

Aus der Medizinischen Klinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med Georg Ertl

**Der Einfluß von Adrenostatika auf die
Hormonbiosynthese und die Expression des
ACTH-Rezeptors in boviner
Nebennierenrinden – Primärkultur**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Anja Irene Kircher

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2004

Referent: Prof. Dr. B. Allolio

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Seufert

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

Die Promovendin ist Ärztin

1 EINLEITUNG

1.1 Die Nebennierenfunktion und – regulation	1
1.2 Steroide und ihre Biosynthese	4
1.2.1 Mineralkortikoide	7
1.2.2 Glukokortikoide	7
1.2.3 Adrenale Androgene	8
1.3 Tumoröse Veränderungen der Nebennierenrinde	8
1.3.1 Hyperplastische Veränderungen der NNR	9
1.3.2 Das Nebennierenrindenadenom	9
1.3.3 Das Nebennierenrindenkarzinom	10
1.4 Adrenostatika	11
1.4.1 Aminoglutethimid	12
1.4.2 Metyrapon	13
1.4.3 Etomidat	13
1.5 ACTH und der ACTH-Rezeptor	14
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	16

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material	18
2.2 Zellkultur	19
2.2.1 Präparation boviner Nebennieren	19
2.2.2 Versuchsbeschreibung	21
2.2.2.1 Untersuchung der mRNA-Expression	21

2.2.2.2 Tests zur Hormonsekretion der bovinen NNR-Zellen	22
2.3 Hormonanalysen	23
2.3.1 Testprinzip	23
2.3.2 Durchführung	24
2.4 Expressionsnachweis des ACTH-Rezeptors	24
2.4.1 Extraktion der RNA	25
2.4.2 Formaldehyd-Gelelektrophorese	26
2.4.3 Kapillartransfer auf Nylonmembran	27
2.4.4 Herstellung der DNA-Sonde	28
2.4.5 Markieren der Sonde und Hybridisierung der geblotteten Membran	29
2.5 Statistische Auswertung	31

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung der Primärkultur der bovinen NNR-Zellen	32
3.2 Effekte von Adrenostatika und ACTH auf die bovinen NNR-Zellen	32
3.2.1 Hormonbiosynthese	33
3.2.2 ACTH-R-mRNA-Expression	36

4. Diskussion

4.1 Etablierung der bovinen NNR-Primärkultur	38
4.2 Effekte von Adrenostatika auf NNR-Zellen	38

4.2.1 Aminoglutethimid	38
4.2.2 Metyrapon	39
4.2.3 Etomidate	41
4.3 Die Wirkung von ACTH auf NNR-Zellen	41
4.4 Validität der Methodik und der eigenen Ergebnisse	45
4.5 Vorteile und Unterschiede der bovinen NNR-Primärkultur gegenüber anderen Zellmodellen	46
5. Zusammenfassung	49
6. Anhang	
Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese	52
7. Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ACTH-R	ACTH-Rezeptor
AG	Aminogluthetimid
ANF=ANP	Atrialer natriuretischer Faktor=Atrialer natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintri-phosphat
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CGB	Cortikosteroide bindendes Globulin
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CTP	Cytosintri-phosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
ETO	Etomidate
FCS	Fetal Calf Serum
GTP	Guanosintri-phosphat
3-β-HSD	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HS	Horse Serum
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ
MTP	Metyrapon
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
NN	Nebenniere
NPY	Neuropeptid Y
17-OH-P	17-Hydroxy-Progesteron
POMC	Pro-Opiomelanocortin

P450c17	P450 17 α -Hydroxylase
P450c21	P450 21-Hydroxylase
P450scc	P450 sidechain-cleavage-enzyme
P450c11	P450 11 β -Hydroxylase
PBS	Phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PCR	Polymerase chain reaction
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonucleic Acid
StaR	Steroidogenic acute regulator Protein
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
TNF α	Tumor necrosis factor α
TTP	Tyrosintriphosphat

1. Einleitung

1.1. Die Nebennierenrindenfunktion und -regulation

Die Nebennieren sitzen den oberen Nierenpolen kappenartig auf und sind paarig angelegt. Sie werden von der Fettkapsel der Niere umschlossen und von den Aa. suprarenales superior aus den Aa. phrenicae inf., Aa. suprarenales med. aus der Aorta und den Aa. suprarenales inf. aus den Aa. renales versorgt. (1,2)

Die Nebenniere besteht aus zwei Teilen mit unterschiedlicher Entstehung, Funktion und Struktur, dem Nebennierenmark (NNM) und der Nebennierenrinde (NNR).

Das NNM bildet den inneren Anteil der Nebenniere. Am Ende der Embryogenese wandern Sympathikoblasten aus der Anlage des Sympathikusgrenzstrangs in die NN-Anlage ein und bilden so ein sympathisches Paraganglion, welches von präganglionären Sympathikusfasern innerviert wird. Es produziert überwiegend Adrenalin und Noradrenalin.

Die NNR umgibt das NNM und ist mesodermalen Ursprungs. Sie ist ab dem zweiten Gestationsmonat zu erkennen und entwickelt sich aus dem Zölomepithel des Mesoderms an der dorsalen Bauchwand. Neben den Gonaden ist die NNR der zentrale Ort der Steroidbiosynthese. Sie teilt sich in drei Zonen: die subkapsulär gelegene Zona glomerulosa, daran anschließend die Zona fasciculata und die marknahe Zona reticularis.

In der schmalen Zona glomerulosa liegen die kleinen, azidophilen Epithelzellen mit kleinem Kern als Zellnester zusammen. Hier werden hauptsächlich Mineralkortikoide (Endprodukt: Aldosteron) gebildet. Den größten Teil der NNR nimmt die Zona fasciculata ein, in der die Epithelzellen als parallele säulenartige Zellstränge angeordnet sind. Die großen runden oder polygonalen Zellen enthalten große Lipidtropfen. In dieser Zone findet die Glukokortikoidproduktion (Endprodukt: Cortisol) sowie eine geringe Androgenproduktion statt. In der Zona reticularis bilden die Epithelzellstränge netzartige Strukturen. Die Zellen sind kleiner als in der Zona fasciculata und synthetisieren überwiegend Androgene (Endprodukt: DHEA), aber auch Glukokortikoide (1).

Man nimmt an, dass die Zona fasciculata eher für den Sofortbedarf mit schnell erhöhter Cortisolproduktion auf ACTH-Stimulation reagiert, während die Zellen der Zona reticularis eine basale Glukokortikoidsekretion aufrecht erhalten (3,4).

Die Regulation der Hormonsynthese in der Nebenniere ist sehr komplex und wird bis heute nur teilweise verstanden. Das adrenocortikotrope Hormon (ACTH), das in der Hypophyse gebildet wird, nimmt Einfluss auf die Zona fasciculata und Zona reticularis und stimuliert dort die Bildung und Sekretion der Glukokortikoide, der adrenalen Androgene und beeinflusst gemeinsam mit Angiotensin II und ANF in der Zona glomerulosa die Bildung und Sekretion von Aldosteron (5). Es nimmt damit eine wesentliche Rolle in der Steuerung der Hormonsynthese der Nebenniere ein. ACTH ist ein unverzweigtes Peptidhormon aus 39 Aminosäuren. Es wird zusammen mit einer Anzahl weiterer Peptide, z.B. dem Melanozyten stimulierenden Hormon (MSH), Lipotropinen und Endorphinen aus dem großen Vorläufermolekül Pro-Opiomelanocortin (POMC) in der Pars anterior der Hypophyse gebildet. Diese Synthese wird vor allem durch das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und Vasopressin, welche sowohl die circadianen Schwankungen als auch den neuronalen Einfluss von Stress vermitteln, reguliert. Daneben wird die Sekretion von ACTH auch von weiteren Substanzen wie Angiotensin II, Zytokine und nicht zuletzt durch Glukocortikoide selbst direkt und indirekt beeinflusst (6). Die Bedeutung von ACTH für die Nebennierenfunktion besteht hauptsächlich in der Stimulation der adrenalen Steroidbiosynthese, der RNA- und Proteinsynthese. Der Volumenzunahme der Nebenniere unter ACTH scheint eher eine Hypertrophie der Zellen zu Grunde zu liegen als eine erhöhte Mitoserate der Zellen (7, 8), in einigen Studien wurde sogar ein proliferationshemmender Effekt von ACTH beschrieben (9,10). Dies ließ den Schluss zu, dass andere Faktoren hypophysären Ursprungs für eine Wachstumsförderung der NN verantwortlich waren. Man fand andere Spaltprodukte des hypophysären POMC, die Einfluss auf das Wachstum der Nebenniere haben. Das 1-76-POMC, ein größeres N-terminales POMC Peptid, auch Pro γ -MSH genannt, hatte keinen wachstumsfördernden Effekt auf die NN, während kürzere POMC-Fragmente wie das 1-28-POMC, in denen der γ -MSH-Teil nicht vorhanden ist, sehr wohl mitogene Effekte zeigten. Um diese kürzeren N-POMC-Fragmente genauer zu untersuchen, wurde in jüngerer Zeit synthetisch hergestelltes physiologisches 1-28-POMC und 1-48 POMC

mit 2 definierten Disulfidbrücken mit verschiedenen Zellmodellen untersucht. Hier fand man einen mitosefördernden Effekt auf die Zellen sowohl von Tumorzelllinien als auch von Primärkulturen „gesunder“ boviner NN sowie eine Hemmung der Steroidbiosynthese. Diese N-POMC-Fragmente wirken also entgegengesetzt zum ACTH (11).

Daneben haben auch Wachstumsfaktoren und lokale Steuerungshormone Einfluss auf die Nebennierenfunktion. Eine Vielzahl solcher vom Nebennierenmark sezernierter Faktoren, die auf die adrenokortikale Funktion einwirken, wurden bereits in *in-vitro*-Studien identifiziert. Wenn Nebennierenrindenzellen zusammen mit chromaffinen Zellen des NNM kultiviert wurden, produzierten sie ein Zehnfaches an Glukokortikoiden als es bei den Zellen der NNR in Monokultur der Fall ist. Zudem wurde bei ersteren eine deutliche Hochregulation der mRNA-Expression einiger P450-Enzyme sowie des steroidogenic acute regulatory proteins (StAR) nachgewiesen (12,13,14).

Auch morphologische Untersuchungen der adulten NNR zeigten chromaffine Zellen in allen Zonen der adulten Nebennierenrinde sowie Nebennierenrindenzellen im Nebennierenmark, was die Annahme der Interaktion der Zellen stützt (15,16).

Als lokale Steuerungshormone wurden im Nebennierenmark verschiedener Säugetierspezies verschiedene Peptide mit parakriner Wirkung auf die Nebennierenrindenfunktion nachgewiesen: Adrenomedullin, welches inhibitorisch auf die Angiotensin II-stimulierte Aldosteronsekretion wirkt (17), daneben ANP, NPY, Substanz P und VIP (18).

Weiterhin sind einige Wachstumsfaktoren wie der basic fibroblast growth factor (bFGF), der Insulin-like growth factor I und II (IGF I, IGF II), der transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) und Wachstumsfaktoren des Endothelinsystems an der intraadrenalen Mitogenese und Steroidogenese beteiligt (15,18,19,20,21,22). Von den hier genannten Faktoren wirkt beispielsweise TGF- β 1 proliferationshemmend auf adrenale Zellen (23,24).

Auch das Immunsystem wirkt auf die Nebennierenfunktion. So beeinflusst das Immunsystem die Aktivität der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse durch Cytokine, die zum einen die Sekretion von CRH und ACTH stimulieren und zum anderen auch direkten stimulierenden oder hemmenden Einfluss auf die Nebenniere

ausüben. Für die Interleukine IL-1, IL-3 und IL-6 wurden stimulierende Effekte auf die Steroidbiosynthese nachgewiesen (12,25,26), für den tumor necrosis factor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) inhibitorische (27,28).

1.2.Steroide und ihre Biosynthese in der Nebenniere

Steroidhormone werden aus der Ausgangsverbindung Cholesterin synthetisiert, das die Nebenniere von Lipoproteinen im Blut über Low-density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren aufnimmt oder de novo synthetisieren kann. Nun soll die Biosynthese von Cortisol, Aldosteron und die Vorstufen der Sexualhormone DHEA, DHEA-S und Androstendion dargestellt werden.

Die einzelnen Schritte der Steroidbiosynthese sind einschließlich der dazu benötigten Enzyme in der Abbildung 1 im Anhang dargestellt.

Die Nomenklatur dieser Enzyme sei im Folgenden kurz erklärt: Bei den meisten Enzymen handelt es sich um oxidative Enzyme einer großen Familie, die Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm absorbieren und daher den Namen P450-Enzyme tragen. Dem P450 wird je nach Funktion des Enzyms oder seinem Angriffsort am Steroidgrundgerüst ein Zusatz angehängt (29). Man verwendet dazu die vereinbarte Durchnummerierung der Kohlenstoffatome der Steroide, wie in Abbildung 1 dargestellt. (Zum Beispiel: Das P450scc-(sidechain-cleavage)-Enzym spaltet die Seitenkette des Cholesterins ab und das P450c17-Enzym katalysiert die Hydroxylierung am C-Atom 17.)

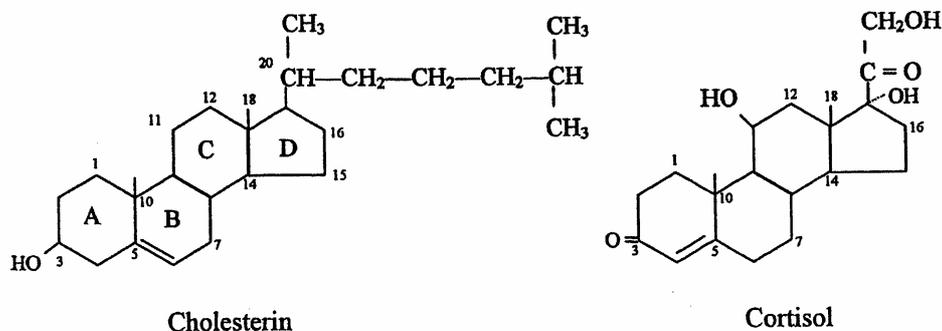


Abbildung 1: Ausgangsverbindung Cholesterin und Endprodukt Cortisol

Einige Autoren bezeichnen die Enzyme der Steroidbiosynthese auch vereinfacht nach ihrer biochemischen Funktion. (Zum Beispiel hydroxyliert die 21-Hydroxylase das C-Atom 21.)

Der erste Schritt der Steroidbiosynthese ist die Abspaltung der Seitenkette von Cholesterol zum Folgeprodukt Pregnenolon. Dies geschieht durch zwei Hydroxylierungen an den C-Atomen 20 und 22 und die folgende oxidative Abspaltung der Seitenketten zwischen C₂₀ und C₂₂. Dieser Schritt wird durch das P450_{scc}-Enzym katalysiert. Im deutschen Sprachraum wird dieses Enzym auch als 20,22-Desmolase bezeichnet. Dieses Enzym kommt in allen drei Zonen der NNR vor und ist an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert.

Diese Abspaltung der Seitenkette ist maßgeblich von ACTH beeinflusst und stellt einen der limitierenden Faktoren der Steroidbiosynthese dar.

Um das Endprodukt Cortisol zu erhalten, müssen weitere Schritte stattfinden: Die Dehydrogenierung des Pregnenolon zu Progesteron mittels der 3-β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (3-β-HSD), dem einzigen Enzym der Steroidbiosynthesekette, das nicht zur P450-Familie gehört und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (30).

Darauf folgen drei Hydroxylierungen an den C-Atomen 17, 21 und 11. Alternativ kann die Hydroxylierung am C-Atom 17 auch vor 3β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenierung stattfinden.

Die P450_{c17}-Hydroxylase kommt im glatten Endoplasmatischen Retikulum der Zellen der Zona fasciculata und reticularis vor. Sie katalysiert die Hydroxylierung am C-Atom 17 und die Abspaltung der dadurch gebildeten 17-hydroxylierten Substrate. Dies ist eine obligate Reaktion für die weitere Synthese von Cortisol und Androgenen.

Die P450_{c21}-Hydroxylase ist ebenfalls im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, findet sich aber nur in Zellen der Zona fasciculata und glomerulosa. Sie hydroxyliert sowohl das Progesteron auf dem Weg zum Aldosteron als auch das 17-Hydroxy-Progesteron in Richtung Cortisol. Abbildung 2 zeigt eine halbschematische Darstellung der Biosynthese von Cortisol.

Für die Synthese von Androgenen wird zwar die Hydroxylierung von Pregnenolon am C-Atom 17 benötigt, nicht jedoch die Hydroxylierungsschritte an den C-Atomen 21 und 11. Aus 17-Hydroxy-Pregnenolon wird durch die Katalysierung des P450_{c17}-Enzyms

Dehydroepiandrosteron (DHEA) synthetisiert, dessen sulfatiertes Derivat DHEA-S ebenso in der Nebenniere hergestellt wird.

Das Androstenedion entsteht durch die Katalysierung der 3- β -HSD aus DHEA. Die Konversion zu Testosteron daraus findet in erster Linie in den peripheren Geweben, zum Beispiel den Gonaden statt (31).

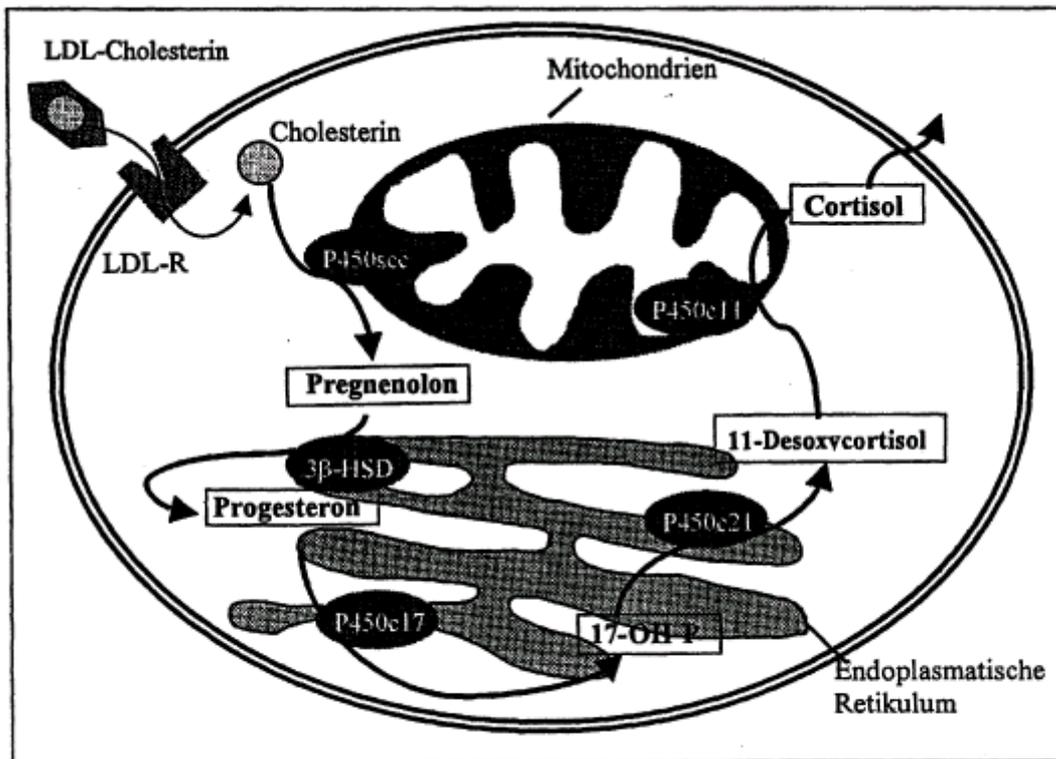


Abbildung 2: Halbschematische Darstellung der Cortisolbiosynthese

Es gibt zwei geschwindigkeitsbestimmende Schritte für die Steroidbiosynthese: Zum einen die Substratmobilisation, den Transfer von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran. Dieser Schritt wird durch das steroidogenic acute regulatory protein (StAR) katalysiert. Seine de-novo Synthese limitiert diesen Schritt. Zum anderen wird die Geschwindigkeit der Steroidbiosynthese durch die Gentranskription der P450-Enzyme bestimmt (32,33).

1.2.1 Mineralkortikoide

Bei normaler Salzaufnahme von gesunden Menschen liegt die durchschnittliche Aldosteronsekretion zwischen 0,1 und 0,7 μmol (50-250 μg) (34). Mineralkortikoide, vor allem Aldosteron beeinflussen den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Körpers über eine erhöhte Natriumretention und Kaliumsekretion in der Niere. Aldosteron bindet in den Zielgeweben an den Mineralkortikoid-Rezeptor Typ-I-Glukokoid und vermittelt dadurch diese Wirkungen.

Die Aldosteronfreisetzung wird durch das Zusammenspiel aus Renin-Angiotensin-System, dem Kalium- und dem ACTH-Serum-Spiegel kontrolliert (5).

1.2.2 Glukokortikoide

Die Nebenniere des Menschen sekretiert täglich zwischen 40 und 80 μmol (10-15 mg) und hat dabei eine ausgeprägte Tagesrhythmik mit einer Spitze am Morgen und dem niedrigsten Wert in der Nacht. Cortisol wird pulsatil sezerniert (35) und die Sekretion von Cortisol wird vor allem durch ACTH kontrolliert.

Glukokortikoide werden im Blut in erster Linie an einem Protein, dem Cortikosteroide bindenden Globulin (CBG) gebunden transportiert.

Sie diffundieren dann in die Effektorzellen und binden dort an spezifische Rezeptoren im Zytosol der Zellen, von denen zwei Typen beschrieben sind. Typ I, der auch Mineralkortikoid- oder High-Affinity-Rezeptor genannt wird, bindet sowohl Mineralkortikoide als auch Glukokortikoide und ist aufgrund seiner hohen Affinität und seiner geringen Spezifität schon bei einer geringen Glukokortikoidkonzentration im Blut aktiv und vermittelt so die basale „Non-Stress“-Aktion von Glukokortikoiden. Typ II, auch als Glukokortikoid- oder Low-Affinity-Rezeptor bezeichnet, vermittelt dagegen Stresssituationen mit hohen Glukokortikoidkonzentrationen im Blut.

Die entstandenen Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexe werden zu spezifischen Rezeptoren am Nukleus der Zelle transportiert und initiieren dort den Transkriptionsprozess und damit letztlich die spezifische Proteinproduktion der Zelle.

Glukokortikoide regen die Gluconeogenese an, verringern die Glucoseaufnahme und Insulineffektivität in den peripheren Zellen und erhöhen die Glycogensynthese. Immunologische und hämatologische Effekte zeigen sich in einer partiellen Beeinträchtigung von T-Lymphozyten, in der Hemmung der Aktivierung und Anzahl von Monozyten, in einer verminderten Entzündungsreaktion durch Hemmung der Phospholipase, in einer Leukozytose und Eosinopenie.

Sie tragen auch zur Aufrechterhaltung des Blutgefäßtonus und der glomerulären Filtrationsrate bei (31,6).

1.2.3 Adrenale Androgene

Die Nebennierenrinde an Androgenen sezerniert vor allem DHEA, sowie das sulfatierte Derivat DHEA-S. Diese Verbindungen besitzen selbst nur geringe androgene Wirkung. In peripheren Geweben werden sie zu Testosteron gewandelt.

Die Sekretion der adrenalen Androgene wird nicht durch die Gonadotropine LH und FSH stimuliert, sondern durch ACTH.

Androgene regulieren unter anderem die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und können so bei gesteigerter Produktion bei Frauen Symptome einer Virilisierung hervorrufen.

1.3. Tumoröse Veränderungen der Nebennierenrinde

Die Unterteilung der NNR-Tumoren kann in funktionell-bedingte Hyperplasien und in echte Parenchymneoplasien vorgenommen werden. Die letztgenannte Gruppe teilt sich nochmals nach ihrer Dignität in Adenome und Karzinome mit jeweils unterschiedlicher Hormonsyntheseaktivität auf.

1.3.1 Hyperplastische Veränderungen der NNR

Durch eine übermäßige Stimulation durch ACTH kommt es bei vielen Patienten zu einer bilateralen Hyperplasie der NNR und folglich zu einem Hyperkortisolismus. Dies wird als ACTH-abhängiges Cushing-Syndrom bezeichnet. Innerhalb des hyperplastischen Gewebes kommt es bei einem Teil auch zu knotigen Veränderungen. Histologisch kann man diese Hyperplasien nicht als neoplastische Veränderungen bezeichnen, denn ihre Zellen vermehren sich im Gegensatz zu Adenomen oder Karzinomen polyklonal.

1.3.2 Das Nebennierenrindenadenom

Die benignen Adenome sind mit einer Prävalenz von 0,5 – 4,4% nach dem 50. Lebensjahr relativ häufig. Sie werden im Rahmen von sonographischen oder computertomographischen Untersuchungen meist zufällig entdeckt (36,37). In ca. 80% der Fälle sind diese NNR-Tumore endokrin inaktiv. Bei symptomlosen NNR-Befunden, die kleiner als 1 cm sind, wird zur Zeit auf eine endokrine Funktionsdiagnostik verzichtet (5). Histologisch kann man sie von endokrin-aktiven Adenomen nicht differenzieren.

Diese Tumore werden nach ihrer endokrinen Aktivität eingeteilt. Man unterscheidet Cortisol-, Aldosteron- oder Androgen-produzierende und endokrin inaktive Adenome. Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt.

Die häufigste Unterform der endokrin-aktiven Adenome ist das Aldosteron-produzierende Adenom, auch Aldosterom oder – nach seinem Erstbeschreiber - Conn-Adenom genannt.

Mit einem Durchmesser von meist unter 1-2 cm sind diese Adenome vergleichsweise klein. Klinische Symptome sind vor allem die Hypokaliämie und die Hypertonie.

Die Inzidenz der Cortisol-produzierenden Adenome der NNR liegt bei ca 0,2-0,5 pro 100 000 Einwohner und tritt bei Frauen 3-5 mal häufiger auf als bei Männern. Das sogenannte Cushing-Syndrom fasst die Symptomatik dieser Adenome zusammen. Typische Befunde und Symptome sind Stammfettsucht (80-100%), Mondgesicht (75-

92%), Glukoseintoleranz (55-84%), Muskelschwäche (30-90%), Bluthochdruck (75-88%), psychische Veränderungen (30-85%), Gefäßfragilität (25-85%), Hirsutismus (65-84%). Oligomenorrhoe/Impotenz (55-80%), Stria rubrae distensae (50-65%) und Osteoporose (40-56%) (5).

Ursache eines Hyperkortisolismus können außer den NNR-Adenomen (7,5%) auch das NNR-Karzinom (7,5%), das kortikotrope Hypophysen-Adenom, auch Morbus Cushing genannt (70%) und ektope ACTH-bildende Tumore (z.B. Bronchial-Ca) darstellen.

Die iatrogene Verabreichung von Steroiden ist hingegen die häufigste Ursache eines Cushing-Syndroms, das sich von adrenalen Hyperkortisolismus-Formen kaum unterscheidet.

Bei endokrin-aktiven NNR-Adenomen zeigt sich die medikamentöse Therapie des Hormonexzesses als schwierig, so dass eine chirurgische Entfernung der Adenome mit einer theoretischen Heilungsquote von 100% indiziert ist.

1.3.3 Das Nebennierenrindenzarzinom

Mit einer Inzidenz von 1:1,7 Millionen pro Jahr ist das NNR-Karzinom zwar ein seltenes, jedoch ein hochmalignes Karzinom mit schlechter Prognose. Die Hälfte der Patienten verstirbt bereits in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung. Der Altersgipfel der Erkrankung wird zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr angegeben (5). Etwa 56% der Karzinome produzieren Glukokortikoide, 29% produzieren Androgene und 7% Aldosteron. Bei fehlenden Allgemeinsymptomen wachsen die Tumoren bis zur Diagnosestellung oftmals zu einer Größe von über 6 cm.

Die möglichst vollständige chirurgische Entfernung des Tumors ist anzustreben. Die mittlere Überlebensdauer nach chirurgischer Intervention direkt nach Diagnosestellung liegt zwischen 14,5 Monaten und 3 Jahren (38). Bei inoperablen Tumoren und in der metastasierten Situation gibt es Therapieansätze mit o-p-DDD (Mitotane), einer selektiv adrenolytisch wirkenden Substanz, die die verschiedenen Enzymsysteme der NNR hemmt und kortisolsezernierende Zellen zerstört. Die besten Ergebnisse werden mit dieser Substanz bei langsam wachsenden und hormonaktiven Tumoren erzielt. Das

Therapieziel bei beiden Therapieansätzen ist oftmals hauptsächlich die Reduktion des Hormonexzesses mit den einhergehenden Symptomen.

1.4. Adrenostatika

Die Kontrolle der übermäßigen Hormonproduktion und die damit verbundenen Symptome ist ein wichtiges Therapieziel in der Behandlung von endokrin-aktiven Veränderungen der NNR. Die Indikation zur medikamentösen Therapie ergibt sich bei Versagen einer kurativen Therapie und zur Unterstützung vor einer operativen Therapie. Vor allem bei exzessiver Glukokortikoidproduktion zum Beispiel bei ektooper ACTH- oder CRH-Produktion metastatischer oder unklarer Herkunft kommen Adrenostatika auch bei benignen Erkrankungen immer wieder zum Einsatz (5).

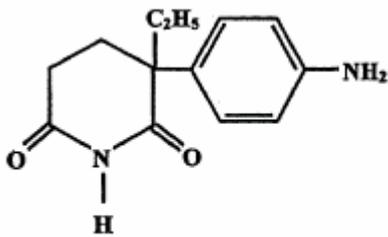
Neben o-p-DDD, das wie oben beschrieben in der Therapie des NNR-Karzinoms eingesetzt wird, gibt es weitere Inhibitoren der Steroidbiosynthese, die im Folgenden beschrieben werden. In Tabelle 2 sind einige Adrenostatika und die von ihnen gehemmten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 1: Adrenostatika und die von ihnen gehemmten Enzyme in der NNR (39)

Aminoglutethimid	P450scc-Enzym
Metyrapon	P450c11-Hydroxylase P450scc-Enzym
Etomidat	P450c11-Hydroxylase P450scc-Enzym
Trilostane	3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Ketoconazol	P450c17-Enzym P450c11-Hydroxylase P450scc-Enzym

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird auf die Adrenostatika Aminoglutethimid, Metyrapon und Etomidat der Schwerpunkt gelegt. Diese sollen hier kurz beschrieben werden.

1.4.1 Aminoglutethimid (AG)



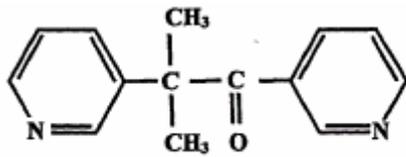
AG (Orimeten[®]) hemmt mitochondriale P450-Enzyme in verschiedenen Organen kompetitiv. Die Eigenschaft das P450_{scc}-Enzym der NNR zu inhibieren und damit die komplette Steroidbiosynthese zu supprimieren, macht man sich seit Jahren in der Therapie des Cushing Syndroms zunutze (31,39,40).

Die Konzentration der halbmaximalen Hemmung (IC₅₀) des P450_{scc}-Enzyms der NNR liegt bei ungefähr 16-40µM (41). Es finden sich Hinweise, dass die Interaktion von AG in der Nähe der prosthetischen Häm-Gruppe des P450-Enzyms stattfindet.

Als starker Aromatasehemmer wird AG auch in der Therapie des Mammakarzinoms und als P450_{scc}-Enzymhemmer in den Leydigischen Zwischenzellen in der Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt.

In der Literatur wird das therapeutische Spektrum mit einem Plasmaspiegel zwischen 7,5-15 µg/ml angegeben, was ca. 32-70 µM entspricht (42)

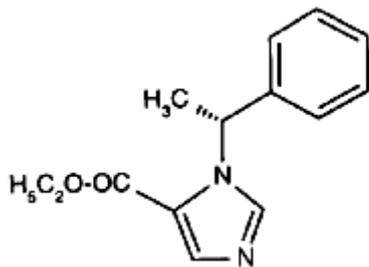
1.4.2 Metyrapon (MTP)



MTP (Metopiron[®]) inhibiert kompetitiv und reversibel das P450_{scc}-Enzym und die P450_{c11}-Hydroxylase (43) in der NNR und wird so ebenfalls therapeutisch bei Hyperkortisolismus eingesetzt (5,39). Die hemmende Wirkung auf die P450_{c11}-Hydroxylase (IC₅₀: 7,8µM) ist um ein Vielfaches höher als auf das P450_{scc}-Enzym (IC₅₀: 330 µM) (43,44). Dabei konkurriert MTP mit Deoxycorticosteron an derselben Bindungsstelle des Cytochrom P450_{c11} und hemmt so seine 11β-Hydroxylierung (45). Auch die 18-Hydroxylase-Aktivität wird durch MTP gehemmt (46). Des Weiteren konnte die Bedeutung der beiden Pyridylringe des MTP gezeigt werden. Während der B-Pyridylring für die Inhibition des P 450_{scc}- und des P450-11β-Enzyms nötig ist, gilt dies für den A-Pyridylring nicht zwingend (47).

MTP kommt bei der Funktionsdiagnostik der primären Nebenniereninsuffizienz sowie bei der Differentialdiagnostik der verschiedenen Ursachen des Cushing Syndroms zum Einsatz.

1.4.3 Etomidat (ETO)



Etomidat ist ein Imidazolderivat und ist so mit einigen Antimycotika wie Ketoconazol und Miconazol verwandt, die ebenfalls adrenostatisch wirken.

Etomidat wird als Kurzzeitanästhetikum eingesetzt. Es wirkt anästhetisch durch GABA-agonistische und damit dämpfenden Effekt auf die Formatio reticularis. Früher wurde es zur Langzeitsedierung bei Intensivpatienten eingesetzt. 1983 beschrieben Ledingham und Watt eine erhöhte Mortalität ihrer Intensivpatienten nach Langzeitsedierung mit Etomidat (48). Die daraufhin veranlassten Untersuchungen zeigten eine Suppression der Cortisol-, Corticosteron- und Aldosteronspiegel sowie erhöhte Plasma-ACTH-Konzentrationen (49-52)

In zahlreichen in-vitro- Untersuchungen an verschiedenen Modellen und in vivo wurde eine dosisabhängige Hemmung der P450c11-Hydroxylase sowie des P4450scc-Enzyms nachgewiesen. Bereits in Konzentrationen unterhalb der sedierenden Dosis besteht eine effektive Suppression der Cortisol synthese. Der stärkste Effekt von Etomidat konnte für die P450c11-Hydroxylase nachgewiesen werden (52-55).

Als Anästhetikum wird es in einer Dosierung von 0,15-0,30 mg/kg Körpergewicht i.v. eingesetzt (56).

1.5. ACTH und der ACTH-Rezeptor

Die Synthese der Glukokortikoide und Androgenen in der Nebenniere wird vorwiegend durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert (57-59). ACTH vermittelt diese Stimulation hauptsächlich über den Adenylatzyklaseweg mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP. Es kann aber auch andere Kaskaden wie den Proteinkinase C- und den Lipoxygenaseweg aktivieren (60-65).

Angriffspunkt ist hierbei der transmembranöse ACTH-Rezeptor (ACTH-R), der als MC2-Rezeptor zur Gruppe der Melanocortin-Rezeptoren gehört. Der ACTH-R gehört wie auch die LH-, FSH- und β -adrenergen Rezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er zeichnet sich daher durch sieben transmembranöse Domänen aus und ist über ein G-Protein mit oben genannten „second-messenger“-Systemen verbunden (66,67).

Er ist mit 297 Aminosäuren der bisher kürzeste G-Protein-gekoppelte Rezeptor und hat ein Molekulargewicht von 33 kD (60,68). Exprimiert wird der ACTH-R fast ausschließlich in der NNR. Es wurde aber auch ACTH-R-mRNA in der Haut und in Nagetieradipozyten nachgewiesen.

Durch die Bindung von ACTH an den Rezeptor wird die Adenylatzyklase stimuliert und führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. cAMP aktiviert nun die Proteinkinase A und löst damit vielfältige Reaktionen in der Zelle aus. So wird unter anderem die Hormonbiosynthese (s.1.2.) gesteigert (69,70), das Zellwachstum angeregt (71-75) und verschiedene Protoonkogene reguliert (76-78). Die Adaptationsprozesse der Hypertrophie und Hyperplasie der NNR sind ACTH-abhängig.

Man stellte fest, dass durch ACTH ungewöhnlicherweise die Expression von ACTH-Bindungsstellen in menschlichen NNR-Zellen hochreguliert wird (60,79). Auf DNA-Ebene fanden sich mehrere cAMP-response-elements in der ACTH-R-Promotor-Region (80). Weitere Studien belegten auch eine vermehrte ACTH-R mRNA-Expression durch Angiotensin II (79-82).

Hingegen führen Mutationen, die eine Forskolin- und ACTH-Resistenz der Adenylatzyklase bedingen, zu einem Verlust der ACTH-R-Expression (83).

Durand et al. wiesen in Untersuchungen mit Schafs-NNR-Zellen eine Steigerung der cAMP-Antwort und der Steroidogenese auf ACTH nach Langzeitbehandlung mit Glukortikoiden nach (84). In späteren Untersuchungen ließ sich auch eine gesteigerte ACTH-R-mRNA-Expression feststellen (85). Eine Behandlung der NNR-Zellen mit AG oder MTP führte zu einer Verminderung der ACTH-R-mRNA-Synthese. Diese war durch Substitution von Hydrocortison und durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Forskolin reversibel (85,86).

Eine Suppression der ACTH-R-Expression durch den Transkriptionsfaktor DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene1) sowie durch TGF- β wurde in weiteren Arbeiten beschrieben (60,87).

Keine Rolle scheint der ACTH-R als Onkogen in der adrenalen Tumorgenese zu spielen. Bisher fanden sich keine aktivierenden ACTH-R-Mutationen (60,88). So ist die

ACTH-R mRNA-Expression in endokrin inaktiven Adenomen und Karzinomen niedrig, während sie in Cortisol- und Aldosteron-produzierenden Adenomen relativ hoch ist (60,88,89).

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurde die Biosynthese und Regulation der Steroidhormone in der Nebenniere in verschiedenen Zellmodellen untersucht und beschrieben. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der ACTH-R. Die meisten Untersuchungen zur Funktion der NNR in vitro wurden an der humanen NNR-Karzinom-Zelllinie NCI-h295 durchgeführt. Hier konnte unter anderem gezeigt werden, dass Adrenostatika sehr wirksam die Steroidbiosynthese hemmen. Gleichzeitig fand sich überraschenderweise, dass sie die Expression des ACTH-Rezeptors vermindern und das Zellwachstum hemmen (86). In der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob diese Effekte auch in nichtkarzinomatösen Zellen identisch sind.

1. Die erste Aufgabe bestand folglich darin, Primärkulturen gesunder boviner NN zu etablieren.

Des Weiteren sollten die Effekte von Adrenostatika an bovinen NNR-Zellen in Primärkultur anhand folgender Fragen untersucht werden:

2. Welchen Einfluß hat die Inkubation mit Adrenostatika (Aminogluthetimid, Metyrapone, Etomidat) und ACTH auf die Steroidbiosynthese von gesunden Rinder-NNR-Zellen ?

3. Führt die Behandlung mit den Adrenostatika in den Rinder-NN-Zellen ebenfalls zu einer Downregulation des ACTH-Rezeptors und wie wirkt sich die Inkubation von ACTH mit und ohne Adrenostatika auf die mRNA-Expression des ACTH-Rezeptors aus?

Anhand dieser Untersuchungen sollten auch die Vor- und Nachteile sowie die Unterschiede zwischen der bovinen NNR-Primärkultur und anderen adrenalen Zelllinien herausgearbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Verbrauchsmaterialien/Reagentien	Firma
α - ³² P-dCTP	Amersham Buchler, Braunschweig
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer Mannheim
RIA Assays für Cortisol, 17-OH-P	DPC/Biermann, Bad Nauheim
Fetal Horse Serum, Horse Serum, Trypan Blau	Life Technologies, Eggenstein
AG, MTP, Hydrocortison, DMSO, DEPC, MOPS-Puffer, Agarose, MTT, DMEM/HAM's F12 Medium, Kollagenase II, Desoxyribonuklease I, Percoll	Sigma, Deisendorf
Maus- β -Actin cDNA, Quickhyb®, Salmon sperm DNA, Nuc Trap® purification columns	Stratagene, Heidelberg
ACTH ₁₋₂₄ (Synacthen®)	Ciba Geigy, Wehr
RNeasy Total RNA Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiamp Tissue Kit, QIAshredder, Qiabran Nylon Membran	Qiagen, Hilden
Etomidat (Hypnomidate®)	Janssen, Neuss
Ethanol, Isopropanol, Osmiumtetroxid, Propylenoxid, Primer 5'-bovi und 3'-bovi	Karl Roth KG, Karlsruhe
Percoll	Pharmacia GmbH, Freiburg
Amphotericin B, Penicillin-Streptomycin, Glutamin	Gibco
Gentamycin	Invitrogen
Geräte	
Casy Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen
Elisareader 400 SF	Lab Instruments, Salzburg

Aminoglutethimid (AG) liegt in Pulverform vor und wurde in 65% (v/v) Ethanol gelöst und anschließend zunächst mit PBS, dann mit DMEM/HAM's F12 Medium verdünnt. Die Endkonzentration des Alkohols lag in allen Versuchen unter 0,1% (v/v).

Metyrapon (MTP) liegt ebenfalls in Pulverform vor und ließ sich leicht in 10 mM Essigsäure lösen und ebenfalls mit DMEM/HAM's F12 Medium verdünnen. Die Endkonzentration der Essigsäure lag maximal bei 20µM.

Etomidat (ETO) liegt im Präparat Hypnomidate® als Lösung vor. Die Stammlösung wird mit DMEM/HAM's F12 Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Das synthetische Peptid ACTH₁₋₂₄ (Synacthen®) wurde in einer Konzentration von 10⁻⁸ M eingesetzt. Die Substanz ist gut wasserlöslich. Die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration konnte in normalem Zellkulturmedium erfolgen.

Percoll ist eine Suspension mit kolloidalen Teilchen von 15 bis 30 nm Durchmesser, die mit Polyvinylpyrolidin beschichtet sind. Die Stammsuspension hat eine Dichte (ρ_s) von 1,13 g/ml. Durch Verdünnung mit 1,5 M NaCl ($\rho_{\text{NaCl}} = 1,058$ g/ml) und reinstem Wasser kann man die benötigte Dichte (ρ_o) erreichen. Die Formel zur Berechnung der Volumina auf die gewünschte Dichte lautet: $V_s = V_o \times (\rho_o - (0,1 \times \rho_{\text{NaCl}}) - 0,9) / (\rho_s - 1)$. V_s entspricht dem Volumen der Percoll-Stammsuspension, V_o dem benötigten Volumen der verdünnten Suspension.

Für die Zentrifugation mit der Percoll suspension zur Separierung der Nebennierenzellen benötigt man eine Dichte von 1,07 g/ml. Für 100 ml Suspension mit der Dichte 1,07 g/ml fügt man 10 ml 1,5 M NaCl und 49,3 ml Percoll-Stammsuspension zu 40,7 ml reinstem Wasser (90).

Für die Verdauung des die Nebennierenzellen umgebenden Bindegewebes wurde Collagenase II und Desoxyribonuklease I verwendet.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Präparation boviner Nebennieren

Das Protokoll der im Folgenden beschriebenen Präparation folgte modifiziert nach der Beschreibung von Weber und Michl 1996 (90).

Die im Verlauf des Protokolls verwendeten Medien:

- DMEM HAM's F12 Medium, das mit 52 µg Gentamycin und 0,5 µg Amphotericin B pro ml Medium versetzt wurde.

- Für die im Versuch beschriebenen Waschschrirte wurde diesem Medium 10 % FCS hinzugefügt.
- Das Wachstumsmedium enrhieit schließlich 10 % FCS, 5 % HS und 365 mg Glutamin pro ml.

Für eine Versuchsreihe wurden zwischen 9 und 15 Nebennieren von frisch geschlachteten Rindern aus dem örtlichen Schlachthof gebraucht.

Die Nebennieren wurden noch im Schlachthof direkt nach der Schlachtung von der periaarenalen Fettkapsel befreit und in eisgekühltem, sterilem PBS ins Labor transportiert.

Dort wurde unter dem sterilen Abzug die Nebenniere gereinigt. In mehreren Schritten präparierte man nun die Nebennierenrinde vorsichtig von der Kapsel unter Vermeidung von Kontakt mit Fettzellen zur Verminderung der lipasebedingten Zytolyse. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst wenig Bindegewebe mit Fibroblasten in das weiterbearbeitete Material gelangte.

Das gewonnene Nebennierenrindenmaterial wurde zerkleinert und dann ca. 75 Minuten in mit Antibiotika versetztem DMEM-HAM's F12 Medium mit 1mg/ml Collagenase II und 7,5µg/ml Desoxyribonuklease bei 37°C unter Rühren verdaut. Der Verdauungsprozess wurde durch Verdünnung mit 10% FCS-Medium unterbrochen. Die nun zähflüssige Suspension wurde zunächst durch ein feines steriles Edelstahlsieb filtriert. Danach folgte ein Filtrationsschritt durch eine 50µm Gaze.

Die Zellsuspension wurde jetzt in mehreren Waschschrirten bei 400 g (1400U/min) für 7 Minuten zentrifugiert und mit frischem 10% FCS- Medium resuspendiert.

Im Anschluss daran wurde nach der letzten Zentrifugation das Waschmedium abgenommen und das Zellpellet in 37°C warmer Percoll-Lösung sorgfältig resuspendiert und bei 730 g (2000U/min) für 10 Minuten wieder zentrifugiert. In der oberen Schicht sammelten sich entsprechend dem Dichtegradienten die Nebennierenzellen, während sich die Erythrozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens sammelten. Die Nebennierenzellschicht wurde vorsichtig mit einer feinen Pipette abgesaugt, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 37°C warmem Waschmedium resuspendiert. Daraufhin wurde wieder bei 1400 U/min zentrifugiert und dieser Waschschrirte noch ein- bis zweimal mit Kulturmedium wiederholt.

Vor der Aussaat der Zellen in 75 cm³ Zellkulturflaschen wurden die Zellen gezählt. In einem definierten Volumen wurden die Zellen resuspendiert, mit Medium verdünnt und dann mit Trypan-Blau im Verhältnis 1:1 mittels der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Schließlich wurden die Zellen mit einer Konzentration zwischen 10⁴ und 10⁶ Zellen /ml ausgesät. Dabei wurden immer zwischen 20 und 25 ml in eine Kulturflasche eingebracht.

Die Zellen wuchsen adhärent am Boden der Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂.

Nach 24 h fand der erste Mediumwechsel statt. Dabei wurde auf eine reinigende PBS-Spülung verzichtet, um die gerade auf dem Boden der Kulturflasche angewachsenen Zellen nicht wieder zu lösen. Bei den weiteren Mediumwechseln jeweils nach 24 h wurde dieser Spülschritt zur Verminderung der Verschmutzung durch Zelldetritus jedes Mal durchgeführt.

2.2.2 Versuchsbeschreibung

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden die Wirkungen verschiedener Adrenostatika und ACTH sowie deren Kombination auf die bovinen NNR-Zellen hinsichtlich der Hormonbiosynthese, der mRNA-Expression und der Zellproliferation untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten herangezogen. Die Effekte auf die Hormonbiosynthese konnten in beiden Verfahren untersucht werden. Hierfür wurden nach der Inkubation mit den Testsubstanzen jeweils Aliquots des Mediums asserviert und mittels Radioimmunassays (RIA) auf einzelne Hormone hin analysiert (siehe dazu 2.3.).

2.2.2.1 Untersuchung der mRNA-Expression bei NNR-Zellen in Primärkultur

Die NNR-Zellen in Primärkultur wurden dabei in den Zellkulturflaschen von 75 cm³ belassen und mit den Adrenostatika inkubiert. Um die mRNA-Expression der NNR-Zellen zu untersuchen, bediente man sich des Northern-Blot-Verfahrens, das unter 2.4.

beschrieben wird. Hierfür benötigt man genügend vitale Zellen, um daraus eine ausreichende Menge RNA zu extrahieren. Die Zellen wurden nach einer Spülung mit 37°C warmem PBS mit frischem Medium und dem jeweiligen Zusatz von AG (300, 400, 450, 800, 1200 μM), MTP (300 μM), ACTH (10nM), AG (300 μM) + ACTH (10 nM) oder MTP (300 μM) + ACTH (10nM) für 48 h inkubiert. Die Experimente wurden jeweils in Triplets durchgeführt.

Die FCS-Menge wurde von 10% auf 7,5%, die HS-Menge von 5% auf 2,5% reduziert, um eine Verfälschung der Hormonergebnisse aufgrund der nicht definierten Substanzen (unter anderem verschiedene Hormone) in FCS und HS zu verringern. Eine weitere Reduktion der Serumkonzentrationen war jedoch nicht möglich, da sonst die Vitalität der Zellen drastisch abgenommen hätte.

Am Ende der Inkubation wurde das Medium abgenommen und Aliquots zur späteren Hormonbestimmung bei -20°C eingefroren. Die in der Kulturflasche adhärent wachsenden Zellen wurden nach Spülung zur Entfernung des verbliebenen Mediums mit Trypsin vom Boden gelöst und mit frischem Medium aufgenommen. Die Vitalität der Zellen wurde während der Zellzählung in der Neubauerzählkammer mittels Trypan-Blau überprüft.

Das Medium wurde abzentrifugiert und die Zellen für die RNA-Extraktion (siehe 2.4.) vorbereitet und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2. Tests zur Hormonsekretion der bovinen NNR-Zellen

Zur Evaluierung der Hormonproduktion der bovinen NNR-Zellen wurden diese in Wellplatten mit den verschiedenen Adrenostatika und ACTH sowie der Kombination der Adrenostatika mit ACTH fünf Tage inkubiert.

Für diese Tests wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gelöst. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und für 5 bis 10 Minuten mit 2 bis 5 ml Trypsin inkubiert. Dann wurden die vom Flaschenboden gelösten Zellen in Medium aufgenommen und in Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach der Zentrifugation wurden sie in einer definierten Menge frischen Mediums wieder aufgenommen und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Nach einigen Vorversuchen zur Ermittlung der idealen Zellzahl und optimalen Zellversorgung während des Versuches wurden die Versuche wie folgt durchgeführt:

In 96-Well-Platten wurden pro Well 30 000 Zellen eingesät. Die jeweiligen Medikamente wurden gleich bei Einsaat in den Ansatz zugegeben. Die Zellen inkubierten fünf Tage ohne Mediumwechsel.

Auf jeder Testplatte waren jeweils mindestens acht Wells für unbehandelte Kontrollzellen in Wachstumsmedium vorgesehen. Die Zellen wurden mit AG, Etomidat, MTP jeweils mit den Konzentrationen 0,6 μ M, 6 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 300 μ M inkubiert. Des Weiteren gab es Testreihen mit 10nM ACTH sowie der Kombination von 10nM ACTH mit 60 μ M AG oder mit 60 μ M Etomidat.

Nach fünf Tagen Inkubation wurde Medium zur späteren Hormonbestimmung asserviert.

2.3. Hormonanalysen

Aus den Aliquots, die in den 2.2. beschriebenen Versuchen gewonnen wurden, wurde Cortisol und 17-OH-P bestimmt. Im Falle der unter 2.2.2.1. beschriebenen Versuche konnten die Hormonkonzentrationen pro 10⁶ dargestellt werden.

2.3.1 Testprinzip

Die Tests zur Bestimmung von Cortisol und 17-OH-P arbeiten mit dem Grundprinzip des Radioimmunassays (RIA). Es konkurrieren hierbei Antigene, in diesem Falle die Hormone der zu testenden Lösung beziehungsweise der Kontroll- und Standardproben, mit dem radioaktiv-markierten Hormon (Tracer) um eine definierte Anzahl von Bindungsstellen an antigenspezifischen Antikörpern, die an der Oberfläche des Teströhrchens fixiert sind.

Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Menge des radioaktiven Antigens gemessen, dessen Menge umgekehrt proportional zur Konzentration der zu analysierenden Probe ist.

Mit Standardproben wird eine Eichkurve erstellt, an der die zu analysierenden Proben verglichen und bestimmt werden können.

2.3.2 Durchführung

Das Arbeitsprotokoll des Herstellers wurde genauestens beachtet. Mit einem γ -Counter konnten die Proben gemessen und umgerechnet werden. Die Hormonbestimmung erfolgte doppelt, woraus ein Mittelwert gebildet wurde.

2.4. Expressionsnachweis des ACTH-Rezeptors

Zur Darstellung der mRNA des ACTH-Rezeptors bediente man sich in der vorliegenden Arbeit dem Northern-Blot-Verfahren, das 1977 von Alwine et al. entwickelt und beschrieben wurde (91).

Hierzu wurde die in den Zellen vorhandene RNA extrahiert, in einer Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (sogenanntes Blotten).

Anschließend wurde die zu untersuchende RNA des ACTH-Rezeptors mit komplementären, radioaktiv markierten DNA-Ausschnitten des ACTH-R (sogenannte DNA-Sonde) auf der Membran markiert. Mit der so markierten Membran wurde ein Röntgenfilm belichtet und so die RNA des ACTH-Rezeptors dargestellt.

Als Anleitung für den Northernblot wurde das Protokoll der Firma Stratagene in modifizierter Form verwendet. Die folgende Abbildung 3 zeigt das Northern-Blot-Verfahren schematisch.

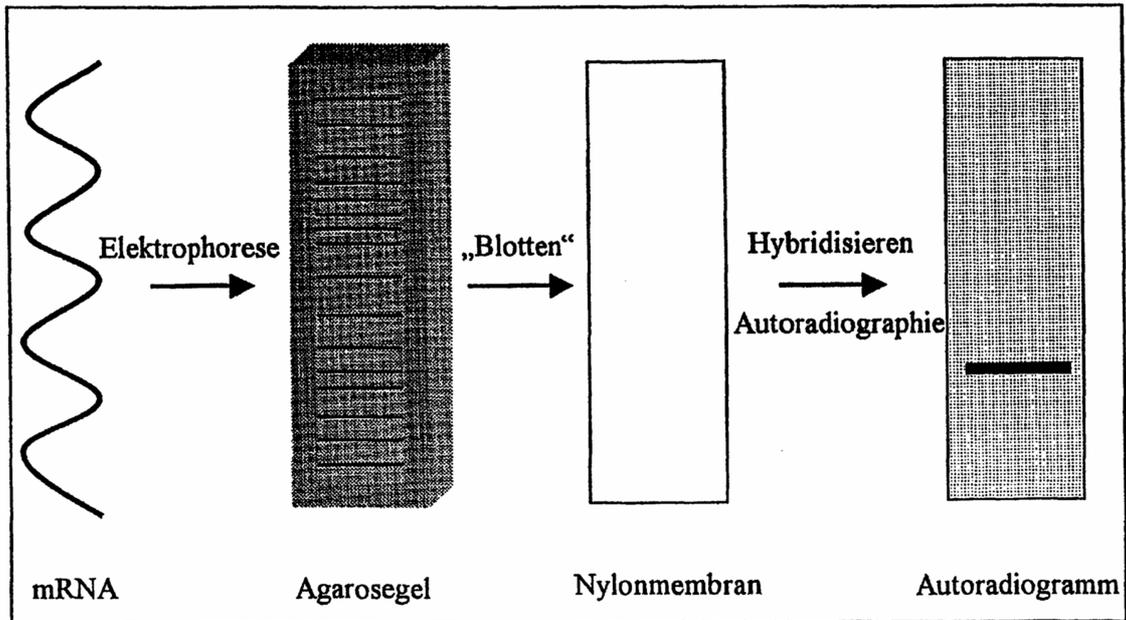


Abbildung 3 : Schematische Darstellung des Northern-Blot-Verfahrens (92)

Die Darstellung der exprimierten RNA von β -Actin diente der Normierung der Proben. β -Actin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und somit seine RNA-Menge pro Zelle relativ konstant. So korreliert diese gut mit der absolut eingesetzten RNA-Menge pro Bande.

2.4.1 Extraktion der RNA

Um die Gefahr des RNA-Abbaus durch in der Umgebung vorkommende sogenannte RNAsen so gering wie möglich zu halten, müssen die Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit so schnell wie möglich lysiert und zugleich die RNAsen denaturiert werden. Des Weiteren wird die RNA an einen spezifischen Träger gebunden, um die weiteren Bestandteile der Zellen (Lipide, Proteine, DNA usw.) in chemischen Waschschritten zu entfernen. Zum Schluss wird bei veränderten pH-Bedingungen die RNA von dem Träger eluiert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden alle RNA-Extraktionen mit dem RNeasy total RNA Kit der Firma Qiagen und dem dazugehörigen Protokoll durchgeführt, das auf die speziellen Bedingungen abgestimmt wurde.

Die nach den Versuchen aservierten Zellen wurden bei 800 rpm (153 g) 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit Lysis Buffer RTL, der mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 μ l/ml) zur Eliminierung der RNAsen versetzt war, resuspendiert. Um eine optimale Lyse der Zellen zu erreichen, wurde die Zellsuspension mit einem Ultra Turrax[®] eine Minute lang homogenisiert. Das Lysat wurde bei -80 C° bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren und gelagert.

Zur eigentlichen RNA-Extraktion wurde das Lysat nach dem Auftauen nochmals mittels eines speziell für Eukaryontenzellen entwickelten QIAshredder[®] homogenisiert, die Proteine mit 70%igem Alkohol ausgefällt und das so präparierte Lysat auf RNeasy-Zentrifugenröhrchen gegeben. In diesen Röhrchen ist eine mit Silikatkugeln beschichtete Membran eingearbeitet, die unter definierten ionischen Verhältnissen RNA ab einer Größe von 200 Basenpaaren binden kann.

Danach wurde die Membran in den Röhrchen mit vorgefertigten Waschpuffern verschiedener Salzkonzentrationen gereinigt und zum Schluss die RNA mit RNAsenfreiem Wasser aus der Membranbindung eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal durchgeführt. Dabei inkubierte das Wasser jeweils 10 Minuten auf der Membran, um eine optimale Ausbeute an RNA zu erhalten. Das Eluat der am Beginn der Extraktion zur besseren Bearbeitung getrennten Proben wurde wieder zusammengeführt und die Konzentration der RNA spektrophotometrisch bestimmt. Der Reinheitsgehalt der RNA wurde mit der Ratio, dem Verhältnis zwischen der Absorption bei der Wellenlänge 260 nm und 280 nm, bewertet. Nur Proben mit einer Ratio zwischen 1,8 und 2,0 wurden der Weiterbearbeitung zugeführt.

Das RNA-Extrakt konnte bei -20 C° gelagert werden.

2.4.2. Formaldehyd-Gelelektrophorese

30 μ g RNA-Extrakt wurden pro Ansatz in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und die getrockneten Proben mit 5 μ l Puffer gelöst. Mit diesem wurde die RNA denaturiert. Der Puffer war wie folgt zusammengesetzt:

48% deionisiertes Formamid

34 % Loading Dye

18 % Formaldehyd

Der obengenannte Loading Dye war zuvor aus 30 % (v/v) 10X MOPS, 2 0% (v/v) 10mg/ml Ethidiumbromid, 20 % (v/v) sterilisiertem Wasser, 15 % (v/v) sterilem Glycerol, 15 % (v/v) gesättigter Bromophenolblau-Lösung hergestellt worden.

Die Proben wurden nach 2 minütigem Erwärmen bei 37°C auf ein 2%iges Agarosegel (2g Agarose, 10,8 ml 37%iges Formaldehyd auf 200 ml Gesamtvolumen) einzeln in vorgeformte Taschen geladen.

Die RNA wurde bei 34 Volt für einen definierten Zeitraum (15 Stunden) in 1X MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.3. Kapillartransfer auf Nylonmembran („Blotten“)

Ob die RNA vollständig aufgetrennt war, wurde unter UV-Licht kontrolliert und zur Dokumentation fotografiert.

Als ersten Schritt des Blottens wurde die RNA im Gel mit 0,05 M NaOH 25 Minuten teilhydrolysiert, um einen besseren Transfer zu gewährleisten. Danach wurde das Gel in Tris-HCl mit einem pH von 7,5 wieder neutralisiert.

Vor dem Transfer wurde das Gel mindestens 20 Minuten in 10X SSC-Puffer inkubiert. Dann folgte der Transferaufbau: zuunterst das Gel, dann die Nylonmembran und als „Saugkraft“ drei Lagen Whatman-Papier und Papierhandtücher. Das Gel wurde über eine Whatman-Papierbrücke während des gesamten Transfers von 18 bis 24 Stunden Dauer mit 10X SSC-Puffer feucht gehalten.

Danach wurde die Membran beschriftet und die RNA durch Crosslinking bei 150 mJoule im GS Gene Linker von Bio Rad dauerhaft auf die Membran fixiert. Bis zur Hybridisierung konnte die Membran bei 4°C gelagert werden.

Zur Darstellung der spezifischen RNA-Bande für den ACTH-Rezeptor benötigt man nun eine komplementäre DNA-Sonde, die sich, radioaktiv markiert, an die auf der Membran fixierten RNA des ACTH-Rezeptors anlagert.

2.4.4. Herstellung der DNA-Sonden

2.4.4.1. Die ACTH-Sonde

Als ACTH-Rezeptor-Sonde wurde cDNA verwendet, die mittels einer PCR hergestellt worden war. Da die gesamte kodierte Sequenz des ACTH-R im Exon 2 vorliegt, kann zur Herstellung einer cDNA-Sonde in diesem Falle auch DNA genommen werden.

Zunächst wurde aus Gewebe von Nebennieren und Nieren des Rindes die DNA extrahiert. Dies erfolgte mit dem Qiamp Tissue Kit der Firma Qiagen. Es wurden vier Ansätze mit jeweils zwischen 14 und 20 mg Gewebe der Niere bzw. der Nebenniere über Nacht mit 40 µl RNase (10 mg/ml) lysiert und dann mittels des Tissue Kits die DNA eluiert.

Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt und die Integrität der DNA auf einem Agarosegel überprüft.

Aus der so gewonnenen Gesamt-DNA des Rindes wurde das 805 Basenpaare große Fragment, das einem großen Teil des bovinen ACTH-Rezeptors entspricht, mit einer PCR unter Verwendung folgender Primer amplifiziert: 5'-TCA-TAT-CCA-TTG-TTG-GG-3' und 5'-ATC-ATT-CTA-CTG-GTA-ACA-GT-3' (93).

Mithilfe dieser Primer lässt sich das gewünschte DNA-Stück amplifizieren. Zudem benötigt man eine ausreichende Menge der vier Desoxynucleosid-triphosphate und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Zunächst wird die DNA durch Erhitzen denaturiert. Nach einer Abkühlung hybridisieren die Primer an den DNA-Einzelsträngen jeweils in 3'-5'-Richtung an die DNA-Einzelstränge. Nachfolgend an diese Primer werden nun die komplementären DNA-Stränge neu synthetisiert. Im nächsten Zyklus werden durch Erhitzung die DNA-Stränge wieder aufgebrochen und so beginnt der Vorgang von neuem. Ab dem 3. Zyklus kann man von einer Amplifizierung des gewünschten DNA-Stücks ausgehen. Die Cycles werden ca. 20 bis 30 mal wiederholt. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich der Anteil der zu amplifizierenden DNA-Stücke.

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Anhand eines 100 bp Markers wurde die richtige Größe der Bande (ca. 800bp) kontrolliert. Die Bande wurde aus dem Gel geschnitten und die amplifizierte DNA mithilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits aus dem Gel extrahiert.

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der selektiven Adsorption der Nukleinsäuren an die Qiaex-Silicage-Partikel, die in speziellen Filtern enthalten sind, in Anwesenheit von hohem Salzgehalt und der Löslichkeit von Agarosegel. Zunächst werden durch eine hohe Natriumperchloratlösung im QX1-Puffer die Wasserstoffbrücken im Agarosepolymer zerstört, wodurch es zu einer Auflösung des Gels kommt. Zusätzlich dissoziieren die DNA-Bindungsproteine von der DNA durch die hohe Salzkonzentration bei bestehendem niedrigen pH (< 7,5). Im zweiten Schritt werden die Agarosegelreste mit dem QX2-Puffer aus dem Filter gewaschen und darauf mit einem alkoholhaltigen Puffer QX3 die Salzreste entfernt.

Nach dieser Prozedur konnte man die DNA mit einem niedrigsalzigen Puffer, hier TE-Puffer, mit einem pH 8,0 aus dem Filter waschen.

Die amplifizierte DNA wurde bis zur Verwendung als Sonde bei 4-8°C gelagert.

2.4.4.2. Die β -Actin-Sonde

Die aus Mäusezellen hergestellte β -Actin-Sonde wurde von der Firma Stratagene bezogen. Sie befindet sich in einem Vektor, der mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut wurde. Die Restriktionsenzyme für β -Actin sind EcoR I und Xho I. Die β -Actin-Sonde ist 1500 bp groß. Wie auch der PCR-generierte ACTH-Rezeptor wurden die β -Actin-Fragmente über ein 1%igen Agarosegel aufgereinigt und eluiert, um dann bei 4-8°C bis zur Weiterverwendung gelagert zu werden.

2.4.5. Markieren der Sonde und Hybridisierung der geblotteten Membran

Die Sonden-DNA wurde mit einem „Random Primed DNA Labeling Kit“ entsprechend der Anweisung des Herstellers mit ^{32}P -dCTP markiert. Zuerst wurde die Sonde 5 Minuten bei 95°C denaturiert und danach mit den Nukleotiden dATP, dGTP, dTTP und ^{32}P -dCTP, einem Reaktionsmix mit Puffer und Hexanukleotiden und dem sogenannten Klenow-Enzym, einer Polymerase, 30 Minuten lang inkubiert. Durch das Enzym wurden neue DNA-Stränge amplifiziert, in die das radioaktive Cytosin eingebaut war. Das überschüssige ^{32}P -dCTP des Ansatzes wurde über NucTrap-Purifikation-Columns®

herausgefiltert, um keine unspezifische Hintergrundaktivität auf dem Blot zu erhalten. Der Erfolg des radioaktiven Einbaus wurde mit einer Messung am β -Counter überprüft.

Zur Vorbereitung der Blot-Membran wurde diese in einem Hybridisierungssofen 30 Minuten mit 10 ml Quickhyb[®] Lösung vorinkubiert. Die markierte Sonde wurde nach Zugabe von 100 μ l Salmon-Sperm-DNA, die eine Verbindung der radioaktiven Sonden untereinander verhindern sollte, nochmals bei 100°C denaturiert und dann zu der vorinkubierten Membran in der Hybridisierungslösung dazugegeben.

Die Blot-Membran wurde nun eine Stunde in der Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde zur Hybridisierung dieser an die spezifische RNA bei 68°C unter ständiger Rotation im Hybridisierungssofen inkubiert.

Im Anschluß daran wurden die unspezifischen Bindungen in verschiedenen stringenten Schritten bei 60°C von der Membran „gewaschen“: zweimal 15 Minuten mit einer Lösung aus 1X SSC (150mM NaCl, 30 mM Na₃Citrat, pH 7,0) und 0,1% (v/v) SDS und zweimal 15 Minuten mit der Lösung aus 0,5X SSC und 0,1%(v/v) SDS.

Zur Detektion der spezifischen, nun radioaktiv markierten RNA-Sequenzen wurde auf die gewaschene Membran ein Kodak-X-Omat-DS-Röntgenfilm gelegt. In einer Kassette mit Verstärkerfolie wurde dieser Film bei -80°C je nach Stärke des Signals mehrere Stunden bis Tage belichtet und anschließend entwickelt.

Die Röntgenfilme wurden zur Auswertung eingescannt. Die Banden konnten so densitometrisch mit Hilfe des Programmes IMAGE (NIHM National Institute of Health, Bethesda, USA) quantifiziert werden.

Um eine andere RNA-Sequenz mittels Hybridisierung darzustellen, musste zuvor die „alte“ Sonde abgewaschen werden. Dazu wurde im sogenannten „Blotstripping“ die Membran mit 0,1 X SSC und 1% (v/v) SDS dreimal jeweils 15 Minuten bei 95°C inkubiert und zum Schluss mit RNAsen-freiem Wasser gespült. Vor Rehybridisierung mit einer anderen DNA-Sonde wurde die Membran mit einem Röntgenfilm auf vollständige Entfernung der „alten“ Sonde kontrolliert. Auf diese Weise war es möglich, die RNA auf den Membranen mehrmals zu untersuchen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden entweder als Durchschnittswerte mit Standardfehlern angegeben oder die Mittelwerte im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent dargestellt, wobei der Kontrollwert 100% angenommen wurde. Die Signifikanzberechnungen erfolgten mit unabhängigen T-Tests der Mittelwerte mit dem Programm SPSS 9.0 für Windows auf einem PC. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Primärkultur der bovinen NNR-Zellen

Das in 2.2.1 beschriebene Verfahren eignete sich gut zur Gewinnung von NNR-Zellen aus Rindernebenieren. Es ließen sich ca $170 \cdot 10^6$ Zellen aus 1 NN gewinnen. Bei sorgfältiger Präparation lag die Anzahl der Fibroblasten bei 10 %. In zwei bis fünf Tagen waren die Zellkulturen so gewachsen, dass die Versuche auf dicht gewachsenen Zellrasen durchgeführt werden konnten. Erfahrungsgemäß wuchsen ca 30% der ursprünglich eingesetzten NN-Zellen an und konnten für die Versuche verwendet werden.

Unbehandelte Zellen produzierten im Mittel $3,8 \mu\text{g} \pm 1$ Cortisol/ 10^6 Zellen und $34,0 \text{ ng} \pm 4$ 17-OH-Progesteron/ 10^6 Zellen in 48 h.

Da die Primärkultur für Kontamination mit von extern eingeschleppten Bakterien anfällig wurde, wurde das Antibiotikum von Gentamycin auf Penicillin und Streptomycin gewechselt, um die Kontamination in den Griff zu bekommen. So konnte man dem lokalen Erregerspektrum gerecht werden.

Die Zellen wuchsen unterschiedlich schnell und vermehrten sich unterschiedlich gut, so dass der Zeitpunkt des Versuchbeginns nicht immer in gleichem zeitlichen Abstand zur Präparation lag.

Zu Beginn eines Experiments konnte von keiner definierten Zellzahl pro Kulturflasche ausgegangen werden, da die Zellen adhärent wachsend, nicht direkt vor der Inkubation mit den Testsubstanzen gezählt werden konnten. Dies gilt nicht für die durchgeführten MTT-Tests, bei denen eine definierte Zellzahl mit den zu testenden Substanzen direkt inkubiert wurde.

3.2 Effekte von Adrenostatika und ACTH auf die bovinen NNR-Zellen

Aufgrund der obengenannten Schwierigkeiten waren nicht alle Versuche auswertbar. Die folgenden Ergebnisse resultieren in einigen Fällen aus weniger als drei unabhängigen Versuchen.

3.2.1. Hormonbiosynthese

3.2.1.1. Dosisabhängige Cortisol synthesehemmung von AG, MTP und Etomidat

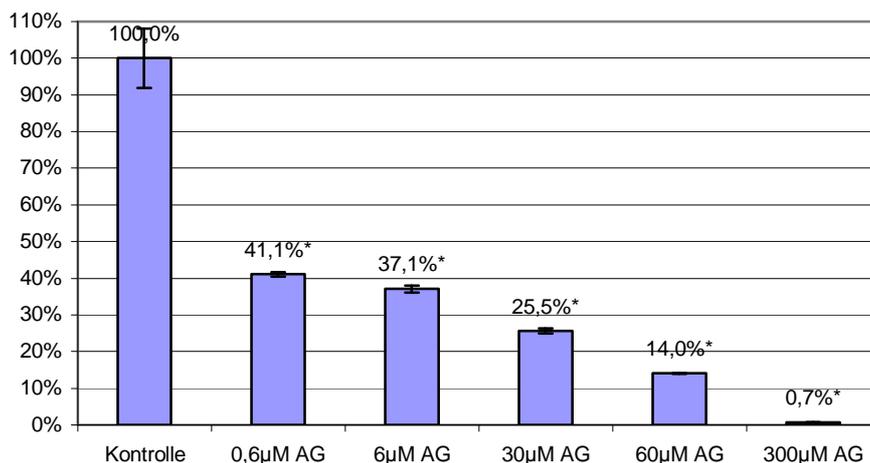
Bei den Hormonanalysen konnte für die Substanzen AG, MTP und Etomidat eine dosisabhängige Hemmung von Cortisol gezeigt werden.

Die Hormonproben wurden aus den Wells bei den oben beschriebenen MTT-Tests gewonnen. Bei gleicher Zellaussaat von 30 000 Zellen pro Well kann man von vergleichbaren Hormonwerten ausgehen.

Die Hormonwerte wurden nach 48 h Inkubation mit der jeweiligen Substanz gemessen.

Mit AG konnte eine dosisabhängige Hemmung nachgewiesen werden. Bei einer Inkubation mit 0,6 μM AG fand sich eine deutliche Hemmung auf 41,1 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine komplette Hemmung auf 0,7% der Kontrolle war bei einer Konzentration von 300 μM AG zu erkennen (Diagramm 1)

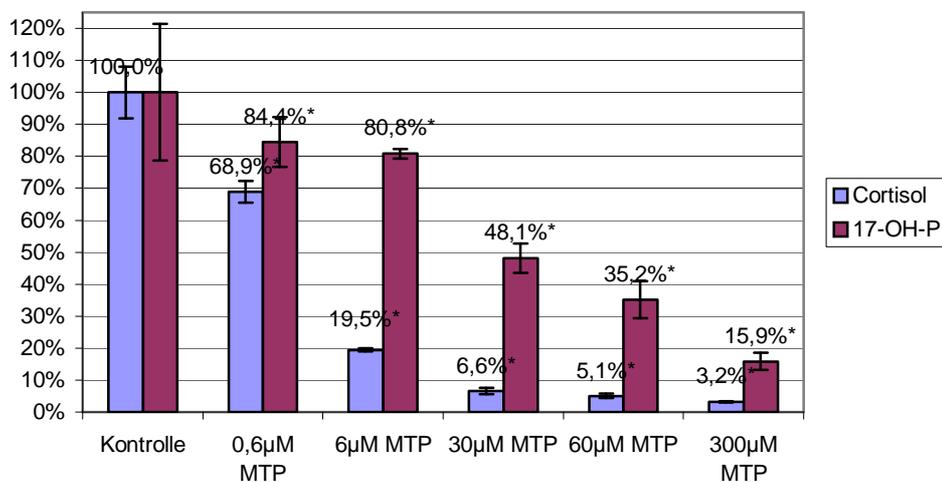
Diagramm 1: Dosisabhängige Hemmung der Cortisolsekretion mit Aminoglutethimid



Dargestellt ist die Cortisol synthese rate in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen (=100%) in 48 h mit Standardfehler. *= $p < 0,05$ versus Kontrolle. Die dosisabhängige Reduktion der Cortisolkonzentration bei steigenden AG-Konzentrationen sind zu erkennen.

Mit 0,6 μM MTP konnte eine signifikante Hemmung der Cortisolproduktion auf 68,9% der Kontrolle erreicht werden. Bei einer Konzentration von 30 μM MTP wurde die Cortisolproduktion auf 6,6 % zur Kontrolle und die 17-OH-P-Synthese auf 48% zur Kontrolle reduziert, während 17-OH-P bei niedrigeren Konzentrationen (0,6 μM und 6 μM) mit 84% und 81% noch deutlich höher lag (Diagramm 2).

Diagramm 2: Dosisabhängige Hemmung der Cortisol- und 17-OH-P-Sekretion mit Metyrapon



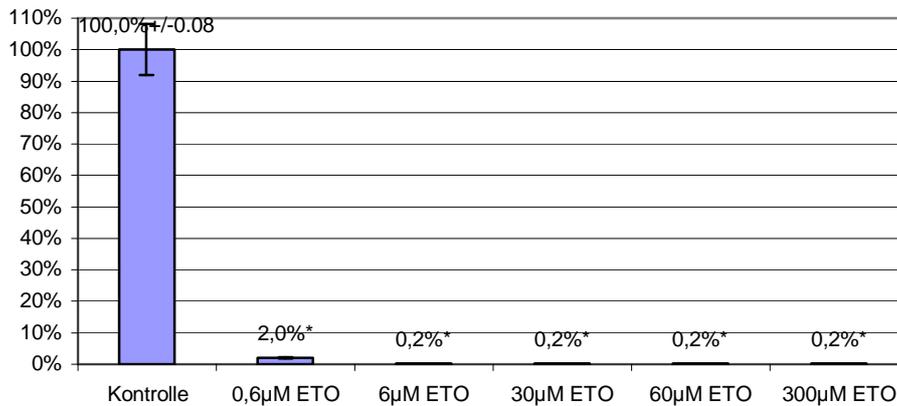
Links ist die Cortisol synthese rate in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen (=100%) in 48 h und rechts die 17-OH-P-Syntheserate mit Standardfehler dargestellt. *= $p < 0,05$ versus Kontrolle.

Die dosisabhängige Hemmung der Cortisolproduktion zeigt sich ab einer MTP-Konzentration von 0,6 μM . Erst ab einer Konzentration von 30 μM MTP war die 17-OH-P Konzentration auf unter 50% der Kontrolle reduziert.

Bei Etomidat zeigte sich bereits bei 0,6 μM eine nahezu komplette Hemmung der Cortisolproduktion auf 2% im Vergleich zur Kontrolle. Ab 6 μM ETO kam es zu einer maximalen Hemmung auf 0,2% der Kontrolle (Diagramm 3)

Die 17-OH-P-Syntheserate war bei 0,6 μM ETO auf 47% und bei 30 μM ETO auf 2,4% reduziert. Diese Werte waren mit $p < 0,001$ hochsignifikant.

Diagramm 3: Dosisabhängige Hemmung der Cortisolsekretion mit Etomidate



Dargestellt ist die Cortisol synthese rate über 48 h in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen (=100%) mit Standardfehler. *= $p < 0,05$ versus Kontrolle. Der Standardfehler der Konzentrationen ab $6 \mu\text{M}$ ETO beträgt $\pm 0,001$ und kleiner. Es stellt sich eine deutliche Hemmung der Cortisol synthese bereits ab einer Etomidatkonzentration von $0,6 \mu\text{M}$ dar.

3.2.1.2. Effekte von AG und MTP in Kombination mit ACTH auf die Hormonsynthese

Durch ACTH wird die Sekretion von Cortisol und 17-OH-Progesteron auf das über zehnfache gesteigert. Interessanterweise lässt sich durch die Kombinationsbehandlung von Adrenostatika und ACTH die komplette Blockade der Hormonsekretion durch die hochdosierte AG- und MTP-Gabe aufheben. Es werden teilweise Werte erzielt, die deutlich über den der Kontrollzellen liegen (Tabelle 2). Während AG bei der Einzelgabe ähnlich potent ist wie MTP, zeigt sich in der Kombination mit ACTH, dass MTP wesentlich stärker die Steroidbiosynthese hemmt.

Tabelle 2: Effekte von AG und MTP in Kombination mit ACTH auf die Hormonsyntheserate

	<u>Cortisol (% d. Kontrolle)</u>	<u>17-OH-P (% d. Kontrolle)</u>
Kontrolle	100,0 ±1	100,0±4
10nM ACTH	1275,0±6 *	1102,0 ±95 *
300µM AG	4,2±0,03 *	6,3±1
300µM MTP	1,93±0 *	1,25±1,6
300µM AG + 10nM ACTH	549,0±5 *	769,0±38 *
300µM MTP + 10nM ACTH	85,0±1	916,0±71 *

Die Zellen wurden 48h mit ACTH, AG, MTP und die jeweilige Kombination von AG und MTP mit ACTH inkubiert. Die Steroidkonzentrationen wurden im Zellüberstand gemessen. Die Ergebnisse sind als Prozentangabe zu den unbehandelten Kontrollzellen (= 100%) mit Standardfehlern dargestellt. *= p< 0,05 versus Kontrolle. Die Signifikanz der Cortisolwerte bei der Kombination von AG+ACTH versus 300µM AG konnte mit p=0,021, der Kombination von MTP+ACTH versus MTP mit p= 0,006 gezeigt werden.

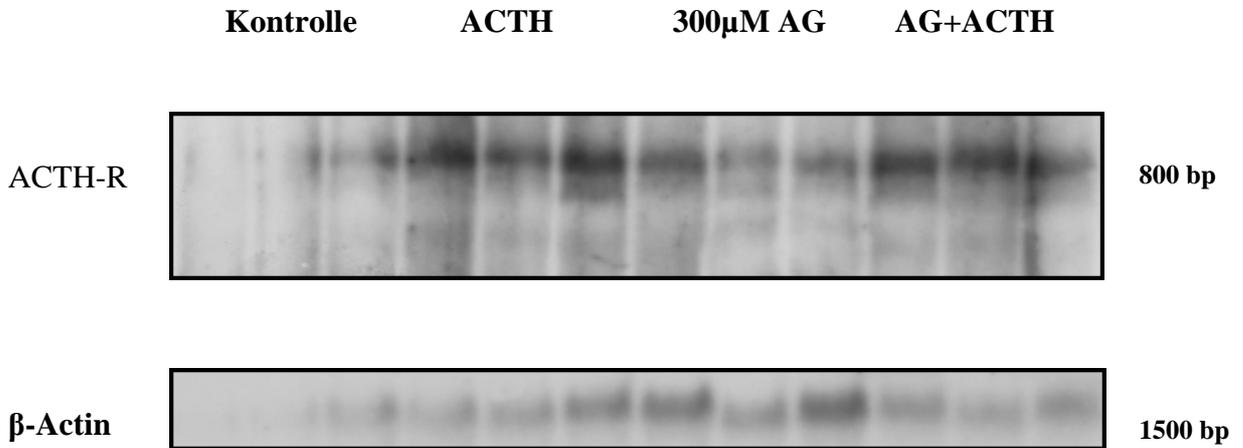
3.2.2 ACTH-R-m-RNA-Expression

Es konnten zwei Northern-Blot-Experimente ausgewertet werden. Die hier untersuchte mRNA stammt aus den Zellen, deren Hormonbiosynthese in der oben gezeigten Tabelle 2 dargestellt wurde.

Bei der Inkubation der bovinen NNR-Zellen mit ACTH konnte eine Erhöhung der mRNA-Expression des ACTH-R (129% im Vergleich zur Kontrolle) beobachtet werden, während die Inkubation mit AG zu einer Verminderung der mRNA-Expression (46% im Vergleich zur Kontrolle) führte.(Abbildung 4, Diagramm 4)

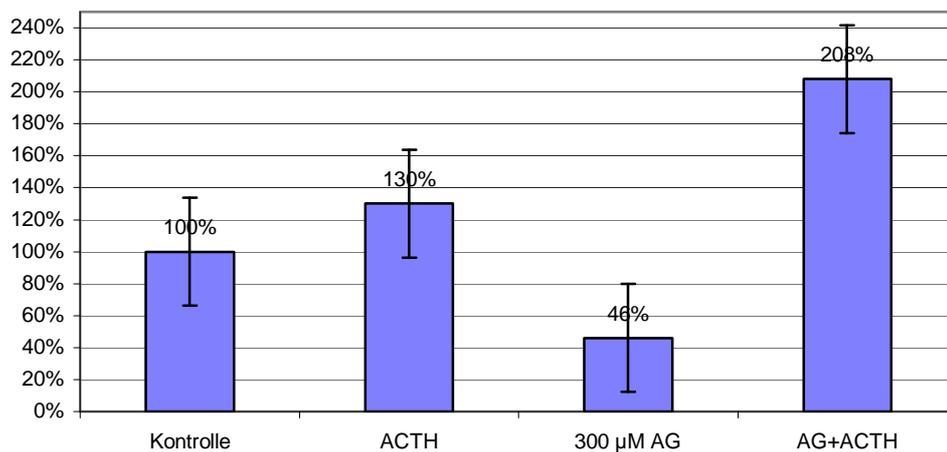
Durch die kombinierte Inkubation der Zellen mit AG und ACTH zeigte sich eine hohe Rezeptor-m-RNA-Expression (208% im Vergleich zur Kontrolle).

Abbildung 4: Effekte der Inkubation von ACTH und 300µM AG auf die mRNA-Expression des ACTH-Rezeptors



Die Zellen wurden in Triplets mit 10^{-8} ACTH, 300µM AG und der Kombination aus AG und ACTH über 48 h inkubiert. Die Auswertung dieses Blots ist im Diagramm 4 dargestellt.

Diagramm 4: Die ACTH-R-m-RNA-Expression unter Beeinflussung von AG und ACTH



Die Ergebnisse der Kontrolle und ACTH stammen aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Einzelwerten. Für AG und AG+ACTH war nur 1 Blot auswertbar mit jeweils zwei bis drei Einzelwerten. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

Es zeigt sich durch die Kombination von 300 µM AG mit ACTH eine Aufhebung der ACTH-R-mRNA-Supprimierung und erhöhte ACTH-R-mRNA-Expression verglichen mit der Kontrolle.

4. Diskussion

4.1.Etablierung einer bovinen NNR-Primärkultur

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde zur Untersuchung des ACTH-R und der Hormonbiosynthese an gesunden Zellen eine Primärkultur aus der bovinen Nebennierenrinde etabliert. Wie dies für Primärkulturen nicht unüblich ist, wuchsen ca. 30 % der initial eingesetzten Zellen gut an und vermehrten sich. Aus einer NN konnten ca. 170×10^6 Zellen gewonnen werden. Bereits nach drei bis vier Tagen war der Boden der Kulturflaschen gut mit den adhärent wachsenden Zellen bedeckt. Die Zellen konnten dann mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert werden. Es wurden konsistente und schlüssige Ergebnisse erzielt. Auf Probleme, die im Laufe der Kultivierung der Zellen eintraten, und auf unterschiedliche Lösungsstrategien wird in Kapitel 4.4. eingegangen.

4.2 Effekte von Adrenostatika auf NNR-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene adrenostatisch wirkende Substanzen vergleichend in bovinen NNR-Primärkulturen untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit diesen Substanzen erzielt wurden, mit denen in anderen tierischen und menschlichen adrenalen Zellen in Primärkultur und in Zellen der Nebennierenkarzinomzelllinie NCI-h295 verglichen.

4.2.1 Aminoglutethimid

Für AG wurde eine dosisabhängige Hemmung der Cortisol- und 17-OH-P-Synthese gefunden. Da beide Hormone in etwa gleichermaßen gehemmt wurden, ist von einer Hemmung des P450 scc Enzyms auszugehen. Dies deckt sich zum einen mit

Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe bei bovinen NNR-Zellen (94) als auch mit den Resultaten, die in den humanen NCI-h295-Zellen gefunden wurden (86, 95). Die Hemmung der Steroidbiosynthese erscheint in den bovinen Zellen sogar ausgeprägter als in den humanen NCI-Zellen zu sein, da bereits 0,6 μM AG zu einer Supression des Cortisols auf 41 % der unbehandelten Kontrollzellen führt, während bei den NCI-h295-Zellen ein Wert von 10 μM angegeben wurde (95).

Neben dieser Beeinflussung der Steroidbiosynthese zeigte sich auch in den bovinen Zellen eine Suppression der ACTH-Rezeptor-Expression, wie sie in den NCI-h295-Zellen beschrieben ist (86). Die Suppression ist mit 46% der Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen allerdings geringer ausgeprägt als bei den NCI-h295-Zellen.

Sowohl die Hemmung der Steroidbiosynthese als auch die Suppression des ACTH-Rezeptors spielt sich in einer Konzentration ab, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch in vivo erreicht wird. So liegen bei Patienten, die mit 1000 mg AG pro Tag behandelt werden, die Plasmaspiegel bei ca 70 μM (96). Die tägliche Dosis beim Cushing-Syndrom liegt bei 500 bis 2000 mg AG pro Tag (56), so dass zu vermuten ist, dass teilweise Spiegel bis 300 μM erreicht werden, wie sie für die Hemmung der ACTH-Rezeptor-Expression notwendig sind. Die Konzentrationen, die zur Unterdrückung der Hormonsynthese notwendig sind, werden erwartungsgemäß schon viel früher erreicht.

4.2.2 Metyrapon

MTP hemmte die Cortisolsynthese in der vorliegenden bovinen NNR-Primärkultur signifikant dosisabhängig. Die Sekretion von 17-OH-P war ebenfalls auf 84% und 81% zum Kontrollwert bei MTP-Konzentrationen von 0,6 μM und 6 μM erniedrigt. Bei einer Konzentration von 30 μM MTP war sie bereits auf 48 % reduziert. Diese Befunde belegen, dass auch in diesen niedrigen Konzentrationen neben der P450c11-Hydroxylase auch vorgeschaltete Enzyme (wahrscheinlich das P450scc-Enzym) gehemmt werden.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich damit deutlich von Ergebnissen in anderen Zellmodellen, die größtenteils von der Nebennierenkarzinom-Zelllinie NCI-h295 oder von anderen NNR-Primärkulturen stammen.

Wie in 1.4.2. beschrieben hemmt MTP die P450c11-Hydroxylase-Aktivität mit einem IC_{50} Wert von $7,8 \mu M$, was zu einer Hemmung der Cortisol-, nicht aber der 17-OH-P-Synthese führt. Erst bei höheren Konzentrationen mit einem IC_{50} -Wert von $330 \mu M$ wird in der Literatur eine zusätzliche Hemmung des P450scc-Enzyms beschrieben (43,44).

Bei NCI-h295-Zellen konnte eine gesteigerte 17-OH-P-Sekretion in niedrigen Konzentrationen von MTP ($60nM$ - $6\mu M$) durch Hemmung der nachgeschalteten 11β -Hydroxylase gezeigt werden (97). Bei höheren Konzentrationen führte es ebenfalls zu einer verminderten Sekretion von 17-OH-P und DHEAS. Dabei ist der IC_{50} -Wert für die Hemmung der P450c11 Hydroxylase $3,5 \mu M$ und für die Hemmung des P450scc Enzyms $17\mu M$ (95) bzw. $30 \mu M$ (97). Damit wirkt auch MTP in den Rinderzellen etwas stärker als in den NCI-h295-Zellen. Die genaue Hemmkonzentration für das P450scc ist nicht eindeutig zu bestimmen, da es durch die früher einsetzende Hemmung der P450c11-Hydroxylase zu einem Anstau von 17-OH-P kommt. So lag bei den NCI-Zellen, die mit MTP-Konzentrationen um den IC_{50} -Wert für P450scc inkubiert wurden, der 17-OH-P-Wert noch deutlich über 100 %. Da in den Rinderzellen aber bereits bei $30 \mu M$ MTP die 17-OH-P-Sekretion auf 48 % zu den unbehandelten Kontrollzellen reduziert ist, ist von einem wesentlich niedrigeren IC_{50} -Wert auszugehen.

Für die Tatsache, dass die Hemmwirkung von MTP auf das P450scc-Enzym bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen einsetzt, gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder der Effekt ist spezifisch für Rinder-NN oder aber das Verhalten gesunder NNR-Zellen unterscheidet sich in diesem Aspekt deutlich von dem karzinomatös veränderter Zellen.

Dass die Hemmung der P450c11-Hydroxylase aber dennoch potenter ist als die der vorgestellten Enzyme zeigt sich am deutlichsten in den Versuchen, in denen MTP zusammen mit ACTH gegeben wurde. Hierbei liegt die Menge der Cortisolsekretion knapp unterhalb der Sekretionsmenge in den unbehandelten Kontrollzellen, während die 17-OH-P-Sekretion um das Neunfache gesteigert ist (siehe 3.2.1.2 Tabelle 2).

4.2.3 Etomidat

Bei Etomidat zeigte sich in den Zellen der NNR-Primärkultur bereits bei einer Konzentration von 0,6 μM eine nahezu komplette Hemmung der Cortisolsynthese auf 2% zum Kontrollwert. Die 17-OH-P-Synthese war mit 0,6 μM ETO auf 47% und mit 30 μM ETO auf 2,4% reduziert. Dies lässt auf eine komplette Hemmung der P450c11-Hydroxylase, aber auch auf eine deutliche Hemmung des P450scc-Enzymkomplex schließen.

In anderen Arbeiten mit bovinen NNR-Zellen hemmte ETO bereits bei Konzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-8} M die 11 β -Hydroxylase-Aktivität um 50 %. Eine ähnliche Inhibition ergibt sich auch für die Produktion von 18-Corticosteron und Aldosteron (98).

Bei NCI-h295-Zellen konnte wie bei MTP eine gesteigerte 17-OH-P-Sekretion in niedrigen Konzentrationen von ETO (0,6-60 nM) durch Hemmung der nachgeschalteten 11 β -Hydroxylase gezeigt werden (97). Höhere Konzentrationen von ETO führten auch hier zu einer verminderten Sekretion von 17-OH-P und DHEAS. Dabei war der IC_{50} -Wert für die Hemmung der P450c11 Hydroxylase 15 nM und für die Hemmung des P450scc Enzyms 400nM (95). Der Unterschied zwischen den NCI-h295-Zellen und den Rinderzellen bezüglich ihrer Sensitivität der P450scc-Hemmung scheint damit wesentlich weniger ausgeprägt zu sein als bei MTP.

4.3 Die Wirkung von ACTH auf NNR Zellen

Wie zu erwarten, ergab die Inkubation der bovinen NNR-Zellen in Primärkultur mit ACTH eine deutliche Steigerung der Cortisolbiosynthese. Auch die Synthese von 17-OH-P war erwartungsgemäß gesteigert. Dieser Effekt ist allerdings wesentlich ausgeprägter als in den Karzinomzelllinien NCI-h295 und Y1 (86,127). Obwohl die basale Expression des ACTH-Rezeptors in den Rinderzellen wie in 3.2.2 gezeigt gering ist, kommt es durch die Behandlung mit ACTH zu einer deutlichen Steigerung der

Sensitivität der Zellen gegenüber ACTH selbst. Nur dadurch läßt sich erklären, dass die Inkubation von ACTH zu zehnfach gesteigerten Cortisolwerten führt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass es bei der Kombination von AG bzw. MTP mit ACTH im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nicht zu einer Hemmung der Cortisol- und 17-OH-P-Synthese führt, sondern weiterhin zu einer Steigerung der Hormonsekretion. Dieser Befund unterscheidet sich ebenfalls deutlich von den Ergebnissen, die aus den Untersuchungen mit der humanen NCI-h295 Zelllinie bekannt sind, da dort in AG oder MTP behandelten Zellen trotz hochdosierter ACTH-Gabe keinerlei Steroidsekretion nachzuweisen war (86). Damit scheint die Aufhebung der Synthesehemmung von Cortisol und 17-OH-P bei der Kombination der Adrenostatika mit ACTH ein Spezifikum der bovinen NNR-Primärkultur zu sein. Die oben diskutierten Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit den Adrenostatika allein schließen eigentlich aus, dass Adrenostatika in den bovinen Zellen weniger stark wirken bzw. die Zellen weniger sensibel gegen die Substanzen sind. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Wirkung der Kombination von ACTH mit Adrenostatika könnte allerdings in der gesteigerten Sensibilität der Zellen gegenüber ACTH liegen, die schon oben diskutiert wurde.

Eine ähnliche Beobachtung lässt sich bei Betrachtung der Northern-Blots machen. Analog zur Aufhebung der Hormonsynthesehemmung lässt sich für die Kombination von ACTH mit AG eine Aufhebung der Downregulation der ACTH-R mRNA durch AG allein beschreiben. Die basale Expression des ACTH-Rezeptors in der Kontrollgruppe ist durch eine Behandlung der Zellen mit ACTH auf 129% gesteigert. Eine Kombination von AG mit ACTH bewirkte sogar eine Steigerung des ACTH-Rezeptors auf 209% im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies unterscheidet sich ebenfalls von den Ergebnissen bei Untersuchungen mit der humanen NCI-h295-Zelllinie, bei denen es zwar auch zu einer Steigerung der mRNA-Expression des ACTH-Rezeptors bei der Kombination von AG mit ACTH kam, jedoch nicht zu einer Verdoppelung der mRNA-Expression gegenüber der Kontrollgruppe unbehandelter Zellen (86).

Die multifaktorielle Regulation der Hormonbiosynthese in der NNR wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Es ergibt sich ein komplexes Bild, das sicherlich noch nicht vollständig ist. Im Folgenden sollen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen

dargestellt werden, die über die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hinaus gehen und die Effekte von ACTH und anderen hormonellen und parakrinen Faktoren ergänzend aufzeigen.

So zeigten Weber et al. eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der Cortisolproduktion durch ACTH. Der stimulierende Effekt zeigte sich bereits nach 3 Stunden und erreichte sein Maximum nach 48 Stunden. In der Kombination mit Insulin-Growth-Faktor 1 (IGF 1) wurde die Cortisolsynthese noch weiter gesteigert, wohingegen IGF 1 allein keine signifikante Erhöhung der Cortisolsynthese zeigen konnte (90).

ACTH hat sowohl einen akuten Effekt auf die adrenale Steroidbiosynthese als auch langfristige Auswirkungen auf die Regulation der Genexpression von Hormonen der Steroidogenese. Es konnte bei einer Inkubation einer NNR-Primärkultur von Meerschweinchen über 72 h mit ACTH gezeigt werden, dass dies die Aktivität der 17-Hydroxylase und der 17,20-Lyase (P450c17) bis zu einem Maximum nach 48 h steigerte. Im Gegensatz dazu fiel die 21-Hydroxylase (P450c21)-Aktivität kontinuierlich ab. Die mRNA-Level der 21-Hydroxylase, der 17-Hydroxylase, der 17,20-Lyase, der 3 β -HSD und des P450scc-Enzyms waren gesteigert mit einem Maximum nach 18 h Inkubation, fielen bis zum Ende der Inkubation nach 72 h bis auf den mRNA-Level des P450c17 wieder ab. Trotz der gesteigerten mRNA-Level der 3 β -HSD und der P450c21 kam es nicht zu einem Anstieg ihrer Enzymaktivitäten (99).

In neueren Arbeiten wurden weitere Faktoren für die Regulation der Steroidbiosynthese an bovinen NNR-Zellen untersucht (100,101). Dabei wurden die Effekte von ACTH, Angiotensin II, Transforming Growth Factor- β (TGF β) und der Insulin-like Growth-Faktor I (IGF-I) auf die Steroidogenese, die Expression des ACTH-Rezeptors, des StAR-Proteins, von P450c17 und der 3 β -HSD untersucht. ACTH und IGF-I fördern die durch ACTH vermittelte „akute“ Cortisolsynthese, Angiotensin II und TGF β hemmen diese. Dabei modifizieren diese Faktoren die Antwort der NNR-Zellen auf ACTH auf drei Ebenen: bei der Bildung von cAMP sowie vor und nach der Pregnenolonbildung. Die Bereitstellung von Cholesterol am P450scc scheint dabei der ausschlaggebende stimulatorische Effekt von IGF-I und der inhibitorische Effekt von Angiotensin II und TGF β zu sein.

ACTH steigert die StAR-mRNA-Level bereits 1,5 h nach Inkubationsbeginn und führt zu einem Maximum nach 4-6 h. Eine Verdoppelung der StAR-mRNA wird auch von

IGF-I induziert. Dieser Level bleibt dann für mindestens weitere 36 h. Mit ACTH vorbehandelte Zellen reagieren in dieser Hinsicht noch stärker. Angiotensin II hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Expression der StAR-mRNA und des StAR-Proteins mit Spitzen nach 1,5-3 h und einem rapiden Abfall bis zu sehr niedrigen Werten nach 12 h. Dies impliziert, dass der inhibitorische Effekt von Angiotensin II auf die Steroidbiosynthese zunächst unabhängig von der StAR-Expression ist (100).

TGF β inhibiert die Steroidogenese über eine Hemmung der P450c17- und der ACTH-R-Expression. Des Weiteren reduziert er die Expression der StAR-mRNA und blockiert den stimulatorischen Effekt von ACTH auf die StAR-mRNA (101).

ACTH, IGF-I und Angiotensin II steigert die Expression des ACTH-Rezeptor-mRNA, TGF β 1 senkt sie. Die P450c11mRNA wurde durch die Stimulation der Zellen mit ACTH und IGF-I stärker exprimiert und durch TGF- β 1 und Angiotensin II reduziert. TGF- β 1 blockierte den stimulatorischen Effekt von parallel vorhandenem ACTH. Ähnliche, aber weniger ausgeprägte Effekte hatten die Substanzen auf die Expression der 3 β HSD-mRNA (100).

In neuerer Zeit wird auch der Effekt von ACTH auf K⁺- und Cl⁻-Kanälen in der Zellmembran von bovinen NNR-Zellen und die Korrelation mit der Steroidbiosynthese untersucht und beschrieben (102). Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass die ACTH-stimulierte Cortisolsynthese durch Cl⁻-Kanal-Blocker inhibiert werden kann.

Eine aktuelle Arbeit beschreibt den stimulatorischen Effekt von Corticosteron auf die Ca⁺-Präsenz und Pregnenolonsynthese in bovinen NNR-Zellen nach der Stimulation mit ACTH. Dieser Effekt tritt innerhalb von Minuten auf und ist spezifisch für ACTH-vermittelte Signale (103).

ACTH stimuliert die Cortisolproduktion von NCI-h295 Zellen. Die Expression der mRNA des ACTH-R ist ebenfalls gesteigert. Bei der Inkubation mit AG und ACTH konnte die Cortisolsynthesehemmung nicht wieder aufgehoben werden, der inhibitorische Effekt von AG auf die mRNA-Expression des ACTH-R war jedoch aufgehoben (86).

4.4 Validität der Methodik und der eigenen Ergebnisse

Wie oben beschrieben, eignet sich die Primärkultur von bovinen NNR-Zellen gut zur Untersuchung der Abläufe und der Regulation der Hormonbiosynthese in der Nebenniere. Dennoch führte das Arbeiten mit diesen Primärkulturzellen während der vorliegenden Arbeit zu gewissen Schwierigkeiten, die im weiteren kurz dargestellt werden sollen. Gab es im ersten Jahr so gut wie keine Probleme mit Kontamination der Zellkultur, stellten sich nach ca. einem Jahr zunehmend Probleme durch Bakterien- und Pilzbefall ein. Die Zellen wuchsen nicht mehr adhärent an und vermehrten sich kaum noch. Drei Tage nach Aussaat der Zellen wurde eine Kontamination sichtbar. Im Mikroskop waren Haufenkokken zu erkennen. Da das eingesetzte Antibiotikum Gentamycin allerdings hauptsächlich auf gram-negative Keime wirkt und viele Haufenkokken gram-positiv sind, wurden Abstriche gewonnen und die Antibiose nach Antibiogramm und nach Rücksprache mit dem mikrobiologischen Institut der Universität Würzburg auf Streptomycin und Penicillin umgestellt, um ein breites Spektrum für den gram-positiven und-negativen Bereich zu erhalten. Die Folge war allerdings, dass die Zellen daraufhin deutlich langsamer wuchsen. Die Zeit bis zum ersten Mediumwechsel wurde auf 36 Stunden und die Zeit bis zum Beginn der Inkubation mit Testsubstanzen wurden auf sieben Tage nach Anlegen der Primärkultur verlängert. Durch zusätzliche sterile Filtration sämtlicher Agentien wurde versucht, das Risiko einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen gering zu halten. Alle Utensilien und der Brutschrank wurden wiederholt autoklaviert, desinfiziert und mikrobiologisch untersucht. Da sich trotz all dieser Maßnahmen bei bestimmten Präparationen immer wieder Kontaminationen zeigten, ist nicht auszuschließen, dass die Infektionsquelle möglicherweise im Schlachthof lag. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Tatsache, dass nach dem Wechsel zu einem anderen Schlachter das Kontaminationsproblem nicht mehr aufgetreten ist, so dass sogar die Antibiose wieder auf das besser verträgliche Gentamycin umgestellt werden konnte.

All die oben ausgeführten Schwierigkeiten mit der neu etablierten Primärkultur machten es nicht möglich, in der vorgegebenen Zeit eine größere Anzahl von unabhängigen Versuchen zu erlangen. Die Mittelwerte der relativ kleinen Anzahl an Einzelergebnissen weisen jedoch in den meisten Fällen in unabhängigen T-Tests signifikante Unterschiede

auf. Da sich diese Ergebnisse, wie oben diskutiert, in vielen Punkten mit den Ergebnissen in anderen adrenalen Zellmodellen decken, ist davon auszugehen, dass die Daten sehr valide sind. Einzig bei den durchgeführten Northern-Blots zeigten sich nicht immer signifikante Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Adrenostatika auf die ACTH-Rezeptor-Expression (siehe 3.2.2). Da allerdings die Befunde der N-Blot Daten sehr gut mit den Befunden der Hormonsynthese korrelieren, ist auch hier davon auszugehen, dass sie in der dargestellten Form valide sind.

Um die Wirkung von Substanzen auf Zellen sicher beurteilen zu können, sollte immer ausgeschlossen werden, dass Begleitsubstanzen oder Lösungsmittel für mögliche Effekte verantwortlich sind. Aus diesem Grund waren in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe mit Zellkulturen die Wirkung der Lösungsmittel für AG und MTP, Ethanol und Essigsäure ausgiebig untersucht worden. Dort wurden erst ab einer Konzentration von 2 % Ethanol negative Einflüsse auf die Zellvitalität und die Hormonsyntheseleistung bei Zellen in Kultur nachgewiesen. Essigsäure konnte selbst bei einer Konzentration von 40 μ M keine signifikanten Veränderungen des Zellmetabolismus auslösen. Bei den Versuchen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, blieb die Konzentration von Ethanol unter 1 %, die Konzentration von Essigsäure unter 20 μ M. So kann davon ausgegangen werden, dass die Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Zellen hatten.

4.5. Vorteile und Unterschiede der bovinen NNR-Primärkultur gegenüber anderen Zellmodellen

Für Versuche mit nicht genetisch veränderten, gesunden NNR-Zellen gibt es derzeit keine leicht zu etablierende Zelllinie. Für derartige Anforderungen muss man sich an Primärkulturen von Säugetieren oder Menschen halten.

Als Quelle für humane NNR-Zellen kommen Nebennieren von Organ Spendern oder Nebennieren, die bei einer Nephrektomie mit entfernt, wurden in Frage. Diese sind zum einen sehr rar. Zum anderen muss von Veränderungen in der NN nach 48h im Status des Hirntods aus einer Intensivstation ausgegangen werden, da der Körper in dieser Zeit

einer extremen Stresssituation mit Ausschüttung von Stresshormonen wie Adrenalin, Cortisol u.a. ausgesetzt ist. Es sind dadurch zum Beispiel Veränderungen in der Rezeptordichte und –sensibilität der NNR-Zellen oder Durchblutungsveränderungen in der NN zu vermuten.

Im Vergleich zu dieser Problematik ist die Entnahme der NN aus frisch geschlachteten Rindern leicht. Der kurzzeitige Stress des Rindes vor der Schlachtung führt wahrscheinlich auch zu einer Ausschüttung der Stresshormone. Man kann aber nicht von zellulären Veränderungen in der NNR ausgehen.

Bei der Langzeitkultur von bovinen NNR-Zellen wurde ein Verlust der mRNA-Expression der 11 β -Hydroxylase und der 21-Hydroxylase und ein Verlust der Fähigkeit der kompletten Steroidbiosynthese gefunden. Dieser Verlust machte sich ab der dritten Passagierung der PK bemerkbar. P450_{ssc} wurde weiterhin exprimiert (104). Daher müssen Fragestellungen, die sich auf die Hormonbiosynthese und deren Regulation beziehen, innerhalb der ersten Tage und Wochen der Kultivierung der Zellen erfolgen.

In der Literatur beschreiben einige Arbeitsgruppen ebenfalls ein erfolgreiches Arbeiten mit der Primärkultur der NNR des Rindes oder des Schafes(90,105,106).

Im Unterschied dazu ist die NCI-h295-Zelllinie eine menschliche NN-Karzinomzelllinie. Diese stammt von einer 48-jährigen Patientin, die an einem primären NNR-Karzinom mit Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- und Androgenexzess erkrankt war, das 1980 operativ entfernt wurde. Die aus dem Operationspräparat gewonnenen Zellen werden seitdem *in vitro* kultiviert. Die Zellen sind sehr differenziert und produzieren über 30 Hormone (107). Die Cortisol- und Androgenproduktion nimmt dabei den Hauptteil der Hormonsynthese ein. Die Zellen exprimieren auch alle Enzyme der adrenalen Steroidbiosynthese (108-119). Neben den P450-Enzymen exprimieren diese Zellen Rezeptoren für ACTH (86), Angiotensin-II (120-124), IGF-I (125), ANP (126) und Glukokortikoide (86).

Wie oben beschrieben zeigen sich in ihrer Zellfunktion und –regulation Unterschiede zur gesunden NNR-Primärkultur.

Eine weitere Karzinomzelllinie sind die Y1-Zellen aus einem NNR-Karzinom der Maus.

Die Zellen wachsen adhärent und produzieren eine Reihe verschiedener Steroidhormone und zeigen eine gute ACTH-Antwort. Die Zelllinie wurde 1964 durch Yasumura et al. etabliert. Die durchschnittliche Verdopplungszeit beträgt 30-40 h.

Es sind einige Varianten der Y1-Zelllinie isoliert und kultiviert worden, die unterschiedliche, jeweils spezifische Eigenschaften haben, wie zum Beispiel eine erhöhte ACTH-sensitive cAMP-Aktivität (127). Andere Mutationen dieser Zellen wiesen eine ACTH-Resistenz auf.

In Versuchen kann man sich das Fehlen oder die Veränderung bestimmter Eigenschaften zunutze machen, um Rückschlüsse auf die Regulation der Steroidbiosynthese und der adrenalen Rezeptoren zu ziehen.

So untersuchten Schimmer et al. Mutanten der Maus-Y1-Zellen, die eine ACTH-Resistenz aufwiesen. Hier wurde der ACTH-R auf mRNA-Ebene trotz intakter Genstruktur nicht exprimiert. Injizierte man diese Zellen nun in eine Maus, bildeten sich solide Tumoren aus, die wieder auf ACTH-Stimulation wie die ursprünglichen Y1-Zellen reagierten. Man musste also von einer Suppression des ACTH-R-Gens ausgehen, die reversibel ist (128). Später wurde im Promotor des ACTH-R-Gens der Maus ein transkriptioneller Repressor ausgemacht, dessen Bindungsstelle zwischen den Positionen -1236 und -908 bp liegt. Er wird unter anderem dafür verantwortlich gemacht, dass der ACTH-R in nicht adrenalen steroidbildenden Organen nicht exprimiert wird (129).

Um die Promotorregion des ACTH-R zu untersuchen wurde der Promotor des humanen ACTH-R isoliert und an bestimmte Enzyme gekoppelt in Y1-Zellen transfiziert. Die Aktivität dieser Enzyme kann evaluiert werden. Man kann dann Rückschlüsse auf die Funktion und Regulation des Promotors unter verschiedenen Bedingungen ziehen (130,131).

Die murine Y1-Zelllinie kann zur Untersuchung der Regulation des ACTH-R in mehrererlei Hinsicht herangezogen werden, zum einen wie oben beschrieben zur Untersuchung von transfizierten Rezeptorabschnitten. Zum anderen wurden Effekte von ACTH auf Zellen ohne genetische Veränderung untersucht, die Rückschlüsse auf den ACTH-R gaben (132).

Neben dem ACTH-R wurden auch die Regulation von Enzymaktivitäten und ihrer Genexpression sowie Induktionen von Signaltransduktionssystemen durch ACTH in Y1-Zellen untersucht (133-136).

Des Weiteren konnten bei diesen Zellen der proliferative und antiproliferative Effekt von ACTH durch unterschiedliche Mechanismen unter verschiedenen Bedingungen dargestellt werden (137-139).

Durch die gut zu definierenden Eigenschaften der Y1-Zellen ließen sich konkrete Schritte in der komplexen Physiologie und Pathophysiologie der NNR nachvollziehen. Sie stellen jedoch kein Modell einer gesunden NN dar.

Die SW 13-Zelllinie entstammt ebenfalls aus einem NNR-Karzinom. Sie wurde 1973 von Leibovitz et al. etabliert (140). Die Zellen synthetisieren nur eine sehr geringe Menge Androgene und keinerlei Gluko- oder Mineralkortikoide (141). Sie exprimieren weder den ACTH-R noch Steroidbiosyntheseenzyme in nachweisbarer Menge.

ETO wirkt auch auf diese Karzinomzellen dosisabhängig antiproliferativ (97).

Es wurde in jüngerer Zeit die Sekretion der vasoaktiven Peptide Endothelin-1 und Adrenomedullin nachgewiesen (142).

5. Zusammenfassung

Die Steroidbiosynthese in der NNR ist ein komplexes System in seiner Funktion und Regulation. Sie unterliegt nicht nur der Regulierung der HHN-Achse, auch Immun- und Nervensystem beeinflussen sie vielfältig sowohl durch Einflüsse auf allen Ebenen der HHN-Achse als auch intraadrenal. ACTH ist dabei der wichtigste Stimulator in der Steroidbiosynthese. Es vermittelt seine Wirkung über einen spezifischen G-Proteingekoppelten Rezeptor, den ACTH-R.

Bei verschiedenen Erkrankungen dieses Systems kommt es zu einer vermehrten Produktion einzelner oder mehrerer Steroidhormone. Bei diesen Erkrankungen, vor allem wenn sie nicht kausal behandelt werden können, kommen Adrenostatika, wie Aminoglutethimid (AG) und Metyrapon (MTP) zum Einsatz. Das Narkotikum Etomidat

(ETO) hat neben seiner narkotischen Wirkung auch adrenostatische Effekte wie bei der Behandlung von langzeitbeatmeten Patienten, bei denen diese Substanz zur Sedierung eingesetzt wurde, zuerst festgestellt werden konnte.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass diese Medikamente neben einer Hemmung der Steroidbiosynthese auch andere Funktionen der Nebennierenzellen beeinflussen. Ein Großteil dieser Arbeiten wurden an NN-Karzinomzelllinien durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von AG, MTP und ETO an gesunden NN-Zellen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde eine Primärkultur von bovinen NNR-Zellen etabliert. Die im Verlauf auftretenden methodischen Probleme wurden analysiert und das Verfahren optimiert.

Die Zellen wurden für 48 h mit steigenden Dosen von AG, MTP und ETO (0,6-300 μ M) allein oder in Kombination mit 10 nM ACTH inkubiert. Anschließend wurde die Cortisol- und 17-OH-P –Sekretion und die ACTH-R-mRNA-Expression quantifiziert.

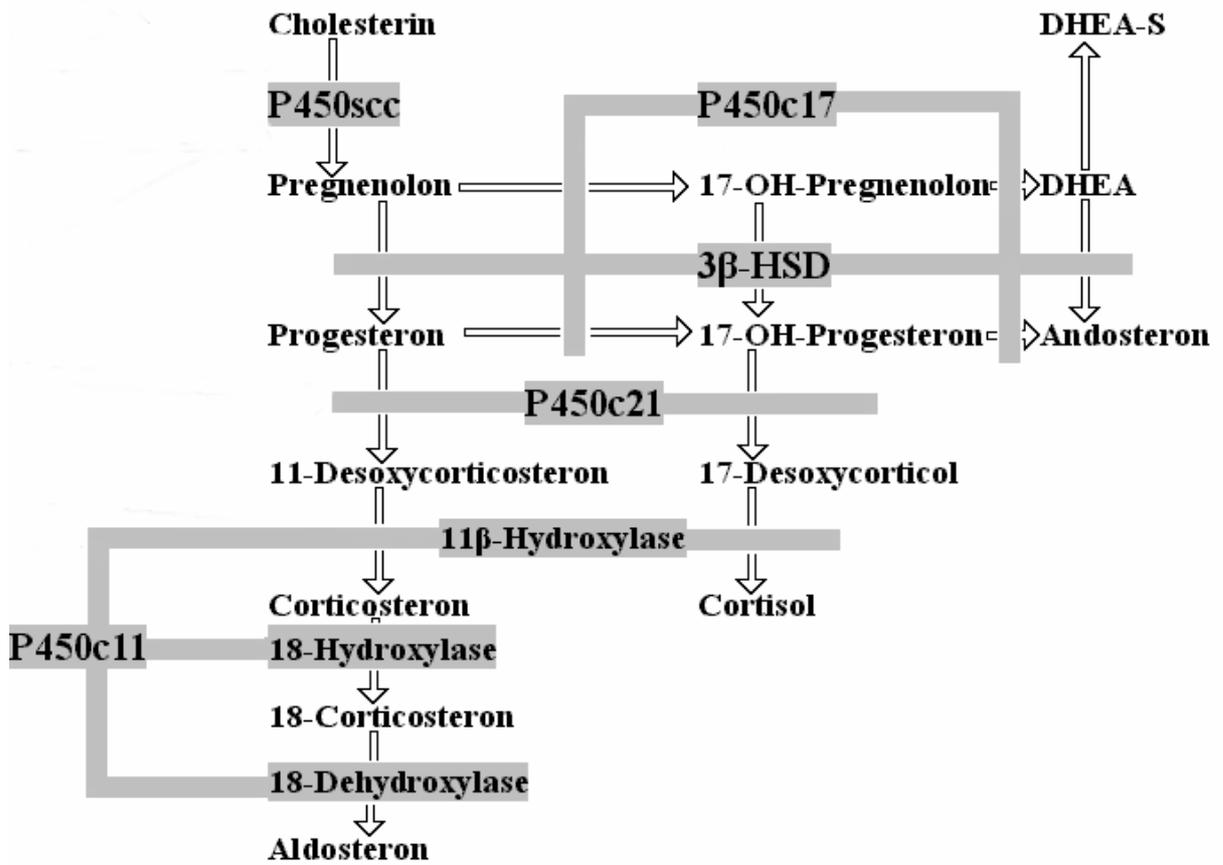
Wie erwartet zeigte sich, dass alle drei Adrenostatika zu einer dosisabhängigen Suppression der Cortisolsekretion führen, die vor allem für AG und MTP etwas stärker ist als in NCI-h295-Zellen, einer humanen Karzinomzelllinie. Bei der Behandlung mit MTP fiel zusätzlich auf, dass die Hemmung des P450_{scc}-Enzyms deutlich früher einsetzt als dies bei den Karzinomzellen zu beobachten war. Ein anderer wesentlicher Unterschied dieser zwei Zellmodelle zeigt sich bei der gemeinsamen Inkubation von ACTH mit den Adrenostatika. Lässt sich bei NCI-Zellen, die mit hohen Konzentrationen von Adrenostatika behandelt wurden, durch eine gleichzeitige Inkubation mit ACTH weiterhin keine wesentliche Hormonsekretion stimulieren, kommt es bei den Rinderzellen zu einer deutlichen Hormonsekretion, die in den meisten Fällen sogar weit über den Werten der unbehandelten Kontrollen liegt. Passend zu diesen Ergebnissen zeigt sich, dass die durch Adrenostatika supprimierte ACTH-R-mRNA-Expression durch die gleichzeitige Gabe von ACTH rückgängig gemacht wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Primärkultur von bovinen NNR-Zellen ein geeignetes Modell darstellt, die Wirkung von Adrenostatika auf unterschiedliche Nebennierenzellfunktionen zu untersuchen. Die beschriebenen Unterschiede zu den NCI-h295-Zellen unterstreichen, dass diese Karzinomzelllinie zur Beurteilung der normalen NN-Physiologie nicht für alle Fragestellungen geeignet ist und dass die

ergänzende Untersuchung in der methodisch aufwendigeren bovinen Primärkultur wertvolle Zusatzkenntnisse liefert.

6.Anhang

Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese



7. Literatur

1. **Leonhardt H.:** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8.überarbeitete und erweiterte Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990
2. **Rohen J.und Yokochi C.:** Anatomie des Menschen. 3.Auflage; Schattauer Verlag Stuttgart, 1993
3. **Fleischhauer K:** Nebennieren, in Drenckhahn D Zenker (Hrsg) Benninghoff: Anatomie, Urban und Schwarzenberg Verlag, 1994, Band 2:200-208
4. **Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.):** Physiologie des Menschen, Springer Verlag Berlin, Berlin 1995, 26. Auflage
5. **Bornstein S.R. und Scherbaum W.A.:** Erkrankungen der Nebenniere. In: Scherbaum.W.A.(Hrsg.): Endokrinologie in Thiemes Innere Medizin, 1. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart, 1999: 190ff
6. **Malven P.V.:** Mammalian Neuroendocrinology, CRC Press, 1993: 87-90
7. **Nickerson P.A.:** Quantitative study on the effect of an ACTH-producing pituitary tumor on the ultrastructure of the mouse adrenal gland. Am J Pathol 1975, 72: 113-17
8. **Mesiano S., Jaffe E.B. :** Developmental and funtional biology of the primate fetal adrenal cortex. Endocr Rev 1997, 18: 378-403
9. **Ramachandran J., Suyama A.T.:** Inhibiton of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin, Proc Natl Acad Sci USA 1975, 72:113-17
10. **Di Blasio A.M., Fuji D.K., Yamamoto M., Martin M.C., Jaffe R.B.:** Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotropic hormone: ratinalization of in vitro and in vivo findings. Biol Reprod 1990, 42: 683-91
11. **Fasnacht M., Hahner S., Hansen I.A., Kreutzberger T., Zink M., Adermann K., Jakob F., Troppmair J, Allolio B.:** N-Terminal Proopiomelanocortin Acts as a Mitogen in Adrenocortical Tumor Cells ans decreases Adrenal Steroidogenesis. J Clin Endocrin Metab 2003, 88(5): 2171-2179

12. **Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M:** Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol* 2000; 59(2):II/12-7
13. **Marx C., Bornstein S.R., Wolkersdorfer G.W.:** Cellular immune-endocrine interaction in adrenocortical tissues. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(S3):1-5
14. **Haidan A., Bornstein S.R., Glasow A., Uhlmann K., Lubke C., Ehrhard-Bornstein M.:** Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffine cells. *Endocrinology*, 1998, 139(2): 772-80
15. **Bornstein S.R.:** Adrenocortical Tumors: Recent Advances in Basic Concepts and Clinical Management. *Ann Intern Med.* 1999;130: 759-71
16. **Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Usadel H., Böckmann M., Scherbaum W.A.:** Morphological evidence for close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1991, 265: 1-9
17. **Andreis P.G., Neri G., Prayer-Galetti T., Rossi G.P., Gottardo G., Malendowicz L.K., Nussdorfer G.G.:** Effects of adrenomedullin on the human adrenal gland : an in-vitro study. *Clin Endocrinol Metab*; 1997, 82: 1167-70
18. **Ehrhardt-Bornstein M., Hinson J.P., Bornstein S.R., Scherbaum W., Vinson G.P.:** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews* 1998, 19(2): 101-43
19. **l'Allemand DNA, Biason-Lauber A.:** Intra-adrenal regulation of androgen synthesis. *Eur J Clin Invest*, 2000; 30(S3): 29-33
20. **l'Allemand DNA, Penhoat A., Lebrethon M.C., Ardevol R., Baehr V., Orlikers W., Saez J.M.:** Insulin-like growth factor enhance steroidogenic enzyme and messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 3892-97
21. **Nussdorfer G.G., Rossi G.P., Belloni A.S.:** The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol* 1997, 171: 267-308
22. **Belloni A.S., Pacheco Y.G., Markowska A., Andreis P.G., Menegheli V., Malendowicz L.K., Nussdorfer G.G.:** Distribution and functional significance

- of the endothelin receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1997, 288: 345-52
23. **Zatelli M.C., Rossi R., Del Senno L., Degli Uberti E.C.:** Role of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in mediating androgen-induced growth inhibition in human adrenal cortex in vitro. *Steroids*, 1998, 63: 243-45
 24. **Lebrethon M.C., Jaillard C., Naville DNA, Begeot M., Saez J.M.:** Effects of transforming growth factor β 1 on human adrenocortical fasciculata-reticularis cell differentiated functions. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79:1033-39
 25. **Weber M.M., Michl P., Auerhammer C.J., Engelhardt DNA:** Interleukin-3 and interleukin-6 stimulates cortisol sekretion from adult human adrenocortical cell. *Endocrinology* 1997, 138(5):2207-10
 26. **Päth G., Bornstein S.R., Späth-Schwalbe E., Scherbaum W.A.:** Direct effects of interleukin-6 on human adrenal cell. *Endocr Res* 1996, 22: 867-73
 27. **Jäättela M., Ilvesmaki V., Voutilainen R., Stenman U.H., Saksela E.:** Tumor nekrosis faktor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steriodogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991, 128: 623-29
 28. **Gonzalez-Hernandez J.A., Ehrhardt-Bornstein M., Späth-Schwalbe E., Scherbaum W.A., Bornstein S.R.:** Human adrenal cells express tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 81: 807-13
 29. **Koolman J., Röhm K.-H.:** Taschenatlas der Biochemie. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994
 30. **Forest M.:** Steroidhormone. In: Hesch R. (Hrsg.): *Endokrinologie*. 1. Auflage; Urban und Schwarzenberg; 1989:74-95
 31. **Robin N.F. M.D.:** *The Clinical Handbook of Endocrinology and Metabolic Disease*, The Panthenon Publishing Group Ltd., 1996: 130-51
 32. **Stocco D.M.:** Tracking the of role a star in the sky of the new millenium. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(8): 1245-54
 33. **Kallen C.B., Arakane F., Christenson L.K., Watari H., Devoto L., Strauss J.F.:** Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory proteine. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 145: 39-45

34. **Williams G., Dluhy R.:** Erkrankungen der Nebennierenrinde. In: (Hrsg.):
Harrisons' Innere Medizin. 13. Auflage; 2285-2298
35. **Esteban N.V., Yergey A.L.:** Cortisol produktion rates measured by liquid
chromatography/mass spectometry. *Steroids* 1990;55:152-8
36. **Copeland P.:** The incidentally discovered adrenal mass. *Ann Int Med* 1983; 98:
940-45
37. **Reincke M., Allolio B.:** Das Nebeninzidentalom. *Dt. Ärzteblatt* 1995; 92: 764-
70
38. **Orth D., Kovacs W W., DeBold C.:** The adrenal cortex. In Wilson J., Foster D.
(Hrsg.): *Williams Textbook of Endocrinology*. 8. Auflage; Saunders;
Philadelphia. 1992: 489-621
39. **Allolio B., Arlt W., Reincke M.:** Medical treatment of Cushing's syndrom In:
von Werder K., Fahlbusch R (Hrsg.): *Pituitary adenomas: from basic research to
diagnostic and therapy*. Elsevier Science; 1996: 223-9
40. **Engelhardt D., Weber M.M.:** Therapy of Cushing's Syndrome with Steroid
Biosynthesis Inhibitors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1994; 49: 261-7
41. **Vanden Bossche H.:** Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: from
research to medical treatment. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1992; 43: 1003-
21
42. **Meyer F.P.:** Indicative therapeutic and toxic drug concentrations in plasma: a
tabulation. *Int.J Clin. Pharmacol. Ther.* 1994, 32: 71-81
43. **Cheng S.C., Harding B.W., Carballeira A.:** Effects of Metyrapone on
Pregnenolone Biosynthesis and on Cholesterol-Cytochrome P-450 Interaction in
the Adrenal. *Endocrinology* 1974; 94: 1451-8
44. **Tobes M., Hays S., Gildenensleeve D., Wieland D., Beierwaltes W.:** Adrenal
cortical 11 β -hydroxylase and side-chain-cleavage enzymes. Requirement for the
A- or B-pyridyl ring in metyrapone for inhibition. *J Steroid Biochem* 1985; 22:
103-10
45. **Williamson D.G., O'Donnell V.J.:** The interaction of metopirone with adrenal
mitochondrial cytochrom P-450. A mechanism for the inhibition of adrenal
steroid 11 β -hydroxylation: *Biochemistry* 1969; 8:1306-11

46. **Watanuki M., Tilley B.E., Hall P.F.:** Cytochrome P-450 for 11 β - and 18-hydroxylase activities of bovine adrenocortical mitochondria: one enzyme or two?. *Biochemistry* 1978 Jan 10; 17(1): 127-30
47. **Tobes M.C., Hys S.J., Gildersleeve D.L., Wieland D.M., Beierwaltes W.H.:** Adrenal cortical 11 β -hydroxylase and side-chain cleavage enzymes. Requirement for the A- or B- pyridyl ring in metyrapone for inhibition. *J Steroid Biochem.* 1985 Jan; 22(1): 103-10
48. **Ledingham I, Watt I:** Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet*, 1983, June 4, p1270
49. **Lee Wagner R., White P.F.:** Etomidate versus thiopental-comparative effects on adrenocortical function. *Anaesthesiology*, 1984, 81
50. **Fellows W., Bastow M.D., Byrne A.J., Allison S.P.:** Adrenocortical suppression in multiple injured patients. A complication of etomidate treatment. *Br Med J*, 1983, 287: 1835-37
51. **Allolio B., Dörr H., Stuttmann R., Knorr DNA, Engelhardt DNA, Winkelmann :** Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin Endocrinol*, 1985, 22
52. **Schulte H.M., Benker G., Reinwein DNA, Sippell W.G., Allolio B.:** 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*, 1990, 70: 1426-30
53. **Weber L., Lang J., Abedinpour F., Zeilberger K., Adelman B. Engelhardt D.:** Different inhibitory effect of etomidate and ketoconazole on the human adrenal steroid biosynthesis. *Clin Investig*, 1993, 71: 933-8
54. **Fry D.E., Griffiths H.:** The inhibition by etomidate of the 11 β -Hydroxylation of Cortisol. *Clin Endocrinol*, 1994, 20: 625-9
55. **Lamberts S.W.J., Bons E.G., Bruining H.A., De Jong F.H.:** Differential effects of the imidazole derivatives etomidate, ketoconazole and miconazol and of metyrapone on the secretion of cortisol and its precursors by human adrenocortical cells. *J of pharm and experim therap*, 1987; 240: 259-64
56. **Scholz H., Schwabe U.:** Taschenbuch der Arzneimittelbehandlung. Thieme Verlag 10. Auflage, 1994, S 360-1

57. **Schiøth H.B., Chhajlani V., Muceniece R., Klusa V., Wikberg J.E.:** Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci* 1996, 59: 797-801
58. **Clark A.J., Cammas F.M.:** The ACTH-Rezeptor. *Ballieres Clin Endocrinol Metab* 1996, 10: 29-47
59. **Kapas S., Cammas F.M., Hinson J.P., Clark A.J.:** Agonist and receptor binding properties of adrenocorticotropin peptides using the cloned mouse adrenocorticotropin receptor expressed in a stably transfected HeLa cell line. *Endocrinology* 1996, 137: 3291-4
60. **Beuschlein F., Fassnacht M., Klink A., Allolio B., Reincke M.:** ACTH-rezeptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation *Eur J Endocrinol* 2001 81: 807-13
61. **Kajita K., Ishizuka T., Yamamoto M., Nagashima T., Taniguchi O., Mune T., Murayama M., Kitagawa S., Yasuda K.:** ACTH and phorbol ester stimulated redistribution of protein kinase C in human cortisol-producing adrenal adenomas. *Endocr J* 1994, 41: 107-13
62. **Arola J., Heikkila P., Voutilainen R., Kahri A.I.:** Protein kinase C signal transduction pathway in ACTH-induced growth effect of rat adrenocortical cells in primary culture. *J Endocrinol* 1994, 141: 285-93
63. **Parissenti A.M., Kirwan A.F., Kim S.A., Colantonio Schimmer B.:** Molecular strategies for the dominant inhibitor of Protein kinase C. *Endocr Res* 1996, 22: 621-30
64. **Ishizuka T., Daidoh H., Morita H., Mune T., Miura A., Suwa T., Shibata T., Yamada K., Itaya S., Kajita K., Yasuda K.:** ACTH-induced cortisol secretion is mediated by cAMP and PKC in various adrenocortical adenomas. *Endocr J* 1997, 44: 661-70
65. **Yamazaki T., Higuchi K., Kominami S., Takemori S.:** 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate adrenocorticotropin action in bovine adrenal steroidogenesis. *Endocrinology* 1996, 137: 2670-5
66. **Probst W., Snyder L., Schuster D.I., Brosius J., Sealfon S.:** Sequence alignment of the G-coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992; 11: 1-20

67. **Starke K., Palm D.:** Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage; BI-Wissenschaftsverlag; 1992: 96-124
68. **Wikberg J.E.S., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A.:** New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacological Research* 2000, 42(5): 393-420
69. **Sala G.B., Hayashi K., Catt K.J., Dufau M.L.:** Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cAMP in stimulation of corticosterone synthesis. *J Biol Chem* 1979; 254: 3861-5
70. **Schimmer B.P.:** Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *ADV Cyclic Nucleotide RES* 1980; 13: 181-214
71. **Boshier D.P., Holloway H., Liggins G.C.:** Effects of cortisol and ACTH on adrenocortical growth and cytodifferentiation in the hypophysectomized fetal sheep. *J Dev Physiol* 1981; 3:355-71
72. **Dallman M.F.:** Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr Res* 1984; **10**: 213-42
73. **Arola J., Heikkila P., Voutilainen R., Kahri A.I.:** Corticosterone regulates cell proliferation and cytochrom P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger RNA expression in primary cultures of fetal rat adrenals. *Endocrinology* 1994; 135: 2064-9
74. **Malendowicz L.K., Dembrinska M.:** Proliferation and distribution of adrenocortical cells in ACTH treated femal hamsters. *Folia Histochem Cytobiol* 1990; 28: 51-9
75. **Armelin H.A., Lofti C.F., Lepique A.P.:** Regulation of growth by ACTH in the Y1 line of mouse adrenocortical cells. *Endocr Res* 1996;22: 373-83
76. **Imai T., Seo H., Murata Y., Ohno M., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matui N.:** Adrenocorticotropin increases expression of c-fos and β -actin genes in rat adrenals. *Endocrinology* 1990; 127: 1742-7
77. **Heikkila P., Arola J., Salm A., Kahri A.I.:** ACTH-induced c-myc protooncogene expression precedes antimitogenic effect during differentiation of fetal rat adrenocortical cells. *J Endocrinol* 1995; 145: 379-85

78. **Pencoat A., Oual R., Viard I., Langlois D., Saez J.M.:** Regulation of primary response and specific genes in adreal cells by peptide hormones and growth factors *Steroiss* 1996; 61: 176-83
79. **Mountjoy K.G., Bird I.M., Rainey W.E., Cone R.D.:** ACTH induces up-regulation of ACTH-rezeptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994, 99, R17-R20
80. **Naville DNA, Jaillard C., Barjhoux L., Durand P., Begeot M.:** Genomic structure and promote characterization of the human ACTH rezeptor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 230: 7-12
81. **Penhoat A., Jaillard C., Saez J.M.:** Regulation of bovine adrenal cell corticotropin receptor mRNA levels by corticotropin (ACTH) and angiotensin II (A-II). *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994, R7-R10
82. **Lebrethon M.C., Naville DNA, Begeot M., Saez J.M.:** Reglation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest* 1994, 93: 1828-33
83. **Qiu R., Tsao J., Kwan W.K., Schimmer B.P.:** Mutations to forskolin resistance result in loss of adrenocorticotropin receptors and consequent reductions in levels of G-protein- α subunits. *Molecular Endocrinology* 1996, 10: 1708-81
84. **Darbeida H., Durand P.:** Glucocorticoid enhancement of adrenocorticotropin-induced 3' 5'-cyclic adenosine monophosphate production by cultured ovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 1987, 121: 1052-55
85. **Picard-Hagen N., Penhoat A., Hue DNA, Jaillard C., Durand P.:** Glucocorticoids enhance corticotropin receptor mRNA levels in ovine adrenocortical cells. *Journal of Molekular Endocrinology* 1997, 19: 29-36
86. **Fassnacht M., Beuschlein F., Vay S., Mora P., Allolio B., Reincke M.:** Aminoglutethimide supresses adrenocorticotropin rezeptor expression in the NCI-h295 adrenocortical tumor cell line. *Journal of Endocrinology* 1998, 159: 35-42
87. **Lalli E., Melner M.H., Stocco D.M., Sassone-Corsi P.:** DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 1998, 139: 4237-43

88. **Reincke M., Beuschlein F., Lalli E., Arlt W., Vay S., Sassone-Corsi P.:** DAX-1 expressions in human adrenocortical neoplasms: implication for steroidogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83 2597-600
89. **Arnaldi G., Mancini V., Costantini C., Giovagnetti M., Petrelli M., Masini A.:** ACTH receptor mRNA in human adrenocortical tumors: overexpression in aldosteronomas. *Endocrine Research* 1998, 24: 845-9
90. **Weber M.M., Michl P.:** Primary Culture of Bovine and Human Adult Adrenocortical Cells. *Endocrine Methods* 1996
91. **Alwine J.C., Kemp D.J. und Stark G.R.:** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5350-4
92. **Stryer L.:** *Biochemistry*. 4. Auflage. Fremann and Company 1995;121
93. **Raikhinstein M., Zohar M., Hanukoglu I.:** cDNA cloning and sequence of the bovine ACTH receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1220(1994) 329-332
94. **Sheets J.J., Vickery L.E.:** Effects of aminoglutethimide and its metabolite, N-acetylamino-glutethimide, on bovine adrenocortical and human placental cytochromes P-450sc. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1982 Oct; 321(1): 70-3
95. **Fassnacht M., Hahner S., Beuschlein F., Klink A., Reincke M., Allolio B.:** New mechanisms of adrenostatic compounds in an human adrenostatical cancer cell line. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(3): 76-82
96. **Meyer F.:** Indicative therapeutic and toxic drug concentration in plasma: a tabulation. *Int j Clin Pharmacol Ther* 1994; 32: 71-81
97. **Hahner S., Fassnacht M., Zink M., Reincke M., Allolio B.:** Adrenostatische und antiproliferative Wirkung von Etomidat auf die humane NN-Karzinomzelllinie NCI-h295. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999; 107: 153
98. **Wada A., Ohnishi T., Nonaka Y., Okamoto M.:** Inhibition of bovine adrenocortical mitochondrial cytochrome P-450(11) β -mediated reactions by imidazole derivates and mineralocortical analogs. *J Steroid Biochem.* 1988 Nov; 31(5): 803-8

99. **Provencher P.H., Tremblay Y., Fiet J., Belanger A.:** Effects of ACTH on steroidogenic enzymes in guinea pig fasciculata-glomerulosa cells: Changes in activity and mRNA levels. *J Steroid Biol Mol Biol*, 1992; 41 (1): 59-67
100. **Le Roy C., Yuan Li J., Stocco D.M., Langlois D., Saez J.M.:** Regulation by ACTH, Angiotensin II, Transforming Growth Factor- β and Insulin-like Growth Factor I of bovine adrenal cell steroidogenic capacity and expression of ACTH receptor, StAR Protein, Cytochrom P450c17 and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology* 2000, 141(5); 1599-1607
101. **Brand C., Cherradi N., Defaye G., Chinn A., Chambaz E.M., Feige J.J., Bailly S.:** Transforming growth factor β 1 decreases cholesterol supply to mitochondria via repression of StAR protein expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 6410-6
102. **Dupré-Aucouturier S., Penhoat A., Rougier O., Bilbaut A.:** ACTH-induced Cl⁻ current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion. *Am J Endocrinol Metab* 2002; 282: E355-E365
103. **Chiyo T., Yamazaki T., Aoshika K., Kominami S., Ohta Y.:** Corticosterone enhances ACTH-induced Calcium signals in bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 2003, May 8
104. **Cheng C.Y., Hornsby P.J.:** Expression of 11 β -hydroxylase and 21-hydroxylase in long-term cultures of bovine adrenocortical cells requires extracellular matrix factors. *Endocrinology* 1992; 130,5: 2883-9
105. **Chavarri M., Yamakita N., Chiou S., Gomez-Sanchez C.E.:** Calf adrenocortical fasciculata cells secrete aldosterone when placed in primary culture. *J Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 54, No 6, 1993; 493-500
106. **Michl P., Beikler T., Engelhardt D., Weber M.M.:** Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways. *J Neuroendocrinol* 2000 Jan; 12 (1): 23-8
107. **Gazar A.F., Oie H.K., Shackleton C.H., Chen T.R., Triche T.J., Myers C.E., Chroisos G.P., Brennan M.F., Stein C.A. und La Rocca R.V.:** Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 1990; 50: 5488-96

108. **Staels B., Hum D.W., Miller W.L.:** Regulation of steroidogenesis in NCL-H295 cells: a cell model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 1993; 7 : 423-33
109. **Holland O.B., Mathis J.M., Bird I.M., Rainey W.E.:** Angiotensin increases aldosterone synthase mRNA levels in human NCI-H295 cells. *Mol Endocrinol* 1993; 94:9-13
110. **Rainey W.E., Bird I.M., Sawetawa C., Hanley N.A., McCarthy J.L., McGee E.A., Wester R., Mason J.I.:** Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 731-7
111. **Rainey W.E., Bird I.M., Mason J.I.:** The NCI-H295 cell line: a pluripotent model of human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100: 45-50
112. **Tremblay Y., Belanger A., Fleury A., Beaudoin C., Provost P., Martineau I.:** Studies of the guinea pig adrenal cytochrome P450c17 cDNA. *Endocr Res* 1995; 21: 495-507
113. **Bird I.M., Mathis J.M., Mason J.I., Rainey W.E.:** Ca²⁺-regulated expression of steroid hydrolases in H295R human adrenocortical cells. *Endocrinology* 1995; 136: 5677-84
114. **Mason J.I., Bird I.M., Rainey W.E.:** Adrenal androgen biosynthesis with special attention to P450c17. *Ann NY Acad Sci* 1995; 774: 47-58
115. **Clyne C.D., Nguyen A., Rainey W.E.:** The effects of KN62, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, on adrenocortical cell aldosterone production. *Endocr Res* 1995; 21; 259-61
116. **Cobb V.J., Williams B.C., Mason J.I., Walker S.W.:** Forskolin treatment directs steroid production towards the androgen pathway in the NCI-H295R adrenocortical tumor cell line. *Endocr Res* 1996; 22: 545-50
117. **Olson L.J., Lowe D.G., Drewett J.G.:** Novel natriuretic peptide receptor/guanyl cyclase A-selective agonist inhibits angiotensin II – and forskolin-evoked aldosterone synthesis in a human glomerulosa cell line. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 430-5
118. **Lenz D., Bernhardt R.:** Activity of 5' deletion mutants of the human CYP11B1 promoter in H295R cells. *Endocr Res* 1996; 22:501-2

119. **Rodriguez H., Hum D.W., Staels B., Miller W.L.:** Transcription of the human genes for cytochrom P450scc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:365-71
120. **Bird I.M., Hanley N.A., Word R.A., Mathis J.M., Mc Carthy J.L., Mason J.I., Rainey W.E.:** Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. Endocrinology 1993; 133: 1555-61
121. **Bird I.M., Mason J.I., Rainey W.E.:** Regulation of type 1 angiotensin II receptor messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical carcinoma H295cells. Endocrinology 1994, 134: 2468-74
122. **Bird I.M., Mason J.I., Rainey W.E.:** Hormonal regulation of angiotensin II type 1 receptor expression and AT1-R mRNA levels in human adrenocortical cells. Endocr Res 1995; 21: 169-82
123. **Bird I.M., Word R.A., Clyne C., Mason J.I., Rainey W.E.:** Potassium negatively regulates angiotensin II type 1 receptor expression in human adrenocortical H295R cells. Hypertension 1995; 25: 1129-34
124. **Watanabe G., Lee R.J., Albanese C., Rainey W.E., Battle D., Pestell R.G.:** Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. J Biol Chem 1996; 271: 22570-7
125. **Reincke M., Fassnacht M., Vath S., Mora P., Allolio B.:** Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? Endocr Res 1996;22:757-61
126. **Bodart V., Rainey W.E., Fournier A., Ong H., De Lean A.:** The H295R human adrenocortical cell lines contains functional atrial natriuretic peptide receptors that inhibit aldosterone biosynthesis. Mol Endocrinol 1996; 118: 137-44
127. **Schimmer B.P.:** Adrenocortical Y1-Zells in Methods in Enzymology, Vol LVIII, 1979, Academic Press, Inc
128. **Schimmer B.P., Kwan W.K., Tsao J., Qiu R.:** Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor. J Cell Physiol 1995;163:164-71

129. **Cammas F.M., Pullinger G.D., Barker S., Clark A.J.:** The mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 1997;11:867-76
130. **Naville D., Jaillard C., Barjhoux L., Durand P., Bégeot M.:** Genomic Structure and Promotor Characterisation of the human ACTH Receptor Gene. *Biochem Biophys Res Com* 1997, 230;7-12
131. **Sarkar D., Kambe F., Hayashi Y., Ohmori S., Funahashi H., Seo H.:** Involvement of AP-1 und SF-1 in the cAMP-dependent induction of adrenocorticotropic hormone (ACTH) promotor. *Endocr J* 2000; 47(1): 63-75
132. **Baig A.H., Swords F.M., Noon L.A., King P.J., Hunyady L., Clark A.J.L.:** Desensitization of the Y1 Cell Adrenocorticotropin Receptor. *J Biol Chem*, 2001; 276(48): 44792-7
133. **Liu Zheng, Simpson E.R.:** Steroidogenic Factor 1(SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocr.* 1997; 11(2): 127-37
134. **Lin X.Z., Takemori H., Katoh Y., Doi J., Horike N., Makino A., Nonaka Y., Okamoto M.:** Salt-inducible Kinase is involved in the ACTH/cAMP-dependent protein kinase signaling in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Mol Endocrin* 2001, 15(8): 1264-76
135. **Lozano R.C., Maloberti P., Mendez C.F., Paz C., Podesta E.J.:** ACTH regulation of mitochondrial acyl-CoA thioesterase activity in Y1 adrenocortical tumor cells. *Endocr Res* 2002; 28(4): 331-7
136. **Poderoso C., Maciel F.C., Gorostizaga A., Bey P., Paz C., Podesta E.J.:** The obligatory action of protein tyrosine phosphatase in ACTH-stimulated steroidogenesis is exerted at the level of StAR protein. *Endocrin Res.* 2002 Nov; 28(4):413-7
137. **Lofti C.F.P., Lepique A.P., Forti F.L., Schwindt T.T., Eichler C.B., Santos M.O., Rebutini I.T., Hajj G.N.M., Juliano L., Armelin H.A.:** Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Brazil j Med Biol Res*, 2000; 33:1133-40
138. **Forti F.L., Schwindt T.T., Moraes M.S., Eichler C.B., Armelin H.A.:** ACTH promotion of p27 (Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is

dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation.

Biochemistry, 2002; 41(31): 10133-40

139. **Bey P., Gorostizaga A.B., Maloberti P.M., Lozano R.C., Poderoso C., Maciel F.C., Podesta E.J., Paz C.:** Adrenocorticotropin induces mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology*, 2003; 144(4): 1399-406
140. **Leibovitz A., Mc Combs W.M.D., Johnston D., Mc Coy C.E., Stinson J.C.:** New human cancer cell culture line. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 691-7
141. **Itoh S., Tanaka K., Horiuchi T., Kumagai M., Watabe T., Kanbegawa A., Shimizu N.:** DHEA-S and 3',5' cAMP production in a cultured human adrenocortical carcinoma cell line (SW-13). *Endocrinol Jpn* 1988; 35: 149-58
142. **Takahashi K., Yoshinoya A., Murakami O., Totsune K., Shibahara S.:** Secretin of endothelin-1 and adrenomedullin by SW-13 Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *J Cardiovas Pharmacol* 2000; 36(1): 393-4

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Martin Reincke bedanken, der den ersten Anstoß zu dieser Arbeit gab und mir den Einstieg in das Thema ermöglichte. Herrn Professor Dr. med. Bruno Allolio danke ich für die Möglichkeit und die Ermutigung die Arbeit weiter zu führen. Für die Unterstützung im Labor weiter zu arbeiten, als ich bereits in Coburg meine Stelle als Ärztin in der Frauenklinik angetreten hatte, möchte ich mich bei ihm herzlich bedanken.

Vor allem möchte ich Dr. med. Martin Faßnacht danken, der mich methodisch und fachlich immer unterstützte, mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand und gerade jetzt in der Schlussphase meine Arbeit mit Ideen und konstruktiver Kritik maßgeblich förderte. Er hat mir trotz der seit Jahren bestehenden räumlichen Entfernung mit großer Geduld zur Seite gestanden.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch allen MitarbeiterInnen der Endokrinologischen Abteilung Würzburg, die mit großen und kleinen Hilfestellungen die Arbeit erleichterten und mir mit Tipps und Verbesserungsvorschlägen in der Laborarbeit viel beibrachten. Dabei möchte ich vor allem Martina Zink und Sonngard Vay erwähnen, die mir sehr bei der Etablierung der Primärkultur halfen, sowie Patricia Mora und Sonja Meissner

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. Stefanie Hahner, meiner „Mitdotorandin“ in der ersten Zeit für die sehr gute Zusammenarbeit .

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglichten und mich immer, nicht nur auf meinem Berufsweg unterstützt und ermutigt haben. In meinen Dank möchte ich auch meine Freunde einschließen, die mich während des Studiums und im Speziellen bei dieser Arbeit begleitet haben.

Lebenslauf

Anja Irene Kircher
geboren am 27. November 1973 in Kiel

Eltern

Prof. Dr. Ernst Kircher
Margarete Kircher

Schulbildung

1980-84 Grund-und Hauptschule Dürrbachgrund
1984-93 Friedrich-Koenig-Gymnasium, Würzburg
1993 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Herbst 1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1995 Physikum
1996 Erstes Staatsexamen
1998 Zweites Staatsexamen
Praktisches Jahr
1. Terial Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik Würzburg
2. Terial Innere Medizin am Klinikum Coburg
3. Terial Chirurgie an der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
Mai 2000 Drittes Staatsexamen
1996-2000 Stipendiatin des Evangelischen Studienwerkes Villigst e.V.

Derzeitige Tätigkeit

seit 06/00 zunächst Ärztin im Praktikum, dann Assistenzärztin zur Weiterbildung in der Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik Coburg

Coburg, 15.10.2004