Nuklearmedizinische Bildgebung der NNR-Neoplasien

Zu den weiterführenden Bildgebungsverfahren gehören die Szintigraphie, und in jüngster Zeit auch die Positron-Emissions-Tomographie [PET] (2).

Die PET stellt eine weitere nicht-invasive Methode dar (160-166). In der Literatur werden unterschiedliche radioaktiv markierte Tracersubstanzen zur Charakterisierung

der verschiedenen NNR-Neoplasien beschrieben. Zur Differenzierung von malignen Raumforderungen dient vor allem 18F-Fluorodeoxyglucose [^{18}F -FDG] (159, 167-169). Bei malignen Tumoren wird ein gesteigerter Glucosemetabolismus beobachtet (170-172). Der Nachteil der 18F-FDG-PET ist die geringere Spezifität des Tracers. Eine vermehrte 18F-FDG-Anreicherung wird u.a. in Gehirn, bei kardiovaskulären Erkrankungen, beim M. Alzheimer wie auch bei verschiedenen infektiösen bzw. Autoimmunerkrankungen beobachtet. Allerdings ist ein gesteigerter Glucosemetabolismus in entzündlich verändertem Gewebe die häufigste Ursache falsch-positiver Ergebnisse in der Onkologie (166, 173-177).

Bis kürzlich wurde auch (^{131}I)Iodomethyl-Norcholesterol (NP59) eingesetzt (178). Wegen des langsamen Einbaus des markierten Cholesterols in die Rindenhormone muß als Radionuklid für die Markierung des Methyl-Norcholesterols ein relativ langlebiges Isotop mit einer Halbwertszeit (HWZ) von mehreren Tagen eingesetzt werden, zum Beispiel I-131 mit einer HWZ von 8 Tagen. Dies führt allerdings zu einer hohen Strahlenexposition der Patienten (178).

Aufgrund ihrer hohen Affinität zu den adrenalen Enzymen (insbesondere P450c11-Enzymkomplex) wurden [^{11}C]-ETO und [^{11}C]-MTO als Tracer in der Bildgebung der humanen Nebenniere in mehreren Studien eingesetzt. Im Vergleich zu nicht-adrenokortikalen Karzinomen wiesen die Läsionen von adrenalen Ursprungs die höchste Anreicherung wie auch Bindungskapazität auf (179). Dementsprechend wurde mit Hilfe der [^{11}C]-Meto-PET eine exzellente Darstellung von adrenokortikalen Neoplasien erzielt (179-183). Im Vergleich zur NP59-Bildgebung weisen [^{11}C]-ETO und [^{11}C]-MTO eine verminderte Strahlendosis auf. Jedoch infolge der kurzen Halbwertszeit des ^{11}C von 20 min ist die Verfügbarkeit des Tracers und somit der Einsatz der [^{11}C]-MTO-PET auf spezielle PET-Zentren, die ein Zyklotron direkt vor Ort aufweisen, beschränkt. (36, 184).

Erste *in vitro* und auch *in vivo* Studien mit den neueren Imidazolderivaten [^{123}I]-Iodmetomidat [IMTO] (150) und [^{18}F]-Fluoretomidat [FETO] (148, 180, 185) sind erfolgt. IMTO (150) und FETO (148, 185) weisen ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu den adrenalen CYP11B-Enzymen auf, die ausschließlich in Gewebe

adrenokortikalen Ursprungs exprimiert werden. In der Arbeit von *Hahner et al.* (186) wurde die Inhibition der CYP11B1 sowie CYP11B2-Enzyme durch IMTO, ETO, MTO und FETO in den humanen NCI-h295 Zellen sowie in den murinen Y1-Zellen beschrieben. *In vitro* führten alle Imidazolderivate zu einer potenten Inhibition der CYP11B1- sowie CYP11B2-Enzyme. *In vivo* wurden nach i.v.-Injektion von [$^{123/125}$ I]-IMTO die pharmakologischen Eigenschaften sowie biologische Verteilung in Mäusen mittels eines Kleintier-SPECT gezeigt. Ferner wurden vier Patienten mit nachgewiesenem Nebennierentumor (davon zwei mit einem metastasierenden ACC, einer mit einem bilateralen adrenokortikalen Adenom sowie einer mit einem metastasierten Melanom) ebenfalls mittels des [123 I]-Iodometomidat-SPECT untersucht. Zusammenfassend konnte eine hohe sowie spezifische Anreicherung des [$^{123/125}$ I]-IMTO in den Nebennieren von Mäusen nachgewiesen werden. Zudem wurde bei den Patienten ebenfalls eine spezifische, vermehrte Anreicherung in den primären Nebennierentumoren sowie Metastasen gezeigt. Bei dem Patienten mit dem metastasierenden Melanom konnte hingegen keine vermehrte Anreicherung gesehen werden. *Hahner et al.* (186) beschrieben demzufolge erstmals ein *in vivo* Detektionssystem mittels der [123 I]-IMTO-Szintigraphie sowohl bei Versuchstieren als auch bei Menschen.

Dank der hohen Bindungsspezifität, der längeren Halbwertszeit sowie geringeren Strahlenbelastung erscheint [123 I]-IMTO für die zukünftige SPECT-Darstellung der NNR-Neoplasien vielversprechend.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

In bisherigen Studien wurde Etomidat neben seiner Eigenschaft als Anästhetikum als potentes Adrenostatikum der Nebenniere untersucht und beschrieben. Neben inhibitorischen Wirkungen auf die Steroidbiosynthese und Zellproliferation konnten eine Suppression verschiedener Steroidbiosyntheseenzyme wie auch der ACTH-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden (187).

In der Literatur gibt es jedoch nur wenige Daten über die Imidazolderivate Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat. Bis auf die Verwendung als neue PET-Tracer sind weitere Einflüsse von MTO, IMTO und FETO auf die menschliche Nebenniere nicht näher bekannt (36, 148, 183, 188, 189). Demzufolge ist es interessant, ihre molekulare Wirkung auf die Nebennierenzellen zu charakterisieren. In dieser Arbeit sollte die Aktivität dieser neueren Komponenten bezüglich ihrer weiteren Einflüsse auf die Schlüsselregulatoren der Funktion und Zellproliferation in der Nebenniere bestimmt werden.

Anhand folgender Fragestellungen sollten die Effekte der Adrenostatika an der humanen NNR-Karzinomzelllinie NCI-h295 untersucht werden.

- 1. Wie verhalten sich - im Vergleich zu Etomidat - Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat bezüglich**
 - a) adrenostatischer Eigenschaften**
 - b) der intraadrenalen Regulation für die Steroidogenese relevanter Proteine**

- 2. Welchen Einfluss haben – im Vergleich zu Etomidat - Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat auf proliferative Eigenschaften *in vitro*?**
 - a) Wie wird das Proliferationsverhalten von adrenokortikalen Zellen beeinflusst?**
 - b) Welche Signalkaskaden, die in Proliferationsprozesse und generelle zellregulatorische Prozesse involviert sind, werden beeinflusst?**

2. Material und Methodik

2.1 Material

Verbrauchsmaterialien/Reagentien	Firma
Etomidat (Hypnomidate®), Metomidat (Hypnodil®)	Janssen Pharmaceuticals, Neuss Germany
ACTH ₁₋₂₄ (Synacthen®)	Ciba-Geigy GmbH Wehr, Waldshut-Tiengen Germany
RPMI 1640 Medium, DMEM/HAMS F12, Trypan blue Solution (0,4%), Glycine, SDS, Ponceau S Solution, Insulin, Selenium, Transferrin, Forskolin (FSK)	Sigma, Deisenhofen Germany
Fetal calf serum (FCS), Horse serum (HS), bovine serum albumin (BSA), HEPES	Invitrogen®, Eggenstein Germany
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, 30% Acrylamid/ Bis Solution, Temed	BioRad, München Germany
TRIS (Ultra Qualität) Pufferen®, Ethanol, Isopropanol, Methanol, 2-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe Germany
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), Kalium-di-Hydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt Germany
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen®, Eggenstein Germany
Nitrocellulose Membran	Hybond Amersham Bioscences
Antikörper gegen MC2-Rezeptor	Abcam, Cambridge, GB
Antikörper gegen Phospho ERK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörper gegen β-Actin	Sigma, Deisenhofer Germany
Antikörper gegen StAR, P450scc	Freundliche Gabe von WL Miller, San Francisco, USA
Antikörper gegen DHEA-ST	Freundliche Gabe von M Coughtrie, Dundee, GB
Antikörper gegen Phospho AKT, Anti-rabbit- und Anti-mouse-Zweitantikörper	Cell Signaling Technology, Frankfurt Germany
ECL (Western Blotting Detection System)	Amersham Pharmacie Biotech, Buckinghamshire, GB
RIA Assays für Cortisol, 17-OH-P, Androstendion, DHEA und DHEA-S	DPC/Biermann, Bad Nauheim Germany
humanes CYP11A1-Promoter pGL3 basis Vektorkonstrukt	Freundliche Gabe von Dr. Gary Hammer
Humanes MC2R-Promoter pGL3 basis Vektorkonstrukt	Freundliche Gabe von Dr. Oliver Zwermann
Zellen	
NCI-h295 S und NCI-h295 R	ATCC, Rockville, MD USA
Geräte	
Tischkühlzentrifuge: Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products, Germany
Icyler für PCR: Master cyler gradient	Eppendorf, Hamburg Germany
Für Western Blot: Elektrophorese- und Semidry-Transfer-System, Blotting Kammer Mini Protean II™	BioRad, München Germany
Für Hormonanalyse: Immulite 2000	DPC/Biermann, Bad Nauheim Germany
Gamma-Counter	

2.2 Synthese von Iodmetomidat und Fluoretomidat

Etomidat und Metomidat wurden von *Janssen Pharmaceuticals* (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) käuflich erworben. Die Synthese ihrer Derivate folgt einer 5-Schritte-Sequenz, die aus Alkylierung, N-Formylierung, Ringschluss und oxidativer Desulfurisierung besteht. Die Synthese des Iodmetomidats erfolgte durch das Radiochemielabor der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik Würzburg wie bereits vor kurzem beschrieben (150). Für die Synthese des FETO wurde MTO [*(R)*-(+)-*Methyl-1-(1-Phenylethyl)-1H-Imidazol-5-Carboxylsäure*] (3,0 g, 13,0 mmol) für 10 min in 30 % NaOH hydrolysiert. Die Lösung wurde anschließend auf einen pH-Wert von 4,0 - 4,2 gepuffert und mit Dichlormethan dreimal extrahiert. Durch die Zugabe von Na₂SO₄ wurden die kombinierten organischen Phasen getrocknet, gefiltert und verdunsteten zu einer Trockensubstanz. Das daraus gewonnene Produkt wurde mittels Rekrystallisation von Wasser gereinigt und in Vakuum getrocknet. Mittels dieses Verfahrens wurden 2,25 g (80 %) weiße Kristalle erbracht. Die daraus erzielte (*R*)-(+)-*1-(1-Phenylethyl)-1H-Imidazol-5-Carboxylsäure* (541 mg, 2,5 mmol) wurde in einer Mischung aus 1,2-Dichloroethan (10 ml), Schwefelsäure (1,4 ml) und 2-Fluoroethanol (4 g, 62,5 mmol) gelöst. Diese Suspension wurde bei 80 °C über Nacht geschüttelt, anschließend auf Eis gelegt, mit Natriumbikarbonat neutralisiert und wiederum mit Dichlormethan dreimal extrahiert. Durch die Zugabe von Na₂SO₄ wurden die kombinierten organischen Phasen gefiltert und verdunsteten schließlich zur Trockensubstanz. Zuletzt erfolgte die Aufbereitung des Verdunstungsrückstandes mit einem Flash-Chromatographen.

2.3 Zellkultur

2.3.1 NCI-h295 Zellen

Aufgrund erschwelter Gewinnung von adrenalem Gewebe wurde die *in vitro* Untersuchung der Regulation der adrenokortikalen Steroidogenese an der Nebennierenkarzinomzelllinie NCI-h295 durchgeführt. *Gazdar et al.* isolierten 1990

zum ersten Mal diese Tumorzelllinie aus einem invasiven primären adrenokortikalen Karzinom (132). Diese sehr differenzierten, adrenokortikalen Tumorzellen produzieren fast alle für die adrenale Steroidbiosynthese relevanten Enzyme und viele verschiedene Hormone (u.a. Mineralkortikoide, Glukokortikoide und Androgene) (13, 37, 190). Ferner exprimieren NCI-h295-Zellen Rezeptoren für ACTH (8), Androgene (44), Glukokortikoide (153), sowie für Angiotensin-II und IGF-1 (106, 191) .

Für die Experimente wurden zwei Formen der NCI-h295-Zellen verwendet, die Suspensions- und die adhären wachsenden Zellen.

Die Suspensionzellen [NCI-h295-S] wurden in SIT-Medium: RPMI-1640 Medium in 175 cm² Flaschen bei 37 °C kultiviert. Dabei wurde das SIT-Medium durch Zusatz von Insulin (5 µg/ml), Transferrin (0,1 mg/ml), Natriumselenit (5,2 ng/ml) und 5 % fetalem Rinderserum [FCS] hergestellt. Aufgrund von den Zellen eigens produzierten relevante Wachstumsfaktoren wurde ca. 20 % des alten Mediums nach jedem Mediumwechsel wieder verwendet.

Die NCI-h295-R (adhärenten)-Zellen wuchsen in definierten DMEM/Ham's F12-Medium mit 15mM HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure]. Diesem Medium wurden zusätzlich Insulin (6,25 µg/ml), Transferrin (1 mg/ml), Natriumselenit (6,4 ng/ml), bovines Serumalbumin [BSA] (1,25 mg/ml) und Nu-Serum 2,5 % hinzugefügt.

Für die Experimente wurde der Serumanteil für beide NCI-Zelltypen auf 2 % reduziert.

2.3.2 Y-1 Zellen

Diese Zelllinie stellt eine adhären wachsende hormonproduzierende NNR-Karzinomzelllinie der Maus dar. Sie wurde 1966 durch *Yasumura et al.* etabliert (106). Die Zellen produzieren eine große Zahl verschiedener Steroidhormone und zeigen eine gute ACTH-Antwort (192, 193). Die Zellen wurden kultiviert in Ham's F10/DMEM-Medium (1:1) mit Zusatz von Horse-Serum 7,5 %, FCS 2,5 % und L-Glutamin (200 mM) (194).

2.3.3 SW-13 Zellen

Diese von *Leibovitz et al.* in 1973 (195) etablierte humane NNR-Karzinomzelllinie produziert keine Gluko- und Mineralokortikoide und nur geringste Mengen an Androgenen (196).

In ihrem Kulturmedium konnten Adrenomedullin und Endothelin-1 nachgewiesen werden (197). Die Zellen exprimieren weder den ACTH-Rezeptor noch Steroidbiosyntheseenzyme in nachweisbarer Menge. Somit wurden sie als Negativkontrollen bei den Proliferationsstudien mit adrenostatisch wirkenden Substanzen eingesetzt.

Sie wachsen adhärent bei 37 °C unter CO₂-armen (5% CO₂/ 95 %O₂) Bedingungen in Leibovitz L-15 Medium mit 10 % FCS und 2 nM L-Glutamin.

2.3.4 MCF-7 Zellen und HT-29 Zellen

Sowohl MCF-7, eine humane Mammakarzinom-Zelllinie als auch die HT-29-Zelllinie, eine humane Kolonkarzinom-Zelllinie, dienten als eine nichtadrenale maligne Vergleichszellpopulation.

Das Kulturmedium für die MCF-7-Zellen bestand aus MEM, NEAA 1 %, FCS 10 % und Glutamin 2 mM.

Die HT-29- Zelllinie wurde in MEM [Minimal essential medium] mit NEAA 1 %, FCS 10 %, Glutamin 2 mM und HEPES-Puffer 4 mM kultiviert.

2.4. Zellproliferationsanalysen

Wachstumskurven

Für die Proliferationsversuche wurden die NCI-h295-Suspensionszellen verwendet. Die Suspensionzellen wurden in 24-well-Platten in einer Dichte von 500 000 Zellen pro well ausgesät. Es wurden vier Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen von ETO, MTO, IMTO und FETO (zu je 0,6 µM, 6 µM und 60 µM) für 8 Tage inkubiert. Alle

Proliferationsversuche wurde in Triplets mit jeweils einem Triplet unbehandelter Kontrollzellen angelegt. Als Positivkontrolle diente der Proliferationsfaktor bFGF (10 nM, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die Zellen wurden bei 37 °C und in einer Atmosphäre von 5 % CO₂/ 95 % Raumluft gezüchtet.

2.4.2. MTT-Test

Dieser erstmalig von Moosmann 1983 entwickelte und später u. a. von *Denizot et al.* und *Carmichael et al.* (1987) modifizierte Test wurde für die Proliferationsstudien angewendet (198). Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test. Hierbei werden Zellen *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Das Grundprinzip beruht darauf, dass das Tetrazoliumsalz MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid*] hauptsächlich durch die Reduktionsäquivalenten NADH [reduzierte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid] und NADPH [Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat] und teilweise durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase in blaues Formazan umgewandelt wird, welches photometrisch messbar ist (199). Diese Umwandlung findet nur in vitalen Zellen statt. Die Menge des produzierten Formazans ist proportional der Glykolyserate der Zellen, welche wiederum positiv mit der Zellzahl korreliert (200).

Adhärente Zellen wurden hierbei in 96-well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von 50000 Zellen/well ausgesät. Nach 24 Stunden wurden diese für weitere 4 Tage mit den entsprechenden Testsubstanzen (0,6-60 µM) inkubiert.

Die MTT-Substanz (5 mg/ml Stammlösung, Sigma, Deisenhofen) wurde in serumfreiem Kulturmedium (Nutrient Mixture F12 Ham) gelöst, um Interferenzen mit den Serumproteinen zu vermeiden. Die Inkubationszeit betrug weitere 3 Stunden bei 37 °C. Das unlösliche Formazan wurde mit 100 µl Isopropanol/HCl-Lysepuffer wieder in Lösung gebracht. Hierbei soll HCl mögliche Störfaktoren von Phenolrot vermeiden, indem es dieses in eine nicht-interferierende Farbe umwandelt.

Die photometrische Auswertung erfolgte per Elisa Reader (Elisareader 400 SF, SLT Lab Instruments, Salzburg) bei einer Wellenlänge von 570 nm.

2.5 Das Western Blot Verfahren

Ein Western Blot (syn: Immunoblot) bezeichnet die elektrophoretische Auftrennung und den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Bsp: Nitrocellulosemembran). Diese transferierten Proteine werden mit Hilfe von speziell gegen sie gerichteten Antikörpern nachgewiesen.

2.5.1 Proteinprobenaufbereitung

Vor dem eigentlichen Western Blot wurden die Proben nach der Laemmli-Methode (201) aufbereitet, um die Proteine für die weiteren Schritte zu extrahieren.

Die mit verschiedenen Substanzen inkubierten NCI-h295-R-Zellen wurden mit eisgekühltem PBS (1 ml/well) gespült und anschließend mit 200 µl Laemmli-Puffer (1:4) versetzt. Dieses Laemmli-Zell-Gemisch wurde in einem 1,5 mL Eppendorf-Cap gegeben und für fünf Minuten bei ca. 100 °C erhitzt mit dem Ergebnis der Denaturierung der Proteine. Das Laemmli- bzw. Lysis-Puffer wurde aus folgendem Bestandteilen zusammengesetzt: 10 ml Glycerin (= 10 %), 30 ml 10 % SDS (= 2 %), 5 ml 2-Mercapto-Ethanol (= 5 %), 12,5 ml Tris base (= 0,0625 M; pH 6,8) und 250 mg Bromphenolblau (0,04 %).

Dabei führt die reduzierende Thiolverbindung, 2-Mercaptoethanol, zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine. Dies hat zur Folge, dass das in dem Lysis-Puffer enthaltene SDS, ein anionisches Detergenz, sich an der hydrophoben Seite der entfaltenen Proteinketten anlagert. Dieses SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass diese eine einheitliche negative Ladung aufweisen. Aufgrund dieser negativen Ladung erfolgt die Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe entsprechend.

2.5.2 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide electrophoresis)

(Laemmli, 1970)

Bei dem SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System handelt es sich um ein Trennsystem mit diskontinuierlichem pH-Verlauf (Disk-Elektrophorese). Im SDS-PAGE werden die denaturierten Proteine entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt, dabei durchlaufen sie zuerst ein Sammelgel (pH 6,8) und anschließend das eigentliche Trenngel (pH 8,8). Das Polyacrylamidgel ist in einem natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen TRIS-Glycin-Puffersystem eingelegt, welches eine gute Trennung der einzelnen Proteine voneinander erzielt. Dieses System wurde ursprünglich von *U. K. Laemmli* 1970 entwickelt (201).

Nach dem Auftragen der denaturierten Proteine auf das Gel wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proteine zur Anode bewirkt. Während der Sammelgel-Phase von ca. 75 Minuten wurde eine Spannung von 100 V erzeugt. In der Trenngel-Phase von weiteren 90 Minuten durchliefen die Proteine eine Spannung von 180 V. Das engporige Trenngel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende der Gelelektrophorese sind alle Proteine in den einzelnen Proben nach Größe sortiert und können durch weitere Analysen (in diesem Fall Western Blot) bestimmt werden.

Für die jeweiligen Acrylamidkonzentrationen wurden die Gele entsprechend der nachfolgend aufgeführten Tabelle angesetzt:

Anleitung für 1 Gel mit 1,5mm Dicke

Trenngel 10 %		Sammelgel	
Acrylamid/Bisacrylamid 30%		Acrylamid/Bisacrylamid	
	2,5 ml	30%	375 µl
4xLower Buffer	1,875 ml	4 x Upper Buffer	750 µl
ddH ₂ O	3,125 ml	ddH ₂ O	1,875ml
TEMED	7,5 µl	TEMED	4 µl
APS 10%	75 µl	APS 10%	75 µl
4 x Lower Buffer pH 8,8		4 x Upper Buffer pH 6,8	
SDS	4g	SDS	2g
Tris	181,72g	Tris	30,28g
ad 1000 ml ddH ₂ O		ad 1000ml ddH ₂ O	

Elektrophoresepuffer

Tris	15,1g
Glycin	94g
SDS 10%	50 ml
ad 1000 ml ddH ₂ O	

Die Elektrophorese erfolgte in der Blotting Kammer Mini Protean II TM der Firma Biorad. Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten, Spacer und Käbme mit 70 % Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die Glasplatten mit den Spacern in eine Halterung geschraubt, wobei die Unterseiten der Platten mit einem Parafilm abgedichtet wurden. Diese Abdichtung diente dem Schutz vor dem Auslaufen der noch nicht polymerisierten Gele. Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel entsprechend dem Pipettierschema in 50 ml Falcon-Röhrchen angesetzt. Durch Zugabe der letzten Komponenten Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisation des Acrylamid/Bisacrylamidgels gestartet. Die Trennkammer wurde zügig bis ca. 2 cm unter den Rand gefüllt und das Gel dann vorsichtig mit Wasser überschichtet. Während der Polymerisationsphase des Trenngels

wurde der Ansatz für das Sammelgel nach o.g. Tabelle in einem 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert mit Ausnahme von APS und TEMED. Nach 15-20 Minuten war das Trenngel polymerisiert und das Wasser vorsichtig entfernt worden. Anschließend wurde die Gelkammer bis zum oberen Rand mit der Sammelgel-Lösung gefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren 20 Minuten war nun auch das Sammelgel polymerisiert, so dass die Kämmen entfernt werden und die Gele mit den zuvor denaturierten Proteinen beladen werden konnten. Dabei wurde die erste Tasche des Sammelgels mit 10 µl BenchMarker™ (Invitrogen) als Größenmarker und die weiteren 9 Taschen mit 20 µl der zu untersuchenden Proben beladen.

2.5.3 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

(Western Blot)

Beim Western Blot selber werden die aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulosemembran) transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Zusätzlich wird bei diesem Vorgang das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, so dass die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen können.

Für diesen elektrophoretischen Transfer wurde das Semidry-Blot-System mittels dem Trans-Blot® SD der Firma Biorad verwendet. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Glaskammern der Blotting Kammer Mini Protean II™ (Biorad) entnommen. Die Gele wurden vorsichtig aus den Glasplatten herausgenommen. Dabei wurde das Sammelgel verworfen. Whatman-Paper und Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Trenngels (ca. 5,5 x 8,9 cm) zugeschnitten und anschließend in den Semidry-Blotting Puffer eingelegt.

Semidry-Blotting-Puffer

Tris	3,7 ml	ad 1000 ml ddH ₂ O
Glycin	2,93 g	
SDS 10 %	3,7 ml	
Methanol	200 ml	

Als nächstes wurde ein Sandwich aus 10 Whatman-Papieren, der Nitrozellulosemembran, das Trenngel und weiteren 10 Whatman-Papieren gebildet. Mit einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurde behutsam die restliche Luft zwischen den einzelnen Schichten ausgestrichen. Dies hatte den Grund, dass der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran ungehindert stattfinden konnte. Der elektrophoretische Proteintransfer erfolgte über 75-80 min bei einer Spannung von 25 V. Als Positivkontrolle für die erfolgte Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden diese mit dem unspezifischen Proteinmarker Ponceau-S eingefärbt. Überschüssiges Ponceau wurde mit destilliertem Wasser abgespült und das restliche Ponceau-S mit einer phosphat-gepufferten Salzlösung PBS-Tween 0,1 % ausgewaschen. Anschließend wurden die geblotteten Membranen mit 5 % Magermilch für 1 Stunde bei Raumtemperatur gesättigt. Die Magermilch diente zur Blockierung der noch freien Bindungstellen der Membran, so dass die monoklonalen Antikörper nur an die zu untersuchenden Epitope binden konnten. Folgend wurde die restliche Magermilch der gesättigten Membranen erneut mit PBS-Tween 0,1 % (→ dreimal für 5 min bei Raumtemperatur) ausgewaschen.

2.5.4 Immunodetektion und Chemolumineszenz

Am häufigsten werden die Proteine über eine Immunodetektion visualisiert. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primär-Antikörper an Epitope des gesuchten, transferierten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt.

Nach dem Waschprozess wurden monoklonale Erstantikörper gegen StAR (1:15000), P450scc (1:1000), P450c17 (1:1000), DHEA-Sulfotransferase (DHEAS) (1:2000), phosphoryliertes ERK-1 und -2 (pERK-1 und -2) (1:1000), Gesamt-ERK-1 und -2 (1:1000) bzw. MEK (1:1000) hinzugefügt und die Membranen anschließend über Nacht bei ca. 5 °C im Kühlraum gelagert. Nach 24 Stunden wurde dieser Primär-Antikörper abgossen und der Waschvorgang mit PBS-Tween 0,1 % (→ dreimal für 5 min bei Raumtemperatur) wiederholt. Durch das Waschen wurden die Membranen von unspezifisch gebundenen Antikörper-Molekülen gereinigt. Danach wurde ein

Zweitantikörper (Anti-Rabbit-IgG 1:3000 oder Anti-Mouse-IgG 1:1500) für 1 Stunde bei Raumtemperatur den Membranen hinzugegeben.

Mittels der AmershamTM-ECLTM-Methode der Firma Amersham Pharmacie Biotech erfolgte die Detektion der Proteine. Hierbei ist der Zweitantikörper mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase [*Horseradish Peroxidase* bzw. HRP], gekoppelt. Das HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Lichtemission wurde mit einem Röntgenfilm als Schwärzung nachgewiesen. Diese entsprachen dem typischen Bandenmuster der Protein-Antikörperverbindungen. Anschließend wurde die relative Intensität der Signale im Verhältnis zum β -Aktin mit Hilfe des Scan-Programms Image Gauge V3.4 (Fujifilm, Deutschland) densitometrisch ausgewertet.

2.6 Hormonanalyse

Anfang der 60er Jahre entwickelten *Berson und Yalow* das Prinzip der immunologischen Hormonbestimmung (202). Dieses Verfahren zeichnet sich durch die notwendige Spezifität und Empfindlichkeit für die Hormonbestimmung in Körperflüssigkeiten aus. Die Methode beruht auf eine Reaktion des zu bestimmenden Hormons mit spezifischen Antikörpern, die inzwischen gegen jedes bekannte Hormon in ausreichender Spezifität und Menge gewonnen werden können. Der Vorteil der immunologischen Hormonbestimmung liegt in der Einfachheit ihrer Durchführung.

2.6.1 Radioimmunoassay (RIA)

In den Experimenten wurden die Hormonanalysen nach dem Prinzip des Radioimmunoassays [RIA] bestimmt. Das RIA ist eine Labormethode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen. Dabei konkurrieren eine konstante Menge an radioaktiv markierten Antigenen mit unterschiedlichen Mengen nicht markierter Antigene aus der zu untersuchenden Probe um eine limitierte Zahl von freien Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Anschließend wird mit einem γ -Counter

die Radioaktivität gemessen, die der Konzentration des zu untersuchenden, unmarkierten Antigens (i.e. Hormone) umgekehrt proportional ist.

Für die Versuche wurden die Coat-A-Count® RIA-Assay-Kits der Firma DPC Biermann verwendet. Hierbei basiert das kompetitive Immunoassay auf Antikörperbeschichtete Polypropylenröhrchen. Sowohl eine bestimmte Menge an Probenserum wie auch an mit ¹²⁵I markierten Testantigenen wurden in diese Röhrchen pipettiert. Nach Inkubation wurden die ungebundenen Antigene durch Dekantierung verworfen. Die Radioaktivität wurde mit einem γ -Counter gemessen und die Menge der Hormonkonzentration konnte anhand einer Standardkalibrierungskurve ermittelt. Die Probenserum stammten aus den Überständen der NCI-h295-Zellen-Versuche, die mit verschiedensten Konzentrationen von ETO, MTO, IMTO und FETO versetzt wurden.

2.7 Bestimmung der RNA-Expression

2.7.1 RNA-Extraktion

Vor der eigentlichen Bestimmung der RNA-Expression mittels der Realtime-PCR-Methode wurde die mRNA [Messenger-Ribonukleinsäure] aus den NCI-h295-R-Zellen aufgereinigt.

Die Zellen wurden in 60 mm Petrischalen ausgesät und mit ETO 60 μ M, MTO 60 μ M, ACTH 10 nM und Forskolin substituiert. Jeder Versuch wurde vierfach angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,5 ml Trizol hinzugefügt und die Lysis der Zellen begonnen. Mit einer Feindosierungsnadel (Omnifix-F 1ml plus, B. Braun Melsungen AG) wurde das Zell-Lysis-Gemisch mehrmals resuspendiert und in einem Eppendorf-Cap gegeben. Die Suspension wurde bei 12000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde erneut in einen Eppendorf-Cap pipettiert und das Pellet (der eigentliche Zellschrott) verworfen. Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform/Trichlormethan und einer Wartezeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension wiederum bei 12000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Folgend wurde die wässrige (obere) Phase in einen weiteren Eppendorf-Cap gegeben. Diese Chloroformreinigung wurde zweimal wiederholt.

Anschließend wurde die wässrige Phase abpipettiert und mit 250 µl Isopropanol versetzt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zugabe des Isopropanol führte zur Ausfällung der RNA. Dieses Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, um das restliche Isopropanol zu entfernen. Nachdem der restliche Ethanolgehalt verdunstet war, wurde die RNA in 20 µL sterilem ddH₂O resuspendiert. Der RNA-Gehalt wurde spektrophotometrisch mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf gemessen.

2.7.2 cDNA-Herstellung für Realtime-PCR

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die zuvor extrahierte RNA untersucht werden. Bei der Amplifikation (Vervielfältigung) von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA-abhängig sind. Diese Polymerasen sind nicht in der Lage RNA zu amplifizieren. Daher wird zuerst eine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA kann im Anschluß als Ausgangsprodukt in der Realtime-PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu vervielfältigen.

Zur Initiation der DNA-Synthese benötigt die RT ein kurzes DNA-Stück, einen sogenannten Primer. Oftmals wird hier ein Oligo-d(T)-Primer aus mehreren Thymin-Basen verwendet, welcher komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3`-Ende der mRNA ist. Erst im zweiten Schritt der PCR werden dann Gen-spezifische Primer eingesetzt.

In den Experimenten wurde die zuvor extrahierte mRNA (siehe 3.1.4) mit Hilfe der Assays-on-Demand Gene Expression Products der Firma Applied Biosystems, USA in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben.

Hierbei wurden die einzelnen Substanzen nach folgendem Schema pipettiert:

2x RT Master Mix Ansatz

für 24 µl RNA (Template)

10 x Random Hexamer Primer	45 µl
25 x dNTP (Nukleotide)	75 µl
H ₂ O	30 µl

Reaktionsmix

für 30 µl Gesamtvolumen Master Mix

10 x Reverse Tr anskription Puffer	150 µl
MgCl ₂ 25 mM	300 µl
0,1 M DTT	150 µl
Rnase OUT	75 µl

24 µl RNA wurden mit 6 µl 2x RT Master Mix in 1,5 ml RNasefreien Eppendorf Biopur Cap (Biorad®) versetzt und bei 65 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension auf Eis gekühlt. Nach 1 min wurden 27 µl Reaktionsmix der RNA-MasterMix-Suspension hinzugefügt und diese für weitere 2 min bei 25 °C inkubiert. Im folgenden Schritt wurde 1 µl SuperScript RT-Enzym (Applied Biosystems, USA) hinzupipettiert.

Folgend wurde die Reverse Transkriptase in einem thermalen Icyler der Firma Biorad® nach vorgegebenen Schema (bei 25 °C für 10 min Inkubation, bei 42 °C für 50 min Reaktion und bei 70 °C für 10 min zum Stoppen der RT) gestartet.

2.7.3 Realtime PCR-Verfahren

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Technik zur gezielten Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, der von zwei bekannten Sequenzen [Oligonukleotid-Primer] eingerahmt wird. Durch den Einbau von Nukleotiden verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase [Taq-Polymerase] die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize, und neue DNA-Stränge entstehen. In

jeder Vermehrungsrunde dienen wiederum die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize für die Polymerase, so dass eine exponentielle Erhöhung der Kopienzahl entsteht.

Zur Durchführung einer PCR benötigt man folgende Komponenten:

- cDNA-Matrize (template) mit einer definierten Sequenz
- Einzelsträngige Oligonukleotidprimer, die komplementär zu den Enden des *templates* sind
- Hitzestabile DNA-Polymerase zur Synthese der neuen DNA-Doppelstränge
- Puffer und Mg^{2+} -Ionen (für den dNTP-Einbau ausschlaggebend und fördern die Aktivität der Polymerase).

Die Realtime PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt [Fluoreszenz-Energietransfer, FRET]. Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren.

Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragments steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikation direkt proportional. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten CT-Wert ("threshold cycle"). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal die Reporter-Fluoreszenz über dem Grundrauschen ermittelt wird.

In den Experimenten wurde die relativ quantifizierende Realtime-PCR mit den FAMTM dye-labeled TaqMan[®] MGB Proben (Assays on Demand Gene Expression Products,

Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Hierbei wurde die mRNA- bzw. Genexpression von StAR, ACTH-Rezeptor, P450scc, P450c17, p450c21, p450c11 detektiert.

Der Versuchsaufbau wurde entsprechend der vorgegebenen Anleitung der Firma Applied Biosystems angesetzt:

Reaction Component	Volume/Well (25 µl volume reaction)
TaqMan®	
Universal PCR Master Mix	12,5 µl
20X Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (= Sonde)	1,25 µl
cDNA diluted in Rnase-free water	11,25 µl
Total	25 µl

Jede einzelne Reaktion wurde mit einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 250 ng cDNA in Triplets angesetzt. In 96-well-Reaktionsplatte (Biorad®) wurden 5 µl Proben (cDNA, Standard A-F [1:4 Verdünnung] und Kontrollen [H₂O]) pro well pipettiert. Anschließend wurden 20 µl TaqMan®-Standardansatz hinzugegeben.

Die 96-er Lochplatte wurde mit Folie verdeckt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die cDNA-Reaktionsplatte in Alufolie gewickelt (= Schutz vor dem Licht) und über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag wurde die Realtime-PCR gestartet, dabei wurden die von Applied Biosystem vorgeschriebenen thermalen cycling Parameter angewandt (2 min bei 50 °C für die Aktivierung der AmpErase UNG, 10 min bei 95 °C für die Aktivierung der AmpliTaq Gold Enzyme, gefolgt von 50 PCR-Zyklen zu je 15 sek bei 95 °C für Denaturierung und 1 min bei 60 °C für Annealing und Extension der DNA).

Die Realtime-PCR wurde in einem *iCycler thermocycler* der Firma Biorad® durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem *iCycler iQ Real time detection system Software*-Pogramm berechnet. Jede einzelne Expression der zu untersuchenden Komponenten wurde anhand einer Forskolin-Standardkurve verglichen. Als endogener Kontrollparameter wurde die 18s Expression quantifiziert. Alle Ergebnisse wurden dann anschließend im Verhältnis zur 18s-Expression normalisiert.

2.8 Promoteranalysen mittels des Dual-Luciferase Reporter (DLRTM)

Assay-Kit (Promega)

Mit Hilfe des Dual-Luciferase-Reporter-(DLRTM)-Assay-Kit wurden die Promoteraktivitäten analysiert. Hierbei dienen die aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* gewonnene Firefly-Luciferase als Reporterenzym und Renilla-Luciferase aus der Seequalle *Renilla reniformis* stammend als Kontrollenzym für die Transfektionseffizienz (203). In Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ wird das Genprodukt Luciferin zu Oxyluciferin durch die Firefly-Luciferase oxidiert, bei diesem Prozess wird ein Lichtblitz erzeugt (203-205). Analog kommt es bei der Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid durch die Renilla-Luciferase ebenfalls zu einer Lichtemission (206, 207). Anhand der Messung der freigesetzten Lichtmenge kann die exprimierte Luciferase im Luminometer bei 562 nm ermittelt werden. Für die Transaktivierungsversuche wurden pGL3-basic-Vektorkonstrukte, die die vollständige humane P450sc^c- bzw. P450c17 [p(CAP11A1)GL3basic]- sowie MC2R-Promotor-Sequenz [p(MC2R)GL3basic] (28) enthielten, als Reportergenkonstrukte eingesetzt. Mit Hilfe des Lipofectamin wurden diese Luciferase-Reportergenkonstrukte vorübergehend in NCI-h295-Zellen transfiziert (= transiente Transfektion). Die Kontrollzellen wurden mit einem leeren Vektor pGL3 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit ETO 60 µM, ACTH1-24 (Synacthen) 100 nM oder FSK (Forskolin) 10 - 5 M stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt.. Nach 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden wurde die Aktivität nach dem DLRTM-Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und jeweils mit Passive Lysis Buffer (PLB) auf einem Schüttler für 15 min von den Loch-Platten gelöst. Hiernach wurde das Lysat in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 12 000x g konnten die Zellüberreste entfernt und der Überstand zur weiteren Analyse genutzt werden. In einem Luminometer-Röhrchen wurden je 100 µl Luciferase Assay-Reagenz II (LAR II) mit 20 µl PLB-Zelllysat versetzt. Im Luminometer konnte nun die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen werden. Nach Zugabe von 100 µl Stop&Glo[®]-Reagent wurde die Wirkung von Firefly-Luciferase beendet und zugleich die Renilla-Luciferase aktiviert. Die Werte der Firefly-Luciferase und somit

Promoteraktivität wurden schließlich gegen die durch Renilla ermittelte Transfektionseffizienz normalisiert.

2.9 Statistische Auswertungen

Mittels des Statistik-Software-Programms *Stat View 4.51* von SAS Institute wurden alle signifikanten Unterschiede durch eine Varianzanalyse [ANOVA] erhoben. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angesehen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung [S.D.] dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkung von Etomidat und dessen Derivaten auf die Steroidogenese

3.1.1 Ergebnisse der Hormonanalysen

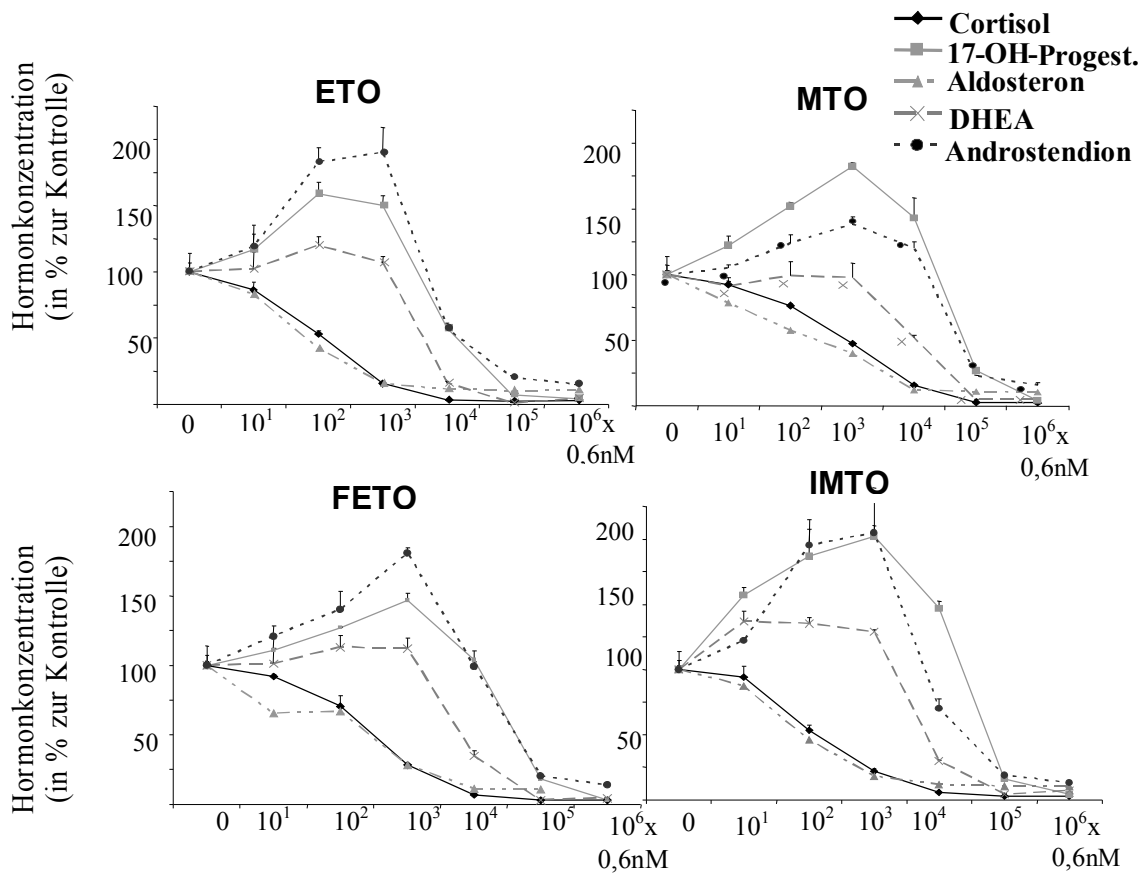
Alle Substanzen führten zu einer potenten dosisabhängigen Hemmung der adrenalen Steroidbiosynthese mit einer Blockade von 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) (IC₅₀: ETO 6,8 nM, IMTO 6,95 nM, FETO 17,6 nM und MTO 51 nM) und in etwa gleichen Maßen der Aldosynthase (CYP11B2) sowie in höheren Konzentrationen auch des P450_{scc} Enzyms (CYP11A1) (> 0,6 μ M).

Die Inkubation der NCI-h295 Zellen mit ETO, IMTO, FETO und MTO führt zu einer signifikanten dosisabhängigen Suppression der Synthese von Cortisol.

Eine Anreicherung der vorgeschalteten Vorläuferhormone (17-OH-Progesteron, DHEA und Androstendion) zu Gunsten einer vermehrten Androgenproduktion war bei geringen Konzentrationen (0,6 nM – 0,06 μ M) zu beobachten (s. Diagramm 1).

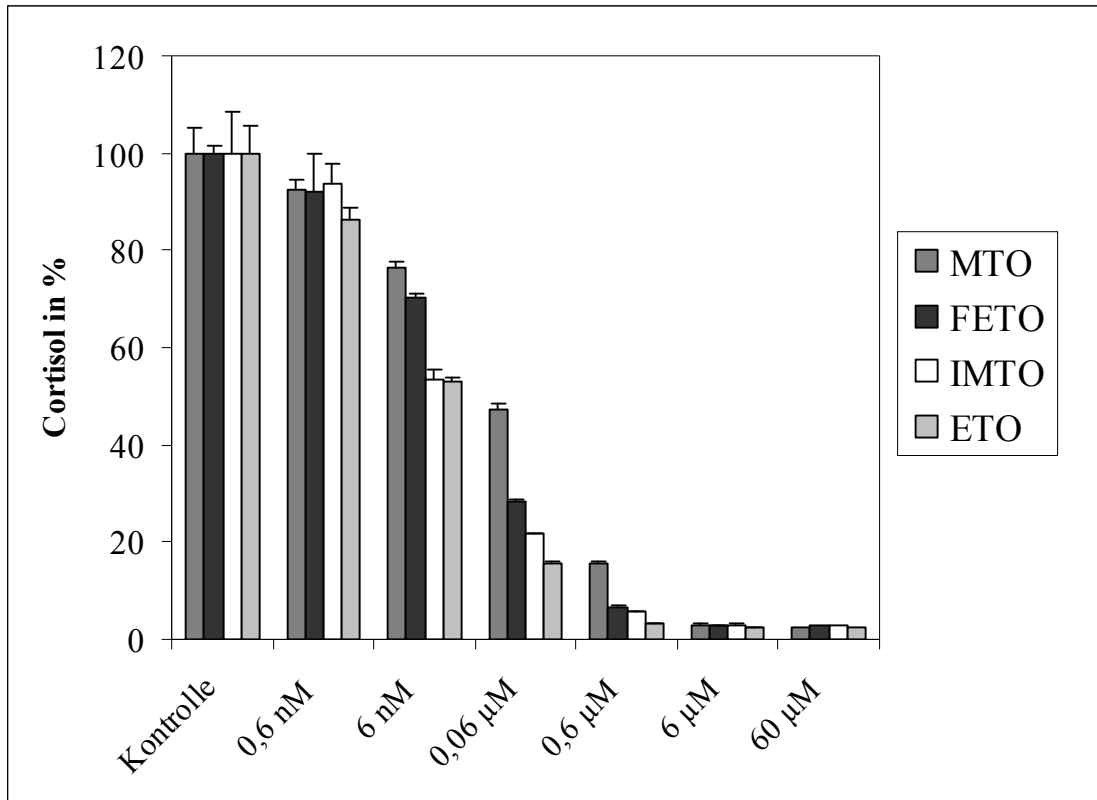
Folglich ist dies zunächst auf die Blockade der beiden P450-Enzyme, 11- β -Hydroxylase und Aldosynthase, zurückzuführen. Ab höheren ETO-, IMTO-, FETO- und MTO-Konzentrationen (> 6 μ M) versiegte die gesamte Hormonsynthese als Hinweis der Blockade des P450_{scc}-Enzyms. Im Vergleich zu seinen Analoga erwies sich ETO als potentester Inhibitor gefolgt von IMTO, FETO und zuletzt MTO.

Diagramm 1: Wirkung von Etomidat, Metomidat, Fluoretomidat und Iodmetomidat auf die Steroidbiosynthese der NCI-h295 Zellen



Dargestellt ist die Hormonsekretion von Cortisol, 17-OH-Progesteron, Aldosteron, DHEA und Androstendion in NCI-h295 Zellen nach 48-h Inkubation mit ETO, MTO, IMTO und FETO (0,6 nM-60 μ M). Jeder Ansatz wurde in Triplets durchgeföhrt. Die Werte sind als % zu den Kontrollzellen \pm Standardabweichung dargestellt.

Diagramm 2: Vergleich der Effekte von ETO, MTO, FETO und IMTO auf die Cortisolsynthese der NCI-h295 Zellen



Cortisolsynthese in % der Werte (\pm Standardabweichung) der unbehandelten Kontrollen (=100 %) nach 48-stündiger Inkubation von NCI-h295 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen ETO, MTO, FETO und IMTO.

Tabelle 4: Effekte von Etomidat, Metomidat, Fluoretomidat und Iodmetomidat auf die Steroidbiosynthese der NCI-h295-Zellen

	Cortisol	17-OH-P	DHEA-S	DHEA	Androstendion
Kontrolle	100±2,8	100±14,0	100±9,5	100±6,9	100±2,8
0,6 nM ETO	86±5,8	117±18,3	100±21,2	102±12,7	119±9,9
6 nM ETO	53±2,5	159±8,6	90±7,5	120±6,8	183±11,1
0,06 µM ETO	16±0,8	150±7,6	78±5,4	107±4,3	190±19,0
0,6 µM ETO	3±0,3	57±4,2	9±3,2	16±1,0	57±3,4
6 µM ETO	2±0,1	7±0,6	0±0	1±0,4	20±1,5
60 µM ETO	2±0,2	4±0,4	0±0	4±0,4	15±0,3
0,6 nM MTO	92±5,3	122±7,5	79±1,0	91±3,7	105±2,4
6 nM MTO	76±2,0	152±18,1	76±4,5	99±13,7	124±2,2
0,06 µM MTO	47±1,3	182±2,9	96±1,1	98±10,9	138±6,0
0,6 µM MTO	16±1,0	143±15,2	69±2,4	52±1,8	120±5,1
6 µM MTO	3±0,2	27±1,7	46±7,5	5±0,2	23±0,6
60 µM MTO	3±0,1	4±0,2	6±2,5	5±0,8	16±2,1
0,6 nM FETO	92±1,7	111±8,1	109±2,2	101±11,0	121±7,4
6 nM FETO	70±7,7	127±0,4	87±11,4	113±8,4	140±13,4
0,06 µM FETO	28±0,7	147±5,1	72±4,3	112±7,4	181±3,5
0,6 µM FETO	7±0,4	104±6,5	21±2,9	35±3,6	99±3,6
6 µM FETO	3±0,1	18±0,6	0±0	3±0,8	20±0,8
60 µM FETO	3±0,1	3±0,2	0±0	4±0,4	14±1,4
0,6 nM IMTO	94±8,5	157±5,9	125±10,3	137±7,7	122±2,4
6 nM IMTO	53±4,0	187±27,8	121±9,4	135±4,7	195±12,9
0,06 µM IMTO	22±2,1	202±37,4	128±3,6	129±1,4	205±5,2
0,6 µM IMTO	6±0,1	147±5,3	48±3,8	30±0,6	70±7,5
6 µM IMTO	3±0,2	16±1,4	25±8,2	4±0,6	19±0,8
60 µM IMTO	3±0,2	4±0,2	24±8,6	7±1,5	13±1,1

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von ETO, MTO, FETO und IMTO inkubiert. Die Daten sind als Mittelwerte in % der unbehandelten Kontrollzellen (=100 %) ± Standardabweichung dargestellt.

3.1.2 Wirkung auf die Proteinexpression der Steroidbiosyntheseenzyme

Die Blockade der Steroidbiosyntheseenzyme durch ETO, IMTO, FETO oder MTO (60 μM) hatte eine signifikante Steigerung der StAR und P450scc-Proteinexpression zur Folge, die nach 6 - 96 Stunden nachweisbar war. Verglichen zu den Kontrollzellen konnte nach einer Inkubation mit 60 μM für Eto eine gesteigerte StAR-Proteinexpression auf 216 % (± 48 % Standardabweichung), für IMTO auf 213 % (± 26 % S.D.) und für MTO auf 188 % (± 9 % S.D.) festgestellt werden. Einhergehend zeigte sich eine gesteigerte P450scc-Proteinexpression für ETO auf 152 % (± 36 % S.D.), für IMTO auf 180 % (± 23 % S.D.) und für MTO auf 131 % (± 3 % S.D.) Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte in % zu den Kontrollzellen [=100 %] nach 96 Stunden verglichen und densitometrisch bestimmt. Gleichsam war ein Anstieg des P450c17-Proteins in den NCI-h295 Zellen nach einer Inkubation mit 60 μM ETO zu beobachten. Eine Veränderung in der Proteinexpression der DHEA-Sulfotransferase (SULT2A1) hingegen war nicht zu sehen (s. Abbildung 6).

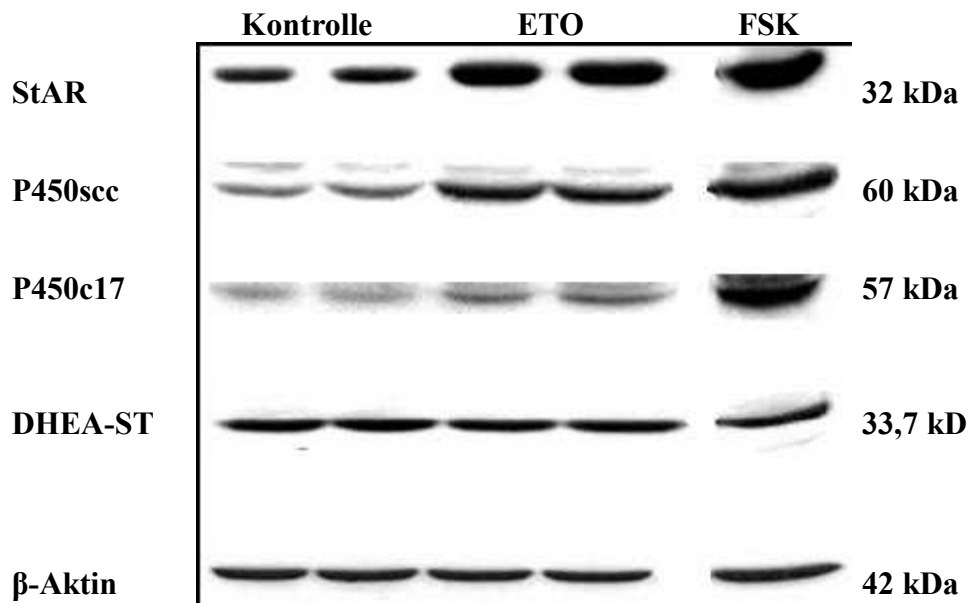
Ferner zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auch bei geringeren, nicht-sedierenden Dosen (0,06 - 0,6 μM) von ETO bzw. MTO eine vermehrte Expression des P450scc-Proteins (s. Abbildung 7).

Die vermehrte P450scc-Akkumulation konnte nicht durch eine exogene Substitution von Hydrokortison (20 μM) aufgehoben werden, sodass diese gesteigerte Proteinexpression nicht primär durch ein intrazelluläres Defizit an Glucocorticoid bedingt erscheint (s. Abbildung 8).

Dementsprechend hatten weder eine alleinige Hydrokortison- (5 μM und 15 μM) noch alleinige Dexamethasonsubstitution (100 nM) Auswirkungen auf die P450scc-Proteinexpression.

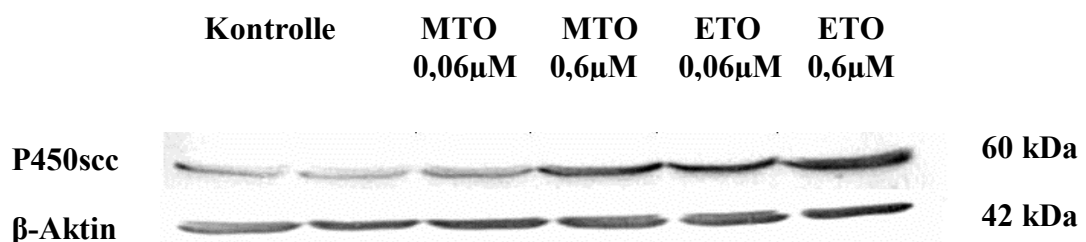
Durch die Zugabe von Cycloheximid (50 μM), einem Translationsinhibitor, war die nach ETO-Inkubation nachweisbare Erhöhung der Proteinmenge von P450scc und StAR nicht mehr nachweisbar (s. Abbildung 9).

Abbildung 6: Effekt von ETO auf die Protein-Expression der Steroidbiosyntheseenzyme StAR, P450scc, P450c17 und DHEA-Sulfotransferase (DHEA-ST/SULT2A1) nach 72-stündiger Inkubation



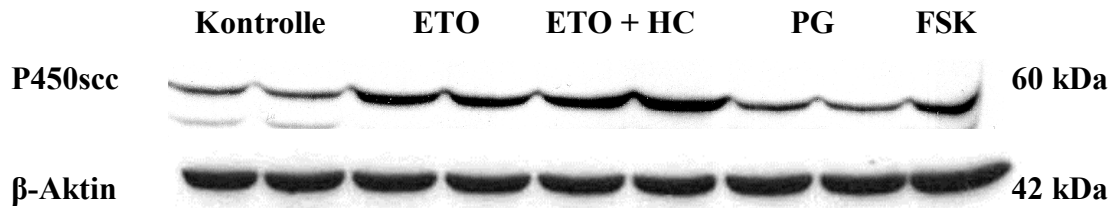
NCI-h295 Zellen wurden für 72 Stunden mit 60 μ M ETO oder mit 10 μ M Forskolin (FSK) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend nach der Laemmli-Methode aufbereitet. Die Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis folgten mittels Western-Blot-Verfahren.

Abbildung 7: Effekt von ETO und MTO auf die Proteinexpression von P450scc nach Inkubation mit nicht-hypnotischen Dosen



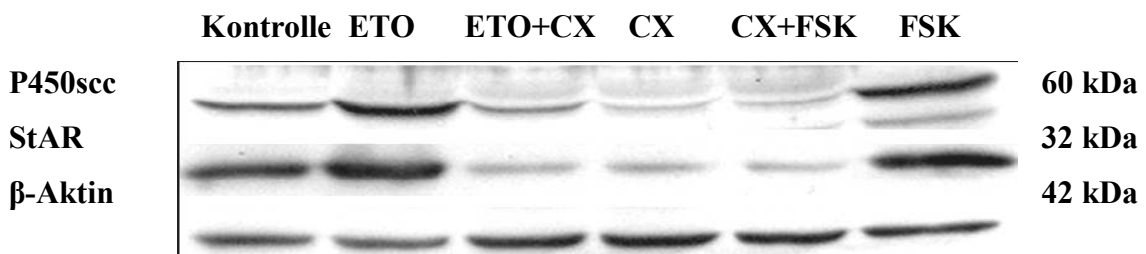
P450scc-Proteinexpression in den NCI-h295 Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation mit 0,06 - 0,6 μ M ETO bzw. MTO. Die Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis folgten mittels Western-Blot-Verfahren.

Abbildung 8: Effekt von ETO in Kombination mit Hydrokortison auf die Protein-Expression des Steroidbiosyntheseenzym P450scc nach 96-stündiger Inkubation



Protein-Expression der NCI-h295 Zellen nach Inkubation mit 60 μ M ETO allein oder in Kombination mit 20 μ M Hydrokortison (HC) sowie mit Propylenglykol (PG) bzw. 10 μ M Forskolin (FSK). Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

Abbildung 9: Effekt von ETO in Kombination mit Cycloheximid auf die Protein-expression von StAR und P450scc nach 96-stündiger Inkubation

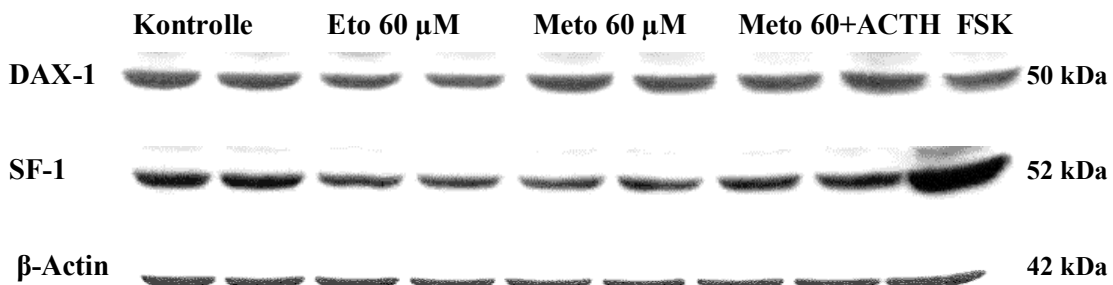


Expression des P450scc- und StAR-Protein in den NCI-h295 Zellen nach einer Inkubation mit 60 μ M ETO bzw. 10 μ M Forskolin (FSK) allein oder in Kombination mit 50 μ M Cycloheximid (CX). Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

3.1.3 Einfluss auf die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren SF-1 und DAX-1

Für SF-1 und DAX-1 zeigte sich nach Inkubation mit 60 μ M ETO und MTO eine tendenzielle jedoch nicht signifikante Verminderung der Proteinexpression gegenüber den Kontrollen (i.e.: p-Wert von 60 μ M ETO mit 0,07 und von 60 μ M MTO mit 0,45 für DAX-1 sowie 0,06 und 0,13 für SF-1). Die zusätzliche Substitution von ACTH hatte eine nur geringfügige Steigerung zur Folge. Als positiver Aktivator der Proteinexpression ließ sich für Forskolin (FSK) ein signifikanter Anstieg für SF-1 (p-Wert = 0,00), jedoch nicht für DAX-1 feststellen (s. Abbildung 10).

Abbildung 10: Effekte von ETO und MTO auf Transkriptionsfaktoren SF-1 und DAX-1 nach 96-stündiger Inkubation



NCI-h295 Zellen wurden für 96 Stunden mit 60 μ M Etomidat, 60 μ M Metomidat allein oder in Kombination mit ACTH sowie mit Forskolin (FSK) inkubiert. Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

3.1.4 Wirkung auf die mRNA-Expression der Steroidbiosyntheseenzyme, des StAR-Proteins und des ACTH-Rezeptors (MC2R)

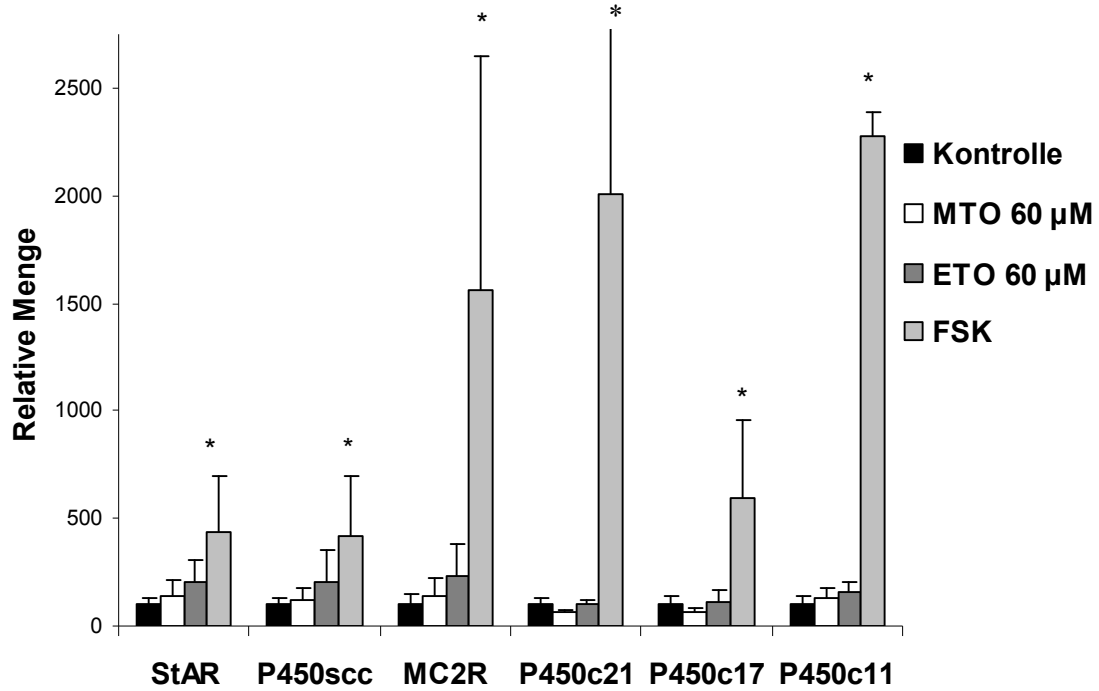
Nach einer 48-stündigen Inkubation führten ETO (60 μ M) und MTO (60 μ M) zu einer dosisabhängigen, aber nicht signifikanten Steigerung der mRNA-Expression von StAR, P450scc und MC2R. Die mRNA-Expression von P450c21, P450c17 und P450c11 der NCI-h295-Zellen hingegen blieb durch ETO und MTO im Wesentlichen unbeeinflusst.

Mit Forskolin (10 μ M) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. In diesen Zellen ließ sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der mRNA-Spiegel von StAR, P450scc, MC2R, P450c21, P450c11 und P450c17 nachweisen (s. Diagramm 3).

Nach Transfektion der NCI-h295 Zellen mit dem p(P450scc)GL3- bzw. p(MC2R)-GL3-Vektor, die den jeweiligen Promotor und ein Reportergen enthalten, wurde die Promotoraktivität von P450scc und MC2R gemessen. Die Kontrollzellen wurden mit einem leeren Vektor pGL3 transfiziert. Die Promotoraktivität der entsprechenden Gene zeigte keine signifikante Veränderung nach einer 2-48 stündigen Inkubation mit 60 μ M ETO, während sich durch Forskolinstimulation eine deutliche Aktivierung der untersuchten Promoter induzieren ließ. Die untransfizierten Kontrollzellen zeigten ebenfalls keine relevante Aktivität

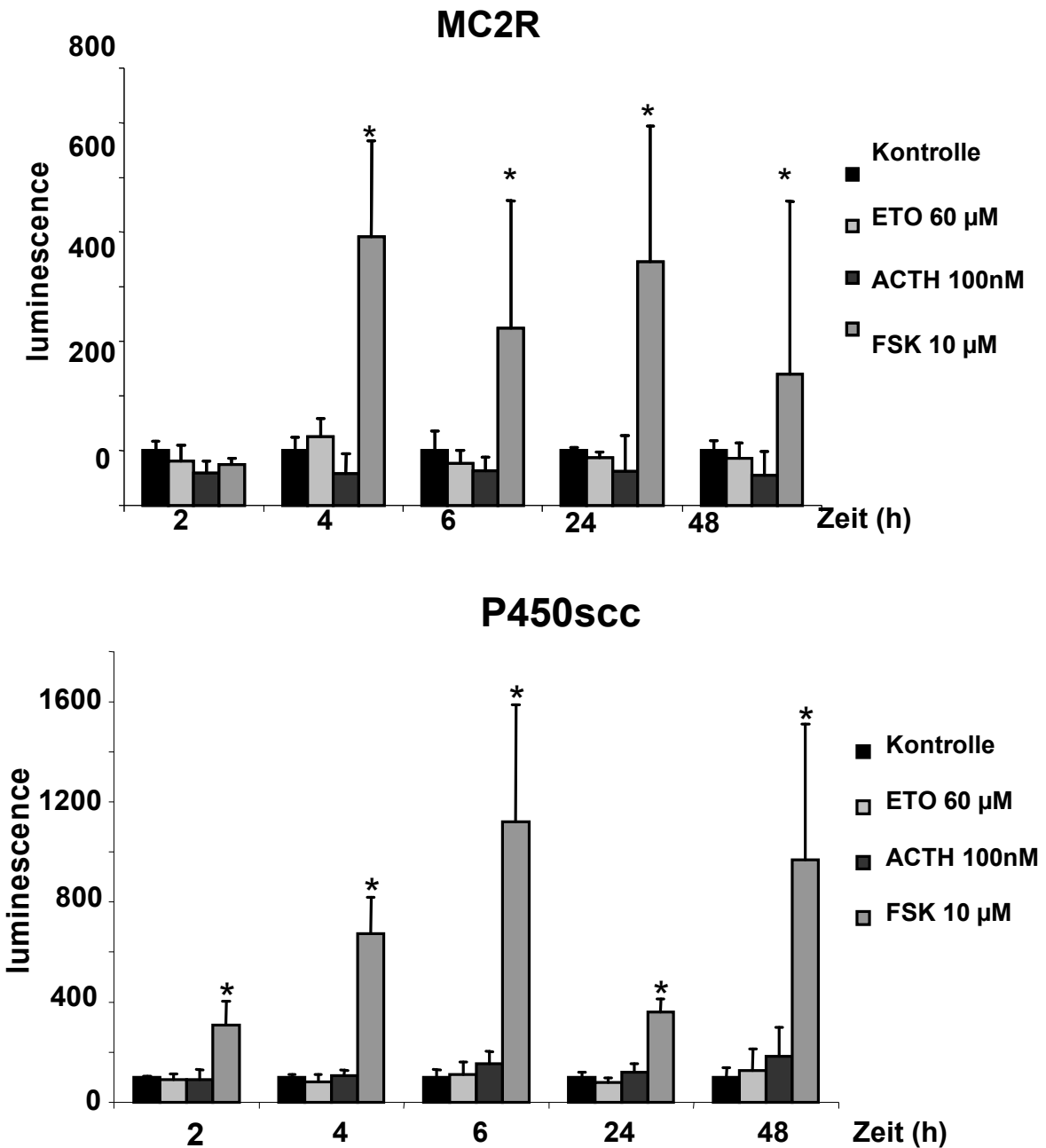
Als zweite Positivkontrolle wurde Synacthen (1-24ACTH) eingesetzt. Im Vergleich zu ETO führte eine Inkubation mit 100 nM Synacthen einerseits zu einer Verminderung der MC2R- und andererseits zu einer Aktivierung der P450 Promoteraktivität (s. Diagramm 4).

Diagramm 3: Effekte von ETO und MTO auf die mRNA-Expression einiger P450-Enzyme, StAR und des ACTH-Rezeptors (MC2R) in NCI-h295-Zellen



*Relative Quantifizierung der mRNA-Expression nach 48-stündiger Inkubation mit 60 µM ETO, 60 µM MTO bzw. 10 µM Forskolin (FSK). Die Zellen wurden in Triplets ausgesät. Anschließend folgten die RNA-Extraktion und der spezifische mRNA-Nachweis mittels Real time PCR. Die Daten sind als Mittelwerte in % der unbehandelten Kontrollzellen (=100%) ± Standardabweichung dargestellt; * = $p < 0,05$.*

Diagramm 4: Effekt von ETO, ACTH und Forskolin auf die Transkriptionsaktivität von humanen MC2R-pGL3basic und P450scc-pGL3basic



NCI-h295 Zellen wurden mit dem hMC2R- bzw. hP450scc-pGL3basic Vektor mittels des Lipofectamine-Delivery-System transfiziert. Die Kontrollzellen wurden mit einem leeren Vektor pGL3 transfiziert. Nach 2, 4, 6, 24 und 48-stündiger Inkubation mit ETO, ACTH bzw. FSK wurde die Transkriptionsaktivität mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System gemessen. (Dargestellt sind die Mittelwerte dreier voneinander unabhängige Experimente; * = $p < 0,05$).

3.2 Wirkung von Etomidat und dessen Derivaten auf das Zellwachstum

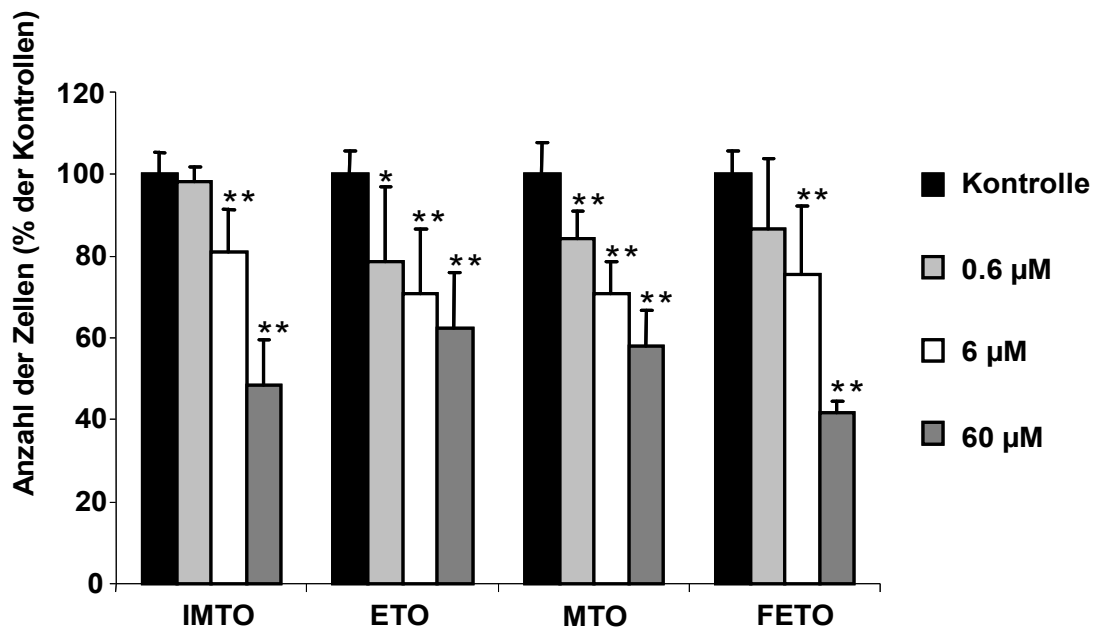
3.2.1 Wirkung der Adrenostatika in den Wachstumskurven

ETO, IMTO, FETO und MTO zeigten eine signifikante dosis- und zeitabhängige antiproliferative Wirkung auf die NCI-h295 Zellen in den *dye exclusion assays*

(IC50: ETO 0,25 μ M, IMTO 13,6 μ M, FETO 12,5 μ M und MTO 1,0 μ M)

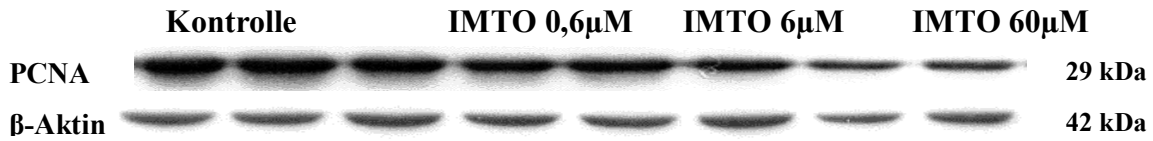
(s. Diagramm 5). Im Vergleich zu seinen Analoga erwies sich ETO als potentester Suppressor gefolgt von MTO, FETO und zuletzt IMTO. Passend dazu zeigte sich anhand durchgeführter Western Blot-Analysen eine dosisabhängige, leichtgradig verminderte Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA nach einer Inkubation mit ETO und dessen Derivaten (s. Abbildung 11).

Diagramm 5: Effekte von ETO, IMTO, FETO und MTO auf die Proliferation der NCI-h295-Zellen nach 6 Tagen



NCI-h295 Zellen wurden in Triplets über 8 Tage mit ETO, IMTO, FETO und MTO (0,6 - 60 μ M) inkubiert. Nach der Anfärbung mit Trypan-Blau fand die Zellzählung an den Tagen 0, 2, 4, 6 und 8 mittels der Neubaur-Zählkammer statt. Die ermittelten Werte sind als Mittelwert in % zu den unbehandelten Kontrollzellen (=100%) \pm Standardabweichung dargestellt. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$

Abbildung 11: Wirkung von IMTO auf die Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA



Dosisabhängige Inhibition der Proteinexpression von PCNA in NCI-h295 Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation mit IMTO (0,6 - 60 µM). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für MTO und ETO gesehen (Daten nicht dargestellt). Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

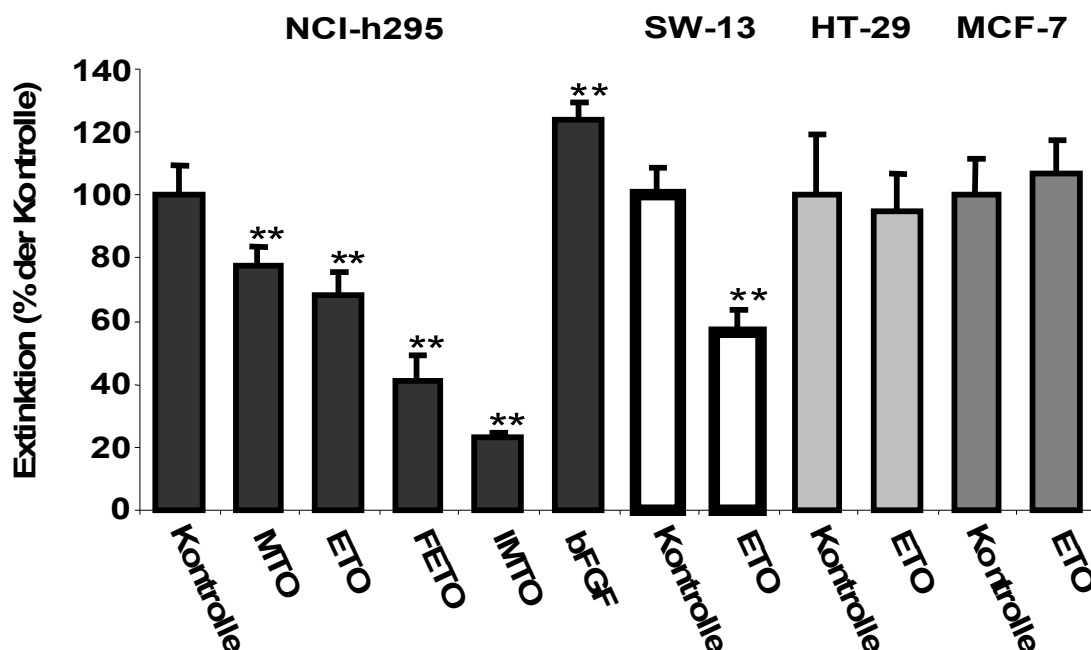
3.2.2 Bestätigung der antiproliferativen Wirkung der Adrenostatika mittels des MTT-Tests

Der in den Wachstumskurven nachgewiesene antiproliferative Effekt von ETO, MTO, IMTO und FETO konnte mittels MTT-Tests bestätigt werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigte sich eine hoch signifikante Wachstumshemmung bei allen untersuchten Substanzen ($p < 0,01$) in den NCI-h295 Zellen.

Zudem war eine signifikante Inhibition der Proliferation bei der humanen NNR-Karzinom-Zelllinie SW-13 durch ETO (60 µM) nachweisbar ($p < 0,05$).

Bei den beiden nichtadrenalen Karzinom-Zelllinien HT-29 (Colon-Ca) und MCF-7 (Mamma-Ca) war keine antiproliferative Wirkung durch ETO, MTO, IMTO und FETO festzustellen (s. Diagramm 6).

Diagramm 6: Effekte auf das Wachstumsverhalten im MTT-Test verschiedener Karzinom-Zelllinien nach 96-stündiger Inkubation



NCI-h295 Zellen und SW-13 humane adrenokortikale Karzinomzellen, wie auch humane HT29-Kolon-Ca- und humane MCF-7 Mamma-Ca-Zellen wurden über 4 Tage in 96-well Mikrotiterplatten mit jeweils ETO, MTO, IMTO, FETO und bFGF inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl indirekt über die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt, die die MTT-Substanz in photometrisch bestimmbares Formazan umwandeln. Die Extinktion bei 570 nm wurde mit Hilfe des ELISA Plate Reader ermittelt.

Die ermittelten Daten sind als Mittelwert in % zu den unbehandelten Kontrollzellen (=100%) \pm Standardabweichung dargestellt. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$

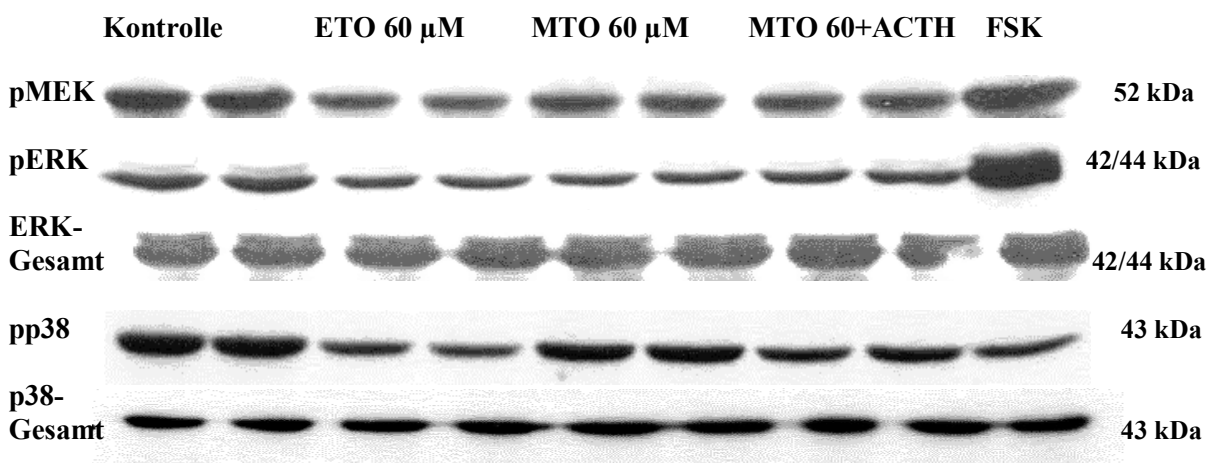
3.2.3 Wirkung der Adrenostatika auf an der Zellproliferation beteiligte Signaltransduktionsprozesse

Etomidat, Metomidat und Iodmetomidat führten auf der Signaltransduktionsebene zu einer verminderten Phosphorylierung der in die mitogenen Signalwege involvierten MAP-Kinasen ERK-1 und -2 sowie p38. Ein Einfluss auf die SAP-Kinase/JNK oder den Proteinkinase B-Weg ließ sich hingegen nicht detektieren. Die Inkubation mit Forskolin hatte eine stark vermehrte ERK- und p38-Aktivierung zur Folge.

Weiterhin zeigte sich durch die Behandlung mit ACTH ein nur gering vermehrter Anstieg der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit MTO. Unterschiede in der Proteinexpression der unphosphorylierten Kinasen waren nicht zu sehen (s. Abbildung 11 und 12).

Abbildung 11: Effekte von ETO und MTO auf der Signaltransduktionsebene nach 96-stündiger Inkubation

MAP-Kinasen



SAP-Kinase

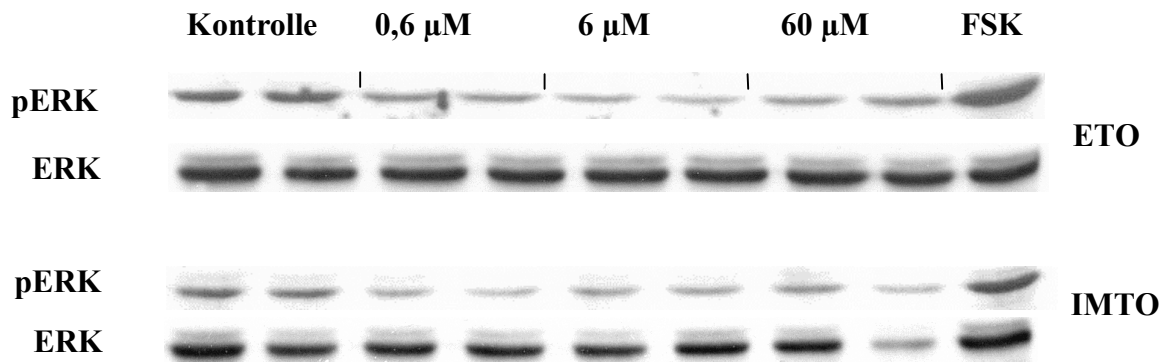


Proteinkinase B-Signalweg



Analyse der Proteinexpression und des Phosphorylierungsniveaus in mitogene Signaltransduktionswege involvierter MAP-Kinasen im Vergleich zur SAP-Kinase und dem Proteinkinase B-Signalweg. NCI-h295 Zellen wurden für 96 Stunden mit 60 μ M Etomidat, 60 μ M Metomidat allein oder in Kombination mit ACTH sowie mit Forskolin (FSK) inkubiert. Die Aktivierung (Phosphorylierung) wurde mittels Western Blot detektiert.

Abbildung 12: Effekte von ETO und IMTO auf die MAP-Kinase ERK-1 und -2 nach 96-stündiger Inkubation



Analyse der Proteinexpression und des Phosphorylierungsniveaus in mitogene Signaltransduktionswege involvierter MAP-Kinasen (pERK und ERK). NCI-h295 Zellen wurden für 96 Stunden mit 0,6, 6 und 60 µM Etomidat und Iodmetomidat sowie mit Forskolin (FSK) inkubiert. Die Aktivierung (Phosphorylierung) wurde mittels Western Blot detektiert.

4. Diskussion

4.1 Steroidogenese

4.1.1 Effekte von ETO, MTO, IMTO und FETO auf die Regulation der P450-Enzyme, StAR- und ACTH-R-Expression

In vivo unterliegt die Glukokortikoidsynthese der Nebenniere v.a. dem Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Hierbei aktiviert die ACTH-Freisetzung eine Kaskade intraadrenaler Signalwege, die letztendlich mit einer gesteigerten Steroidbiosynthese einhergeht (208, 209). Ferner unterliegt die Proteinexpression von StAR und anderer Steroidbiosyntheseenzyme v.a. einer ACTH-Stimulation (31, 210, 211). Allerdings ist bis dato wenig über ACTH-unabhängige zelluläre Kontrollmechanismen der adrenalen Steroidbiosynthese bekannt.

In dieser Arbeit zeigten wir, dass Etomidat und seine Analoga (Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat) pleiotrope Effekte auf die Nebenniere aufwies. Durch die Blockade der P450c11- sowie P450aldo- und in höheren Konzentrationen der P450scc-Enzymaktivität übten alle Substanzen eine hoch potente, dosisabhängige adrenostatische Wirkung auf die Nebenniere aus. Im Vergleich zu seinen Analoga erwies sich ETO als potentester Inhibitor gefolgt von IMTO, FETO und zuletzt MTO. Ferner ging die Hemmung der Steroidbiosynthese mit einem signifikanten Anstieg der Proteinspiegel von StAR und P450scc einher. Ebenfalls erwies sich ETO als potentester Induktor der Proteinexpression im Vergleich zu seinen Derivaten (s. Abbildung 6 u. 7).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die vermehrte Proteinexpression ist ein durch ETO bzw. dessen Analoga bedingter intrazellulärer Cortisolmangel. *In vivo* wird infolge eines fehlenden negativen Feedbacks vermehrt ACTH in der Hypophyse freigesetzt, das wiederum die cAMP-abhängige PKA-Signalkaskade aktiviert (5). Eine gesteigerte StAR-Proteinexpression wird bekanntermaßen durch eine Aktivierung beider Proteinkinase A- und Proteinkinase C-Signalwege beschrieben (34, 212). *In vitro* kommt es jedoch nicht zur Aktivierung dieser corticotropen Achse. Folglich ist ein durch ETO bzw. dessen Analoga bedingter intrazellulärer Cortisolmangel zu erwägen, der über andere Mechanismen als ACTH zur vermehrten Aktivierung der

Steroidbiosynthese führt. In Übereinstimmung mit früheren Studien (34) konnten wir jedoch keine Veränderung in der Proteinexpression von P450_{scc} und StAR durch eine zusätzliche Gabe von Dexamethason oder Hydrocortison demonstrieren. Demzufolge scheint Cortisol kein direktes intrazelluläres Feedback auf die adrenale Steroidbiosynthese bzw. Proteinexpression auszuüben.

Eine weitere mögliche Erklärung für die gesteigerte Proteinexpression von StAR und der Steroidbiosyntheseenzyme könnte ein durch die Enzymhemmung bedingter Überschuss an Vorläuferhormonen wie Progesteron und DHEA sein (s. Diagramm 1). Die Arbeit von *Asif et al.* (213) konnte eine gesteigerte StAR-Proteinexpression nach einer Inkubation mit DHEA-S in den adrenokortikalen NCI h295 Tumorzellen zeigen. In einer weiteren Studie von *Schwarzenbach et al.* (214) konnte auch für Progesteron eine gesteigerte StAR-Proteinexpression dokumentiert werden. Es wäre demnach denkbar, dass ETO, MTO, IMTO und FETO in nicht-hypnotischen Dosen (0,6 mM-0,06 µM), die noch eine Aktivität von P450_{scc} zulassen, während die Aktivität von 11-beta-Hydroxylase und Aldosteronsynthase bereits blockiert ist, eine durch DHEA bzw. Progesteron-bedingte Induktion der StAR-Proteinexpression bewirken. Dies erklärt jedoch nicht die gesteigerte StAR-Proteinexpression bei höheren Konzentrationen von ETO bzw. dessen Derivaten beim parallel beobachteten Ausbleiben der gesamten Steroidbiosynthese infolge der zusätzlichen Blockade des P450_{scc}-Enzyms. Folglich sind weitere intraadrenale Regulationsmechanismen in der Proteinexpression beteiligt.

In zahlreichen Studien werden auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene verschiedene Regulationsmechanismen der Expression von StAR und der Steroidbiosyntheseenzyme sowie des ACTH-Rezeptors dargestellt. Im Folgenden wird auf einige Beispiele näher eingegangen.

In den Arbeiten von *King et al.* (215) und *Christenson et al.* (216) werden Oxysterole als Regulatoren der Proteinexpression von StAR beschrieben. Oxysterole entstehen infolge Oxidation von Cholesterol durch spezifische Hydroxylasen verschiedener Zellen. Mit Hilfe des Transkriptionsfaktors *Liver X receptor alpha* [LXR α] und einem *Sterol regulatory element binding protein* [SREBP] *cleavage-activating* Protein [SCAP] sind Oxysterole an der Regulation der Cholesterol- bzw. Lipidhomöostase beteiligt. In den murinen adrenokortikalen Zellen Y1 und den Leydigtumorzellen MA-10 führte die

Inkubation mit Oxysterolen zu einem raschen Anstieg der StAR-Proteinkonzentration. Erst nach einer länger anhaltenden Inkubation der Zellen war eine geringe Vermehrung der mRNA-Konzentration von StAR ohne eine direkte Beeinflussung der Promoteraktivität zu beobachten (216).

Im Gegensatz zu den Oxysterolen induzierten Lipoproteine wie das LDL bzw. HDL eine Steigerung der Proteinexpression von StAR durch Aktivierung der eigenen Promoteraktivität. Studien des StAR-Promoters mit den murinen adrenokortikalen Tumorzellen Y1-BS1 zeigten, dass der Transkriptionsfaktor SF-1 an der LDL-/HDL-induzierten Promoteraktivität beteiligt ist (217). Ferner wurde ein Anstieg der StAR-Proteinexpression und in geringerem Maße der mRNA-Konzentration durch das aus der Lipoproteinsynthese stammende Cholesterol beschrieben (209). Oxysterole scheinen demnach die StAR-Aktivität und die Steroidogenese auf posttranskriptionaler Ebene zu regulieren, während Lipoproteine auf transkriptionaler Ebene regulieren.

Entsprechend den Ergebnissen von *King et al.* (215) und von *Reyland et al.* (217) konnten auch wir eine gesteigerte Induktion der Proteinexpression von StAR wie auch des P450_{scc}-Enzyms (CYP11A1) nach Inkubation der NCI-h295-Zellen mit Etomidat und dessen Derivaten zeigen, während sich ein nur geringer Anstieg der mRNA-Konzentration bei ausbleibender Stimulation der Promoteraktivität zeigte. Schlussfolgernd scheinen translationale Prozesse mehr als transkriptionale Prozesse ursächlich zu sein. Demzufolge scheint die posttranskriptionale Regulation der Enzymexpression, die für eine schnelle „akute“ Veränderung der Proteinspiegel verantwortlich ist, eine essentielle Rolle in der Steroidbiosynthese zu besitzen. Es ist demnach vorstellbar, dass hierdurch eine schnelle intrazelluläre Adaptation zum Erhalt der Homöostase in den steroidogenen Zellen bewirkt wird.

In dieser Arbeit zeigte sich zudem, dass ETO und dessen Derivate auch Auswirkungen auf die Expression des ACTH-Rezeptors in den NCI-H295-Zellen besitzen. Nach einer 48-stündigen Inkubation induzierten ETO (60 µM) und MTO (60 µM) eine gesteigerte mRNA-Expression des MC2R (s. Diagramm 3). Die Aktivität des MC2R-Promoters hingegen zeigte keine signifikante Veränderung. Bekanntermaßen wird der MC2R vorwiegend in der Nebenniere exprimiert (5). Seine Expression wird durch seinen eigenen Liganden, ACTH, via dem cAMP-abhängigen Signalweg hochreguliert (6, 12).

In der Literatur wird die Beteiligung verschiedener nuklearer Transkriptionsfaktoren an der Regulation der ACTH-Rezeptorexpression beschrieben.

Die Arbeit von *Beuschlein et al.* (218) demonstrierte, dass AP-1 an der vermittelten cAMP-abhängigen MC2R-Expression beteiligt ist. Für zwei weitere Faktoren, SF-1 und DAX-1 konnte ebenfalls die besondere Bedeutung für die Entwicklung und die spezifische Funktion der Nebenniere dargestellt werden. Erfahrungsgemäß aktiviert SF-1 die Transkription mehrerer Cytochrom-P450-Enzyme (219-223), des MC2Rs (12, 218, 224) und von StAR (210). Sowohl für die P450- als auch für den MC2R-Promoter konnten Bindungsstellen für SF-1 nachgewiesen werden. Mutationen von SF-1 gingen u.a. mit verminderter ACTH-Rezeptorexpression (218) und CYP17-Genexpression (225, 226) einher.

Zwermann et al. (46) demonstrierten zudem, dass die mRNA-Expression von DAX-1 und MC2R negativ miteinander korrelierten. *In vitro* verminderte die DAX-1 Expression die humane und murine MC2R-Promoteraktivität um 89 bzw. 55 %. Dementsprechend interagiert DAX-1 mit SF-1 und antagonisiert die SF-1-vermittelte Gentranskription. Allerdings waren Mutationen der SF-1-Bindungsstelle innerhalb des humanen MC2R-Promoters auch mit einer verminderten bzw. aufgehobenen DAX-1-Inhibition assoziiert. Somit wird die DAX-1-Expression durch SF-1 aktiviert (46, 227). Desweiteren werden für ACTH selbst Einflüsse auf die mRNA- und Proteinexpression von SF-1 und DAX-1 beschrieben. Entsprechend ihrer antagonistischen Wirkung führt ACTH zu einer vorübergehenden Suppression von DAX-1 bei gleichzeitiger Induktion von SF-1 mit Folge einer gesteigerten Genexpression der Steroidbiosynthese relevanter Proteinen (224).

Entsprechend diesen Daten wäre es demnach vorstellbar, dass ETO, MTO, IMTO und FETO auch auf transkriptionaler Ebene ihre adrenostatische Wirkung ausüben. Aus diesem Grunde wurden die Proteinexpression von SF-1 und DAX-1 untersucht, wobei nach Inkubation mit ETO und MTO eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung der Proteinexpression gegenüber den Kontrollen zu sehen war (s. Abbildung 10). Im Vergleich zu seinem Analogon war ETO am potentesten. Demzufolge scheinen die Imidazolanaloga an der transkriptionalen Regulation der Expression des ACTH-Rezeptors durch SF-1 und DAX-1 nicht wesentlich beteiligt zu sein. Es wäre demnach denkbar, dass ETO und dessen Derivate über andere nukleare

Transkriptionsfaktoren ihren Einfluss auf die ACTH-Rezeptorexpression ausüben. Diesbezüglich benötigt es noch weiterer Evaluationen.

Neben DAX-1 sind weitere „Cofaktoren“ der SF-1 induzierten Steroidenzym-Genexpression nachgewiesen worden. Die Untersuchungen von *Sewer et al.* (9) demonstrierten, dass eine *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* [MKP-1] -Aktivierung bzw. eine ERK-Aktivierung mit einer verminderten bzw. gesteigerten cAMP/PKA-induzierten hCYP17-Expression einherging. Bekannterweise ist SF-1 an der Regulation der cAMP/PKA-induzierten Gentranskription beteiligt. Folglich untersuchte die Gruppe um *Sewer* den Zusammenhang der gesteigerten MKP-1 bzw. ERK1/2-Expression mit der SF-1-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass eine ERK-Aktivierung mit einer verstärkten Phosphorylierung von SF-1 einherging mit nachfolgend gesteigerter cAMP/PKA-abhängiger Steroidbiosynthese. Als nukleäre Phosphatase hatte MKP-1 hingegen eine verminderte SF-1-Phosphorylierung zur Folge. Diese Daten demonstrierten, dass die Phosphorylierung von SF-1 eine wesentliche Rolle in der cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktion spielt. Passend zu diesen Beobachtungen führte eine Inkubation von ETO, MTO, IMTO und FETO zu einer verminderten Proteinexpression der phosphorylierten MAP-Kinase ERK 1 und 2. Allerdings ist hiermit die gesteigerte Proteinexpression von P450_{scc} und StAR nicht erklärt. Möglicherweise beruht die Steigerung der StAR- und P450_{scc}-Proteinexpression auf einer vermehrten Proteinkinase C-Aktivierung infolge einer durch ETO und dessen Analoga induzierten Inhibition der cAMP/PKA-Signalkaskade.

Jo et al. (34) konnten zeigen, dass in Leydig-Tumorzellen eine Inhibition von PKC mit einer signifikanten Verminderung der Steroidbiosynthese, der Phosphorylierung des *cAMP-responsive element binding* [CREB] Proteins und der Gentranskription von StAR einherging. Daraus läßt sich schließen, dass die intraadrenale Regulation sowohl der Proteinexpression als auch der Steroidbiosynthese durch das Zusammenspiel beider Proteinkinasen A und C bestimmt wird.

Ferner hatte eine Inhibition der steroidogenen Enzyme durch Etomidat und dessen Analoga eine Akkumulation der Substrate zur Folge. Möglicherweise spielt die vermehrte Verfügbarkeit der einzelnen Substrate eine weitere entscheidende Rolle in

der intraadrenalen Regulation der Steroidogenese unabhängig von der ACTH-induzierten Stimulation. In den Arbeiten von *Gonzales et al.* (228) und *Kühn-Velten et al.* (229) wurde durch eine vermehrte Substratbindung eine Stabilisierung einiger P450-Cytochrom-Enzyme gezeigt, so dass hier ein weiterer, möglicher Erklärungsansatz für die Substratanreicherung als Stabilisierungsfaktor des P450-Proteins zu finden ist. Ferner konnten wir zeigen, dass die Zellen, die mit ETO und Cycloheximid kombiniert inkubiert waren, einen höheren StAR-Proteinspiegel aufwiesen im Vergleich zu den Zellen mit einer Cycloheximid-Monoinkubation. Eine Inkubation mit dem Proteintranslationsinhibitor Cycloheximid hatte keine ähnlich vermehrte Proteinexpression zur Folge. Demzufolge scheint eine Substratakkumulation zur Proteinstabilisierung führen bzw. ETO selbst eine proteinstabilisierende Wirkung zu besitzen. Somit wäre es denkbar, dass die Aktivierung der Translation für die gesteigerte Proteinexpression ursächlich sein könnte. Alternativ könnte jedoch auch eine Stabilisierung der Proteine ursächlich sein, was anhand der vorliegenden Daten nicht sicher auszuschließen ist.

4.2 Effekte der Adrenostatika auf das Wachstumsverhalten

In den Zellproliferationsexperimenten zeigte sich sowohl für ETO als auch für MTO, IMTO und FETO eine signifikante dosis- und zeitabhängige Suppression der Zellproliferation selbst schon in nicht-hypnotischen Konzentrationen von 6 μM . Im Vergleich zu seinen Analoga erwies sich ETO als potentester Suppressor gefolgt von MTO, FETO und zuletzt IMTO (s. Diagramm 5). Eine Substitution mit Hydrocortison bzw. Dexamethason konnte diesen antiproliferativen Effekt nicht aufheben, sodass ein intrazelluläres Glucocorticoiddefizit per se keine Relevanz bezüglich der proliferativen Aktivität der untersuchten adrenokortikalen Zellen besitzt.

Es stellte sich daher die Frage, ob der proliferationshemmende Effekt durch das Überangebot an Vorläuferhormonen bzw. Androgenen hervorgerufen wird (s. Diagramm 1). In der Arbeit von *Zatelli et al.* (44) konnte gezeigt werden, dass die humane adrenocortikale Tumorzelllinie NCI-H295 Androgenrezeptoren exprimiert und dass eine Inkubation mit Dihydrotestosteron [DHT] mit einer signifikant reduzierten

Zellproliferation einherging. Ferner demonstrierten sie die Androgenauswirkung auf die Produktion des *Transforming growth factor-beta 1*. Eine Inkubation mit DHT führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der mRNA- und Proteinexpression von TGF- β 1 mit Folge einer erheblichen Abnahme der Zellproliferation. Somit wird der inhibitorische Effekt von DHT durch die Induktion des TGF- β 1-Produktion bestätigt. Wie bereits erwähnt, führte die Inkubation von NCI-H295-Zellen mit ETO, MTO, IMTO und FETO ebenfalls zu einer gesteigerten Konzentration an Androgenvorläufern (v.a. DHEA und Androstendion). Dank der Inhibition der 11 β -Hydroxylase wäre demnach eine gesteigerte TGF- β 1-Produktion durch ETO und dessen Analoga zu erwarten.

Zudem konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die antiproliferative Aktivität der getesteten Imidazolanaloga mit einer signifikanten Hemmung der ERK-1/2 und P38-Phosphorylierung und somit mit einer Hemmung des mitogenen MAPK-Signaltransduktionsweges wie auch der vorgeschalteten MEK-Kinase korrespondierte. Im Vergleich zu seinen Analoga erwies sich ETO als potentester Suppressor. Ein Einfluss auf die SAP-Kinase/JNK oder den Proteinkinase B-Weg ließ sich hingegen nicht detektieren (s. Abbildung 11 u. 12).

Der MAP-Kinase-Weg bezeichnet einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg, der unter anderem an der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt ist (230-232). MAP-Kinasen werden von ihren Aktivatoren, *MAP-KK*, phosphoryliert und akkumulieren im Zellkern, wo sie nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren (s. Abbildung 1). Demnach könnte die beobachtete verminderte Zellproliferation zusätzlich aus einer Abnahme der Aktivität der MEK- bzw. ERK-1/2-Proteinkinase resultieren.

In der Literatur existieren zahlreiche Daten einer inversen Korrelation zwischen der steroidogenen Aktivität und der Proliferation in steroidogenen Zellen. *Fassnacht et al.* (22) demonstrierten eine verminderte Steroidsekretion in den NCI-h295 Zellen nach Induktion der Zellproliferation durch 1-28 N-POMC, welche mit einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK-1 /-2 assoziiert war. Dagegen hatte eine ACTH-Substitution eine signifikante Verminderung der Zellzahl zur Folge.

In ähnlicher Weise zeigten *Schulte et al.* (124) eine vermehrte BrdU-Anfärbung als Indikator erhöhter proliferativer Aktivität in den Gewebeschnitten der Nebennierenrinde embryonaler Mäuse, die vor allem keine spezifischen adrenalen Marker der Steroidogenese exprimierten.

Entsprechend diesen Daten konnten auch wir in dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung der steroidogenen Enzymaktivität zu einer gesteigerten Proteinexpression dieser Steroidbiosynthese-Enzyme bei gleichzeitiger Abnahme der Zellproliferation führte (s. Abbildung 6-8 sowie Diagramm 3, 5). Möglicherweise nimmt die Zellproliferation zu Gunsten der Aufrechterhaltung einer adäquaten Steroidbiosynthese wie auch Zelldifferenzierung ab. Dennoch ist dieser Zusammenhang weiterhin genauer zu evaluieren.

Neueste Untersuchungen deuten auf eine essentielle Rolle der MAPK in der Regulation der Cytochrom P450 Gene hin (231). Es zeigte sich, dass die Inhibition des ERK-Signalweges eine Hochregulation des CYP2B2 in primären Kulturen der Hepatozyten von Ratten zur Folge hatte. Ferner demonstrierten *Sewer* und *Waterman* (9), dass sowohl eine Überexpression des MKP1 [*mitogen activated protein kinase phosphatase 1*] als auch eine Dämpfung des ERK1/2 mit einer gesteigerten Expression des humanen CYP 17 in den NCI-h295 Zellen korrelierten. Somit wird ein möglicher inverser Zusammenhang zwischen der proliferativen Aktivität und der Steroidbiosynthese weiterhin unterstützt.

In den MTT-Tests ließ sich der dosisabhängige, proliferationshemmende Effekt von ETO, MTO, IMTO und FETO auf NCI-h295-Zellen ebenfalls darstellen. Erst in hohen Konzentrationen ließ sich für eine weitere adrenale Zellreihe (SW-13) eine Wachstumsverzögerung durch 60 μ M ETO feststellen. Unterdessen übten die Imidazolanaloga keine antiproliferative Wirkung auf die non-adrenalen HT-29- und MCF-7-Zellen aus, so dass die adrenale Wirkungsspezifität von ETO, MTO, IMTO und FETO hiermit bestätigt wird.

4.3 Etomidat und seine Derivate als Tracer in der adrenalen Bildgebung

Bei Patienten mit einem endokrin-inaktiven Tumor spielen die bildgebenden Verfahren eine entscheidende Rolle für die Identifizierung und Typencharakterisierung bzw. Diagnostik der Tumore. Bisherige Computertomographie- und Kernspintomographie-Studien stellen akkurate anatomische Verhältnisse von jeglichen Tumoren der Nebenniere dar und sind somit als Anhaltspunkte für die initiale Analyse der Charakterisierung dieser Läsionen anzusehen (169, 233-235).

Die Positron-Emissions-Tomographie bietet eine weitere Möglichkeit der *in vivo* Gewebescharakterisierung adrenaler Tumoren bezüglich ihrer Benignität und Malignität (170, 171, 234, 236). In bisherigen präklinischen und klinischen Analysen konnte erfolgreich dargestellt werden, dass ETO und dessen Analoga MTO, IMTO und FETO sich als Tracer gut eignen. Aufgrund ihrer nachgewiesenen hohen Bindungsaffinität zu den adrenalen Steroidbiosyntheseenzymen werden sie für die molekulare Bildgebung von adrenalen Gewebe eingesetzt, passend zu den vorliegenden Daten zur Inhibition der Hormonsynthese (insbesondere 11 β -Hydroxylase und p450_{scc}-Enzym s. Diagramm 1) (36, 160, 181, 183, 188). Als Voraussetzung der hohen Bindungsaffinität wurde eine intakte Estergruppe sowie die (R)-Konfiguration der Imidazolanaloga nachgewiesen (150). Entsprechend der Arbeit von *Wadsak et al.* (148) zeigten auch unsere Ergebnisse, dass *in vitro* IMTO wie auch FETO ähnliche Wirksamkeiten wie MTO und ETO aufwiesen. Demnach scheinen weder Iodination noch Fluorination die pharmakodynamischen Eigenschaften des Metomidats bzw. Etomidats signifikant zu beeinflussen.

Aufgrund ihrer gesteigerten adrenalen Traceraufnahme, ihrer pharmakokinetischen Eigenschaft (insbesondere lange Halbwertszeit von IMTO und FETO) (148, 150, 237) und ihrer verminderten Strahlendosis im Vergleich zur NP59-Bildgebung (180) erscheinen ETO und dessen Analoga vielversprechend für die zukünftige Darstellung der NNR-Neoplasien.

5. Zusammenfassung

Bisher wurde das Anästhetikum Etomidat in nicht-hypnotischer Konzentration als ein potentes adrenostatisch wirkendes Agens in der Therapie des Cushing-Syndroms erfolgreich eingesetzt. In letzter Zeit erwiesen sich die radioaktiv-markierten Analoga [¹¹C]-Metomidat, [¹³¹I]-Iodmetomidat und [¹⁸F]-Fluoretomidat als vielversprechende neue Radiotracer in der adrenalen Bildgebung. Aufgrund der geringen Informationen über die Wirkungsmechanismen dieser Analoga und aufgrund der Hinweise ihres adrenostatischen Effekts jenseits der direkten Blockade der steroidogenen Enzymen in der Nebenniere evaluierten wir in dieser vorliegenden Arbeit die Wirkungen von Etomidat und dessen Derivaten – Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat - auf die adrenale Funktion *in vitro*. Hierbei wurden die steroidale Hormonsekretion, die Zellproliferation und die Expression der Schlüsselregulatoren der adrenalen Steroidogenese sowie der Proliferation in den adrenokortikalen NCI-h295 Tumorzellen untersucht. Als Ergebnis zeigten Etomidat, Metomidat, Iodmetomidat und Fluoretomidat eine signifikante dosisabhängige Blockade der adrenalen Hormonsekretion durch Inhibition der 11-beta-Hydroxylase, der Aldosteronsynthase und der P450scc-Aktivität. Die Hemmung der Steroidogenese war mit einer gesteigerten Proteinexpression von StAR, P450scc und P450c17, jedoch nicht einer erhöhten Konzentration der jeweiligen mRNA assoziiert. Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen die vorbehandelten Zellen keine vermehrte Promotoraktivität des MC2R oder von P450scc auf. Ferner konnte die zunehmende Proteinexpression durch Cycloheximid aufgehoben werden. Diese Beobachtung indiziert, dass die gesteigerte Proteinexpression posttranskriptionalen Mechanismen unterliegt. Des Weiteren zeigten alle Komponenten eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung, die parallel mit einer verminderten Expression des Proliferationsmarker PCNA und mit einer Abnahme des phosphorylierten ERK [pERK] einherging.

Zusammenfassend weisen Etomidat und dessen Imidazol-Analoga pleiotrope Effekte auf die adrenale Funktion *in vitro* auf: die Inhibition der Steroidogenese hat eine gesteigerte Expression der steroidogenen Schlüsselenzyme und eine verminderte Proliferation zur Folge. Diese Veränderungen können als Anpassungsvorgänge zum Erhalt der Steroidogenese auf Kosten der adrenalen Proliferation interpretiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Leonhardt H** 1990 Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
2. **Classen M, DV, Kochsiek K., Schmiegel W et al** 2004 "Prinzipien der internistischen Diagnostik" aus Innere Medizin 5. Auflage: Urban & Fischer
3. **Böcker W, Denk H, Heitz PH** Nebennieren. In: Pathologie: Urban&Fischer Verlag, München 2004, 3. völlig überarbeitete Auflage
4. **Fleischhauer K** Nebennieren. In: Drenckhahn D, Zenker eds. Benninghoff: Anatomie: Urban und Schwarzenberg Verlag, 1994; Band 2: 200-208
5. **Schmidt RF, Lang F, Thews G** 2005 Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Springer Verlag, Berlin 29. Auflage
6. **Morita TM, Imai T, Murata Y, Kambe F, Funahashi H, Takagi H, Seo H** 1995 Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. *Endocr J* 42:475-480
7. **Arnaldi G, Mancini V, Costantini C, Giovagnetti M, Petrelli M, Masini A, Bertagna X, Mantero F** 1998 ACTH receptor mRNA in human adrenocortical tumors: overexpression in aldosteronomas. *Endocr Res* 24:845-849
8. **Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD** 1992 The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251
9. **Sewer MB, Waterman MR** 2003 CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem* 278:8106-8111
10. **Morimoto I, Yamamoto S, Kai K, Fujihira T, Morita E, Eto S** 2000 Centrally administered murine-leptin stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenal axis through arginine-vasopressin. *Neuroendocrinology* 71:366-374
11. **Castro MG, Estivariz FE, Iturriza FC** 1988 The regulation of the corticomelanotropic cell activity in aves. III--Effect of various peptides on the release of MSH from dispersed, perfused duck pituitary cells. Cosecretion of ACTH with MSH. *Comp Biochem Physiol C* 91:389-393
12. **Lebrethon MC, Jaillard C, Naville D, Begeot M, Saez JM** 1994 Regulation of corticotropin and steroidogenic enzyme mRNAs in human fetal adrenal cells by corticotropin, angiotensin-II and transforming growth factor beta 1. *Mol Cell Endocrinol* 106:137-143
13. **Nicol MR, Cobb VJ, Williams BC, Morley SD, Walker SW, Mason JI** 2004 Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates cortisol secretion from the H295 human adrenocortical tumour cell line via VPAC1 receptors. *J Mol Endocrinol* 32:869-877
14. **Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA** 1997 Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46:1235-1238
15. **Sreedharan SP, Patel DR, Huang JX, Goetzl EJ** 1993 Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 193:546-553
16. **Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S** 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106:1417-1425

17. **Estivariz FE, Carino M, Lowry PJ, Jackson S** 1988 Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *J Endocrinol* 116:201-206
18. **Gallo-Payet N, Payet MD** 2003 Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61:275-287
19. **Mesiano S, Jaffe EB** 1997 Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*:18:378-403
20. **Estivariz FE, Morano MI, Carino M, Jackson S, Lowry PJ** 1988 Adrenal regeneration in the rat is mediated by mitogenic N-terminal pro-opiomelanocortin peptides generated by changes in precursor processing in the anterior pituitary. *J Endocrinol* 116:207-216
21. **Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP** 1997 Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 272:29886-29891
22. **Fassnacht M, Hahner S, Hansen IA, Kreutzberger T, Zink M, Adermann K, Jakob F, Troppmair J, Allolio B** 2003 N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2171-2179
23. **Estivariz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ** 1982 Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiocortin peptides. *Nature* 297:419-422
24. **Selstam G, Rosberg S, Liljekvist J, Gronquist L, Perklev T, Ahren K** 1976 Differences in action of LH and FSH on the formation of cyclic AMP in the prepubertal rat ovary. *Acta Endocrinol*:81: 150-164
25. **Zhu X, Birnbaumer L** 1996 G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of Galoha (16) and evidence for a synergic interaction between Gbeta gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*:93:2827-2831
26. **Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM** 2006 cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J Mol Endocrinol* 37:81-95
27. **Stocco DM** 2001 Star protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*:63: 193-213
28. **Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J** 1998 The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* 12:428-441
29. **Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR** 2005 Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19:2647-2659
30. **Fleury A, Mathieu AP, Ducharme L, Hales DB, LeHoux JG** 2004 Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Steroid Biochem Mol Biol*:91:259-271
31. **Clark BJ, Combs R, Hales KH, Hales DB, Stocco DM** 1997 Inhibition of transcription affects synthesis of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 138:4893-4901
32. **Stocco DM, Clark BJ** 1996 Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17:221-244

33. **Cooke BA** 1999 Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic-AMP independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*:151:125-135
34. **Jo Y, King SR, Khan SA, Stocco DM** 2005 Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod* 73:244-255
35. **Ascoli M, Segaloff DL** 1989 Regulation of the differentiated functions of Leydig tumor cells by epidermal growth factor. *Ann N Y Acad Sci*:564:599-115
36. **Bergstrom M, Bonasera TA, Lu L, Bergstrom E, Backlin C, Juhlin C, Langstrom B** 1998 In vitro and in vivo primate evaluation of carbon-11-etomidate and carbon-11-metomidate as potential tracers for PET imaging of the adrenal cortex and its tumors. *J Nucl Med* 39:982-989
37. **Staels B, Hum DW, Miller WL** 1993 Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 7:423-433
38. **Penhoat A, Jaillard C, Saez JM** 1994 Regulation of bovine adrenal cell corticotropin receptor mRNA levels by corticotropin (ACTH) and angiotensin-II (A-II). *Mol Cell Endocrinol* 103:R7-10
39. **Voutilainen R, Miller WL** 1987 Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1590-1594
40. **Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S** 2001 Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:796-800
41. **Castelli M, Camps M, Gillieron C, Leroy D, Arkinstall S, Rommel C, Nichols A** 2004 MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha. *J Biol Chem* 279:44731-44739
42. **Lee TC, Miller WL, Auchus RJ** 1999 Medroxyprogesterone acetate and dexamethasone are competitive inhibitors of different human steroidogenic enzymes. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2104-2110
43. **Magee BJ, Gattamaneni HR, Pearson D** 1987 Adrenal cortical carcinoma: survival after radiotherapy. *Clin Radiol* 38:587-588
44. **Zatelli MC, Rossi R, degli Uberti EC** 2000 Androgen influences transforming growth factor-beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:847-852
45. **Ilvesmaki V, Voutilainen R** 1991 Interaction of phorbol ester and adrenocorticotropin in the regulation of steroidogenic P450 genes in human fetal and adult adrenal cell cultures. *Endocrinology* 128:1450-1458
46. **Zwermann O, Beuschlein F, Mora P, Weber G, Allolio B, Reincke M** 2000 Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 142:689-695
47. **Cherradi N, Capponi AM, Gaillard RC, Pralong FP** 2001 Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. *Endocrinology* 142:3302-3308

48. **Tanabe A, Naruse M, Nishikawa T, Yoshimoto T, Shimizu T, Seki T, Takagi S, Imaki T, Takano K** 2001 Autonomy of cortisol secretion in clinically silent adrenal incidentaloma. *Horm Metab Res* 33:444-450
49. **Cell Signaling Technology Inc** 2010 Mitogen - Activated Proteinkinase Signaling Cascades, created January 2002, revised November 2010. 2002-2010 Cell Signaling Technology, Inc
50. **Voutilainen R** 1998 Adrenocortical cells are the site of secretion and action of insulin-like growth factors and TNF-alpha. *Horm Metab Res* 30:432-435
51. **Verhoeven G, Cailleau J, Van Damme J, Billiau A** 1998 Interleukin-1 stimulates steroidogenesis in cultured Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*:57:51-60
52. **Wong M, Ikeda Y, Luo X, Caron KM, Weber TJ, Swain A, Schimmer BP, Parker KL** 1997 Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function. *Recent Prog Horm Res* 52:167-182; discussion 182-164
53. **Barrett PQ, Bollag WB, Isales CM, McCarthy RT, Rasmussen H** 1989 role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr Rev*:10:496-518.
54. **Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Wang W, Carling T, Lifton RP** 2011 K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331(6018):768-772
55. **Renz-Polster H KS, Braun J (Hrsg.)** 2004 Erkrankungen der Nebenniere. In: *Basislehrbuch Innere Medizin: Urban&Fischer Verlag, München* 2004. 3. Auflage Seiten: 780-791
56. **Nussey SS, Whitehead SA** 2001 "The adrenal gland" in *Endocrinology - An Integrated Approach*. Bios Scientific Publishers Ltd
57. **Silbernagel S, Despopoulos A** Hormone, Reproduktion. In: *Taschenatlas der Physiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart 2001; 5 komplett überarbeitete und neu gestaltete Auflage:
58. **Reincke M, Peter M, Sippell WG, Allolio B** 1997 Impairment of 11 beta-hydroxylase but not 21-hydroxylase in adrenal 'incidentalomas'. *Eur J Endocrinol* 136:196-200
59. **Rheume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, New MI, Labrie F** 1992 Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet* 1:239-245
60. **Sewer MB, Waterman MR** 2003 ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61:300-307
61. **Kenyon CJ, Young J, Gray CE, Fraser R** 1984 Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 58:947-949
62. **King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, Clark BJ, Orly J, Stocco DM** 1995 Steroid production after in vitro transcription, translation, and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 136:5165-5176

63. **Burgos-Trinidad M, Youngblood GL, Maroto MR, Scheller A, Robins DM, Payne AH** 1997 Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Mol Endocrinol* 11:87-96
64. **Spinas GA, Heitz PU** 2004 "Nebennierenrinde (NNR)" Eine Zusammenstellung der pathophysiologischen, pathobiochemischen, pathologischen und klinischen Grundlagen im Bereich Endokrinologie für das 3. und 4. Studienjahr der Medizin an der Universität Zürich. www.megruunizh.ch/j3/module/endokrinologie/
65. **Horn F** 2005 *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium* 4. Auflage:385-386
66. **Silbernagel S, Lang F** *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme Verlag Stuttgart 2001:1. Auflage
67. **Van den Berg F** 2005 *Angewandte Physiologie - Organsysteme verstehen und beeinflussen*. 2. Auflage:167-169
68. **Wehling M** 2005 Störungen der Nebennierenrinde aus *Klinische Pharmakologie*. 1:306-309
69. **Esteban NV, Yergey AL** 1990 Cortisol production rates measured by liquid chromatography/mass spectrometry. *Steroids*:55:152-158
70. **Alrt W, Stewart PM** 2005 Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism and action *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:293-313; viii. Review
71. **Abecassis M, McLoughlin MJ, Langer B, Kudlow JE** 1985 Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management. *Am J Surg* 149:783-788
72. **Korobkin M, Francis IR, Kloos RT, Dunnick NR** 1996 The incidental adrenal mass. *Radiol Clin North Am* 34:1037-1054
73. **Hedeland H, Ostberg G, Hokfelt B** 1968 On the prevalence of adrenocortical adenomas in an autopsy material in relation to hypertension and diabetes. *Acta Med Scand*:184: 211-214
74. **Aron DC, Kievit J** 2003 Adrenal incidentalomas. In: Schwartz A, Pertsemlidis D, Gagner M eds. *Endocrine Surgery*: Marcel Dekker, New York; 411-427
75. **Geelhoed GW, Druy EM** 1982 Management of the adrenal "incidentaloma". *Surgery* 92:866-874
76. **Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B** 1995 Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 16:460-484
77. **Boland GW, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MM, Mueller PR** 1998 Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. *AJR Am J Roentgenol* 171:201-204
78. **Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR** 2004 The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 25:309-340
79. **Aron DC** 2002 Endocrine incidentalomas. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*:29: 21-238.
80. **Fassnacht M** 2010 Nebennieren-Inzidentalom/Subklinisches Cushing-Syndrom: Wann besteht eine OP-Indikation? *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel - Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 3 (4):16-20
81. **Copeland PM** 1983 The incidentally discovered adrenal mass. *Ann Intern Med* 98:940-945

82. **Riede U, Saeger W** Nebennierenrinde In: Allgemeine und spezielle Pathologie: Thieme Verlag, Stuttgart 1999; 4. Auflage, aktualisierter Nachdruck
83. **Reincke M, Nieke J, Krestin GP, Saeger W, Allolio B, Winkelmann W** 1992 Preclinical Cushing's syndrome in adrenal "incidentalomas": comparison with adrenal Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 75:826-832
84. **Bernini G, Moretti A, Argenio G, Salvetti A** 2002 Primary aldosteronism in normokalemic patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 146:523-529
85. **Herold G** 2004 Innere Medizin. Seite: 651
86. **Krone J-R, Dufaux B, Zimmer M, Münstermann D, Lucht A, Thiele A, Becker K** 2011 Funktionstest: Captopriltest <http://www.laborkrone.de/funktionstests/details>.
87. **Ross NS** 1994 Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23:539-546
88. **Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Cesario F, Paccotti P, Angeli A** 1998 Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48:89-97
89. **Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S, Daffara F, Procopio M, Paccotti P, Borretta G, Angeli A** 2002 Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 87:998-1003
90. **Valli N, Catargi B, Ronci N, Vergnot V, Leccia F, Ferriere JM, Chene G, Grenier N, Laurent F, Tabarin A** 2001 Biochemical screening for subclinical cortisol-secreting adenomas amongst adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 144:401-408
91. **Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Gregianin M, Macri C, Boscaro M** 1998 Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *J Clin Endocrinol Metab* 83:55-62
92. **Charbonnel B, Chatal JF, Ozanne P** 1981 Does the corticoadrenal adenoma with "pre-Cushing's syndrome" exist? *J Nucl Med* 22:1059-1061
93. **Nader S, Hickey RC, Sellin RV, Samaan NA** 1983 Adrenal cortical carcinoma. A study of 77 cases. *Cancer* 52:707-711
94. **Ng L, Libertino JM** 2003 Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 169:5-11
95. **Soreide JA, Brabrand K, Thoresen SO** 1992 Adrenal cortical carcinoma in Norway, 1970-1984. *World J Surg* 16:663-667; discussion 668
96. **Weingartner K, Gerharz EW, Bittinger A, Rosai J, Leppek R, Riedmiller H** 1995 Isolated clinical syndrome of primary aldosteronism in a patient with adrenocortical carcinoma. Case report and review of the literature. *Urol Int* 55:232-235
97. **Allolio B, Fassnacht M** 2006 Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 91(6):2027-2037
98. **Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B** 2009 Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* 115(2):243-250.
99. **Vierhapper H, Heinze G, Gessl A, Exner M** 2003 Adrenocortical tumors: prevalence of impaired glucose tolerance and of "Paradoxical Rise" of cortisol during an oral glucose tolerance test. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111:415-420

100. **Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA** 2000 Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88:711-736
101. **Loncarevic IF, Hering A, Posorski N, Linden T, Hoyer H, Bucsky P** 2008 Number of genomic imbalances correlates with the overall survival for adrenocortical cancer in childhood. *Pediatr Blood Cancer* 51(3):356-362
102. **Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG** 2002 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87(7):3467-3474
103. **Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D** 2011 Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol* [Epub ahead of print]
104. **Custódio G, Komechen H, Figueiredo FR, Fachin ND, Pianovski MA, Figueiredo BC** 2011 Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol* [Epub ahead of print]
105. **Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y** 2001 Molecular Markers and Long-Term Recurrences in a Large Cohort of Patients with Sporadic Adrenocortical Tumors. *Cancer Res* 61(18):6762-6767
106. **Zenkert S, Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Allolio B, Reincke M** 2000 Steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in adrenal tumours. *Eur J Endocrinol* 142:294-299
107. **Grumbach MM, Biller BMK, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JKT, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS** 2003 NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med* 138:424-429.
108. **Tobias-Machado M, Rincon Rios F, Tulio Lasmar M, Tristao R, Herminio Forseto P, Jr., Vaz Juliano R, Wroclawski ER** 2006 [Laparoscopic retroperitoneal adrenalectomy as a minimally invasive option for the treatment of adrenal tumors]. *Arch Esp Urol* 59:49-54
109. **Palazzo FF, Sebag F, Sierra M, Ippolito G, Souteyrand P, Henry JF** 2006 Long-term outcome following laparoscopic adrenalectomy for large solid adrenal cortex tumors. *World J Surg* 30:893-898
110. **Owecki M, Majewska KA, Stawny B, Nikisch E, Drews M, Sowinski J** 2006 [Adrenal tumours in a selected 10-years surgical material]. *Pol Merkur Lekarski* 20:678-681
111. **Liao CH, Chueh SC, Lai MK, Hsiao PJ, Chen J** 2006 Laparoscopic adrenalectomy for potentially malignant adrenal tumors greater than 5 centimeters. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3080-3083
112. **Lee JA, Duh QY** 2006 Reoperation for adrenocortical neoplasms. *Curr Treat Options Oncol* 7:320-325
113. **Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, Ferman S, Piovezan GC, Lichtvan LL, Voss SZ, Stingham ST, Callefe LG, Parise GA, Santana MH, Figueiredo BC** 2006 Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. *J Pediatr Hematol Oncol* 28:513-524

114. **Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L** 2005 Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 12:657-666
115. **Gagner M, Lacroix A, Prinz RA, Bolte E, Albala D, Potvin C, Hamet P, Kuchel O, Querin S, Pomp A** 1993 Early experience with laparoscopic approach for adrenalectomy. *Surgery* 114:1120-1124; discussion 1124-1125
116. **Staren ED, Prinz RA** 1996 Adrenalectomy in the era of laparoscopy. *Surgery* 120:706-709; discussion 710-701
117. **Prinz RA, Brooks MH, Churchill R, Graner JL, Lawrence AM, Paloyan E, Sparagana M** 1982 Incidental asymptomatic adrenal masses detected by computed tomographic scanning. Is operation required? *Jama* 248:701-704
118. **Fassnacht M, Johanssen S, Fenske W, Weismann D, Agha A, Beuschlein F, Führer D, Jurowich C, Quinkler M, Petersenn S, Spahn M, Hahner S, Allolio B** 2010 Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively by specialized centers. *J Clin Endocrinol Metab* 95(11):4925-4932.
119. **Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, Kenn W, Hahner S, Allolio B, Flentje M** 2009 Radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer* 115(13):2816-2823
120. **Sabolch A, Feng M, Griffith K, Hammer G, Doherty G, Ben-Josef E** 2011 Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80(5):1477-1484
121. **Abraham J, Bakke S, Rutt A, Meadows B, Merino M, Alexander R, Schrupp D, Bartlett D, Choyke P, Robey R, Hung E, Steinberg SM, Bates S, Fojo T** 2002 A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma: continuous infusion doxorubicin, vincristine, and etoposide with daily mitotane as a P-glycoprotein antagonist. *Cancer* 94:2333-2343
122. **Williamson SK, Lew D, Miller GJ, Balcerzak SP, Baker LH, Crawford ED** 2000 Phase II evaluation of cisplatin and etoposide followed by mitotane at disease progression in patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer* 88:1159-1165
123. **McLeod MK, Thompson NW, Gross MD, Bondeson AG, Bondeson L** 1990 Sub-clinical Cushing's syndrome in patients with adrenal gland incidentalomas. Pitfalls in diagnosis and management. *Am Surg* 56:398-403
124. **Schulte HM, Benker G, Reinwein D, Sippell WG, Allolio B** 1990 Infusion of low dose etomidate: correction of hypercortisolemia in patients with Cushing's syndrome and dose-response relationship in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1426-1430
125. **Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Ali A, Piovesan A, Paccotti P, Angeli A** 1994 Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J Clin Endocrinol Metab* 79:1532-1539
126. **Wagner RL, White PF, Kan PB, Rosenthal MH, Feldman D** 1984 Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *N Engl J Med* 310:1415-1421
127. **Wagner RL, White PF** 1984 Etomidate inhibits adrenocortical function in surgical patients. *Anesthesiology* 61:647-651

128. **Wada A, Ohnishi T, Nonaka Y, Okamoto M** 1988 Inhibition of bovine adrenocortical mitochondrial cytochrome P-450(11)beta-mediated reactions by imidazole derivatives and mineralocorticoid analogs. *J Steroid Biochem* 31:803-808
129. **Varga I, Racz K, Kiss R, Futo L, Toth M, Sergev O, Glaz E** 1993 Direct inhibitory effect of etomidate on corticosteroid secretion in human pathologic adrenocortical cells. *Steroids* 58:64-68
130. **Lamberts SW, Bons EG, Bruining HA, de Jong FH** 1987 Differential effects of the imidazole derivatives etomidate, ketoconazole and miconazole and of metyrapone on the secretion of cortisol and its precursors by human adrenocortical cells. *J Pharmacol Exp Ther* 240:259-264
131. **Weber MM, Lang J, Abedinpour F, Zeilberger K, Adelman B, Engelhardt D** 1993 Different inhibitory effect of etomidate and ketoconazole on the human adrenal steroid biosynthesis. *Clin Investig* 71:933-938
132. **Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV** 1990 Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50:5488-5496
133. **Pablo LS, Bailey JE** 1999 Etomidate and telazol. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:779-792
134. **Reves GJ, Glass PSA, Lubarsky DA** 2000 Nonbarbiturate intravenous anesthetics. In: Miller RD ed. *Anesthesia Churchill Livingstone, Philadelphia, USA*; 2228-2272
135. **Evans RH, Hill RG** 1977 The GABA-mimetic action of etomidate [proceedings]. *Br J Pharmacol* 61:484
136. **Ledingham I, Watt I** 1983 Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet*:p1270
137. **Allolio B, Stuttmann R, Fischer H, Leonhard W, Winkelmann W** 1983 Long-term etomidate and adrenocortical suppression. *Lancet* 2:626
138. **Allolio B, Dorr H, Stuttmann R, Knorr D, Engelhardt D, Winkelmann W** 1985 Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 22:281-286
139. **Krakoff J, Koch CA, Calis KA, Alexander RH, Nieman LK** 2001 Use of a parenteral propylene glycol-containing etomidate preparation for the long-term management of ectopic Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4104-4108
140. **Serrano L, Lees P, Hillidge CJ, al e** 1976 Influence of Azaperone/Metomidate Anaesthetics on Blood Biochemistry in the Horse. *Br Vet J*:132, 405-415
141. **Ryder-Davies P** 1973 The use of Metomidate, an intramuscular Narcotic for Birds. *The Vet Record*:92: 507-509
142. **Azhar S, Medicherla S, Shen WJ, Fujioka Y, Fong LG, Reaven E, Cooper AD** 2006 LDL and cAMP cooperate to regulate the functional expression of the LRP in rat ovarian granulosa cells. *J Lipid Res* 47:2538-2550
143. **Cadle DR, Martin GR** 1976 Metomidate as role anaesthetic agent in tawny owls. *Vet Rec*:98:91-92
144. **Henrikson H, Jensen-Waern M, Nynan G** 1995 Anaesthetics for general Anaesthesia in Growing Pigs. *Acta vet Scand*:36, 401-411
145. **Gerard H, Sensky PL, Broom DM, Perremans S, Geers R** 1996 Influence of type of anaesthesia on cortisol, β -endorphin and heart rate in pigs. *Vet Res*: 27, 219-226

146. **Ungemach FR, Heinritzi K, Kersjes CM, Erhardt W** 1997 [Ban of the use of metomidate (Hypnodil) in swine. Background, consequences and alternatives]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 25:417-423
147. **Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ** 1996 Injectable Anesthetics. In: Thurmon CJ, Tranquilli WJ, Benson GJ eds. *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia*.: Williams & Wilkins, Maryland (USA); third edition: 210-240
148. **Ettlinger DE, Wadsak W, Mien LK, Machek M, Wabnegger L, Rendl G, Karanikas G, Viernstein H, Kletter K, Dudczak R, Mitterhauser M** 2006 [18F]FETO: metabolic considerations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33:928-931
149. **Zolle IM, Berger ML, Hammerschmidt F, Hahner S, Schirbel A, Peric-Simov B** 2008 New selective inhibitors of steroid 11beta-hydroxylation in the adrenal cortex. Synthesis and structure-activity relationship of potent etomidate analogues. *J Med Chem* 51(7):2244-2253
150. **Schirbel A, Zolle I, Hammerschmidt F, Berger F, Schiller D, Kvaternik H, Reiners C** 2004 4-[123/131I]Iodometomidate as a radioligand for functional diagnosis of adrenal disease: synthesis, structural requirements and biodistribution. *Radiochim Acta* 92:297-303
151. **Schirbel A, Zolle I, Hammerschmidt F, Berger M, Schiller D, Kvaternik H, Reiners C** 2004 4-[123/131I]Iodometomidat as a radioligand for funtional diagnosis of adrenal disease: synthesis, structural requirements and biodistributions. *Radiochim Acta* 92
152. **Nawar R, Aron D** 2005 Adrenal incidentalomas -- a continuing management dilemma. *Endocr Relat Cancer* 12:585-598
153. **Reincke M, Fassnacht M, Vath S, Mora P, Allolio B** 1996 Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr Res* 22:757-761
154. **Bulow B, Ahren B** 2002 Adrenal incidentaloma--experience of a standardized diagnostic programme in the Swedish prospective study. *J Intern Med* 252:239-246
155. **Dwamena BA, Kloos RT, Fendrick AM, Gross MD, Francis IR, Korobkin MT, Shapiro B** 1998 Diagnostic evaluation of the adrenal incidentaloma: decision and cost-effectiveness analyses. *J Nucl Med* 39:707-712
156. **Gicquel C, Bertherat J, Le Bouc Y, Bertagna X** 2000 Pathogenesis of adrenocortical incidentalomas and genetic syndromes associated with adrenocortical neoplasms. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29:1-13, vii
157. **Müller-Leisse C.R. GRW** 1990 Nichtinvasive und invasive Methoden in der Diagnostik von Nebennierenerkrankungen. In Allolio B., Schulte H.M. (Hsrg.): *Moderne Diagnostik und hterapeutische Strategien ei Nebennierenerkrankungen.*, 1990, p 1
158. **Krestin GP** 1990 Kernspintomographie der Nebennieren. In Allolio B., Schulte H.M. (Hrsg.): *Moderne Diagnostik und therapeutische Strategien bei Nebennierenerkrankungen.* Schattauer, Stuttgart:8
159. **Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E** 2006 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med* 47:32-37
160. **Eriksson B, Bergstrom M, Sundin A, Juhlin C, Orlefors H, Oberg K, Langstrom B** 2002 The role of PET in localization of neuroendocrine and adrenocortical tumors. *Ann N Y Acad Sci* 970:159-169

161. **Eriksson B, Orlefors H, Oberg K, Sundin A, Bergstrom M, Langstrom B** 2005 Developments in PET for the detection of endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:311-324
162. **Lawson MA** 2001 Role of molecular imaging in management of nonhypersecreting adrenal masses. *J Nucl Med* 42:893-894
163. **Maurea S, Caraco C, Klain M, Mainolfi C, Salvatore M** 2004 Imaging characterization of non-hypersecreting adrenal masses. Comparison between MR and radionuclide techniques. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 48:188-197
164. **Maurea S, Klain M, Mainolfi C, Ziviello M, Salvatore M** 2001 The diagnostic role of radionuclide imaging in evaluation of patients with nonhypersecreting adrenal masses. *J Nucl Med* 42:884-892
165. **Pacak K, Eisenhofer G, Goldstein DS** 2004 Functional imaging of endocrine tumors: role of positron emission tomography. *Endocr Rev* 25:568-580
166. **Phelps ME** 2000 PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 41:661-681
167. **Metser U, Even-Sapir E** 2006 The role of 18F-FDG PET/CT in the evaluation of solid splenic masses. *Semin Ultrasound CT MR* 27:420-425
168. **Devaskar SU, Ollesch C, Rajakumar RA, Rajakumar PA** 1997 Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 238:44-47
169. **Yun M, Kim W, Alnafisi N, Lacorte L, Jang S, Alavi A** 2001 18F-FDG PET in characterizing adrenal lesions detected on CT or MRI. *J Nucl Med* 42:1795-1799
170. **Boland GW, Goldberg MA, Lee MJ, Mayo-Smith WW, Dixon J, McNicholas MM, Mueller PR** 1995 Indeterminate adrenal mass in patients with cancer: evaluation at PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology* 194:131-134
171. **Erasmus JJ, Patz EF, Jr., McAdams HP, Murray JG, Herndon J, Coleman RE, Goodman PC** 1997 Evaluation of adrenal masses in patients with bronchogenic carcinoma using 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *AJR Am J Roentgenol* 168:1357-1360
172. **Maurea S, Mainolfi C, Wang H, Varrella P, Panico MR, Klain M, Rossi R, Cremona F, Bazzicalupo L, Salvatore M** 1996 [Positron emission tomography (PET) with fludeoxyglucose F 18 in the study of adrenal masses: comparison of benign and malignant lesions]. *Radiol Med (Torino)* 92:782-787
173. **Phelps ME, Mazziotta JC** 1985 Positron emission tomography: human brain function and biochemistry. *Science* 228:799-809
174. **Phelps ME, Mazziotta JC, Huang SC** 1982 Study of cerebral function with positron computed tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:113-162
175. **Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE** 2004 Clinical applications of PET in oncology. *Radiology* 231:305-332
176. **Sokoloff L** 1985 Basic principles in imaging of regional cerebral metabolic rates. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 63:21-49
177. **Spence AM, Mankoff DA, Muzi M** 2003 Positron emission tomography imaging of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am* 13:717-739
178. **Fischer M, Gross MD, Shapiro B, Vetter B** 1993 *Nebenniere. Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie*. Springer, Berlin

179. **Hennings J, Lindhe O, Bergstrom M, Langstrom B, Sundin A, Hellman P** 2006 [11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1410-1414
180. **Zettinig G, Mitterhauser M, Wadsak W, Becherer A, Pirich C, Vierhapper H, Niederle B, Dudczak R, Kletter K** 2004 Positron emission tomography imaging of adrenal masses: (18)F-fluorodeoxyglucose and the 11beta-hydroxylase tracer (11)C-metomidate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:1224-1230
181. **Minn H, Salonen A, Friberg J, Roivainen A, Viljanen T, Langsjo J, Salmi J, Valimaki M, Nagren K, Nuutila P** 2004 Imaging of adrenal incidentalomas with PET using (11)C-metomidate and (18)F-FDG. *J Nucl Med* 45:972-979
182. **Bergstrom M, Sorensen J, Kahn TS, Juhlin C, Eriksson B, Sundin A, Bonasera TA, Fasth K, Langstrom B** 1999 PET with [11C]-Metomidate for the Visualization of Adrenocortical Tumors and Discrimination from Other Lesions. *Clin Positron Imaging* 2:339
183. **Bergstrom M, Juhlin C, Bonasera TA, Sundin A, Rastad J, Akerstrom G, Langstrom B** 2000 PET imaging of adrenal cortical tumors with the 11beta-hydroxylase tracer 11C-metomidate. *J Nucl Med* 41:275-282
184. **Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoeflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F** 2007 Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 148:693-704
185. **Mitterhauser M, Wadsak W, Wabnegger L, Sieghart W, Viernstein H, Kletter K, Dudczak R** 2003 In vivo and in vitro evaluation of [18F]FETO with respect to the adrenocortical and GABAergic system in rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:1398-1401
186. **Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, Schirbel A** 2008 [123I]Iodometomidate for Molecular Imaging of Adrenocortical Cytochrome P450 Family 11B Enzymes. *J Clin Endocrinol Metab* 93(6):2358-2365
187. **Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B** 2000 New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest* 30:76-82
188. **Khan TS, Sundin A, Juhlin C, Langstrom B, Bergstrom M, Eriksson B** 2003 11C-metomidate PET imaging of adrenocortical cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:403-410
189. **Mitterhauser M, Wadsak W, Langer O, Schmaljohann J, Zettinig G, Dudczak R, Viernstein H, Kletter K** 2003 Comparison of three different purification methods for the routine preparation of [11C] Metomidate. *Appl Radiat Isot* 59:125-128
190. **Bird IM, Mason JL, Rainey WE** 1998 Protein kinase A, protein kinase C, and Ca(2+)-regulated expression of 21-hydroxylase cytochrome P450 in H295R human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1592-1597
191. **Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD** 1994 ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 99:R17-20

192. **Rae PA, Gutmann NS, Tsao J, Schimmer BP** 1979 Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1896-1900
193. **Schimmer BP** 1979 Adrenocortical Y1 cells. *Methods Enzymol* 58:570-574
194. **Satre M, Vignais PV** 1974 Steroid 11beta-hydroxylation in beef adrenal cortex mitochondria. Binding affinity and capacity of specific (14C)steroids and for (3H)metyrapol, an inhibitor of the 11beta-hydroxylation reaction. *Biochemistry* 13:2201-2209
195. **Leibovitz A, McCombs WM, 3rd, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC** 1973 New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst* 51:691-697
196. **Itoh S, Tanaka K, Horiuchi T, Kumagae M, Watabe T, Kanbegawa A, Shimizu N** 1988 Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production in a cultured human adrenocortical carcinoma cell line (SW-13). *Endocrinol Jpn* 35:149-158
197. **Takahashi K, Yoshinoya A, Murakami O, Totsune K, Shibahara S** 2000 Secretion of endothelin-1 and adrenomedullin by SW-13 human adrenocortical carcinoma cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:S393-394
198. **Mosmann T** 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
199. **Berridge MV, Tan AS** 1993 Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2):474-482.
200. **Denizot F, Lang R** 1986 Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277
201. **Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
202. **Berson SA, Yalow RS** 2006 General principles of radioimmunoassay. 1968. *Clin Chim Acta* 369:125-143
203. **Greentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF** 1998 A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 4:479-486
204. **Gomi K, Kajiyama N** 2001 Oxyluciferin, a Luminescence Product of Firefly Luciferase, Is Enzymatically Regenerated into Luciferin*. *J Biol Chem* 276 (39):36508-36513
205. **Wood KV, et al** 1984 Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Comm* 124: 592-596
206. **Loening AM, Fenn TD, Gambhir SS** 2007 Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *J Mol Biol* 374(4):1017-1028
207. **Sherf BA, et al** 1996 Dual-Luciferase® reporter assay: An advanced coreporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. *Promega Notes* 57:2-9.
208. **Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM** 1995 Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9:1346-1355

209. **Stocco DM, Clark BJ** 1996 Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51:197-205
210. **Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ** 1997 Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 11:138-147
211. **Hsu HT, Chang YC, Chiu YN, Liu CL, Chang KJ, Guo IC** 2006 Leptin interferes with adrenocorticotropin/3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling, possibly through a Janus kinase 2-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-phosphodiesterase 3-cAMP pathway, to down-regulate cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human adrenocortical NCI-H295 cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2761-2769
212. **Jo Y, Stocco DM** 2004 Regulation of steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein in R2C cells by DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene-1). *Endocrinology* 145:5629-5637
213. **Asif AR, Ljubojevic M, Sabolic I, Shnitsar V, Metten M, Anzai N, Muller GA, Burckhardt G, Hagos Y** 2006 Regulation of steroid hormone biosynthesis enzymes and organic anion transporters by forskolin and DHEA-S treatment in adrenocortical cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E1351-1359
214. **Schwarzenbach H, Manna PR, Stocco DM, Chakrabarti G, Mukhopadhyay AK** 2003 Stimulatory effect of progesterone on the expression of steroidogenic acute regulatory protein in MA-10 Leydig cells. *Biology of Reproduction*:68:1054-1063
215. **King SR, Matassa AA, White EK, Walsh LP, Jo Y, Rao RM, Stocco DM, Reyland ME** 2004 Oxysterols regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *J Mol Endocrinol* 32:507-517
216. **Christenson LK, McAllister JM, Martin KO, Javitt NB, Osborne TF, Strauss JF, 3rd** 1998 Oxysterol regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Structural specificity and transcriptional and posttranscriptional actions. *J Biol Chem* 273:30729-30735
217. **Reyland ME, Evans RM, White EK** 2000 Lipoproteins regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in mouse adrenocortical cells. *J Biol Chem* 275:36637-36644
218. **Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M** 2001 Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:627-632
219. **Gizard F, Lavallee B, DeWitte F, Teissier E, Staels B, Hum DW** 2002 The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450_{scc} gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells. *J Biol Chem* 277:39144-39155
220. **Monte D, DeWitte F, Hum DW** 1998 Regulation of the human P450_{scc} gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem* 273:4585-4591
221. **Mueller M, Atanasov A, Cima I, Corazza N, Schoonjans K, Brunner T** 2006 Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines. *Endocrinology*
222. **Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS** 1994 Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:1499-1508

223. **Lala DS, Rice DA, Parker KL** 1992 Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6:1249-1258
224. **Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, Chambon C, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veyssiere G, Martinez A** 2006 Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147:1805-1818
225. **Jacob AL, Lund J** 1998 Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. *J Biol Chem* 273:13391-13394
226. **Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL** 2001 Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol* 15:57-68
227. **Zwermann O, Beuschlein F, Lalli E, Klink A, Sassone-Corsi P, Reincke M** 2005 Clinical and molecular evidence for DAX-1 inhibition of steroidogenic factor-1-dependent ACTH receptor gene expression. *Eur J Endocrinol* 152:769-776
228. **Gonzalez FJ UT, Umeno M, Song BJ, Veech RL, Gelboin HV.** 1991 Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. *Alcohol Alcohol Suppl* 1:97-101
229. **Kühn-Velten WN LJ** 1996 Ligand dependence of cytochrome P450c17 protection against proteolytic inactivation: structural, methodological and functional implications. *FEBS Lett* 388:21-25.
230. **Otis M, Gallo-Payet N** 2007 Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*
231. **Joannard F, Rissel M, Gilot D, Anderson A, Orfila-Lefevre L, Guillouzo A, Atfi A, Lagadic-Gossmann D** 2006 Role for mitogen-activated protein kinases in phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 2B in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 161:61-72
232. **Le T, Schimmer BP** 2001 The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 142:4282-4287
233. **Caoli EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Platt JF, Dunnick NR, Raghupathi KI** 2002 Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology* 222:629-633
234. **Maurea S, Mainolfi C, Bazzicalupo L, Panico MR, Imperato C, Alfano B, Ziviello M, Salvatore M** 1999 Imaging of adrenal tumors using FDG PET: comparison of benign and malignant lesions. *AJR Am J Roentgenol* 173:25-29
235. **Slapa RZ, Jakubowski W, Januszewicz A, Kasperlik-Zaluska AA, Dabrowska E, Fijuth J, Feltynowski T, Tarnawski R, Krolicki L** 2000 Discriminatory power of MRI for differentiation of adrenal non-adenomas vs adenomas evaluated by means of ROC analysis: can biopsy be obviated? *Eur Radiol* 10:95-104
236. **Shulkin BL, Wieland DM, Schwaiger M, Thompson NW, Francis IR, Haka MS, Rosenspire KC, Shapiro B, Sisson JC, Kuhl DE** 1992 PET scanning with hydroxyephedrine: an approach to the localization of pheochromocytoma. *J Nucl Med* 33:1125-1131

237. **Mitterhauser M, Dobrozemsky G, Zettinig G, Wadsak W, Vierhapper H, Dudczak R, Kletter K** 2006 Imaging of adrenocortical metastases with [11C]metomidate. Eur J Nucl Med Mol Imaging 33:974

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med Bruno Allolio bedanken, der initial meine Betreuung als Doktorvater übernahm und mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit im endokrinologischen Labor der Uniklinik Würzburg zu verwirklichen.

Vor allem möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. med. Stefanie Hahner danken, die mir stets durch ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung anfangs als meine Betreuerin und zuletzt als meine Doktormutter zur Seite stand. Während der gesamten Zeit hat sie nie ihr Vertrauen in mich verloren und mich dazu ermutigt, „am Ball“ zu bleiben. Darüber hinaus wurde mir dank ihrer Hilfe der komplexe Bereich der Endokrinologie vereinfacht dargestellt.

Für die großartige Unterstützung im Labor möchte ich mich besonders bei Frau Martina Zink bedanken, die mir nicht nur in der Zellkultur eine großartige Hilfe war. Dank ihr, wußte ich, dass auch während meiner Abwesenheit meine Zellen „in guter Obhut“ verweilten.

Meinen herzlichen Dank gilt natürlich auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Endokrinologischen Labors, die mich insbesondere bei den langwierigen RIA- und ELISA-Versuchen unterstützen.

Ferner möchte ich mich für die großzügige Bereitstellung der Antikörper gegen P450_{scc} und StAR bei Prof. W.L. Miller, San Francisco USA, sowie für den P450_{c17} bei Dr. M. Quinkler, Berlin Deutschland, bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Christian, meinem Sohn Levi, meiner großartigen Familie sowie meinen Freunden bedanken. Sie haben mir während meines gesamten Medizinstudiums und der Doktorarbeit stets zur Seite gestanden, mich motiviert und in meinen Wünschen und Zielen bekräftigt. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Sarah Elizabeth Cochran-Bührmann, geb. Cochran
Geboren am 02. Juli 1978 in Frankfurt am Main
Nationalität US-amerikanisch
Familienstand verheiratet

AUSBILDUNG

08/1989 – 06/1998 Bischof-Neumann-Schule, Königstein/Ts., Deutschland
Allgemeine Hochschulreife
04/2000 – 11/2006 Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Deutschland
Studiengang Humanmedizin
03/2002 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
11/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)

STUDIENBEGLEITENDE PRAKTIKA

FAMULATUREN

11/1998 – 01/1999 Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland
8 Wochen Krankenpflegepraktikum
in der Herz- und Gefäßchirurgie
09/2002 – 10/2002 Frankfurter Diakonie-Kliniken,
Markus-Krankenhaus, Frankfurt, Deutschland
4 Wochen in der Med. Klinik I
07/2003 – 08/2003 Kreiskrankenhaus Kitzingen, Deutschland
4 Wochen in der Allgemein- und Unfallchirurgie
02/2004 – 03/2004 C.S.I. Mission Hospital, Woriur-Trichy, Indien
2 Wochen in der Chirurgie;
2 Wochen in der Gynäkologie
08/2004 – 09/2004 Hausärztliche Praxis
Dr. D. Hausmann, Königstein/Ts., Deutschland
4 Wochen in der Chirurgie

PRAKTISCHES JAHR

- 10/2005 – 02/2006 Universität von Pretoria, Südafrika
1. Tertial Chirurgie
- 02/2006 – 05/2006 Klinikum Coburg, Deutschland
2. Tertial Innere Medizin
- 05/2006 – 09/2006 Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus,
Würzburg, Deutschland
3. Tertial Orthopädie

BERUFLICHER WERDEGANG

- 10/1995 – 03/2000 Andersen Services, Frankfurt am Main, Deutschland
Tätigkeit als Executive Assistant
- 03/2001 – 05/2001 Altkönigstift eG, Kronberg/Ts., Deutschland
Tätigkeit als Pflegeaushilfe
- 11/2002 – 01/2003 Universitätsklinik Würzburg, Deutschland
Tätigkeit als Sitzwache
- 01/2003 – 03/2005 Randstad Deutschland GmbH, Würzburg, Deutschland
Tätigkeit als Sitzwache
- 05/2005 – 09/2005 Amadis Personal-Dienstleistungen, Würzburg, Deutschland
Tätigkeit als Sitzwache
- 12/2006 – 03/2007 Neurochirurgische Gemeinschaftspraxis / Excelsior-Klinik,
Würzburg, Deutschland
Tätigkeit als ärztlicher Nachtdienst
- 04/2007 – 07/2013 St. Josefshospital GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Allgemein- und Unfallchirurgie
Tätigkeit als Assistenzärztin
- 07/2013 - heute St. Josefshospital GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Allgemein- und Viszeralchirurgie
Tätigkeit als Fachärztin