

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Wirkung von Etomidat auf
zelluläre Regulationsmechanismen der Nebennierenrinde**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Stefanie Hahner
aus Kassel

Würzburg, Dezember 2002

Referent: Prof. Dr. med. B. Allolio

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Timmermann

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2003

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Historisches zur Nebenniere	1
1.2	Die Nebenniere und ihre Regulation	2
1.3	Steroide und ihre Biosynthese	5
1.3.1	Mineralokortikoide	8
1.3.2	Glukokortikoide	8
1.3.3	Adrenale Androgene	9
1.4	Tumoröse Veränderungen der Nebennierenrinde	9
1.4.1	Nebennierenrindenadenom	10
1.4.2	Nebennierenrindenzarzinom	11
1.4.3	Therapie der NNR-Neoplasien	12
1.5	Adrenostatika	13
1.5.1	Etomidat (ETO)	14
1.5.2	Metyrapon (MTP)	15
1.5.3	Aminoglutethimid (AG)	16
1.6	ACTH und ACTH-Rezeptor	16
1.7	Der Zellzyklus	18
1.8	Zelltod: Apoptose und Nekrose	21
1.9	Die Fragestellung dieser Arbeit	23
1	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.2	Zellkultur	25
2.2.1	NCI-h295 Zellen	25
2.2.2	Y-1 Zellen	26
2.2.3	SW-13 Zellen	26
2.2.4	MCF-7- Zellen und HT-29- Zellen	26
2.2.5	Rinder-NNR-Primärkultur	27
2.3	Hormonanalysen	28
2.4	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes	28

2.5	Das Northern Blot Verfahren	29
2.5.1	Prinzip	29
2.5.2	Durchführung	30
2.5.2.1	RNA-Extraktion	30
2.5.2.2	Formaldehyd-Gelelektrophorese	30
2.5.2.3	Kapillartransfer auf Nylonmembran („Blotten“)	31
2.5.2.4	Herstellung einer DNA-Sonde	32
2.5.2.5	Markieren der Sonde („Labeln“)	32
2.5.2.6	Hybridisierung und Waschschrirte	33
2.6	Das Western Blot Verfahren	34
2.6.1	Proteinprobenaufbereitung	34
2.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.6.3	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran („Western Blotting“)	36
2.6.4	Immundetektion und Chemolumineszenz	37
2.7	Wachstumskurven	37
2.8	MTT-Test	38
2.9	Zellzyklusanalyse	38
2.10	Apoptosenachweis	39
2.11	Elektronenmikroskopie	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Wirkung von Etomidat auf die Steroidogenese	42
3.1.1	Ergebnisse der Hormonanalysen	42
3.1.2	Effekte auf die Expression von Steroidbiosyntheseenzymen	45
3.1.3	Einfluss auf die Expression von StAR und SF-1	48
3.2	Wirkung von Etomidat auf den ACTH-Rezeptor	49
3.2.1	Wirkung auf die ACTH-Rezeptor-Expression	49
3.2.2	Wirkung auf die ACTH-induzierte cAMP-Synthese	51
3.2.3	ACTH-Stimulation der NCI-h295 Zellen	52
3.3	Wirkung von Etomidat auf das Zellwachstum	53
3.3.1	Effekte von Adrenostatika in Wachstumskurven	53
3.3.2	Nachweis der Wirkung von Adrenostatika auf das Zellwachstum mittels MTT-Test	56
3.3.3	Effekte von Etomidat auf den Zellzyklus der NCI-h295 Zellen	60
3.3.4	Apoptosemessung	62
3.3.5	Einfluss von ETO auf an der Zellproliferation beteiligte Signaltransduktionsprozesse	63
3.4	Wirkung von Etomidat auf die Zellmorphologie	64
3.4.1	Ergebnisse der Elektronenmikroskopie	64

4	DISKUSSION	67
4.1	Effekte der Adrenostatika auf die Steroidbiosynthese	67
4.2	Effekte von Etomidat auf die Regulation der P450-Enzyme und die StAR-Expression	68
4.3	Effekte von Etomidat auf den ACTH-Rezeptor	70
	4.3.1 Mechanismen der ACTH-R-Regulation	71
	4.3.1.1 Der Proteinkinase-A-Signalweg	71
	4.3.1.2 Glukokortikoide und ACTH-R-Expression	72
	4.3.1.3 Der Proteinkinase-C-Weg	72
	4.3.1.4 Nukleäre Transkriptionsfaktoren	73
4.4	Effekte der Adrenostatika auf Wachstumsverhalten und Zellmorphologie	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	79
6	LITERATURVERZEICHNIS	81

1. Einleitung

1.1 Historisches zur Nebenniere

Die Geschichte der Nebennierenforschung beginnt 1563, als Bartholomaeus Eustachius Sanctoseverinatus in seinem Werk „De glandulis quae renibus incumbunt“ die Nebennieren beschreibt und als besondere Organe erkennt. Fast 300 Jahre später, 1855, gibt der englische Arzt Thomas Addison in seiner Arbeit „On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules“ die klassische Beschreibung des Nebennierenausfalls und der nach ihm benannten Krankheit (1). In seiner Arbeit verband er klinische Beobachtungen mit Sektionsbefunden und stellte eine Verbindung zwischen den beobachteten Symptomen und pathologischen Veränderungen der Nebennieren her.

1856 stellt Brown-Sequard im Tierversuch fest, dass die Nebennieren lebenswichtige Organe darstellen, indem er Tiere ein- oder beidseitig adrenaletomierte (2).

Mit der Erkenntnis der Nebennierenunterfunktion als Ursache der Addisonschen Krankheit beginnt man gegen Ende des 19. Jahrhunderts diese Patienten mit Nebennieren-Extrakten zu behandeln. Zunächst enthalten die Extrakte ein relativ undefiniertes Gemisch aus den heute bekannten Mark- und Rindenhormonen, da eine Differenzierung zwischen Mark und Rinde bis dahin noch nicht erfolgt ist und zur Gewinnung die gesamte Nebenniere verwendet wird.

1926 zeigt Smith, dass Hypophysektomie zur Atrophie der Nebennieren führt und Evans gelingt die Verhütung dieser Atrophie mit Hypophysenextrakten.

Die Überfunktion des Hypophysen-NNR-Systems wird 1932 von Harvey Cushing beschrieben. Er bringt hierbei das basophile Hypophysenadenom in Zusammenhang mit der nach ihm benannten Krankheit.

Isolierung, Konstitutionsaufklärung und Synthese der Rindenhormone gelingen in den Jahren 1937-52 durch Reichstein, Kendall, Wintersteiner und Mitarbeiter.

1942 wird von Li und Sayers das ACTH isoliert. 1948 wird durch die späteren Nobelpreisträger Hench und Kendall die entzündungshemmende Wirkung des Cortisons entdeckt.

Der primäre Aldosteronismus wird 1954 von Conn beschrieben (3).

1.2 Die Nebenniere und ihre Regulation

Die Nebennieren sitzen retroperitoneal paarig am oberen Nierenpol, links kappen- oder halbmondförmig, rechts eher dreieckig, und haben ein Gewicht von zusammen ca. 15 g. Umgeben werden sie von einer Kapsel kollagenen Bindegewebes. Schon makroskopisch ist eine Aufteilung in Nebennierenrinde (NNR) und Nebennierenmark (NNM) erkennbar. Die Nebennierenrinde geht aus dem Mesoderm hervor, indem Coelomepithelzellen in das Mesenchym eindringen und die fetale Anlage der Nebenniere bilden. Das Nebennierenmark ist neuroektodermaler Herkunft, man kann es auch als modifiziertes sympathisches Ganglion auffassen, dessen postganglionäre Neurone zu Adrenalin und Noradrenalin sezernierenden NNM-Zellen wurden (4).

Die NNR ist neben den Gonaden zentraler Ort der Steroidbiosynthese.

Die Blutversorgung wird gewährleistet durch die Aa. suprarenales superior, media et inferior, die einen subkapsulären Plexus bilden, aus dem sich verzweigende Arterienäste in die NNR abgehen und Sinusoide mit fenestriertem Endothel bilden. An der Rinden-Mark-Grenze gehen sie in venöse Sinusoide des Marks über. Das Mark erhält also interessanterweise eine doppelte Gefäßversorgung: Venen, die aus Rindenarterien hervorgegangen sind, und Markarterien, die zuvor keine Aufzweigung in der Rinde erfahren haben. Dies unterstützt neuere Hypothesen, nach denen die NNR-Hormone das Nebennierenmark beeinflussen.

Mikroskopisch lässt sich die NNR in drei Schichten mit unterschiedlichen Syntheseleistungen unterteilen: die subkapsulär gelegene Zona glomerulosa, die angrenzende Zona fasciculata und die marknahe Zona reticularis.

Die Glomerulosazellen sind in kompakten Nestern angeordnet, sie bilden Mineralokortikoide mit ihrem Hauptvertreter Aldosteron.

In der anschliessenden Zona fasciculata, der breitesten der drei Zonen, zeigen die Zellen eine strang- oder säulenförmige Anordnung. Die Zellen sind grösser und enthalten grosse Lipidtropfen. In ihnen werden Glukokortikoide und geringe Mengen Androgene produziert.

In der marknahen Zona reticularis sind die Zellen kleiner als in den anderen Schichten und netzartig angeordnet. Sie enthalten weniger Fetttropfen, aber im Alter relativ viele Lipofuszingranula. In dieser Zone erfolgt vor allem die Synthese von Androgenen.

Funktionell gesehen bilden Zona fasciculata und reticularis eine Einheit. In beiden Zonen werden Glukokortikoide sowie Androgene produziert. Man geht jedoch davon aus, dass die Zona fasciculata mehr für die Akutreaktion mit schneller erhöhter Cortisol-Produktion auf ACTH-Stimulation verantwortlich ist, während durch die Zona reticularis eine basale Glukokortikoidsekretion aufrechterhalten wird (5, 6).

Einige Studien haben gezeigt, dass die funktionelle Verknüpfung und gegenseitige Beeinflussung von Rinde und sympathoadrenergem System sowie auch dem Immunsystem wesentlich stärker ausgeprägt sind als zuvor angenommen. Neben den klassischen adrenalen Effektor-Hormonen ACTH und Angiotensin II scheinen noch eine Reihe anderer lokaler Regulationsmechanismen einen Einfluss auf die Nebennierenfunktion zu haben. In *in-vitro*-Studien wurden eine Vielzahl verschiedener vom Nebennierenmark sezernierter Faktoren identifiziert, die Einfluss auf die adrenokortikale Funktion haben. Nebennierenrindenzellen, die mit chromaffinen Zellen kokultiviert wurden, produzierten beispielsweise zehnfach höhere Mengen an Glukokortikoiden als isoliert kultivierte Zellen und zeigten zudem eine deutliche Hochregulation der mRNA-Expression einiger Cytochrom P450-Enzyme sowie des steroidogenic acute regulatory proteins (StAR) (7-9). Bei morphologischen Untersuchungen ließen sich chromaffine Zellen in allen Zonen der adulten Nebenniere nachweisen und umgekehrt waren auch Nebennierenrindenzellen im Mark lokalisierbar (10, 11). Einige im Nebennierenmark verschiedener Säugetierspezies nachgewiesene Peptide mit parakriner Wirkung auf die Nebennierenrindenzellen sind Adrenomedullin, welches eine inhibitorische Wirkung auf die Angiotensin II-stimulierte Aldosteron-Sekretion zeigt (12), weiterhin ANP, NPY, Substanz P und VIP (13). Die Produktion von Adrenomedullin ließ sich auch bei NNR-Karzinomzellen feststellen (14).

Daneben ließ sich die Beteiligung einiger Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF), Insulin-like growth factors I und II (IGF I, IGF II), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und des Endothelinsystems an der intraadrenalen

Regulierung von Mitogenese und Steroidogenese nachweisen (10, 13, 15-18), wobei TGF β 1 im Gegensatz zu den anderen erwähnten Substanzen eine proliferationshemmende Wirkung zugeschrieben wird (15, 19-22).

Zahlreiche Hinweise existieren auch bezüglich einer Interaktion zwischen Immunsystem und Nebenniere. Das Immunsystem beeinflusst die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA/HHV-Achse), indem es durch Cytokine die Sekretion von CRH und ACTH stimuliert oder auch direkten Einfluss auf die Nebenniere ausübt. Für die Interleukine IL-1, IL-3 und IL-6 konnten stimulierende Effekte auf die Steroidbiosynthese nachgewiesen werden (7, 23, 24), eine inhibitorische Wirkung auf die Nebennierenfunktion zeigten dagegen tumor necrosis factor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) (7, 25, 26).

Nebennierenrindenzellen der inneren Rindenzone exprimieren das MHC Klasse II-Molekül, das eine hohe Korrelation zum Differenzierungsgrad der NNR-Zellen aufweist (27) und dessen Expression in NNR-Karzinomen vermindert ist (28).

Die Bedeutung von ACTH auf die Nebennierenfunktion besteht v. a. in der Stimulation der adrenalen Steroidbiosynthese, RNA- und Proteinsynthese. Die früher angenommene mitogene Aktivität scheint mehr in einer Zellhypertrophie mit entsprechender Volumenzunahme der Nebenniere unter ACTH-Stimulation zu bestehen (29, 30). So haben einige Studien sogar einen proliferationshemmenden Effekt von ACTH nachgewiesen (31, 32). ACTH wird mittlerweile mehr als Differenzierungsfaktor betrachtet.

Das Augenmerk richtet sich heute auf ein anderes Spaltprodukt des hypophysären Proopiomelanocortins (POMC), das 1-76-N-POMC, auch Pro- γ -MSH genannt, und dessen weitere N-terminale Spaltprodukte (33). Für das komplette Pro- γ -MSH selbst ließ sich bisher kein proliferationsfördernder Effekt nachweisen (34), anders jedoch für kleinere Pro- γ -MSH-Fragmente, u. a. für das 1-26- und 1-28-N-POMC (33, 35-37). 2001 wurde eine adrenale Protease charakterisiert, die für die Abspaltung der mitogen wirksamen Fragmente des Pro- γ -MSH verantwortlich sein soll (38, 39).

1.3 Steroide und ihre Biosynthese

Steroidhormone spielen eine grundlegende Rolle in der Anpassung an Stressfaktoren, in der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes und in der Sexualentwicklung. Die Biosynthese der verschiedenen Gruppen erfordert sechs verschiedene Cytochrom P450-Enzyme und zwei Hydroxysteroid-Dehydrogenasen in den verschiedenen endokrinen Geweben (40).

Die Biosynthese der Steroidhormone geht vom Cholesterol aus. In vielen Steroidproduzierenden Zellen sieht man es in Form von Lipid-Tröpfchen gespeichert, während die Hormone selbst nicht gespeichert, sondern unmittelbar nach Synthese ausgeschüttet werden.

Im Plasma können die Steroide an Albumin oder spezifischere Transportproteine binden.

Nach ihrer Wirkung werden die Steroide in folgende Gruppen unterteilt: Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Sexualsteroid. Nach der Struktur und der Zahl der vorhandenen C-Atome unterscheidet man zwischen C27-Steroiden, C21-Steroiden (Cortisol, Aldosteron, Progesteron), C19-Steroiden (z. B. Testosteron und verwandte Androgene) und C18-Steroiden (z. B. Östrogene).

Für die Steroidbiosynthese sind die Cytochrom-P450-Systeme besonders charakteristisch. Es handelt sich hierbei um Monooxygenasen mit einem Absorptionsmaximum im Komplex mit CO bei 450 nm, die sich in der mitochondrialen Membran (P450_{scc}, P450_{c11}) sowie im endoplasmatischen Retikulum (P450_{c17}, P450_{c21}) befinden und positions- und substratspezifische Hydroxylierungsschritte sowie oxidative Spaltungen von C-C-Bindungen katalysieren (41, 42). Das einzige Enzym, das in der adrenalen Steroidbiosynthese benötigt wird und keine Assoziation zum P450-Komplex aufweist, ist die 3 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (3 β -HSD), ein Enzymkomplex, der am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.

Die Steroidbiosynthese wird vor allem auf zwei Ebenen durch geschwindigkeitsbestimmende Schritte kontrolliert: der Ebene der Substratmobilisation mit de novo-Synthese von StAR und der Ebene der Gentranskription der P450-Enzyme. StAR vermittelt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Transfers von Cholesterol von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran (43, 44).

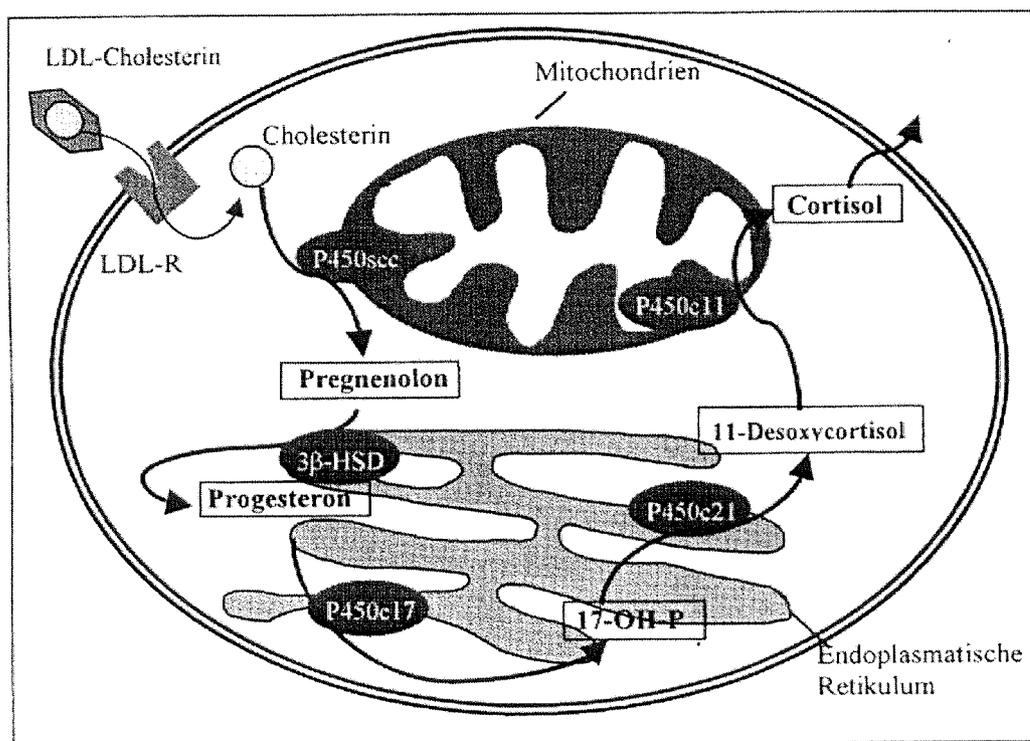
Die P450c17-Hydroxylase:

Dieses Enzym hydroxyliert das C17-Atom des Pregnenolons bzw. des Progesterons und führt weiterhin zur Abspaltung der Seitenkette der gebildeten 17-hydroxylierten Substrate. Die P450c17-Hydroxylase ist am glatten endoplasmatischen Retikulum der Zellen der *Zona fasciculata* und *reticularis* gelegen.

Das P450c21-Enzym:

Dieses Enzym kommt in *Zona glomerulosa* und *Zona fasciculata* vor und ist ebenfalls am glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es katalysiert die Hydroxylierung des C21-Atoms des Progesterons bzw. des 17-OH-Progesterons.

Abbildung 2: Übersicht über die Lokalisation der Steroidbiosyntheseenzyme



1.3.1 Mineralokortikoide

Wichtige Mineralokortikoide sind das Aldosteron und das Deoxycorticosteron. Die durchschnittliche tägliche Aldosteronsekretion liegt bei gesunden Versuchspersonen und bei normaler Salzaufnahme zwischen 0,1 und 0,7 μmol (50-250 μg) (46). Aldosteron nimmt eine unentbehrliche Rolle in der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes ein. Es bindet an spezifische Rezeptoren der Niere und steigert dort über die Aktivierung einer Natrium-Kalium-ATPase die Rückresorption von Natrium und sekundär von Wasser sowie die Sekretion von Kalium (47).

Die Aldosteronfreisetzung unterliegt vor allem drei Hauptregulationsmechanismen: dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, dem Serumkaliumspiegel und dem ACTH-Serumspiegel (48).

1.3.2 Glukokortikoide

Die bedeutendsten Glukokortikoide stellen das Cortisol und in geringerem Maße das Cortison und Corticosteron dar. Die tägliche Cortisolsekretion beträgt zwischen 40 und 80 μmol (15-30 mg) und zeigt eine ausgeprägte Tagesrhythmik mit einem Maximum am frühen Morgen und einem Minimum um Mitternacht (49). Die glukokortikoide Wirkung beinhaltet die Glukoneogenese mit Glukoseproduktion aus Aminosäuren und Glykolyse und damit Erhöhung der Serumglukosekonzentration und Schaffung einer katabolen Stoffwechsellage. Im Fettstoffwechsel steigern die Glukokortikoide die Lipolyse in der Peripherie und sorgen für eine Umverteilung des Körperfettes. Sie wirken außerdem mineralokortikoid und verstärken die Katecholaminwirkung. Schließlich beeinflussen sie in vielfältiger Weise das Immunsystem. Sie wirken antiphlogistisch und antiallergisch durch Hemmung der Histamin-, Prostaglandin- und Leukotrienfreisetzung (50). Die Cortisolausschüttung unterliegt unter anderem der Kontrolle durch das in der Adenohypophyse gebildete ACTH. ACTH ist ein unverzweigtes Polypeptid aus 39 Aminosäuren, das neben einer Reihe anderer Peptide aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin (POMC) gebildet wird. Die Freisetzung von ACTH wiederum wird durch das im *Nucleus paraventricularis* gebildete hypothalamische Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) reguliert. Zwischen

den einzelnen Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse besteht ein enger Regelkreis mit negativem Feedback-Mechanismus.

Cortisol diffundiert wie alle Steroidhormone durch die Zellmembran hindurch und bindet an intrazelluläre Rezeptoren, die verschiedene regulatorische Funktionen auf transkriptioneller Ebene aufweisen.

1.3.3 Adrenale Androgene

Das wichtigste adrenale Androgen ist das Dehydroepiandrosteron (DHEA) sowie dessen Schwefelsäureester DHEA-S. 15-30 mg dieser Verbindungen, die selbst nur geringe androgene Wirkung besitzen, werden täglich ausgeschüttet. Ihre Androgenität ist von der peripheren Konversion zu Testosteron abhängig.

Androgene regulieren u. a. die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und können bei Frauen bei gesteigerter Produktion zu Virilisierung führen. Die Freisetzung der Nebennierenandrogene wird durch ACTH und nicht durch die Gonadotropine LH bzw. FSH stimuliert.

1.4 Tumoröse Veränderungen der Nebennierenrinde

Die Einordnung von Nebennierentumoren kann prinzipiell nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen (Dignität, endokrine Aktivität, Ursprungsort).

Primäre NNR-Tumoren können unterteilt werden in benigne epitheliale Tumoren (Nodus, Nodulus, Adenom), maligne epitheliale Veränderungen (NNR-Karzinom) und nichtepitheliale Tumoren (u. a. Myelolipom, Hämangiom, Lymphom) (51).

Der Großteil der adrenalnen Tumoren ist klinisch unauffällig und wird nur zufällig in der Bildgebung entdeckt. Die Prävalenz dieser sogenannten Inzidentalome wird auf mindestens 1% in der Gesamtbevölkerung geschätzt, wobei eine Zunahme der Häufigkeit mit dem Alter verzeichnet wurde (6% in der Altersgruppe der 60-70jährigen) (52, 53). Nur etwa 1% aller NNR-Tumoren ist maligne (10).

1.4.1 Das Nebennierenrindenadenom

NNR-Adenome treten relativ häufig auf und stellen meist Zufallsbefunde dar. Auch hier ist die endokrine Aktivität sehr unterschiedlich ausgeprägt und kann zu verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern führen.

Man differenziert zwischen Cortisol-, Aldosteron-, und Androgen-produzierenden sowie endokrin inaktiven Tumoren. Adenome sind bei Diagnose meist größer als 1 cm im Durchmesser und weisen ein durchschnittliches Gewicht von etwa 20-50 g auf. Das kritische Gewicht liegt bei ca. 100 g, da ab diesem Bereich häufig Zeichen der Malignität feststellbar sind (51). Die Ätiologie ist bisher weitgehend unbekannt.

Cortisol-produzierende Neoplasien sind für etwa 15-20% der Fälle eines Cushing Syndroms verantwortlich.

Weitere Ursachen eines Hyperkortisolismus können neben dem Adenom das NNR-Karzinom, das ACTH-produzierende Hypophysenadenom (M. Cushing, ca. 70% d. F.), ektop ACTH-bildende Tumoren und sehr selten die mikro-/makronoduläre Hyperplasie sowie eine ektope CRH-Bildung sein (54).

Aldosteron-produzierende Adenome werden bei 0,7%-2,2% der Patienten mit Hypertension gefunden (55). Sie stellen unter den endokrin aktiven NNR-Adenomen die häufigste Untergruppe dar (51).

Das klinische Erscheinungsbild ist vor allem durch Hypertonie und Hypokaliämie gekennzeichnet (55).

Tabelle 1: Klinik des Cushing Syndroms

Symptome/Befunde	Häufigkeit
Zentrale Adipositas	80 – 100%
Hautveränderungen (Atrophie, Striae rubrae)	80 – 100%
Diabetes mellitus/ gestörte Glukosetoleranz	40 – 90%
Muskelschwäche	30 – 90%
Hypertonie	75 – 85%
Gefäßfragilität/ Hämatomneigung	25 – 80%
Hirsutismus	60 – 80%
Zyklusstörungen/ Impotenz	55 – 80%
Psychische Auffälligkeiten	30 – 85%
Osteoporose	40 – 50%

Tabelle 2: Klinik des primären Hyperaldosteronismus

Symptome / Befunde	Häufigkeit
Hypertonie	100%
Hypokaliämie	50%
Polyurie, Nykturie	73%
Muskelschwäche	35%
Lähmungen, Parästhesien	20%
Obstipation	15%

1.4.2 Das Nebennierenrinden-Karzinom

Das NNR-Karzinom ist eine insgesamt sehr seltene tumoröse Veränderung mit heterogenem Erscheinungsbild und bislang unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten. Die jährliche Inzidenz wird auf 0,6-1 : 1 Mio Einwohner beziffert (52, 56). Bevorzugtes Erkrankungsalter des NNR-Karzinoms ist das 4. bis 5. Lebensjahrzehnt, es tritt jedoch auch im Kindesalter auf und zeigt dort einen weniger aggressiven Verlauf (45, 57, 58).

Die Tumoren können beträchtliche Größen mit Gewichten von mehr als 400 g und mikroskopisch alle Differenzierungsgrade aufweisen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt meist (in ca. 70% d. F.) (52) bereits ein fortgeschrittenes Stadium vor. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 22-35% (58-60). Klinisch unterscheidet man zwischen endokrin aktiven (ca. 79%) (58) und endokrin inaktiven Tumoren, wobei sowohl der Grad der endokrinen Aktivität als auch die Art der sezernierten Hormone sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann (45, 56). Am häufigsten findet man Glukokortikoid-produzierende Karzinome, daneben Androgen- und selten Aldosteron- oder Östrogen-sezernierende Tumoren (51).

Die klonale Analyse verschiedener NNR-Karzinome zeigte ein monoklonales Muster (61, 62). Man geht davon aus, dass Mutationen verschiedener Onkogene sowie Tumor-Suppressor-Gene an der Tumorgenese beteiligt sind. Bisherige Untersuchungen zeigten u. a. Mutationen des p53-Tumor-Suppressor-Gens, loss of heterozygosity am Locus 11p15, assoziiert mit IGF II-Überexpression oder Deletionen im ACTH-Rezeptor-Gen (52, 63). Insgesamt ist die Pathogenese bisher jedoch relativ unverstanden.

1.4.3. Therapie der NNR-Neoplasien

Bezüglich des Procedere zufällig entdeckter Nebennierenraumforderungen fand im Februar 2002 eine NIH-Konsensuskonferenz statt, in der eine einheitliche Empfehlung für Diagnostik und Therapie erarbeitet wurde.

Chirurgische Therapie:

Tumoren mit Malignitätsverdacht, endokrin aktive NNR-Tumoren, sowie endokrin inaktive Tumoren ab einer Größe von 6 cm Durchmesser sollten operativ entfernt werden (55). Die laparoskopische Adrenalectomie ist hierbei v. a. für die Entfernung benigner Tumoren zur Methode der Wahl geworden (55,64), während Tumoren mit Malignitätsverdacht weiterhin konventionell operativ entfernt werden sollten.

Bei endokrin inaktiven Tumoren <6 cm Durchmesser empfiehlt sich zunächst ein konservatives Vorgehen mit regelmäßiger Verlaufskontrolle in 6-12-monatigen Abständen.

Medikamentöse Therapie:

Die wichtigste Substanz in der Therapie inoperabler bzw. metastasierter NNR-Karzinome ist Mitotane (o-p-DDD, Lysodren[®]). Es besitzt eine gute adrenotoxische Potenz und wirkt darüberhinaus durch Inhibition der Enzyme P450_{scc} und P450_{c11} adrenostatisch. Insgesamt ist die Wirksamkeit sehr variabel und die vielfältigen Nebenwirkungen (v. a. gastrointestinale und zentralnervöse) spielen häufig eine limitierende Rolle (55, 59, 65). Eine Tumorregression konnte in 15-60% der Fälle beobachtet werden, anhaltende Remissionen kommen in seltenen Fällen vor (66-69). In den letzten Jahren ging man dazu über, ein genaues Serumspiegel-Monitoring durchzuführen, um eine Langzeitbehandlung bei geringeren Nebenwirkungen zu erreichen (56).

Einige Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Etoposid, 5-Fluorouracil, Methothrexat, Cisplatin, Suramin, Taxol u. a. wurden ebenfalls, meist jedoch mit nur sehr unbefriedigendem Ergebnis, eingesetzt (56, 70-73).

Die autonome Produktion von Steroiden macht meist eine adrenostatische Behandlung notwendig. Hierfür stehen verschiedene Inhibitoren der Steroidbiosynthese zur Verfügung, die im folgenden Kapitel z. T. näher besprochen werden sollen.

Strahlentherapie:

Bezüglich der Strahlentherapie herrschen unterschiedliche Auffassungen. Eingesetzt wird sie zur postoperativen Tumorbettbestrahlung zur Prävention eines Lokalrezidivs und in der Behandlung von Knochenmetastasen.

1.5 Adrenostatika

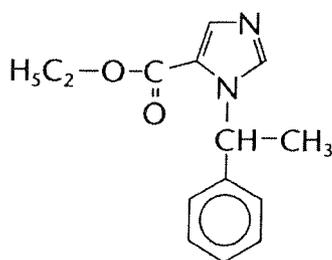
Adrenostatika wirken durch Inhibition der Cytochrom P450-abhängigen Enzyme. Häufig klinisch verwendete Substanzen sind Ketokonazol (Nizoral[®]), bei exzessiver Kortisolsekretion oder zur OP-Vorbereitung Etomidat (Hypnomidate[®]), sowie die in der Tumorthherapie eingesetzten Substanzen Metyrapon und Aminogluthetimid (54, 74). Darüberhinaus existieren noch eine Reihe weiterer adrenostatisch wirkender Substanzen, die in Tabelle 3 aufgeführt sind.

Eine Übersicht über die o. g. Adrenostatika und die von ihnen inhibierten Enzyme soll die folgende Tabelle geben (75):

Tabelle 3: Übersicht über einige Adrenostatika und die durch sie gehemmten Enzyme

Ketokonazol	P450c17 P450c11 P450scc
Etomidat	P450c11 P450scc P450c17 (in sehr hohen Konzentrationen)
Metyrapon	P450c11 P450scc
Aminoglutethimid	P450scc Aromatase
Trilostane	3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

1.5.1 Etomidat



Etomidat wird heute als Kurzzeitanästhetikum eingesetzt. In klinischer Anwendung befindet es sich seit 1972, damals verwendete man es im Wesentlichen zur Narkoseeinleitung als auch zur Langzeitsedierung von Intensivpatienten. Daneben findet es auch Anwendung in der kurzfristigen Therapie des Cushing Syndromes (76, 77). Seine anästhetische Wirkung erhält es durch GABA-agonistischen und

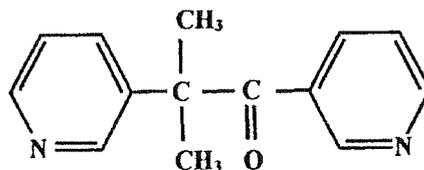
entsprechend dämpfenden Effekt auf die *Formatio reticularis*. Als Vorteile gelten das Fehlen einer kardiovaskulären Depression und der fehlende Anstieg des Histaminspiegels. Der Abbau erfolgt über die Leber.

Etomidat ist ein substituiertes Imidazolderivat und besitzt so eine strukturelle Verwandtschaft mit einigen Antimykotika wie beispielsweise Ketoconazol und Miconazol, für die ebenfalls eine adrenostatische Wirkung gezeigt werden konnte.

1983 berichteten Ledingham and Watt über einen Anstieg der Mortalität ihrer Intensivpatienten nach Langzeitsedierung mit Etomidat (78). Daraufhin durchgeführte Untersuchungen zeigten eine Suppression der Cortisol-, Corticosteron- und Aldosteronspiegel sowie erhöhte Plasma-ACTH-Konzentrationen und eine fehlende NNR-Stimulierbarkeit durch ACTH (79-82).

In zahlreichen *in-vitro*-Untersuchungen an verschiedenen Modellen und auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Etomidat die P450c11-Hydroxylase sowie das P450scc-Enzym dosisabhängig hemmt (83-92). Auch ein schwacher inhibitorischer Effekt auf das P450c17-Enzym (17,20-Desmolase) konnte festgestellt werden (74, 90). Den stärksten Effekt zeigt Etomidat auf die P450c11-Hydroxylase und bereits in Konzentrationen unterhalb der sedierenden Dosis besteht eine effektive Suppression der Cortisolsynthese (82).

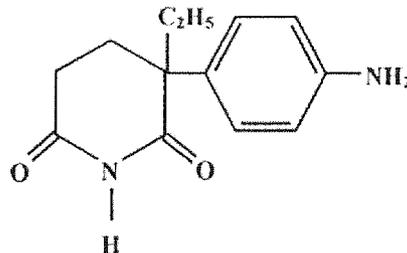
1.5.2 Metyrapon (MTP)



Das Pyridinderivat Metyrapon (Metopiron®) wirkt in niedrigen Konzentrationen inhibitorisch auf das P450c11-Enzym (IC_{50} 3,5 μ M) und in höheren Konzentrationen auch auf das P450 scc-Enzym (IC_{50} 17 μ M) (198-200). Es dient der Behandlung des Hyperkortisolismus, wird aber auch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt (55, 74, 85).

Der Hemmmechanismus ist kompetitiv und reversibel (93).

1.5.3 Aminoglutethimid (AG)



Aminoglutethimid, ein antikonvulsiv wirkendes Medikament, zeigt seine adrenostatische Wirkung durch Hemmung des P450_{scc}-Enzyms (IC₅₀ 10 μ M). Daneben inhibiert es die Aromatase-Aktivität und fand daher neben seinem Einsatz in der Therapie des Cushing Syndroms Anwendung in der Therapie von Mamma- und Prostata-Karzinom (74, 75, 94, 95).

1.6 ACTH und ACTH-Rezeptor

Die Synthese der adrenalen Glukokortikoide und Androgene wird vorwiegend durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert (111-113). Hauptsignaltransduktionsweg des ACTH ist der Adenylatzyklaseweg mit folgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP, aber auch andere Kaskaden wie der Proteinkinase C- und der Lipoxygenaseweg sowie die MAP-Kinasen können durch ACTH aktiviert werden (114-119).

Der ACTH-Rezeptor (ACTH-R) gehört als MC2-Rezeptor zur Gruppe der Melanocortin-Rezeptoren. Diese wiederum gehören der Familie der G-Proteingekoppelten (heptahelikalen) Rezeptoren an, die sich unter anderem durch sieben transmembranöse Domänen auszeichnen (120).

Der ACTH-R ist mit seinen 297 Aminosäuren einer der kürzesten G-Proteingekoppelten Rezeptoren und weist ein Molekulargewicht von 33kD auf. Er wird vor allem in der NNR, insbesondere in den Zonae glomerulosa und fasciculata exprimiert,

daneben ließ sich ACTH-R-mRNA in der Haut und in Nagetieradipozyten nachweisen (114, 120).

Schon bevor die Klonierung des ACTH-R-Gens durch Mountjoy et. al. im Jahr 1992 gelang (121), stellte man fest, dass die Expression von ACTH-Bindungsstellen in menschlichen NNR-Zellen durch ACTH hochreguliert wurde (114). Diese ungewöhnliche Hochregulierung eines Rezeptors durch den eigenen Liganden wurde in späteren Studien bestätigt (122). In der ACTH-R-Promotor-Region fanden sich mehrere cAMP-response-elements (123). Mutationen, die eine Forskolin- und ACTH-Resistenz der Adenylatzyklase bedingen, führten zu einem Verlust der ACTH-R-Expression (124). Daneben belegen Studien auch eine vermehrte ACTH-R mRNA-Expression durch Angiotensin II (122, 125, 126). Untersuchungen der Gruppe um Durand an Schafs-NNR-Zellen wiesen eine Steigerung der cAMP-Antwort sowie der Steroidogenese auf ACTH nach Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden nach (127). Es ließ sich später eine gesteigerte ACTH-R-mRNA-Expression feststellen (128). Die Behandlung mit Aminoglutethimid (AG) oder Metyrapon (MTP) führte zu einer Verminderung der ACTH-R-mRNA-Synthese, die durch die Substitution von Hydrocortison sowie durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Forskolin reversibel war (128, 129).

Die ACTH-R-Expression ist supprimierbar durch den Transkriptionsfaktor DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene 1) (114, 130, 131).

Eine Rolle des ACTH-R in der adrenalen Tumorgenese als Onkogen scheint von eher geringer Relevanz zu sein. Bisher fanden sich keine aktivierenden ACTH-R-Mutationen (114, 132, 133). Die ACTH-R mRNA-Expression in endokrin inaktiven Adenomen und Karzinomen ist niedrig, während sie in Cortisol- und Aldosteron-produzierenden Adenomen relativ hohe Werte erreicht (114, 132, 134). Der ACTH-R scheint eher als Differenzierungsfaktor zu fungieren, ein sogenannter loss of heterozygosity (LOH) in Nebennierentumoren war assoziiert mit einem undifferenzierten Phänotyp (114, 133).

1.7 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus lässt sich formal in zwei Hauptphasen unterteilen: die Mitose- (M-) Phase und die Interphase. In der M-Phase teilen sich zunächst der Zellkern mit den Chromosomen, danach folgt in der Zytokinese die Teilung des Zytoplasmas, so dass am Ende zwei Tochterzellen entstehen. Zwischen den aufeinanderfolgenden mitotischen Zellteilungen liegt jeweils die Interphase, die in jedem Zellzyklus in der Regel etwa 90% der Zeit in Anspruch nimmt, wobei die Zyklusdauer von Zelltyp zu Zelltyp stark variiert. In dieser Phase finden Zellwachstum mit Proteinsynthese und Produktion zytoplasmatischer Organellen sowie Chromosomenreplikation statt. Die Interphase besteht aus drei Wachstumsabschnitten, die man in der Reihenfolge ihres Ablaufes als G1- (vom englischen „gap“), S- (DNA-Synthese) und G2-Phase bezeichnet.

Eine Reihe chemischer und physikalischer Faktoren dient als Regulationsmechanismus für die Zellteilung. So konnten beispielsweise einige Wachstumsfaktoren wie bFGF, IGF, PDGF, TGF- β , CSF1, EGF und NGF (10, 15). identifiziert werden. Auch die Zelldichte scheint eine wichtige Rolle zu spielen, so dass es in gesundem Gewebe zu einer sogenannten dichteabhängigen Zellteilungshemmung kommt, die jedoch bei Tumorzellen meist aufgehoben ist. Eine wichtige Rolle spielen hier offensichtlich eine Reihe von Membranproteinen wie beispielsweise die Integrine, die Einfluss auf intrazelluläre Signaltransduktionswege besitzen (96).

An wichtigen Übergängen von einer Phase zur nächsten existieren Kontrollpunkte („cell cycle checkpoints“). Ein entscheidendes Stadium für die Steuerung der Zellteilung ist die G1-Phase des Zellzyklus. Ein besonderer Kontrollpunkt liegt in der G1-Phase kurz vor Beginn der DNA-Synthesephase, auch als START- oder Restriktions-Punkt bekannt. An diesem G1-Kontrollpunkt entscheidet sich, ob eine weitere Verdoppelung stattfindet, oder ob die Zelle den Zellzyklus verlässt und in einen Ruhezustand, in die G₀-Phase übergeht. Werden solche Kontrollpunkte überschritten, herrscht ein „Alles-oder-Nichts“-Gesetz und die folgenden Abläufe laufen automatisch bis zum nächsten Kontrollpunkt weiter. Die meisten Zellen des menschlichen Körpers befinden sich in der G₀-Phase.

Als molekularer Zeitgeber, der den Takt der aufeinanderfolgenden Vorgänge im Zellzyklus bestimmt, wirken rhythmische Aktivitätsschwankungen bestimmter Regulatorproteine. Darunter befinden sich einige Proteinkinasen, Phosphatasen und die sogenannten Cycline, deren Konzentration einem zyklischen Wechsel von Synthese und Abbau unterliegt. Eine Proteinkinase, die zur Steuerung des Zellzyklus beiträgt, wird nur dann aktiv, wenn sie an ein bestimmtes Cyclin gekoppelt ist, daher auch die Bezeichnung „cyclinabhängige Proteinkinasen“ (cyclin-dependent kinases, Cdk). Jede einzelne Cdk ist während des Zellzyklus stets in der gleichen Konzentration vorhanden, aber ihre Aktivität variiert mit den Konzentrationsschwankungen des jeweilig spezifischen Cyclins, mit dem sie einen Cyclin-Cdk-Komplex bildet. Die einzelnen Phosphorylierungsschritte unterliegen also der Kontrolle der Cycline. Bisher konnten 16 verschiedene Cycline identifiziert werden (97).

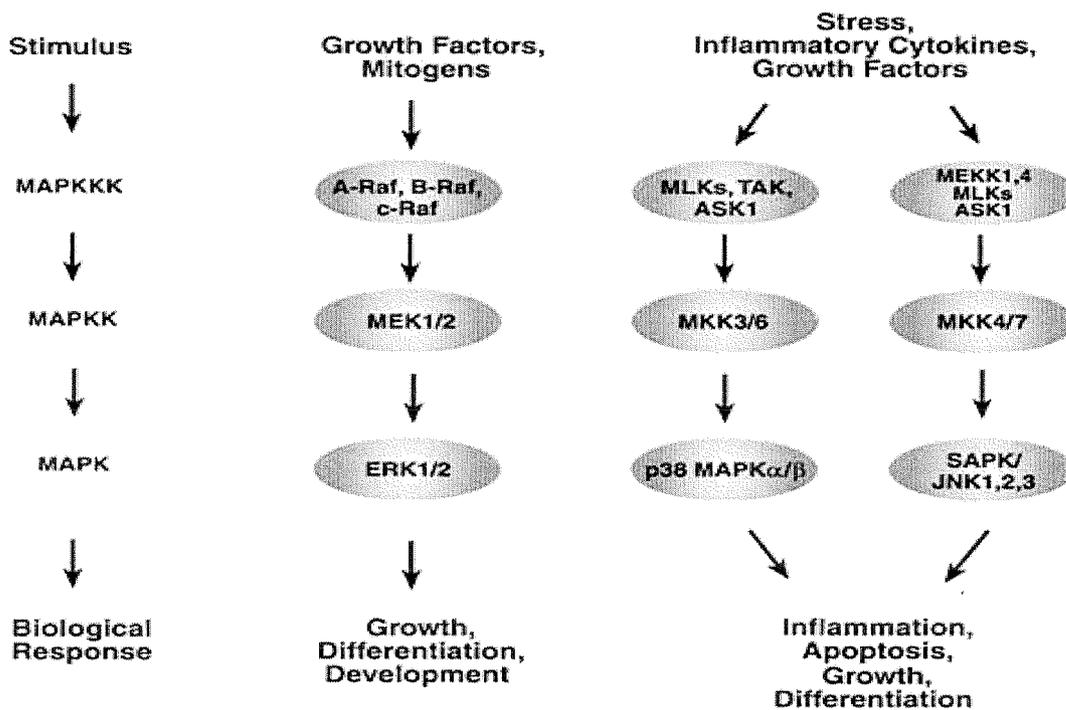
Der Cyclin-Cdk-Komplex muss wiederum durch Phosphorylierung durch einen großen Kinase-Komplex (CAK, Cdk activating complex) in die aktivierte Form gebracht werden und ist für eine Reihe verschiedener Schritte verantwortlich. So führen beispielsweise die Phosphorylierung von Histonen zur Kondensation der Chromosomen, oder von Proteinen der Kernlamina zum Zerfall der Kernhülle (98-100). Eine inhibitorische Wirkung auf die Cyclin-Cdk-Komplexe kann durch sogenannte Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKI) ausgeübt werden.

Man vermutet, dass die verschiedenen in die Regulation des Zellzyklus eingebundenen Proteine auch einer hormonellen Kontrolle unterliegen. Transkriptionsfaktoren, die Hormon-vermittelte Signaltransduktionswege vermitteln, können durch Cycline reguliert werden, verschiedene nukleäre Rezeptoren, darunter der Glukokortikoidrezeptor werden durch Cyclin-Cdk-Komplexe phosphoryliert und aktiviert. Angiotensin II beispielsweise konnte bei NCI-h295-Zellen die G1-Phasen-Progression durch Induktion der Cyclin-D1-Promoter-Aktivität mit vermehrter Cyclin-D1-mRNA-Synthese stimulieren (101).

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, über den viele Wachstumsfaktoren ihren Proliferationsreiz vermitteln, ist die MAP-Kinase-Kaskade (s. Abb. 3). Mindestens drei parallele MAPK sind identifiziert worden (ERK, SAPK, auch als JNK bekannt, und p38). MAPK-Kaskaden werden durch Wachstumsfaktoren oder Stresssignale stimuliert. Ziele für aktivierte MAPK können Proteine im Zytoplasma, der Zellmembran oder

Zytoskelett sein, die phosphoryliert werden, oder sie können in den Zellkern translozieren, wo sie Transkriptionsfaktoren aktivieren oder induzieren, die wiederum dazu führen, dass bestimmte für das Zellwachstum oder auch Zelltod (Apoptose) wichtige Gene exprimiert werden. Insbesondere der MAPK/Erk-Weg ist eng mit Zellproliferation und Zelldifferenzierung verknüpft (102).

Abbildung 3 Der MAPK-Signaltransduktionsweg



Übersicht über die 3 Hauptwege der MAPK-Kaskade ERK, p 38 und JNK. Die Aktivierung erfolgt über eine Kaskade einzelner Kinasen im Schneeballsystem und führt über Phosphorylierungen zur Zellantwort.

1.8 Zelltod: Apoptose und Nekrose

Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Zellproliferation und Zelltod ist unabdingbar für Entwicklung und Funktion eines Organismus. Apoptose ist eine genetisch regulierte Form des Zelltodes und gliedert sich in mehrere aufeinanderfolgende Schritte: Induktion durch Triggerfaktoren, Aktivierung einer Proteasenkaskade und *in vivo* Phagozytose (103). Abhängig von den jeweiligen Triggerfaktoren können verschiedene Aktivierungswege beschrrieben werden: über sogenannte „death receptors“ wie Fas- oder TNF-Rezeptoren, durch das Fehlen von „survival factors“ wie Interleukine oder IGF-1 oder Störungen im Zellmetabolismus oder durch direkte DNA-Schädigung durch Strahlen oder zytotoxische Substanzen (104). Alle diese Mechanismen resultieren letztendlich in der Aktivierung der sogenannten Caspase-Kaskade, an deren Ende durch proteolytische Spaltung Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Kernfragmentierung und damit Tod der Zelle stehen (103, 105) Caspasen liegen als inaktive Procaspasen vor, die erst während der Kaskade aktiviert werden müssen. Die Procaspasen und andere beteiligte Proteine werden permanent durch gesunde Zellen produziert, so dass der Apoptoseprozess sehr schnell vollzogen werden kann und oft weniger als eine Stunde dauert (106, 107). Bisher konnten aus humanen Zellen bereits mehr als 10 verschiedene Caspasen isoliert werden (103). Es sind zwei Hauptwege der Apoptose bekannt: Ein Weg verläuft über die Initiierung durch Zelloberflächenrezeptoren („death receptors“) wie Fas und TNF α , die die Caspase 8 über sog. Adaptormoleküle wie TRADD (TNF receptor I-associated death domain protein) und FADD aktivieren. Der mitochondriale Weg wird durch Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Den letzten Schritt stellt auch hier die Caspase-Kaskade (Caspase-9-Caspase-3-Kaskade) dar, die durch Freisetzung von Cytochrom c aus den geschädigten Mitochondrien getriggert wird (108, 109). Die Bcl-2-Familie ist die bisher am besten untersuchte Genfamilie und umfasst mehr als 20 Mitglieder, darunter sowohl pro- (z. B. BAD), als auch antiapoptotische (z. B. Bcl-2, B_{xl}) Gene (104). Im gesamten Apoptoseprozess fungieren eine Vielzahl an pro- und antiapoptotischen (IAP, inhibitors of apoptosis) Faktoren als Regulativ (108, 110).

Einer der frühesten Veränderungen während der Apoptose ist die Verlagerung von Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Seite der Zellmembran, ein Schritt, der die Zelle für phagozytische Zellen markiert (106).

Im Gegensatz zur anderen Form des Zelltodes, der Nekrose, findet man apoptotische Prozesse auch unter physiologischen Bedingungen. Es handelt sich um einen ATP-abhängigen Prozess, die Plasmamembran bleibt lange Zeit intakt, und es lässt sich keine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes nachweisen (103, 107). Die Nekrose ist das irreversible Endstadium einer hypoxischen, toxischen, physikalischen, mikrobiellen oder auch immunologischen Zellschädigung, bei der die Mechanismen der Apoptose nicht zum Zuge kommen. Durch Schädigung der Membranen, Elektrolytverschiebungen, erniedrigten pH-Wert u.a. denaturieren die Zellproteine und es kommt zur enzymatischen Auflösung der Zell- und Gewebsbestandteile. Die Zellzerfallskomponenten, aber auch vor dem Zelltod sezernierte Faktoren wirken chemotaktisch und rufen eine Entzündungsreaktion hervor. Die Nekrose wird erkennbar durch einen Zerfall der Zellorganellen, die zusammen mit den denaturierten Proteinen schollige Strukturen im Zytoplasma bilden. Durch Ansammlung saurer Stoffwechselprodukte denaturieren Proteine und präzipitieren. Die Integrität von Membranen kann aufgrund des Sauerstoffmangels nicht mehr aufrecht erhalten werden, Lysosomen geben damit ihren Inhalt frei. Die Kerne werden klein, zerkrümeln (Kernpyknose und Karyorrhesis) und lösen sich schließlich auf (Karyolyse) (103, 107).

1.9 Die Fragestellung dieser Arbeit

In bisherigen Untersuchungen konnten für die adrenostatisch wirkenden Substanzen Aminoglutethimid und Metyrapon neben ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Steroidbiosynthese auch eine Suppression der Expression verschiedener Steroidbiosyntheseenzyme sowie des ACTH-Rezeptors nachgewiesen werden (128, 129).

Da Etomidat eine sehr hohe adrenostatische Potenz besitzt, sollten in dieser Arbeit die Effekte von Etomidat auf wichtige zellbiologische Mechanismen adrenaler Zellen z. T. im Vergleich mit MTP und AG untersucht werden.

Es ergaben sich hierbei folgende Fragestellungen :

1. Welche Effekte hat die Inkubation von NNR-Zellen mit Etomidat auf die adrenale **Steroidbiosynthese** ?
2. Lassen sich für Etomidat Auswirkungen auf die **ACTH-Rezeptor-Expression** nachweisen ?
3. Gibt es einen Effekt von Etomidat auf das **Proliferationsverhalten** adrenaler Tumorzellen ?

Als Modell wurde die humane NNR-Karzinomzelllinie NCI-h295 gewählt. Daneben wurden zum Vergleich Untersuchungen auch an verschiedenen anderen Zellmodellen (Y-1-, SW-13, Rinder-Nebennierenprimärkultur-, HT-29- und MCF-7-Zellen) durchgeführt.

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, DHEA-S, Aldosteron und Androstendion	DPC/Biermann, Bad Nauheim
RPMI 1640 Medium, MEM Medium, Leibovitz L15 Medium, FCS, Horse serum, BSA, Trypan blau	Life Technologies, Eggenstein
RNeasy Total RNA Kit, Qiashredder, Qiaex Gel extraction Kit, Qiabran Nylon Membran	Qiagen, Hilden
AG, MTP, Forskolin, Hydrocortison, DMSO, Insulin, Selenium, Transferrin, DEPC, MOPS-Puffer, Agarose, MTT, DMEM/HAMS F12, Kollagenase II, Desoxyribonuklease I, Hapes, Percoll, IBMX	Sigma, Deisenhofen
Maus- β -Actin cDNA, Quickhyb, Salmon sperm DNA, Nuc Trap purification columns	Statagene, Heidelberg
ACTH ₁₋₂₄ (Synacthen®)	Ciba-Geigy, Wehr
Etomidat (Hypnomidate®)	Janssen-Cilag, Neuss, Belgien
Ethanol, Isopropanol, Osmiumtetroxid, Propylenoxid	Karl Roth KG, Karlsruhe
Cacodylsäure Natriumsalz, Uranylacetat	Merck, Darmstadt
RIA für cAMP	Immunotech
Alle Reagentien für FACS-Analyse	Becton Dickinson, Heidelberg
Antikörper gegen phospho ERK, ERK, SF1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörper gegen MC2-Rezeptor	Abcam, Cambridge, GB
Antikörper gegen phospho p38, p38	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Antikörper gegen β -Actin	Sigma, Deisenhofen
Antikörper gegen StAR, P450scc	Freundliche Gabe von WL Miller, San Francisco
Antikörper gegen DHEA-ST	Freundliche Gabe von M Coughtrie, Dundee, GB
Anti-rabbit- und anti-mouse-Zweitantikörper, ECL detection reagent	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
Zellen	
HT29, MCF7, SW13	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Salisbury, GB
NCI-h-295, NCI-h-295 R	ATCC, USA

2.2.1 Zellkultur

2.2.2 NCI h295 Zellen

Die NCI-h295-Zellen sind eine humane Nebennierenrindenzelllinie. Sie wurden 1980 bei einer damals 48jährigen Patientin isoliert, die an einem NNR-Karzinom mit Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- und Androgenexzess litt. Es handelt sich um sehr differenzierte Zellen, die nahezu alle für die adrenale Steroidbiosynthese relevanten Enzyme und über 30 verschiedene Hormone produzieren (135-138).

Zusätzlich exprimieren die Zellen unter anderem den ACTH-Rezeptor (122), den Androgenrezeptor (139), sowie Rezeptoren für Angiotensin-II, IGF-I, ANP, Endothelin-1 und Glukokortikoide (140 – 145).

NCI-h-295-Zellen sind sowohl als Suspensions- als auch als adhären wachsende Zellen erhältlich. Experimente wurden mit beiden Formen dieser Zelllinie durchgeführt.

Die Suspensionszellen wurden in SIT-Medium: RPMI-1640 Medium mit Zusatz von Insulin (5 µg/ml), Transferrin (0,1 mg/ml), Natriumselenit (5,2 ng/ml) und 5% fetalem Rinderserum (FCS) in 175 cm² Flaschen bei 37°C kultiviert. Es erwies sich als vorteilhaft für das Zellwachstum, bei jedem Mediumwechsel ca. 20% des alten Mediums wiederzuverwenden, möglicherweise werden einige relevante Wachstumsfaktoren von den Zellen selbst produziert.

Die adhären wachsenden NCI-h295- Zellen wuchsen in definiertem DMEM/Ham's F12-Medium mit 15 mM HEPES. Als Zusätze wurden Insulin (6,25 µg/ml), Transferrin (1 mg/ml), Natriumselenit (6,4 ng/ml), bovines Serumalbumin BSA (1,25 mg/ml) und Nu-Serum 2,5% hinzugefügt.

Unter diesen Bedingungen vermehrten sich die Zellen mit einer Verdopplungsdauer von ca. 96 Stunden relativ langsam.

Für die Experimente wurde der Serumanteil auf 2% reduziert.

2.2.3 Y-1 Zellen

Diese Zelllinie stellt eine adhärent wachsende hormonproduzierende Nebennierenrindenzelllinie der Maus dar. Sie wurde 1966 durch Yasumura et al etabliert (146). Die Zellen produzieren eine große Zahl verschiedener Steroidhormone und zeigen eine gute ACTH-Antwort (147, 148). Die Zellen wurden kultiviert in Ham's F10/DMEM-Medium (1:1) mit Zusatz von Horse-Serum 7,5%, FCS 2,5% und L-Glutamin (200 mM) (93).

2.2.3 SW-13 Zellen

Diese von Leibovitz et al 1973 (149) etablierte humane NNR-Karzinomzelllinie produziert keine Gluko- und Mineralokortikoide und nur geringste Mengen an Androgenen (150). In ihrem Kulturmedium konnten Adrenomedullin und Endothelin-1 nachgewiesen werden (14). Die Zellen exprimieren weder den ACTH-Rezeptor noch Steroidbiosyntheseenzyme in nachweisbarer Menge. Somit wurden sie sowohl als Negativkontrollen beim Northern-Blot-Verfahren als auch bei den Proliferationsstudien mit adrenostatisch wirkenden Substanzen eingesetzt.

Sie wachsen adhärent bei 37°C unter CO₂ - armen Bedingungen in Leibovitz L-15 Medium mit 10 % FCS.

2.2.4 MCF-7- Zellen und HT-29- Zellen

Sowohl MCF-7, eine humane Mamma-Ca-Zelllinie als auch die HT-29-Zelllinie, eine humane Colon-Ca-Zelllinie, dienen als nichtadrenale Vergleichszellpopulation.

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

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

2.2.5 Rinder-NNR-Primärkultur

Um unsere Versuche auch mit nichtneoplastischen NNR-Zellen durchführen zu können, wurden Primärkulturen aus Rindernebenieren angefertigt. Die Präparation erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Weber et al. (151).

Die Nebennieren stammten aus dem Schlachthof Würzburg. Sie wurden direkt nach Tötung des jeweiligen Rindes entfernt und in ein Gefäß mit PBS auf Eis gegeben. Das PBS enthielt Gentamicin (52 µg/ml) und Amphotericin B (0,5 µg/ml).

Unter der sterilen Werkbank wurde das umgebende Fettgewebe ohne Verletzung der Kapsel vollständig entfernt und die Nebenniere in ein frisches Glas eiskalten PBS mit Antibiotikazusatz überführt.

In weiteren Schritten wurden die Nebennieren geviertelt, das Nebennierenmark herauspräpariert und die Kapsel-Rindenanteile in serumfreiem Medium gesammelt. Mit dem Skalpell liess sich nun das Rindengewebe von der Kapsel abschaben, es wurde in Waschmedium in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschliessend 8 min bei 800 U/min zentrifugiert.

Der Verdauungsschritt zur Zellvereinzelung erfolgte mit Hilfe Collagenase II- (1 mg/ml) und DNase- (75 µg/ml) haltigen Mediums über ca. 75 min bei 37°C.

Die anschliessende Filtration wurde zunächst mit Hilfe eines feinen sterilen Edelstahlsiebes, danach mit einer sterilen Gaze (50 µm Lochdurchmesser) durchgeführt. Das Filtrat wurde folgend mit 37°C warmem Waschmedium aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Um die NNR-Zellen von den übrigen Gewebsbestandteilen weitmöglichst zu separieren, wurde das Zellpellet in 20 ml 37°C warmer, der erwünschten Dichte von 1,07 g/ml entsprechend verdünnter Percoll-Lösung aufgenommen und erneut für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. In der oberen Schicht sammelten sich die NNR-Zellen, die man nun vorsichtig absaugen und in Waschmedium aufnehmen konnte. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit 5 minütiger Zentrifugation bei 1400 rpm wurden die Zellen in einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml ausgesät.

Als Wachstumsmedium wurde DMEM Ham's F12 mit Zusatz von 10% FCS, 5% Horse Serum, Glutamin, Gentamicin und Amphotericin B verwendet.

Ein erster Mediumwechsel wurde nach 24 Stunden durchgeführt. Nach zwei bis drei Tagen konnten Experimente durchgeführt werden.

2.3 Hormonanalysen

Die Hormonanalysen wurden mittels kommerziell erhältlichem Radioimmunoassays (RIA)-Kit der Firma DPC/Biermann durchgeführt. Hierbei konkurrieren J^{125} -markierte Hormone (Tracer) in definierter Menge mit den zu bestimmenden Hormonen des Testserums um eine begrenzte Anzahl entsprechender spezifischer Antikörperbindungsstellen. Die hochspezifischen Antikörper waren meist an Polypropylenröhrchen immobilisiert. Die Menge von J^{125} -markiertem Antigen, das an die Antikörper gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration der Probe. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit erfolgte die Trennung von freiem und gebundenem Antigen durch Dekantieren des Röhrcheninhaltes. Die genaue Hormonkonzentration der Einzelprobe wurde anhand einer mittels Standardproben erstellten Eichkurve ermittelt.

Die Messung erfolgte mittels γ -Counter. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert errechnet wurde. Die Arbeitsschritte wurden streng nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. NCI-h295-Zellen wurden für 48 Stunden mit oder ohne ETO in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Hormonbestimmung wie beschrieben.

2.4 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes

Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen in 24-well Platten mit bzw. ohne ETO (0,6-60 μ M) erfolgte eine 10-minütige Stimulation mit 10 nM ACTH. Zur Messung der basalen cAMP-Produktion diente ein weiterer Ansatz, bei dem keine ACTH-Stimulation erfolgte. Das Kulturmedium enthielt während des Stimulationsschrittes zusätzlich den Phosphodiesterase-Inhibitor 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Die Zelllyse erfolgte bei 4°C in Ethanol/HCl (pH 3), anschließend wurde eine N_2 -Abdampfung bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Für die weiteren Schritte verwendeten wir einen kommerziellen cAMP-Kit der Firma Immunotech, wobei die Bestimmung des cAMP-Gehaltes nach den Prinzipien des Radioimmunoassays (s. o.) erfolgte.

2.5 Das Northern Blot- Verfahren

2.5.1 Prinzip

Ziel des Northern-Blot Verfahrens ist der qualitative und semiquantitative Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen. Das Verfahren, das in Anlehnung an den Southern-Blot (152) von Alwine et al. 1977 (153) entwickelt wurde, besteht aus mehreren Teilschritten, die im weiteren kurz beschrieben werden.

Im ersten Schritt wird die RNA gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei die Nukleinsäuren als negativ geladene Moleküle im elektrischen Gleichstromfeld in Richtung Kathode laufen. Die verschieden langen RNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und Masse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dabei in einzelne Fraktionen aufgetrennt.

Um die RNA im weiteren Verlauf genauer untersuchen zu können, muss diese zuvor auf einer Membran fixiert werden. Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die Membran erfolgte mittels Kapillarblotting-Verfahren. Hierbei wird Puffer durch Kapillarkraft aus einer Vorratswanne durch das Gel und die Membran hindurch in eine Lage saugfähiger Tücher gesogen. Die Nukleinsäuren werden somit aus dem Gel an die Membranoberfläche transportiert und heften sich dort an.

Durch kurze Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (254 nm) verbindet sich ein kleiner Teil der Basen der RNA mit den positiv geladenen Gruppen der Nylonmembran, so dass die RNA irreversibel fixiert bleibt (sog. Crosslinking). Die so immobilisierten RNA-Fragmente werden anschließend mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert (154) und nach einigen Waschschrinen zur Entfernung unspezifischer Bindungen durch Exposition eines Röntgenfilmes als Banden sichtbar gemacht.

2.5.2 Durchführung

2.5.2.1 RNA-Extraktion

Alle RNA-Extraktionen wurden nach einem modifizierten Protokoll der Firma Quiagen (Rneasy Handbook 1994) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 800 rpm (153 g) für 8 min zentrifugiert, vom Überstand befreit und dann sofort in dem mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 μ l/ml) versetzten Lysis-Buffer RTL resuspendiert. β -Mercaptoethanol führt zur Denaturierung der RNAsen. Die optimale Lyse wurde durch Homogenisation (Ultra-Turrax) der Suspension für 1 min erzielt. Das nun entstandene Lysat konnte bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde eine weitere Homogenisation mittels des speziell für Eukaryontenzellen entwickelten QIAshredders durchgeführt. Zum Ausfällen der Proteine wurde das Lysat mit 70%igem Ethanol gemischt und auf zwei RNeasy-Zentrifugenröhrchen gegeben. In diesen Röhrchen war eine mit Silikat-Kugeln beschichtete Membran eingelassen, die unter bestimmten Salzbedingungen RNA einer Mindestgröße von 200 Basen binden kann.

Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen konnte die RNA mit DEPC-behandeltem Wasser aus der Membranbindung eluiert werden. Der RNA-Gehalt des Eluats wurde spektrophotometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) ermittelt.

2.5.2.1 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Als Anleitung diente das Protokoll der Firma Stratagene in modifizierter Form. Die RNA-Proben (25 μ g pro Ansatz) wurden lyophilisiert und anschließend mit 5 μ l Loading Buffer, der auch für die Denaturierung sorgte, resuspendiert.

Der Loading Buffer setzt sich folgendermaßen zusammen :

48% deionisiertes Formamid

34% Loading dye (bestehend aus 30% (v/v) 10X MOPS, 20%(v/v) 10 mg/ml

Ethidiumbromid, 20% (v/v) sterilisiertes DEPC-Wasser, 15% (v/v) steriles Glycerol,

15 % (v/v) gesättigter Bromophenolblau-Lösung)

18% Formaldehyd (37% = 12,3 M)

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, welches aus

2 g Agarose

10,8 ml 37% Formaldehyd

20 ml 10xMOPS

angesetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen bei von 200 ml aufgefüllt wurde. Nach der Polymerisation des Gels wurden die RNA-Proben zwei Minuten bei 75°C erwärmt und anschließend sofort geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 34 V für 15 h in MOPS-Laufpuffer (Netzgerät: Power Pac 300, Biorad, München; Gelkammer: Horizon 11-14, Gibco BRL, Eggenstein).

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde die Auftrennung der RNA unter UV-Licht kontrolliert und fotografisch dokumentiert.

2.5.2.2 Kapillartransfer auf Nylonmembran („Blotten“)

Zur Teilhydrolyse der RNA und damit zum besseren Transfer auf die Nylonmembran wurde das Gel 25 Minuten in 0,05 M NaOH inkubiert und anschließend in Tris-HCl (pH 7,5) wieder neutralisiert.

Zur Transfervorbereitung wurde das Gel anschließend für mindestens 20 Minuten in 10X SSC Puffer inkubiert. Zum eigentlichen Transfer wurde das Gel blasenfrei unter die Nylonmembran gelegt. Als Saugpapier dienten drei Lagen Whatmanpaper® und Papierhandtücher. Die notwendige Zeit für den RNA-Transfer belief sich auf 24 Stunden.

Nach dieser Zeit wurde die RNA mittels Crosslinking bei 150 mJoule (GS Gene Linker, Bio Rad) dauerhaft an der Membran fixiert. Nach diesem Schritt konnte die Membran bei 4°C bis zur Hybridisierung gelagert werden.

2.5.2.3 Herstellung der DNA-Sonden

Als ACTH-Rezeptor-Sonde wurde eine PCR-generierte cDNA verwendet. Hierfür wurde das 1061 Basenpaare lange Fragment, das der vollen Länge der kodierenden Sequenz des humanen ACTH-R entspricht, aus menschlicher genomischer DNA amplifiziert. Verwendet wurden folgende Primer: 5'-GAT-TTA-ACT-TAG-ATC-TCC-AGC-AAG-T-3' („upstream“) und 5'-CGT-TGC-CAA-GTG-CCA-GAA-TAG-TGT-3' („downstream“) (155).

Die DNA-Sonden für die P450-Enzyme wurden freundlicherweise von Dr. Miller, San Francisco, jeweils als Insert eines pUC18 Vektors zur Verfügung gestellt

Die Maus- β -Actin-Sonde war bei der Firma Stratagene erhältlich (156).

Alle in Vektoren befindliche Sonden wurden jeweils mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der verdauten Fragmente über ein Agarosegel und die Gelextraktion der jeweiligen Sonden.

Tabelle 4: verwendete DNA-Sonden

	Restriktionsenzyme	Fragmentgröße	Bandengröße im N-Blot
ACTH-R		1069 Bp	1,8; 3,6; 4,0 kB
P450c17	EcoR I	1754 Bp	2,1 kB
P450 c21	EcoR I	1229 Bp	2,2 kB
β -Actin	Eco R I, Xho I	1500 Bp	1,9 kB

2.5.2.4 Markieren der Sonde („Labeln“)

50 ng Sonden-DNA wurden mit Hilfe des sogenannten „Random Primed DNA Labeling Kits“ entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit ^{32}P -dCTP markiert. Dazu wurde die Sonde zunächst 5 min bei 96°C denaturiert und anschließend mit den Nukleotiden (dATP, dGTP, dTTP und ^{32}P -dCTP), einem Reaktions-Mix (mit Puffer und Hexanukleotiden) und dem sogenannten Klenow-Enzym (= Polymerase) 30 min bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden neue DNA-Stränge amplifiziert, die jeweils radioaktive Cytosin-Reste aufwiesen. Um eine Minimierung der Hintergrundaktivität des Blots zu erreichen, wurden sogenannte NucTrap-

Purification-Columns[®] eingesetzt, die nicht eingebautes ³²P-dCTP von dem markierten Sondenstrang trennen. Der Erfolg des radioaktiven Einbaus wurde mit Hilfe eines β -Counters überprüft.

2.5.2.5 Hybridisierung und Waschschritte

Vor dem eigentlichen Hybridisierungsschritt wurden die geblotteten Membranen im Hybridisierungssofen für 30 min bei 68°C mit 10 ml QuickHyb[®] Lösung vorinkubiert. Währenddessen erfolgte die Denaturierung der markierten Sonde bei 100°C nach Zugabe von 100 μ l Salmon Sperm-DNA, welche eine erneute Anlagerung der Einzelstränge untereinander verhindern sollte. Der Hybridisierungsschritt selbst wurde für mindestens 1 h bei 68°C durchgeführt. Anschließend folgten Waschschritte bei 60°C, die der Lösung unspezifischer Bindungen dienen sollten: zwei Schritte mit 1X SSC (150 mM NaCl, 30 mM Na₃Citrat, pH 7) + 0,1 % (v/v) SDS und zwei Schritte mit 0,5 SSC + 0,1 % (v/v) SDS.

Visualisiert wurde das Hybridisierungsergebnis, indem ein Röntgenfilm (Kodak-X-Omat-DS) in einer Kassette mit Verstärkerfolie bei -80°C durch die Membranen belichtet wurde.

Um weitere Hybridisierungsschritte mit anderen DNA-Sonden durchführen zu können, wurde ein sogenanntes „Blot-stripping“ durchgeführt, bei dem die Nylonmembranen 3 x für jeweils 15 min bei 95°C mit 0,1X SSC + 0,1% (v/v) SDS im Hybridisierungssofen gewaschen wurden.

Ausgewertet wurden die Röntgenfilme, indem sie eingescannt wurden und die Banden densitometrisch mit Hilfe des Programmes IMAGE (NIHM National Institute of Health, Bethesda, USA) quantifiziert wurden.

Alle Blots wurden mit β -Actin hybridisiert und entsprechend normiert, um ausschließen zu können, dass vermeintliche Expressionsunterschiede nur auf RNA-Mengen-Unterschieden auf den Membranen beruhten.

2.6 Das Western Blot Verfahren

Das Prinzip des Western Blots ist in vielen Teilen ähnlich dem des Northern Blots. Es gelingt mit Hilfe dieses Verfahrens Auftrennung und Nachweis einzelner Proteine. Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und können anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

2.6.1 Proteinprobenaufbereitung

Zur Proteinextraktion wurde die Laemmli-Methode eingesetzt (157). Die Zellen wurden zunächst mit eiskühlem PBS gewaschen, in einem Lysis-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-cap überführt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C. Das im Lysis-Puffer enthaltene 2-Mercaptoethanol sorgt für eine Reduktion von Disulfidbrücken. Weiterhin enthalten ist SDS, ein amphiphatisches Detergenz, welches sich mit der hydrophoben Seite an die entfalteten Proteinketten anlagert und mit seinem negativen Rest von der Proteinkette wegzeigt, was dazu führt, dass die Proteine in einer langgestreckten Form vorliegen und stark negativ geladen werden. Aufgrund dieser negativen Ladung kann nun die Auftrennung in der Gelelektrophorese entsprechend dem Molekulargewicht erfolgen.

Lysis-Puffer:

Bromphenolblau 0,04%, Glycerol 10%, SDS 2%, 2-Mercapto-Ethanol 5%, Tris base 0,0625 M (pH 6,8)

2.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der zuvor denaturierten Proteine erfolgt mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei der hier durchgeführten diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) (157) durchlaufen die Proteine zunächst ein Sammelgel und anschließend das eigentliche Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich sowohl im pH-Wert als auch in der Acrylamidkonzentration. Im Sammelgel werden die zu trennenden Proteine aufgrund des schwach sauren pH-Wertes (pH 6,8) und der Wechselwirkung mit Pufferionen in einer schmalen Bande konzentriert, bevor sie das engporige, leicht alkalische (pH 8,8) Trenngel erreichen und entsprechend ihrer Masse aufgetrennt werden. Das Gel selbst ist ein Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid. Die

Acrylpolymeren bilden lange Kettenmoleküle, welche durch das Bisacrylamid quervernetzt werden. Um diese Vernetzung zu bewirken, setzt man den Radikalspender Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator TEMED zu.

Trenngel (10%)

(Anleitung für 1 Gele mit 1,5 mm Dicke)

Acrylamid/Bisacrylamid 30%	2,5 ml
4 x Lower Buffer	1,875 ml
H ₂ O	3,125 ml
TEMED	7,5 µl
APS 10%	75 µl

Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamid 30%	375 µl
4 x Upper Buffer	750 µl
H ₂ O	1,875 ml
TEMED	4 µl
APS 10%	30 µl

4 x Lower Buffer pH 8,8

SDS 4g
Tris 181,72 g
ad 1000 ml ddH₂O

4 x Upper Buffer pH 6,8

SDS 2g
Tris 30,28 g
ad 1000 ml ddH₂O

Für die Gelelektrophorese wurde das System Criterion[®] der Firma Biorad verwendet. Die Glasplatten wurden zunächst mit Ethanol gereinigt und mit den Spacern fest in die Halterungen geschraubt. Die Halterungen wurden anschließend in ein System eingespannt, bei dem die Unterseite der Glasplatten auf einem flexiblen Untergrund stand und somit abgedichtet war. Vor dem Gießen des Trenngels wurde die Höhe des Gels an der Glasplatte markiert. Das Gel sollte ca. 1 cm unterhalb der Enden des Kammes enden, um eine ausreichende Laufstrecke der Proteine im darüber befindlichen Sammelgel zu gewährleisten. Die Bestandteile des Trenngels wurden nun in einem Falcon-Röhrchen zusammenpipettiert,

wobei zuletzt APS und TEMED zugegeben wurden, und anschließend zügig mit einer Glaspipette zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurden die Gele mit Isopropanol überschichtet und für ca. 30 min zur Polymerisation belassen. Das Isopropanol wurde abgegossen, anschließend das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren 20-30 min konnten die Kämmen entfernt und das Gel beladen werden. Als Größenstandard wurde ein Marker (Benchmark) der Firma Invitrogen verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V durch das Sammelgel und bei 150 V durch das Trenngel.

Elektrophoresepuffer

Tris 15,1 g

Glycin 94 g

SDS 10% 50 ml

Ad 1000 ml ddH₂O

2.6.3 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran, „Western Blotting“

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde mittels Semidry Blotting Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde das System Trans-Blot[®] SD der Firma Biorad verwendet. Der Elektrophoreseprozess wurde gestoppt, das Gel aus den beiden Glasplatten herausgenommen und das Sammelgel entfernt. Whatman-Papier und Nitrozellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Semidry Blotting Puffer getränkt. Auf eine Schicht von 10 Whatman-Papieren wurde die Nitrozellulose gelegt, auf die Nitrozellulosemembran wiederum das Gel aufgebracht und anschließend mit weiteren 10 Whatman-Papieren überschichtet. Wichtig ist hierbei eine sorgfältige Schichtung mit Vermeiden von Luftblasen, die den direkten Transfer von Protein aus dem Gel auf die Membran verhindern. Hierzu wurden die Schichten mit einer Rolle (z. B. Glaspipette oder Falcon-Tube) ausgerollt. Der Proteintransfer erfolgte über 60-90 min bei 25 V. Hierbei wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine innerhalb des erzeugten elektrischen Feldes in Richtung Anode. Vor der Anode befindet sich die Nitrozellulosemembran an der die Proteine haften bleiben. Im Anschluss an den proteintransfer wurde die Membran zum Nachweis der an ihr haftenden Proteine und damit zur Überprüfung des Transferprozesses mit Ponceau-S gefärbt. Ungebundenes Ponceau wurde mit Wasser abgespült. Das Ponceau wurde mit PBS-Tween 0,1% wieder abgespült. Folgend wurde der Blot mit 5% Magermilch für 1 Stunde abgesättigt.

Semidry Blotting Puffer

Glycin 1,465 g

Tris 2,905 g

SDS 10% 1,85 ml

Methanol 100 ml

Ad 500 ml

2.6.4 Immundetektion und Chemolumineszenz

Nach erfolgtem Blocken mittels Magermilch wurde der Erstantikörper entweder in 5% Magermilch/PBS-Tween 0,1% oder in 5% BSA/PBS-Tween 0,1% angesetzt. Die Membran wurde entweder für ca. 2-3 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Anschließend folgten fünf jeweils 3-minütige Waschschriffe mit PBS-Tween 0,1%. Nach den Waschschriffen wurde die Membran mit dem jeweils spezifischen Zweitantikörper in 5% Magermilch/PBS-Tween 0,1% für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Waschvorgang mit PBS-Tween 0,1% wiederholt.

Die Antikörperbindung wurde mittels ECL sichtbar gemacht. Hierbei wird über eine Meerrettich-Peroxidase (HRP), die an den Zweitantikörper gekoppelt ist, die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert. Dadurch wird das Luminol in einen angeregten Zustand gebracht. Durch Lichtemission geht es wieder in seinen Grundzustand und damit in ein niedrigeres Energieniveau über. Die Lichtemission führt zu einer Schwärzung des Röntgenfilmes, wodurch die spezifischen Protein-Antikörperbindungen als Bandenmuster zur Darstellung kommen.

2.7 Wachstumskurven

Die Wachstumskurven wurden mit NCI-h295-Suspensionszellen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen in 24-well-Platten in einer Dichte von 0,5 Mio Zellen pro well ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen ETO (0,6µM, 6µM und 60µM) bzw. AG (6 und 600 µM), AG 600µM + HC 12µM, sowie in einem weiteren Ansatz mit ETO 60µM, ETO 60µM + HC 5µM und HC 5µM für bis zu 10 Tage inkubiert.

Alle Ansätze wurden in Triplets angelegt, und es wurde jeweils ein Triplet unbehandelter Kontrollzellen mitgeführt.

Zellzählungen fanden am 2., 4., 6., 8. und 10. Tag mittels Coulter Counter CASY-1 (Schärfe System, Reutlingen) sowie mittels Trypanblaufärbung und manueller Auszählung unter dem Mikroskop (Inversionsmikroskop DM-IL, Leitz, Wetzlar) statt.

2.8 MTT-Test

Dieser, erstmalig von Moosmann 1983 entwickelten und später u. a. von Denizot et al und Carmichael et al (1987) modifizierte Test wurde für die Proliferationsstudien angewendet (158). Das Grundprinzip beruht darauf, dass das farblose Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase in blaues Formazan umgewandelt wird, welches photometrisch messbar ist. Diese Umwandlung findet nur in vitalen Zellen statt. Die Menge des produzierten Formazans ist proportional zur vorhandenen Mitochondrienzahl, welche wiederum positiv mit der Zellzahl korreliert (159).

Adhärente Zellen wurden hierbei in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und für einige Tage (je nach Zellart 3-8 Tage) mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert.

Die MTT-Substanz wurde in serumfreiem Kulturmedium (Nutrient Mixture F12 Ham) gelöst, um Interferenzen mit Serumproteinen zu vermeiden. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. Das unlösliche Formazan wurde mit Isopropanol/HCl wieder in Lösung gebracht. HCl soll mögliche Interferenzen von Phenolrot vermeiden, indem es dieses in eine nicht-interferierende Farbe umwandelt.

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

2.9 Zellzyklusanalyse

Um eine mögliche Zellzyklusverlangsamung von einem apoptotischen bzw. zytotoxischen Effekt abgrenzen zu können, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Adhärente NCI-h295-Zellen wurden für 12 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, um sie auf einen Zyklus zu synchronisieren.

Die Zellen wurden in 6-well-Platten in einer Dichte von 1 Mio Zellen/ml ausgesät und jeweils in Triplets mit $6\mu\text{M}$ und $60\mu\text{M}$ Etomidat, sowie mit zusatzfreiem Kulturmedium als Kontrolle inkubiert.

Jeder Ansatz enthielt $100\mu\text{M}$ BrdU/dC. Eine Zellzyklusanalyse wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Dabei wurden die Zellen abtrypsinisiert, das Trypsin mit 10% Serum neutralisiert und die Suspension in ein Eppendorf-Cap überführt. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm über 5 min wurde das Pellet in 1 ml Staining buffer (s.unten), der unter anderem den Hoechst-Farbstoff 33258 enthält, resuspendiert und für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $2\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid und eine weitere Inkubation für 10 min bei 4°C im Dunkeln. Nach den Färbeschritten wurde die FACS-Analyse (am Epics Elite ESP) durchgeführt. Ethidiumbromid korreliert positiv mit der vorhandenen DNA-Menge, während der Hoechst-Farbstoff in seiner Fluoreszenz negativ mit der eingebauten BrdU-Menge korreliert, so dass Rückschlüsse auf die Zellzyklusphase sowie auf die Zahl der durchlaufenen Zellzyklen möglich sind (160).

Staining buffer : 100 mM Tris pH 7,4
 154 mM NaCl
 1 mM CaCl_2
 0,5 mM MgCl_2
 0,1% NP 40
 0,2% BSA
 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258

2.10 Apoptosenachweis

Eine der frühesten Veränderungen bei Zellen, die einen Apoptoseprozess durchlaufen, ist die Veränderung der Zellmembran. Dabei wird unter anderem das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren an die äußere Membran verlagert.

Wir nutzten zum Nachweis solcher Translokationsvorgänge die Annexin-Markierungsmethode. Annexin ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS (161).

Da Annexin jedoch auch an PS nekrotischer Zellen bindet, wird zur besseren Differenzierung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen eine weitere Färbung mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) durchgeführt, einem Marker, der an intrazelluläre Strukturen bindet, jedoch nicht die intakte Zellmembran passieren kann.

NCI-h295-Suspensionszellen wurden für 4–72 Stunden mit Etomidat in Konzentrationen von 0,6 μM , 6 μM , 60 μM und 120 μM inkubiert. Ausgangszellzahl war 1×10^6 Zellen/ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten zwei Waschschrte in PBS mit 2% FCS
100 μl Zellsuspension in PBS/2% FCS wurden in ein Eppendorf cap überführt und mit 2 μl 7-AAD sowie 5 μl Annexin V für 15 min im Dunkeln inkubiert.

Nach Hinzufügen weiterer 900 μl PBS/2% FCS erfolgte die Messung per FACS-Analyse.

Verwendet wurde hierbei ein Facscalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson) und Cell Quest- Software.

2.11 Elektronenmikroskopie

Um mögliche zelluläre, insbesondere mitochondriale morphologische Veränderungen feststellen zu können, wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Die Ultradünnschnitte wurden im Lehrstuhl Zell- und Entwicklungsbiologie (Abteilung Elektronenmikroskopie) des Biozentrums der Universität Würzburg angefertigt und ausgewertet.

Adhärent wachsende NCI-h295-Zellen wurden hierfür für 5 Tage in 6 μM Etomidat, in Propylenglykol, das anteilmässig der Menge des in 6 μM Etomidat enthaltenen entsprach, und in reinem Kulturmedium ohne weitere Zusätze kultiviert.

Nach fünf Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen für ca. 45 min in Glutaraldehyd-Lösung 2,5% fixiert und in ein Eppendorf-Cap überführt.

Anschließend erfolgten 5 jeweils 3minütige Waschschrte mit 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,2), danach die Fixierung in 2% gepuffertem OsO_4 (Osmiumtetroxid) für 90 – 120 min.

Nach weiteren 5 jeweils 3-minütigen Waschschrten mit H_2O wurde mit 0,5% wässrigem Uranylacetat über Nacht kontrastiert, danach wiederum mit H_2O gewaschen.

Die einzelnen Fixierungs- und Waschschrte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Entwässerung erfolgte in 30minütigen Schritten in Form einer aufsteigenden Ethanolreihe:

30% Ethanol	4°C 2x10 min
50% Ethanol	4°C 2x10 min
70% Ethanol	4°C 2x 10 min
90% Ethanol	4°C 2x 10 min
96% Ethanol	4°C 2x 10 min
100% Ethanol	4°C 2x 10 min
100% Ethanol	Raumtemperatur 2x 10 min
Propylenoxid	Raumtemperatur 4x10 min

Eingebettet wurde in Epon 812, zunächst in Propylenoxid : Epon 1 : 1 für 2-4 Stunden, dann über Nacht. Danach folgte die Einbettung in reinem Epon für insgesamt 5 Stunden und abschließend die Auspolymerisation bei 60°C. Nach 2-3 Tagen konnten per Ultramikrotom Ultradünnschnitte einer Schichtdicke von 60-90 nm erstellt und im Elektronenmikroskop (EM 10, Zeiss, Jena) betrachtet werden.

Fixierungslösung :

2,5% Glutaraldehyd, pH 7,2

- 5 ml 25%iges Glutaraldehyd
- 2,5 ml KCl 1M
- 1,25 ml CaCl₂ oder MgCl₂ 0,1 M
- 12,5 ml Cacodylatpuffer 0,2 M
- 28,75 ml Aqua destillata

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Etomidat auf die Steroidogenese

3.1.1 Ergebnisse der Hormonanalysen

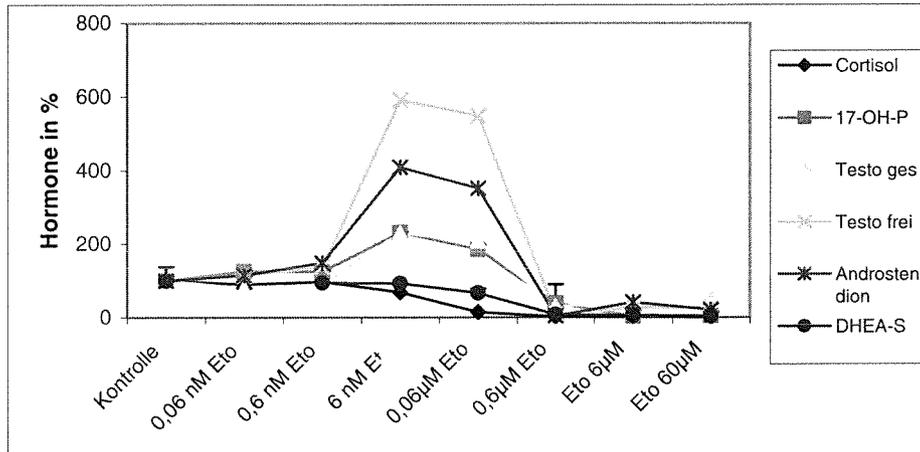
Etomidat erwies sich in allen Versuchen als potentestes Adrenostatikum (IC_{50} für die Blockade von P450c11: 15 nM, für P450scc: 400 nM). Inkubation der NCI-h295 Zellen mit Etomidat führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Suppression der Synthese von Cortisol und DHEA-S. Die Freisetzung von 17-OH-P, freiem Testosteron, Gesamt-Testosteron und Androstendion war bei niedrigen ETO-Konzentrationen (0,6-60 nM) gesteigert, ein Effekt, der auf die zunächst erfolgende Blockade von P450c11 zurückzuführen ist. Höhere ETO-Konzentrationen führten zur Abnahme der Synthese aller gemessenen Hormone, ein Hinweis auf die Blockade des P450scc-Enzyms.

MTP zeigte ein ähnliches Wirkprofil wie ETO, allerdings mit wesentlich geringerer adrenostatischer Potenz (IC_{50} für P450c11: 3,5 μ M, für P450scc: 17 μ M).

AG supprimierte die Hormonsynthese dosisabhängig mit einer IC_{50} von 10 μ M für P450scc.

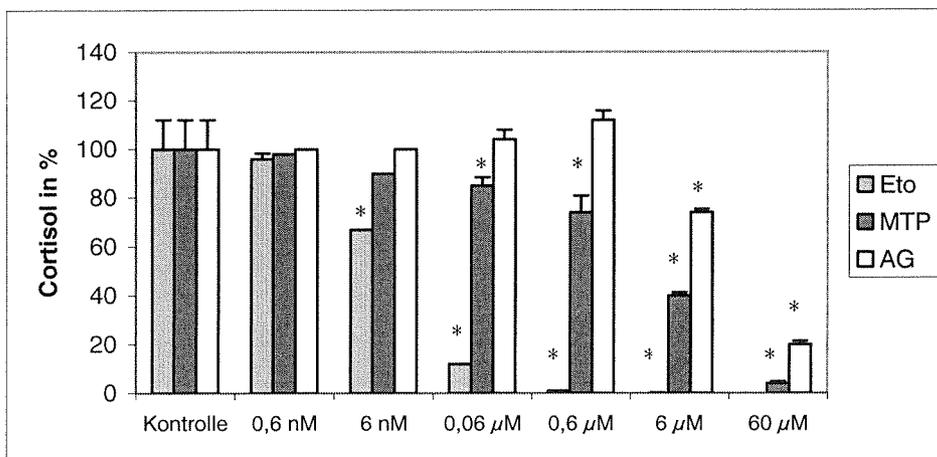
Eine Übersicht über die Ergebnisse der Hormonanalysen geben die Diagramme 1 und 2 sowie die Tabelle 5.

Diagramm 1: Effekte von Etomidat auf die Steroidbiosynthese der NCI-h295-Zellen



Dargestellt ist die Syntheserate von Cortisol, 17-OH-P, Gesamt-Testosteron, freiem Testosteron, Androstendion und DHEA-S unter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Etomidat in NCIh295-Zellen. Dargestellt sind die Werte in % zu den Kontrollzellen \pm Standardabweichung.

Diagramm 2: Vergleich der Effekte von ETO, MTP und AG auf die Cortisolsynthese der NCI-h295-Zellen



Cortisolsyntheserate in % der Werte (\pm Standardabweichung) der unbehandelten Kontrollen (=100%) nach Inkubation von NCI-h295-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen ETO, MTP und AG

Tabelle 5 : Effekte von Etomidat, Metyrapon und Aminoglutethimid auf die Steroidbiosynthese der NCI-h295-Zellen

	Cortisol	17-OH-P	DHEA-S	Testosteron gesamt	Androsten- dion
Kontrolle	100±10	100±12	100±38	100±10	100±11
0,06 nM ETO	90±12	126±10	115±10	80±11	115±13
0,6 nM ETO	97±6	125±23	95±13	90±9	149±15
6 nM ETO	69±6	231±51	93±18	230±28	409±30
0,06 µM ETO	14±2	185±13	66±12	210±14	352±16
0,6 µM ETO	3±2	39±3	8±1	40±4	42±5
6 µM ETO	2±1	3±2		50±3	21±2
60 µM ETO	1±1	4±2		30±1	4±1
0,06 µM MTP	76±9	213±14	77±3		
0,6 µM MTP	48±25	206±20	85±21		
6 µM MTP	21±18	64±6	45±7	50±6	59±7
60 µM MTP	3±1	6±5	14±2	30±5	13±2
0,06 µM AG	104±4	99±7	91±10		
0,6 µ AG	112±4	97±4	94±20		
6 µM AG	74±2	77±2	68±6		
60 µM AG	20±2	48±1	31±12		

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ETO, MTP und AG inkubiert. Die Angaben erfolgten als Mittelwerte in % der Werte der unbehandelten Kontrollzellen (=100%) ± Standardabweichung.

3.1.2 Effekte auf die Expression von Steroidbiosyntheseenzymen

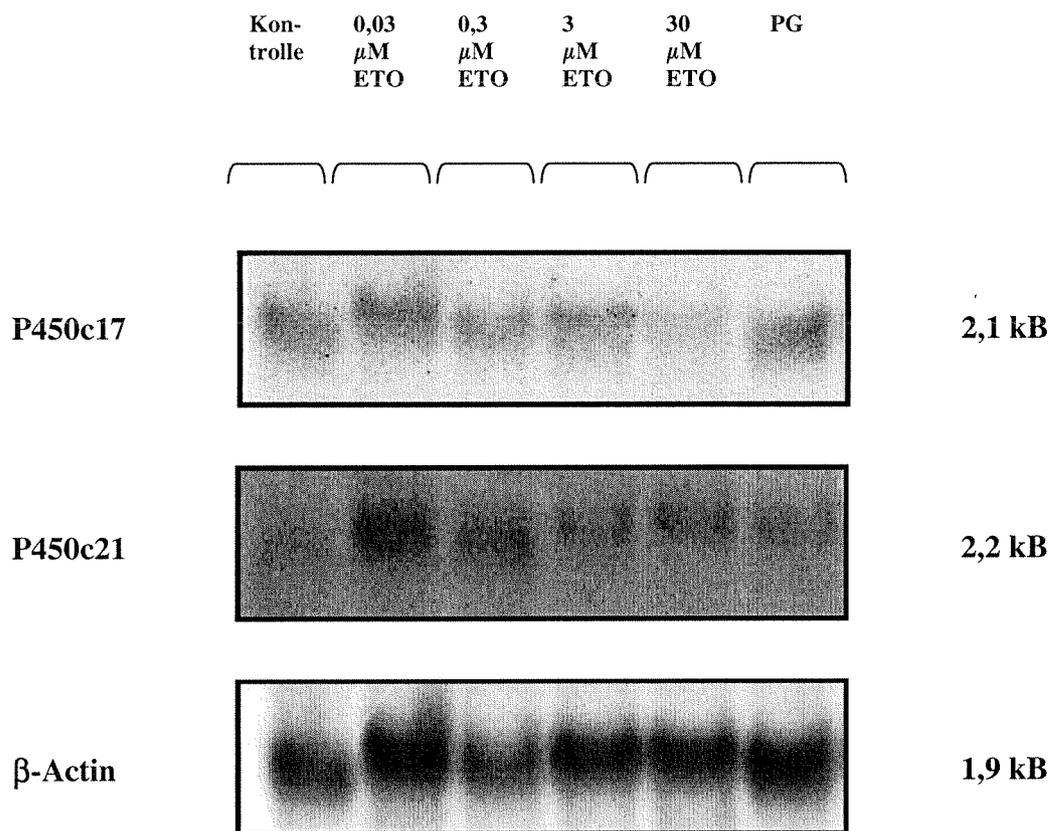
Etomidat führte zu einer dosisabhängigen Suppression der mRNA-Expression der Steroidbiosyntheseenzyme P450c17 und P450c21, (Tabelle 6, Abbildung 4). Diese war jedoch in keinem Fall signifikant (für 30 μM ETO P450c17 $p = 0,18$, P450 c21 $p = 0,07$). Die Untersuchungen zur Proteinexpression zeigen eine vermehrte Expression von P450scc durch ETO. Aufgrund der Hinweise auf eine Hemmung der DHEA-ST in den Hormonanalysen erfolgte die Untersuchung zur Proteinexpression im Western Blot, dort zeigte sich jedoch keine Beeinflussung durch ETO. (Abbildung 5)

Tabelle 6 : Effekt von ETO auf die mRNA-Expression einiger P450-Enzyme in NCI-h295-Zellen

	Kontrolle	0,03 μM Eto	0,3 μM Eto	3 μM Eto	30 μM Eto	Propylenglykol
P450c17	100 \pm 16	72 \pm 13	63 \pm 11	69 \pm 24	59 \pm 38	91 \pm 37
P450c21	100 \pm 20	80 \pm 1	61 \pm 22	54 \pm 13	64 \pm 28	74 \pm 44

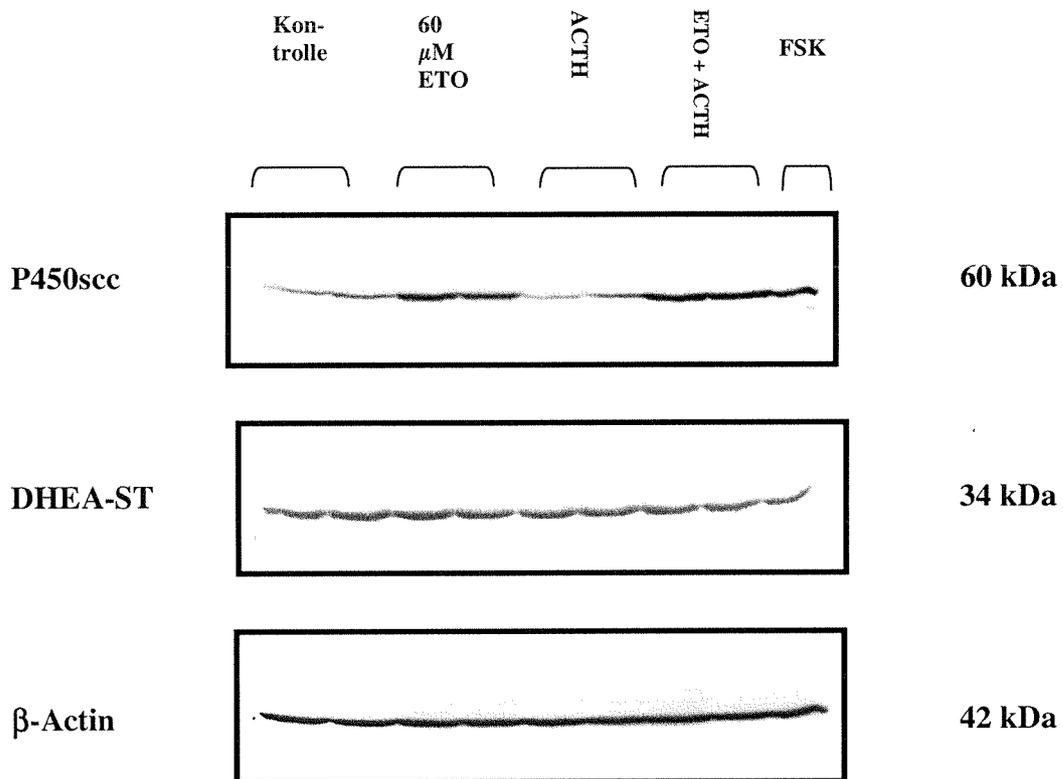
Die Zellen wurden in Triplets für 48 Stunden mit ETO und Propylenglykol inkubiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens. Die Ergebnisse sind nach Normierung auf β -Actin als Prozentangaben \pm Standardfehler im Vergleich zu den Kontrollzellen dargestellt.

Abbildung 4 : Effekt von ETO auf die mRNA-Expression einiger Steroidbiosyntheseenzyme nach 48-stündiger Inkubation



NCI-h295-Zellen wurden für 48 h mit 0,03 – 30 μ M ETO sowie mit dem Lösungsmittel Propylenglykol (PG) inkubiert. Anschließend folgten RNA-Extraktion und der spezifische mRNA-Nachweis mittels Northern-Blot-Verfahren.

Abbildung 5 : Effekt von ETO auf die Protein-Expression der Steroidbiosyntheseenzyme P450scc und DHEA-ST nach 48-stündiger Inkubation

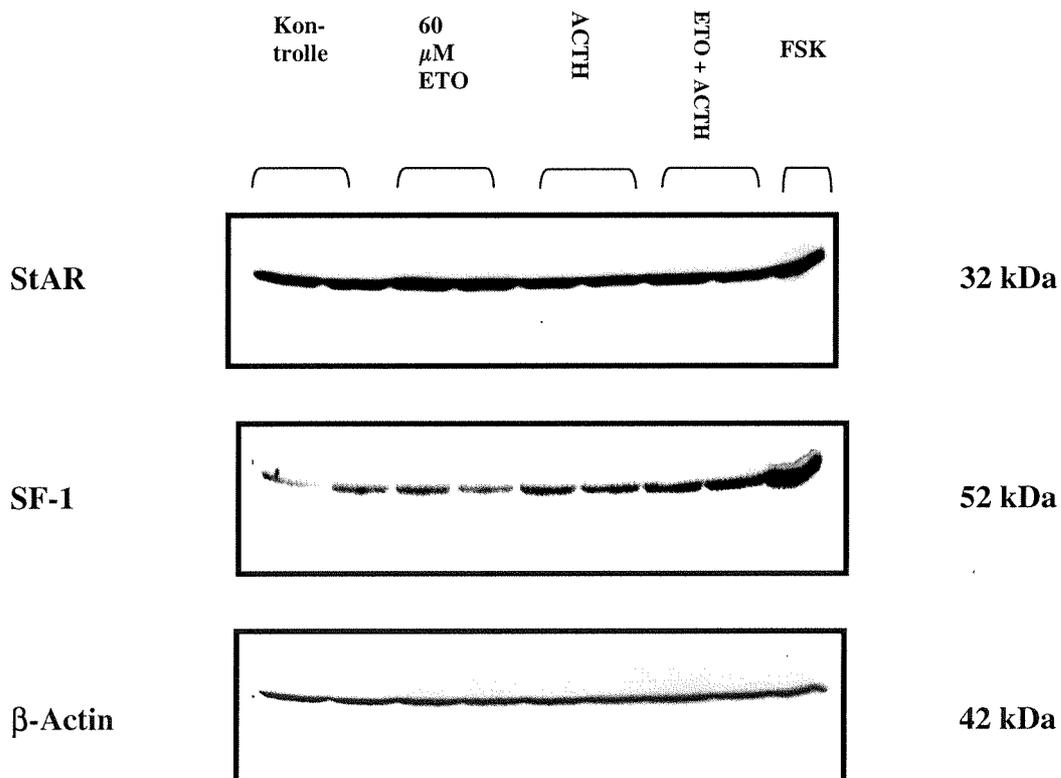


NCI-h295-Zellen wurden für 48 h mit 60 μ M ETO allein oder in Kombination mit ACTH 10^{-9} M sowie mit ACTH bzw. Forskolin (FSK) inkubiert. Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

3.1.3 Einfluss auf die Expression von StAR und SF-1

Für StAR zeigt sich nach Inkubation mit 60 μM ETO eine geringgradige Steigerung der Proteinexpression, ACTH zeigt keinen Einfluss, während sich durch Forskolin eine deutliche Steigerung der Proteinexpression induzieren lässt. Für SF-1 ließ sich keine Beeinflussung durch ETO und ACTH nachweisen, Forskolin fungiert auch hier als positiver Aktivator der SF-1-Proteinsynthese (Abbildung 6).

Abbildung 6 : Effekt von ETO auf die Protein-Expression von StAR und SF-1 nach 48-stündiger Inkubation



NCI-h295-Zellen wurden für 48 h mit 60 μM ETO allein oder in Kombination mit ACTH 10^{-9} M sowie mit ACTH bzw. Forskolin (FSK) inkubiert. Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

3.2 Wirkung von Etomidat auf den ACTH-Rezeptor

3.2.1 Wirkung auf die ACTH-R-Expression

In der Northern-Blot-Analyse ließ sich ähnlich wie bei den Steroidbiosynthese-Enzymen eine nicht-signifikante Reduktion der mRNA-Synthese des ACTH-Rezeptors nach 48-stündiger Inkubation mit Etomidat nachweisen (30 μM ETO $p = 0,24$) (Abbildung 7, Tabelle 7). Die ACTH-R-Proteinsynthese ließ sich durch 60 μM ETO reduzieren, was durch eine Kombination mit 10^{-9} ACTH zumindest teilweise reversibel war. ACTH allein zeigte eine nur sehr leichtgradig vermehrte ACTH-R-Proteinsynthese, während durch Forskolin eine deutliche Steigerung zu verzeichnen war (Abbildung 8).

Abbildung 7 : ACTH-R mRNA-Expression nach 48-stündiger Inkubation mit ETO

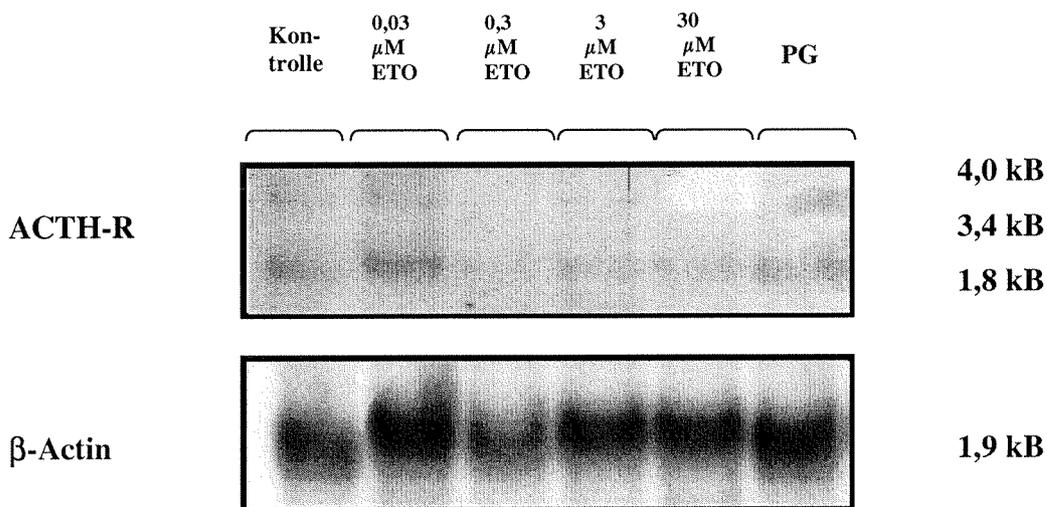
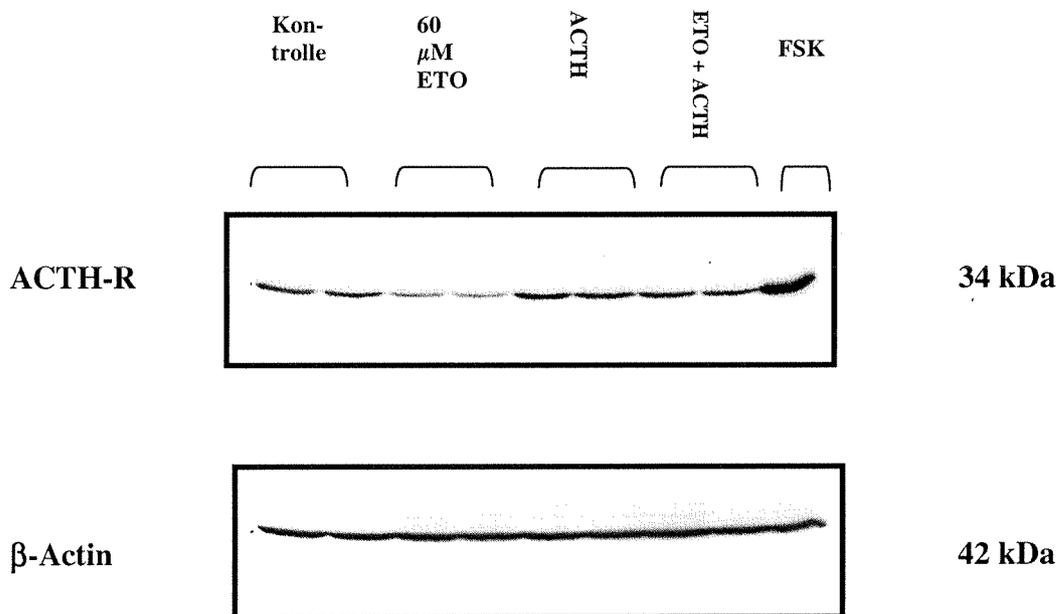


Tabelle 7 : Effekte von ETO auf die ACTH-Rezeptor mRNA-Expression

	Kontrolle	0,03 μ M Eto	0,3 μ m Eto	3 μ M Eto	30 μ M Eto	Propylenglyk
ACTH-R	100 \pm 14	62 \pm 14	44 \pm 21	27 \pm 33	42 \pm 5	70 \pm 22

ACTH-R-mRNA-Expression nach Normierung mit β -Actin angegeben in Prozent \pm Standardfehler zu den Kontrollen.

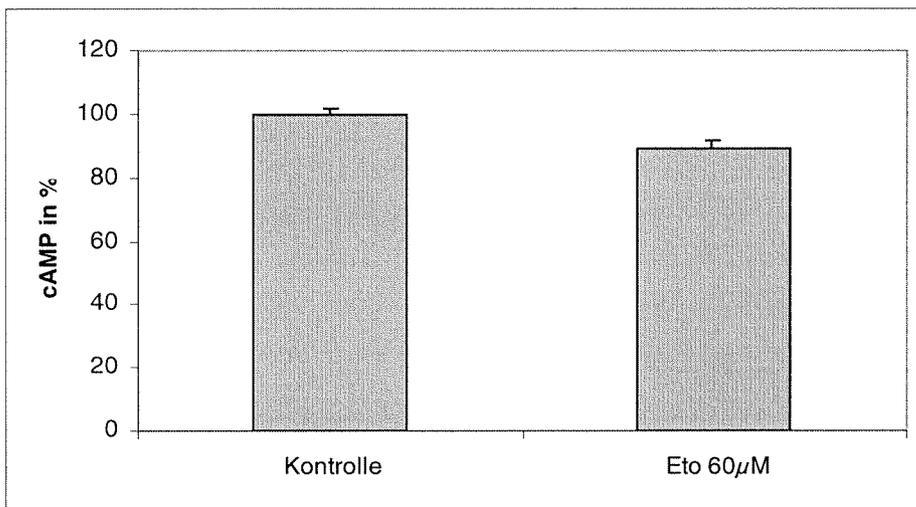
Abbildung 8 : Expression des ACTH-R-Proteins nach 48-stündiger Inkubation mit ETO

NCI-h295-Zellen wurden für 48 h mit 60 μ M ETO allein oder in Kombination mit ACTH 10^{-9} M sowie mit ACTH bzw. Forskolin (FSK) inkubiert. Anschließend folgten Proteinextraktion und der spezifische Protein-Nachweis mittels Western-Blot-Verfahren.

3.2.2 Wirkung auf die ACTH-induzierte cAMP-Synthese

Die cAMP-Antwort der NCI-h295-Zellen auf Stimulation mit 10 nM ACTH war bereits bei den unbehandelten Kontrollzellen gering und ließ sich durch Etomidat nicht signifikant beeinflussen.

Diagramm 3: ACTH-induzierte cAMP-Synthese der NCI-h295-Zellen nach 48-stündiger Vorinkubation mit ETO



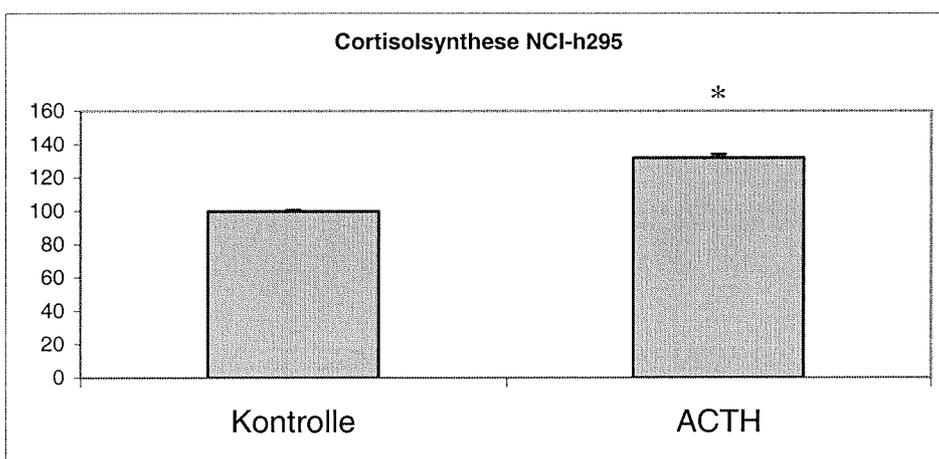
Darstellung der cAMP-Syntheserate der NCI-h295-Zellen nach Stimulation mit ACTH 10 nM abzüglich der Basalproduktion in % zur Kontrolle.

3.2.3 ACTH-Stimulation der NCI-h295-Zellen

Um die durch ACTH stimulierte Cortisolsynthese der NCI-h295-Zellen zu messen, wurden Suspensionszellen für 48 Stunden mit 10 nM ACTH inkubiert. Cortisol wurde aus den Zellüberständen nach 24-stündiger Inkubationszeit mit oder ohne 10 nM ACTH bestimmt.

Die Cortisolantwort lag bei 132% im Vergleich zu den Kontrollzellen (=100%).

Diagramm 4: ACTH-induzierte Hormonsynthese der NCI-h295 Zellen



NCI-h295-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 nM ACTH inkubiert. Anschließend wurde die Cortisolkonzentration im Kulturmedium bestimmt. Angegeben sind die auf die Zellzahl normierten Mittelwerte in % zu den Kontrollen (100%).

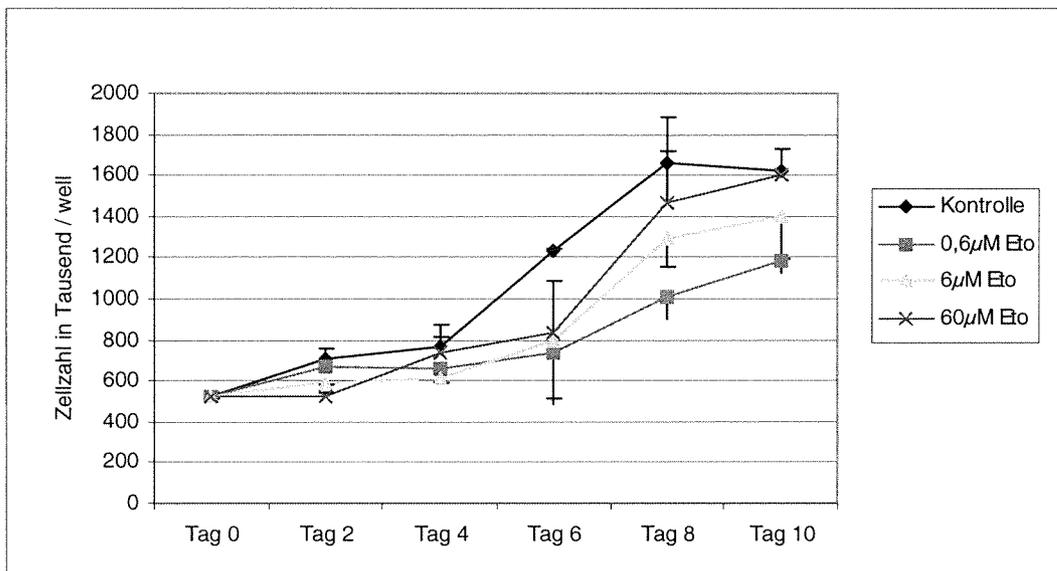
3.3 Wirkung von Etomidat auf das Zellwachstum

3.3.1 Effekte von Adrenostatika in Wachstumskurven

Bei den Wachstumskurven zeigte Etomidat eine signifikante antiproliferative Wirkung, die dosis- und zeitabhängig war.

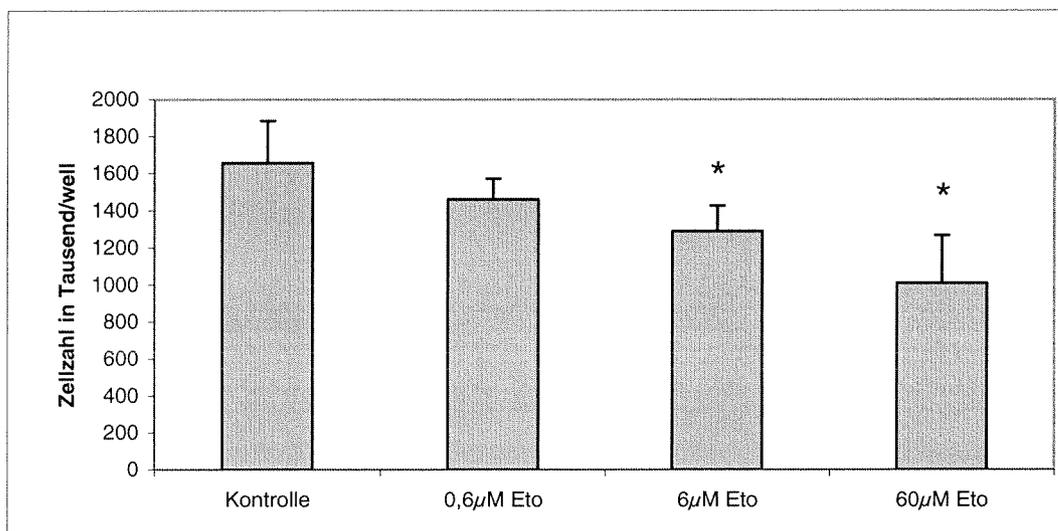
(Tag 8: 0,6 μM Eto $88\% \pm 4\%$, 6 μM Eto $78\% \pm 5\%$, 60 μM Eto $61\% \pm 9\%$ gegenüber den Kontrollzellen $100\% \pm 8\%$; $p < 0,01$)

Diagramm 5: Wachstumskurve der NCI-h295-Zellen unter Inkubation mit ETO



NCI-h295-Zellen wurden in Triplets über 10 Tage mit ETO (0,6-60 μM) inkubiert. An den Tagen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 wurde eine Zellzählung mittel Casy-Coulter Counter durchgeführt.

Diagramm 6: Dosisabhängige Proliferationshemmung von ETO nach 8-tägiger Inkubationszeit



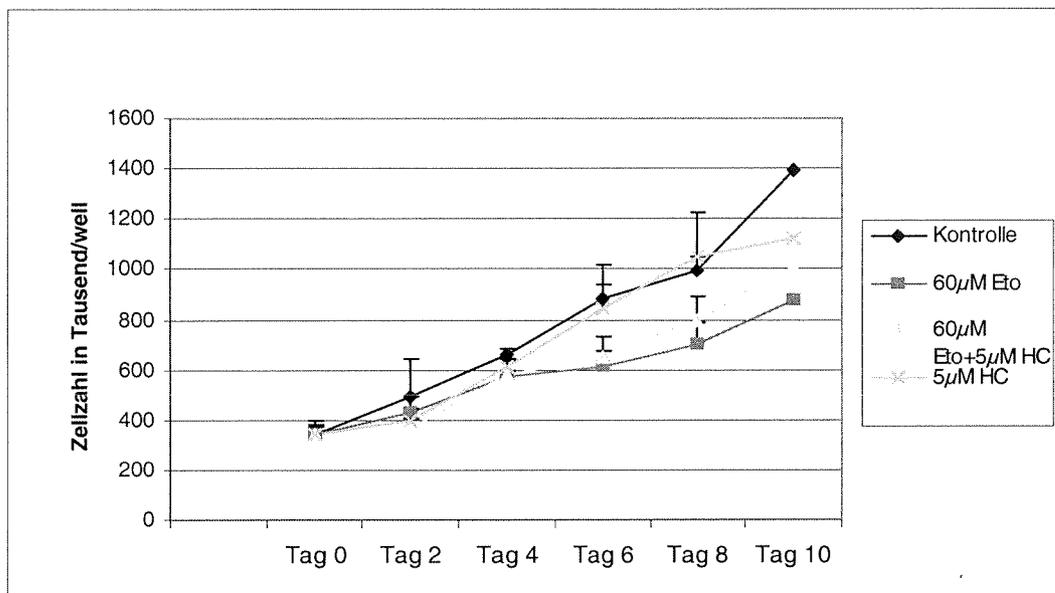
ETO zeigte eine signifikante dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation . Tag 8 : 0,6 µM ETO 88% ± 4%, 6 µM ETO 78% ± 5%, 60 µM ETO 61% ± 9% im Vergleich zu den Kontrollzellen 100% ± 8% ($p < 0,01$).

Um zu untersuchen, inwiefern der Steroidmangel für die wachstumshemmende Wirkung von ETO verantwortlich ist, wurde ein weiterer Wachstumsversuch durchgeführt, in dem die Effekte von 60 µM ETO und 5 µM Hydrocortison auf die NCI-h295-Zellen allein sowie in Kombination analysiert wurden .

Die dem Kulturmedium zugefügte Menge an Hydrocortison entsprach etwa der an Tag 10 des vorangegangenen Wachstumsversuchs im Kulturmedium der unbehandelten Kontrollzellen gemessenen Cortisolkonzentration.

Der wachstumshemmende Effekt von ETO war durch die Substitution mit 5 µM Hydrocortison nicht reversibel. An den Tagen 6 und 8 zeigte sich eine hochsignifikante Wachstumshemmung durch ETO. Tag 6: 60 µM ETO $p < 0,0001$, 60 µM ETO + 5 µM Hydrocortison $p < 0,001$).

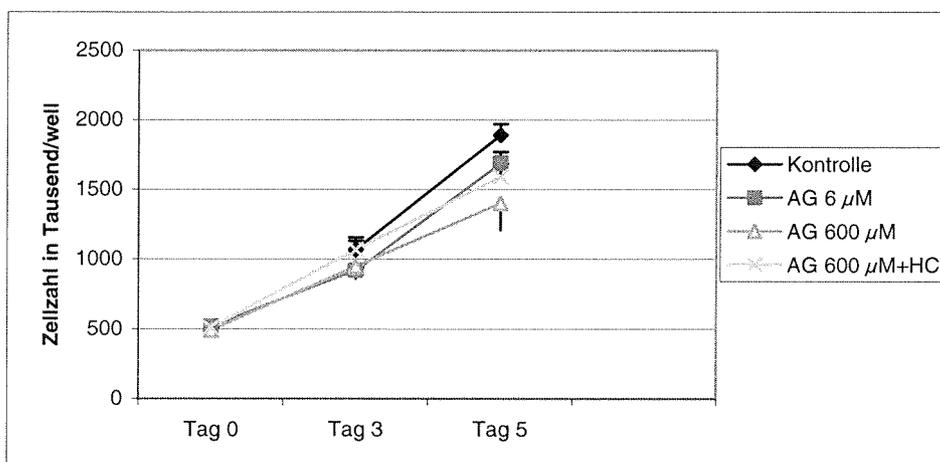
Diagramm 7: Wachstumskurve : Einfluss der Hydrocortison-Substitution mit ETO behandelter NCI-h295-Zellen



Die Zellen wurden mit 60 μ M ETO, 5 μ M Hydrocortison (HC) sowie mit der Kombination von 60 μ M ETO und 5 μ M HC inkubiert. Tag 6: 60 μ M ETO $p < 0,0001$, 60 μ M ETO+HC $p < 0,0001$)

Mehrtägige Behandlung von NCI-h295-Zellen mit Aminoglutethimid führte in höheren Konzentrationen ebenfalls zu einer leichten Verminderung des Proliferationsverhaltens. Die Substitution mit 12 μ M Hydrocortison konnte die Verlangsamung des Zellwachstums teilweise ausgleichen.

Diagramm 8: Wachstumskurve : Effekte von Aminogluthetimid (AG) auf das Proliferationsverhalten der NCI-h295-Zellen



Einfluss von Aminogluthetimid auf das Wachstumsverhalten von NCI-h295-Zellen. Die Zellen wurden mit 6 und 600 µM AG, sowie einer Kombination von AG 600 µM und Hydrocortison 12 µM inkubiert. Zellzählungen wurden an Tag 0, 3 und 5 durchgeführt.

3.3.2 Nachweis der Wirkung von Adrenostatika auf das Zellwachstum mittels

MTT-Test

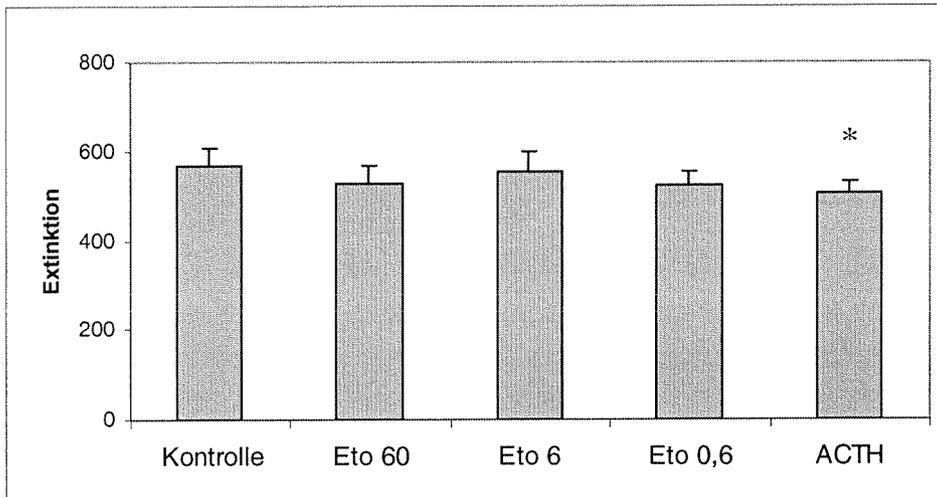
Der mit Hilfe der Wachstumskurven nachgewiesene antiproliferative Effekt von Etomidat auf die NCI-h295-Zellen ließ sich bei den durchgeführten MTT-Tests nicht bestätigen (Diagramm 9).

Bei der als weitere humane NNR-Karzinomzelllinie verwendeten SW-13-Zelllinie war eine signifikante Wachstumshemmung in hohen Konzentrationen (60 µM) nachweisbar, s. Diagramm 10.

Rinder-NNR-Zellen, die als nichtneoplastische Vergleichszellpopulation dienen sollten, zeigten ebenfalls im MTT-Test nur eine geringfügige Antwort in sehr hohen Konzentrationen (300 µM), s. Diagramm 11.

Bei den beiden nichtadrenalen Karzinomzelllinien HT-29 (Colon-Ca) und MCF-7 (Mamma-Ca) ließ sich keine Wirkung von Etomidat auf das Proliferationsverhalten feststellen (Diagramme 12 und 13).

Diagramm 9: Wirkung von ETO auf das Proliferationsverhalten von NCI-h295 Zellen (MTT-Test)



NCI-h295-Zellen wurden über 7 Tage in 96-well Mikrotiterplatten mit aufsteigenden Konzentrationen ETO, sowie mit 10 nM ACTH und 5 μ M HC + 60 μ M ETO inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl indirekt über die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt, die die MTT-Substanz in photometrisch bestimmbares Formazan umwandelten. Die Inkubation mit ETO brachte keine signifikante Veränderung der Zellzahl, während ACTH die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant verminderte ($p < 0,01$).

Diagramm 10: Wirkung von ETO auf das Proliferationsverhalten von SW-13-Zellen (MTT-Test)

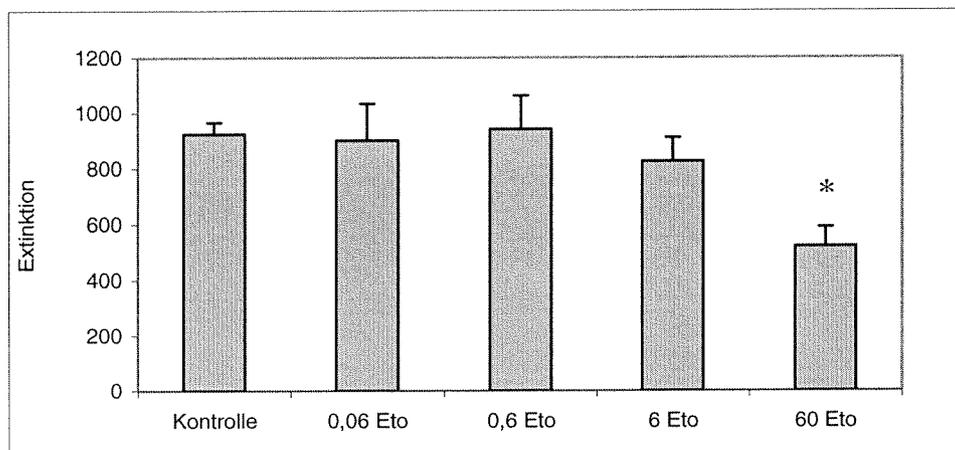


Diagramm 11: Effekte von ETO auf Rinder-NNR-Primärkulturzellen (MTT-Test)

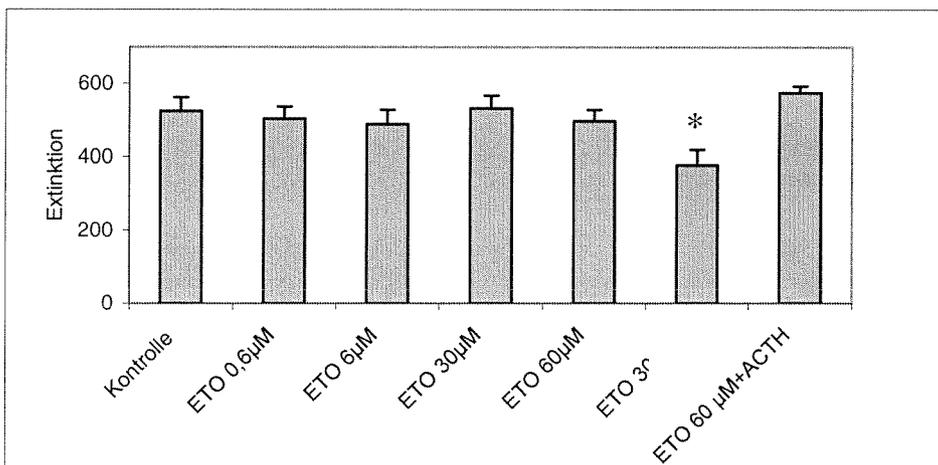


Diagramm 12: Effekte von ETO auf das Proliferationsverhalten von HT-29-Zellen (MTT-Test)

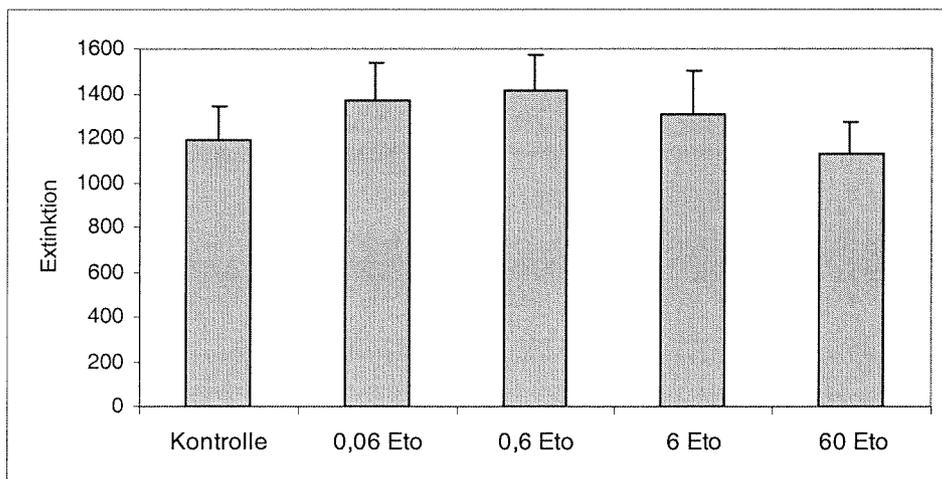
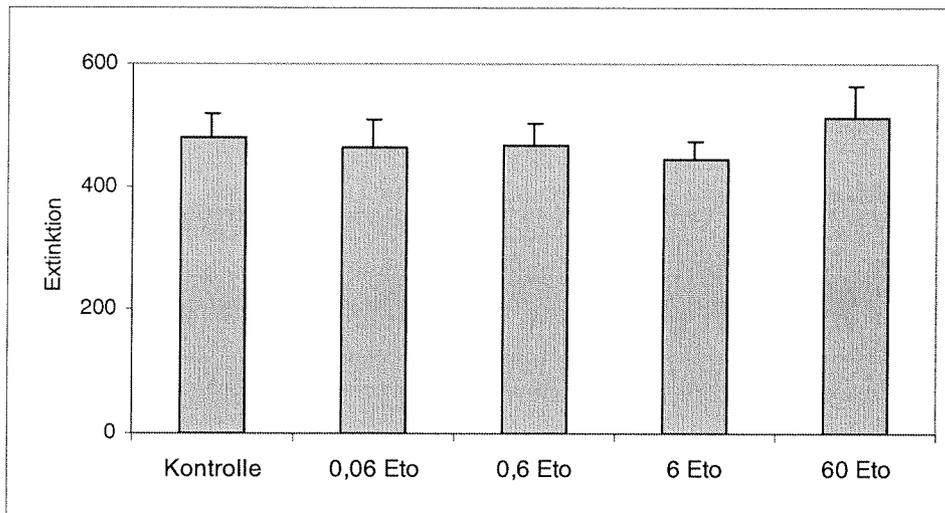


Diagramm 13: Effekte von ETO auf das Proliferationsverhalten von MCF-7-Zellen (MTT-Test)



3.3.3 Effekte von Etomidat auf den Zellzyklus der NCI-h295-Zellen

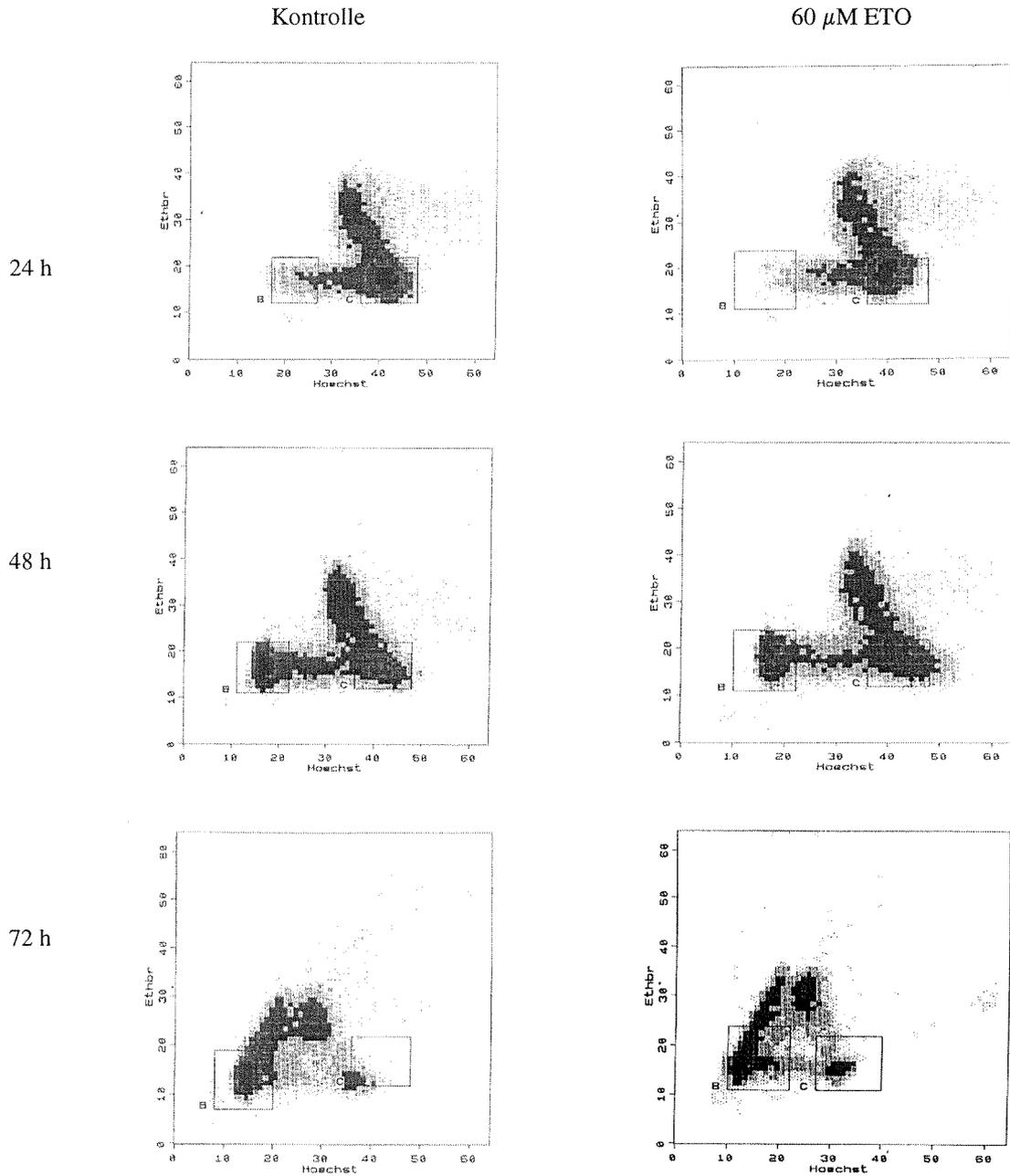
Die nach 24-, 48-, und 72-stündiger Inkubation mit Etomidat (6 und 60 μM) durchgeführte Zellzyklusanalyse zeigte keine signifikante Verlangsamung des Zellzyklus im Vergleich zu Kontrollzellen. Nach 48 Stunden zeigte sich eine tendenzielle Verlangsamung des Zellwachstums im Vergleich zu Kontrollzellen (Tabelle 8, Abbildung 9).

Tabelle 8: Wirkung von ETO auf den Zellzyklus der NCI-h295-Zellen.

	24 h		48 h		72 h	
	A	B	A	B	A	B
Kontrolle	4,6 \pm 2,7	61 \pm 2,3	40,8 \pm 1,6	22,2 \pm 2,8	59,2 \pm 1,4	2,2 \pm 2,2
6μM ETO	4,5 \pm 2,9	63,6 \pm 2,5	36,3 \pm 2,6	26,4 \pm 3,0	74,0 \pm 1,8	4,9 \pm 2,5
60μM ETO	1,3 \pm 1,9	54,5 \pm 2,0	28,6 \pm 1,6	28,2 \pm 2,9	72,4 \pm 1,7	6,4 \pm 1,8

NCI-h295 Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit oder ohne ETO (6-60 μM) inkubiert. Anschließend wurde eine Zellzyklusanalyse per FACS durchgeführt. Aufgeführt sind der Anteil der Zellen, die während der Inkubationszeit einen weiteren Zellzyklus durchlaufen haben (A) und der Anteil der Zellen, die sich noch in der G₁- bzw. G₀-Phase befinden und nicht in einen weiteren Zyklus eingetreten sind (B). Die Angaben stellen jeweils den prozentualen Anteil der gesamt gemessenen Zellen dar.

Abbildung 9: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse-Verteilung der Zellen über die einzelnen Phasen des Zellzyklus

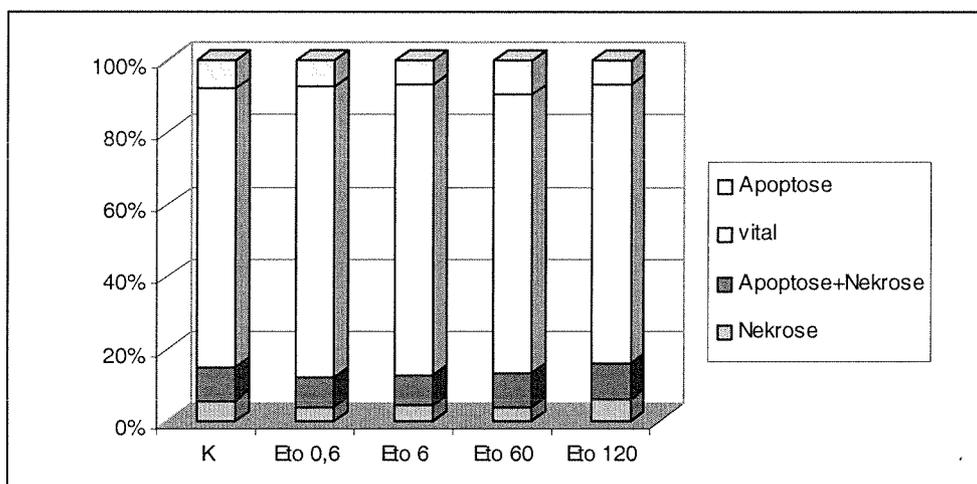


Dargestellt ist exemplarisch die Verteilung der NCI-h295-Zellen über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus nach Inkubation mit oder ohne ETO (6-60 μM). Eine FACS-Analyse wurde nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubationszeit durchgeführt. Die intrazellulär vorhandene Menge Ethidiumbromid korreliert positiv mit der DNA-Menge und kann somit zur Differenzierung zwischen Zellen in der Mitosephase und Zellen in der Interphase beitragen. Der Hoechst-Farbstoff korreliert in seiner Fluoreszenz negativ mit der eingebauten BrdU-Menge, d. h. je mehr BrdU eine Zelle in die eigene DNA eingebaut hat, desto mehr Zellzyklen hat sie durchschritten, und desto geringer ist die Fluoreszenz des Hoechst-Farbstoffes.

3.3.4 Apoptosemessung

In der durchgeführten FACS-Analyse ergab sich kein Hinweis auf eine Induktion von Apoptose durch ETO (Diagramm 14, Tabelle 9).

Diagramm 14: Effekte von ETO auf die Zellvitalität der NCI-h295-Zellen



Anteilsmäßige Verteilung apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit ETO in verschiedenen Konzentrationen (0,6-120 µM). Angaben sind in % der pro Ansatz gesamt gemessenen Zellen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Apoptosemessung in der FACS-

Analyse nach 24-stündiger Inkubationszeit mit ETO

	Vitale Zellen	apoptotische Zellen	apoptotische+ nekrot. Zellen	nekrotische Zellen
Kontrolle	72,0±3	8,2±1	12,8±2	7,0±2
ETO 6	69,2±1	10,2±2	15,1±1	5,5±1
ETO 60	68,7±3	8,8±1	16,4±2	6,1±1

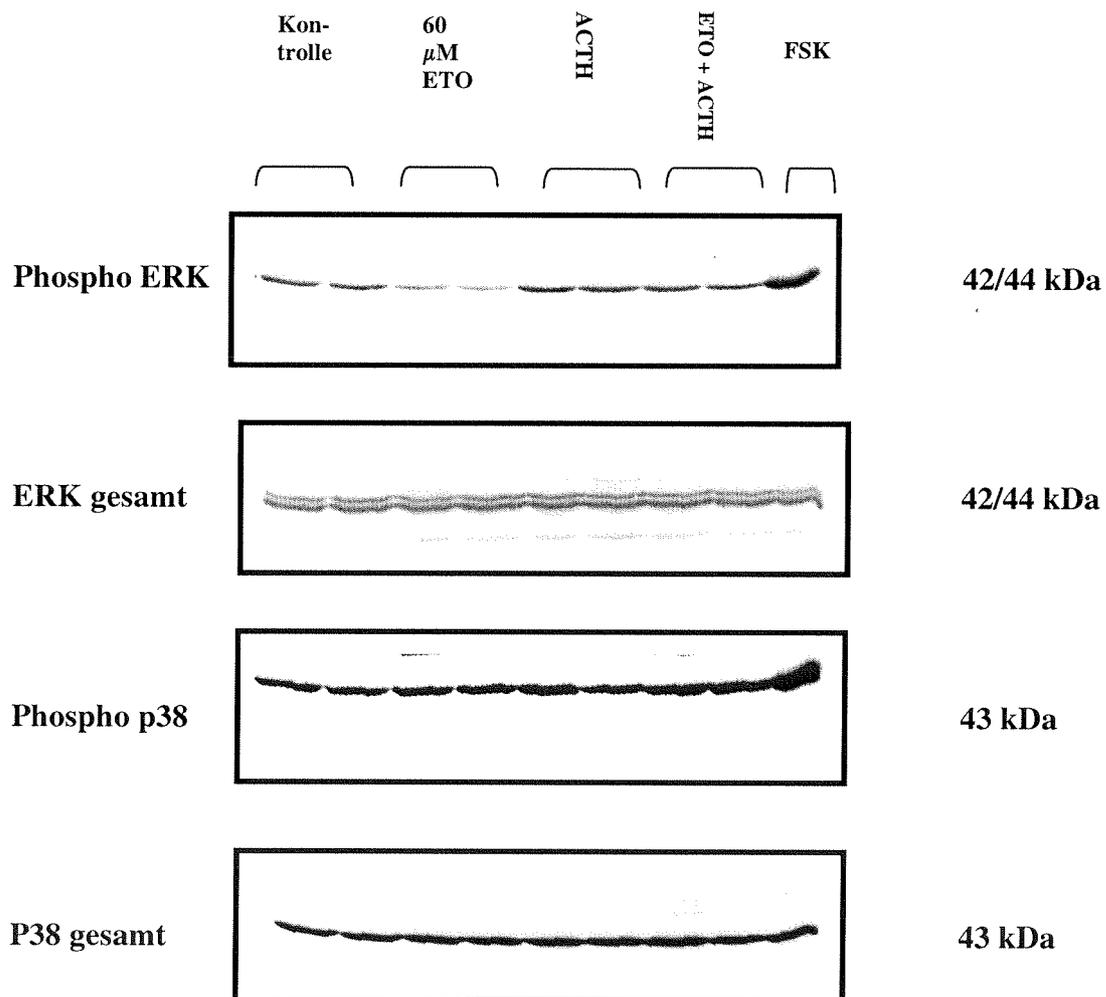
Die Angaben erfolgten in % der gemessenen Gesamtzellen. NCI-h295-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Etomidat inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubationsdauer wurde eine Zellfärbung durchgeführt und per FACS-Analyse der Anteil der Annexin-positiven (= apoptotischen), 7-AAD-positiven (=nekrotischen) sowie für beide Färbungen positiven (=spätapoptotischen/nekrotischen) Zellen bestimmt.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch nach 2-, 4-, 6-, 12-, 48- und 72-stündiger Inkubationszeit.

3.3.5 Einfluss von ETO auf an der Zellproliferation beteiligte Signaltransduktionsprozesse

Inkubation von NCI-h295-Zellen mit ETO führte zu einer Hemmung der Phosphorylierung von ERK-1 und -2, während Forskolin zu einer starken ERK- und auch p38-Aktivierung führte. Für ACTH konnte sich allenfalls ein geringgradig aktivierender Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung feststellen lassen. P38 blieb durch ETO und ACTH unbeeinflusst. Unterschiede in der Proteinexpression zeigten sich bei keiner der eingesetzten Substanzen. (Abbildung 10)

Abbildung 10: Effekt von ETO auf die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38

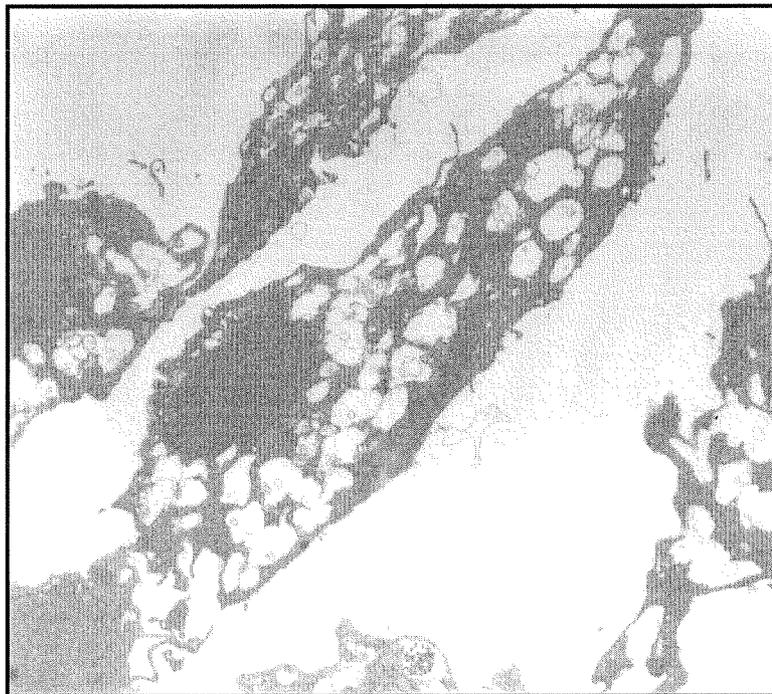


3.4 Wirkung von Etomidat auf die Zellmorphologie

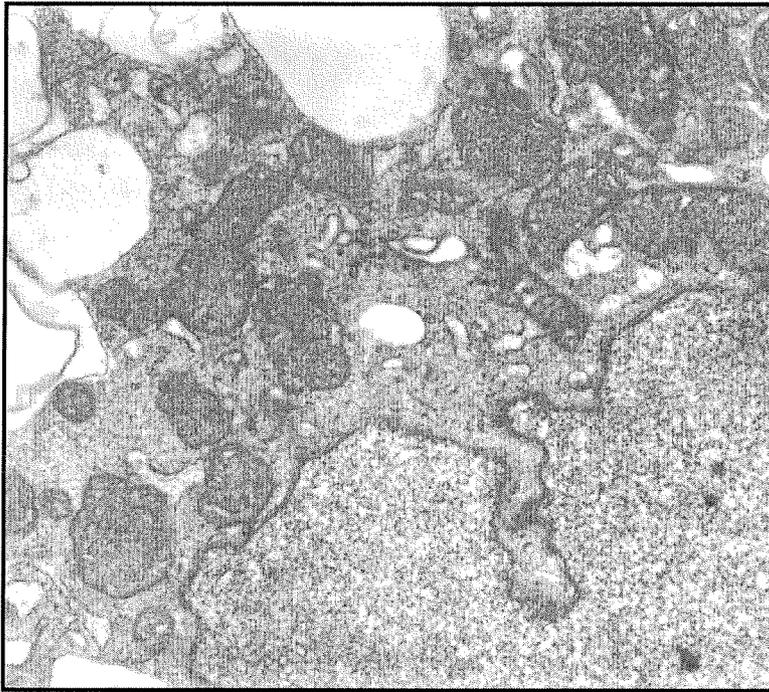
3.4.1 Elektronenmikroskopie

Morphologische Veränderungen der Mitochondrien als Lokalisationsort der von ETO hauptsächlich inhibierten Enzyme P450c11 und P450 scc, sowie Veränderungen der Zellstrukturen im Allgemeinen ließen sich bei ETO-vorbehandelten Zellen nicht feststellen.

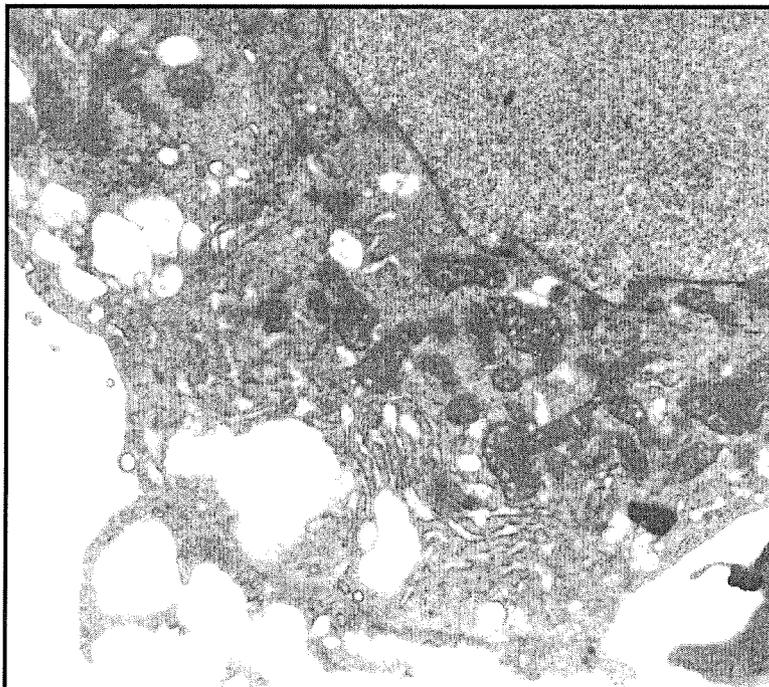
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Übersicht NCI-h295-Zellen



Darstellung unbehandelter Kontrollzellen. Man sieht eine große Zahl von Lipidgranula, die für diese Steroidhormon-produzierende Zelllinie charakteristisch ist. Vergrößerung 1:3150

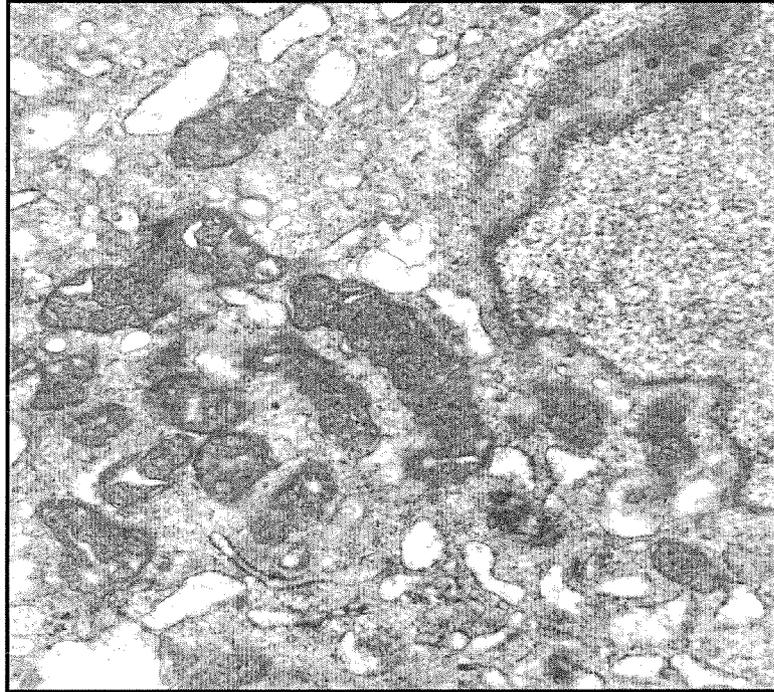
Abbildung 12: Unbehandelte Kontrollzellen

Vergrößerung 1:15 000

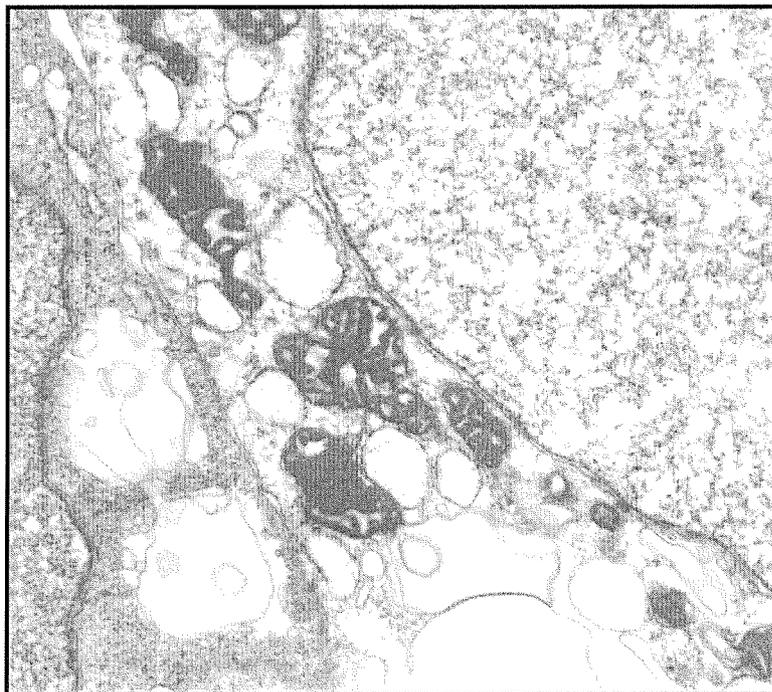
Abbildung 13: Etomidat-behandelte NCI-h295-Zellen

*Ausschnitt mit Darstellung von Zellkern und Zytoplasma mit Mitochondrien und Golgi-Apparat.
Vergrößerung 1:8 000*

Abbildung 14 u. 15: Etomidat-behandelte NCI-h295-Zellen



Vergrößerung 1:15 000



Vergrößerung 1:20 000

4 Diskussion

4.1 Effekte der Adrenostatika auf die Steroidbiosynthese

Die Substanzen ETO, MTP und AG wirken hauptsächlich durch Hemmung verschiedener Steroidbiosynthese-Enzyme (74, 75, 82, 83, 90, 92, 94, 95, 145, 162, 163).

Alle Substanzen führten zu einer dosisabhängigen Inhibition der Aktivität der Steroidbiosynthese-Enzyme. Es konnte gezeigt werden, dass ETO im Vergleich zu MTP und AG eine deutlich höhere adrenostatische Potenz besitzt mit einer IC_{50} von 15 nM für P450c11 und 400 nM für P450scc. Im Vergleich dazu lag die IC_{50} von MTP bei 3,5 μ M für P450c11 und 17 μ M für P450scc. AG zeigte die schwächste inhibitorische Wirkung auf die Steroidbiosynthese mit einer IC_{50} von 10 μ M für P450scc.

Die Synthese von Cortisol und DHEA-S wurde durch ETO dosisabhängig supprimiert. Die Freisetzung von 17-OH-P, Gesamt-Testosteron und Androstendion war bei niedrigen Konzentrationen ETO (0,6-60 nM) gesteigert, ein Effekt, der auf die Blockade von P450c11 zurückzuführen ist. Höhere ETO-Konzentrationen führten zur Abnahme der Synthese aller gemessener Hormone, ein Hinweis auf die Blockade des P450scc-Enzyms.

Auffällig ist, dass sich DHEA-S im Vergleich zu den anderen adrenalen Androgenen dosisabhängig durch ETO supprimieren ließ und kein vorübergehender Anstieg infolge der in niedriger Konzentration alleinigen Blockade des P450c11-Enzyms zu verzeichnen war. Eine Blockade von P450c17 (17-Hydroxylase) mit einer IC_{50} von 6-18 μ M und von P450c17 (17,20-Desmolase) mit einer IC_{50} von 380 μ M durch ETO ist bereits beschrieben worden (74), dient jedoch nicht als ausreichende Erklärung für den Verlauf der DHEA-S-Konzentrationen. Möglicherweise spielt eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der DHEA-Sulfotransferase eine Rolle. Eine verminderte Proteinexpression der DHEA-ST ließ sich im durchgeführten Western Blot zumindest nach 48-stündiger Inkubation nicht nachweisen.

4.2 Effekte von Etomidat auf die Regulation der P450-Enzyme und die StAR-Expression

Neben der direkten Inhibition einiger Steroidbiosyntheseenzyme durch Etomidat ließ sich bei den untersuchten Enzymen P450c17 und P450c21 ähnlich wie für den ACTH-R eine leichtgradige, jedoch nicht signifikante Inhibition der mRNA-Synthese feststellen. Bezüglich des P450scc-Enzyms zeigte sich auf Proteinebene jedoch eine Hochregulation nach 48-stündiger Inkubation mit Etomidat.

Für die Adrenostatika AG und MTP existieren bezüglich ihrer Wirkung auf die Steroidbiosyntheseenzyme in der Literatur unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Behandlung von Schweine-Granulosazellen mit AG führte zu keiner Veränderung der P450scc-Expression, während bei Corpus luteum-Zellen, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, eine Erhöhung des P450scc-Proteinlevels durch AG nachgewiesen werden konnte (164, 165). Bei NCI-h295 Zellen konnte eine signifikante Suppression der mRNA-Synthese einiger Steroidbiosynthese-Enzyme (P450scc, P450c17 und P450c21) durch AG und MTP in relativ hohen Konzentrationen (300 μ M) gezeigt werden (129), passend zu den vorliegenden Daten zur mRNA-Expression von ACTH-R und P450c17 und P450c21.

In bisherigen Studien war auf mRNA-Ebene ein Zusammenhang zwischen der ACTH-R-Expression und der Expression der Steroidbiosynthese-Enzyme (143, 166, 167) feststellbar.

Untersuchungen der Regulation der P450-Steroidhydroxylasen bei Y1-Zellen ergaben, dass der Transkriptionsfaktor SF-1 an gemeinsame Promotor-Elemente upstream der Steroidhydroxylasen bindet und ihre gleichzeitige Expression reguliert (168, 169). Die vorliegenden Daten zeigen hingegen unter Etomidat-Behandlung der NCI-h295-Zellen eine gegenläufige Regulation der Proteinexpression von ACTH-Rezeptor und P450scc, so dass weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Bei Y1-Zellen und in humanen Nebennieren konnte für P450scc, P450c21, P450c11 und für P450c17 der Transkriptionsfaktor "chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor" (COUP-TF) als weiterer negativer Regulator der Transkription

nachgewiesen werden (170, 171). Studien des P450c11- und P450c17-Promoters bei NCI-h295-Zellen zeigten, dass auch die Transkriptionsfaktoren CRE-binding Protein und activating transcription factor 1 und 2 (ATF-1 und ATF-2) sowie Sp1, Sp3 und NF-1C an der Kontrolle der Promoteraktivität beteiligt sind (172, 173). Auch die Aktivierung des Transkriptionfaktors AP-1, einem Dimer aus den Proteinen der jun- und fos-Familie, durch ACTH-Stimulation konnte als Einflussfaktor der transkriptionellen Aktivität des P450c11-Promoters in Y-1-Zellen nachgewiesen werden (174). Die Expression der Steroidbiosynthese-Enzyme unterliegt also einer Vielzahl verschiedener Einflussfaktoren. Es wäre denkbar, dass Adrenostatika direkt oder indirekt einen der aufgeführten Steuerungsfaktoren beeinflussen können.

Die Untersuchungen bezüglich der Proteinexpression von SF-1 zeigten keine Beeinflussung durch Etomidat, während sich durch ACTH eine leichtgradig und durch Forskolin eine deutlich vermehrte Proteinexpression nachweisen ließ. Hierbei blieb jedoch die phosphorylierte und damit aktivierte Form von SF-1, die durch den verwendeten Antikörper nicht spezifisch detektiert werden kann, unberücksichtigt, eine Beeinflussung der Aktivität von SF-1 durch ETO ist somit nicht auszuschließen. Ein Antikörper gegen Phospho-SF-1 ist kommerziell nicht erhältlich.

Die Arbeit von Wu et al. konnte eine Steigerung von Zellproliferation, Steroidogenese und mRNA-Expression von P450scc, P450c17 und der 3- β -HSD in humanen mit einer aktiven K-Ras-Mutante transfizierten Nebennierenzellen zeigen (175). Eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK1 und 2 durch ETO ließ sich in den Western Blot-Untersuchungen nachweisen, so dass hier ein möglicher Erklärungsansatz für die verminderte mRNA-Synthese der Steroidbiosynthese-Enzyme zu finden ist. Die Steigerung der P450scc- und der StAR-Proteinexpression ist hierdurch jedoch nicht erklärt. Die StAR-Expression wird bekanntermaßen durch eine Aktivierung des Proteinkinase A- und auch des Proteinkinase C-Weges gesteigert (176, 177). In einer Arbeit von Huang und Li konnte gezeigt werden, dass Dexamethason bei kultivierten präovulatorischen Rattenfollikel die LH-stimulierte StAR-Expression hemmen konnte, was auf einen für StAR bislang noch nicht weiter charakterisierten Glukokortikoid-Rezeptor-vermittelten Mechanismus zurückgeführt wurde (178). Im Umkehrschluss wäre also denkbar, dass die Hemmung der Steroidbiosynthese zu einem gegenteiligen Effekt für die StAR- und auch die P450scc-Expression und zu einer reaktiven

kompensatorischen Hochregulation führen könnte. Demgegenüber stehen jedoch Ergebnisse, die zeigen, dass eine ERK-Aktivierung bei Y-1-Zellen zu einer vermehrten StAR-Proteinsynthese führt (179), angesichts der durch ETO bewirkten Hemmung der ERK-Phosphorylierung wäre demnach eine Verminderung des StAR-Proteins zu erwarten gewesen. Eine weitere Arbeit zeigt für die beiden adrenostatisch wirkenden Imidazole Econazol und Miconazol eine Verminderung der Bu₂cAMP-induzierten StAR-Proteinsynthese bei demgegenüber jedoch gesteigerter StAR-mRNA-Synthese nach 4-stündiger Inkubation, Daten zu längerfristigen Inkubationszeiten existieren nicht (180).

4.3 Effekte von Etomidat auf den ACTH-Rezeptor

In den Arbeiten von Fassnacht (129) und Picard-Hagen (128) konnte bereits für die beiden Adrenostatika Aminoglutethimid und Metyrapon nachgewiesen werden, dass die Inkubation von Nebennierenrindenzellen mit diesen Substanzen zu einer dosisabhängigen Verminderung der ACTH-R mRNA-Expression sowie der Expression einiger Steroidbiosynthese-Enzyme führt. Die Behandlung mit Aminoglutethimid (AG) oder Metyrapon (MTP) führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Verminderung der ACTH-R-mRNA-Synthese, die durch die Substitution von Hydrocortison sowie durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Forskolin reversibel war (128, 129). Daten zur Proteinexpression des ACTH-Rezeptor unter Adrenostatika-Behandlung liegen bislang nicht vor.

Die Hormonuntersuchungen zeigen, dass Etomidat in seiner adrenostatischen Potenz AG und MTP überlegen ist, so dass sich die Frage stellte, ob und inwieweit sich auch für diese Substanz ein Effekt auf den ACTH-R feststellen lassen würde.

Eine Verminderung der ACTH-R mRNA-Expression ließ sich für ETO in höheren Konzentrationen ebenfalls nachweisen, jedoch nicht in vergleichbarer Ausprägung und Signifikanz wie dies für AG und MTP gezeigt werden konnte. Die Proteinexpression des ACTH-R zeigte sich durch ETO deutlich vermindert und war durch Forskolin, geringgradig auch durch ACTH stimulierbar.

Da sich AG und MTP sowohl in ihrer molekularen Struktur als auch in ihrem Angriffspunkt an den P450-Enzymen voneinander unterscheiden und der Effekt teilweise durch Substitution mit Hydrocortison reversibel war, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen generellen Effekt adrenostatisch wirkender Substanzen handeln muss.

In einigen Untersuchungen konnte an Schafs-NNR-Zellen und an Nebennieren von Meerschweinchen gezeigt werden, dass Glukokortikoide die ACTH-induzierte cAMP-Synthese bzw. Cortisol-Antwort verstärken (127, 181, 182), ein Effekt, den man auf eine Hochregulation der ACTH-Rezeptor-Expression durch Glukokortikoide zurückführte. In späteren Arbeiten ließ sich eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der ACTH-R-mRNA-Expression durch Glukokortikoide feststellen (128).

Um neben dem Nachweis der ACTH-Rezeptor-Expression auf Transkriptionsebene auch Aussagen über die funktionelle Ebene bzw. Proteinebene machen zu können, wurde als weiteres Verfahren die Messung der ACTH-induzierten Synthese von cAMP gewählt. Da der ACTH-R über ein G-Protein mit einer Adenylatzyklase gekoppelt ist, lässt sich somit indirekt eine Aussage über das Vorhandensein von ACTH-R-Proteinen und deren funktionelle Aktivität treffen.

Die cAMP-Antwort war bereits bei den unbehandelten Kontrollzellen gering und ließ sich durch Inkubation mit 60 μ M ETO nicht signifikant beeinflussen.

Zudem waren die Cortisol- und cAMP-Antwort unbehandelter NCI-h295-Zellen auf ACTH relativ gering, so dass man davon ausgehen kann, dass die ACTH-R-Expression dieser Zelllinie insgesamt passager oder permanent deutlich erniedrigt ist.

4.3.1 Mechanismen der ACTH-R-Regulation

4.3.1.1 Der Proteinkinase-A-Signalweg

Der Proteinkinase-A-Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Weg der Signalübermittlung durch ACTH. ACTH und Forskolin sind starke Stimulatoren der

ACTH-R-Promotor-Aktivität und führen zu einer deutlichen Steigerung der ACTH-R-mRNA-Synthese (183-192).

Im humanen ACTH-R-Promoter konnten mehrere cAMP response elements (CRE) identifiziert werden (123, 193, 194). An diese CREs binden durch die Proteinkinase A aktivierte sogenannte CRE Bindungsproteine (CREB) und regulieren die Genexpression. Mutationen, die eine Forskolin- und ACTH-Resistenz der Adenylatzyklase bedingen, führten zu einem Verlust der ACTH-R-Expression (124).

Inkubation von NCI-h295-Zellen mit ETO über 48 Stunden führte, wie schon für AG und MTP (129) dargestellt, zu keiner Änderung der basalen intrazellulären cAMP-Synthese. Eine Beeinflussung nachgeschalteter Prozesse wie beispielsweise Hemmung der Aktivierung der CREBs durch Adrenostatika ist jedoch vorstellbar.

4.3.1.2 Glukokortikoide und ACTH-R-Expression

Untersuchungen der Gruppe um Durand an Schafs-NNR-Zellen wiesen eine Steigerung der cAMP-Antwort sowie der Steroidogenese auf ACTH nach Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden nach (127). Es ließ sich weiterhin eine gesteigerte ACTH-R-mRNA-Expression nach Glukokortikoidinkubation feststellen (128). Im ACTH-R-Promoter der Maus konnte ein Glucocorticoid response element (GRE) identifiziert werden (195). Sollte also auch beim humanen ACTH-R-Promoter ein GRE existieren, wäre dies eine mögliche Erklärung für die inhibitorische Wirkung der Adrenostatika auf die ACTH-R-Expression.

Insgesamt scheinen die Glukokortikoide jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der ACTH-R-Expression zu spielen. So führte beispielsweise die Behandlung von Ratten mit hohen Dosen Dexamethason zu einer Suppression der ACTH-R-Expression. Die Dexamethason-induzierte Hemmung der ACTH-Sekretion hatte offenbar einen stärkeren Einfluss auf die ACTH-R-Expression als das lokale Überangebot an Dexamethason (196).

4.3.1.3 Der Proteinkinase C-Weg

Ein ebenfalls bedeutsamer Signaltransduktionsweg ist der Proteinkinase-C-(PKC-)Weg. In verschiedenen Studien ließ sich nachweisen, dass Angiotensin II die ACTH-R-Expression in Nebennierenzellen steigert (122, 125, 126, 197). Zwei AP-1-Bindungsstellen konnten in der ACTH-R-Promoterregion nachgewiesen werden, die bei der Angiotensin II-stimulierten ACTH-R-Gentranskription beteiligt sind (197).

4.3.1.4 Nukleäre Transkriptionsfaktoren

Nukleäre Rezeptoren sind durch Liganden induzierbare Transkriptionsfaktoren, die spezifisch die Expression von Genen regulieren. Ihre primäre Funktion ist es, die transkriptionelle Antwort von Zielzellen auf verschiedene Signalmoleküle zu vermitteln.

Zwei Faktoren, steroidogenic factor-1 (SF-1) und dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X-chromosome gene-1 (DAX-1) sind für die Entwicklung und spezifischen Funktionen der Nebenniere in besonderem Maße wichtig und sollen kurz näher besprochen werden.

SF-1 und DAX-1

SF-1 stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor in steroidbildenden Zellen dar und gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren, die auch die Steroidhormon- und Schilddrüsenhormonrezeptoren umfassen.

Die Transkription mehrerer Cytochrom P450-Enzyme, des ACTH-R und StAR wird durch SF-1 aktiviert. Bindungsstellen konnten in verschiedenen Cytochrom P450- und im ACTH-R-Promoter nachgewiesen werden. Für den humanen ACTH-R-Promoter sind bisher drei SF-1-Bindungsstellen charakterisiert worden (198, 199). Mutationen von SF-1 führten zu einer verminderten ACTH-R-Expression (200). Weiterhin konnte am Rattenmodell gezeigt werden, dass SF-1 neben seinem Einfluss auf die adrenale

Steroidogenese eine wichtige Rolle im embryonalen wie auch im adulten Nebennierenwachstum spielt (201).

DAX-1, ein weiterer nukleärer Transkriptionsfaktor, steht in engem funktionellem Zusammenhang mit SF-1. DAX-1 interagiert mit SF-1 und antagonisiert die SF-1-vermittelte Gentranskription, ähnlich wie auch chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF). Umgekehrt wird die DAX-1-Expression durch SF-1 aktiviert (199, 202). DAX-1 kann also u. a. zu einer Hemmung der ACTH-R-Promoter-Aktivität beitragen. Die SF-1-Proteinexpression zeigte sich durch ETO nicht verändert, aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines phospho-spezifischen SF-1-Antikörpers konnte der Phosphorylierungsstatus jedoch nicht untersucht werden. Gyles et al konnten zeigen, dass eine ERK-Aktivierung in einer verstärkten Phosphorylierung von SF-1 resultiert (179). Daraus könnte man bei einer Hemmung der ERK-Phosphorylierung, wie durch ETO gezeigt, eine verminderte SF-1-Aktivität erwarten.

4.4 Effekte der Adrenostatika auf Wachstumsverhalten und Zellmorphologie

In den Wachstumskurven zeigte sich für ETO eine dosisabhängige signifikante Suppression des Zellwachstums auch in Bereichen, die unterhalb der hypnotisch wirkenden Konzentration von 6 μM lagen (82).

Der proliferationshemmende Effekt ließ sich durch die Substitution von 5 μM Hydrocortison nicht aufheben.

Dazu lassen sich folgende Erklärungshypothesen aufstellen :

1. die Proliferationshemmung wird nicht oder zumindest nicht allein durch Steroidmangeleffekte hervorgerufen.
2. Die Substitution von 5 μM Hydrocortison führte intrazellulär nicht zu einem Ausgleich des Hormonmangels
3. Der Mangel anderer Hormone, die nicht substituiert wurden, bewirkt einen proliferationshemmenden Effekt

Dass ein Steroidmangel an der Wachstumsverzögerung beteiligt sein muss, lässt die Tatsache vermuten, dass die Inkubation von NCI-h295-Zellen mit AG ebenfalls zu einer geringfügigen Wachstumsverzögerung führte, die zumindest teilweise durch Substitution mit 12 μM Hydrocortison reversibel war. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich ETO und AG sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Angriffspunkt an den Steroidbiosynthese-Enzymen, so dass hier ein genereller Effekt adrenostatisch wirkender Substanzen vorliegen muss.

Die Hydrocortison-Konzentration von 5 μM lag über der bei unbehandelten Kontrollzellen nach Beendigung der 10-tägigen Inkubationszeit im Kulturmedium gemessenen maximalen Cortisol-Konzentration, so dass extrazellulär ein ausreichendes Cortisolangebot vorhanden war. Möglicherweise konnte jedoch intrazellulär kein suffizienter Ausgleich erzielt werden.

In der Literatur werden meist proliferationshemmende Wirkungen durch Glukokortikoide beschrieben. So führte die Inkubation von Ratten-Nebennieren-Organokulturen mit Hydrocortison zu einer signifikanten Abnahme der Zellteilungsaktivität (203). Corticosteron führte zu einer Inhibition der Zellreplikation von Y1-Zellen (204). In den Untersuchungen von Arola et al. zeigte sich eine geringe proliferationsfördernde Wirkung von Corticosteron auf das Proliferationsverhalten unbehandelter Primärkulturzellen fetaler Rattennebnieren. ACTH führte nach 72-stündiger Inkubation zu einem proliferationsfördernden Effekt, der sich durch Koinkubation mit Corticosteron hemmen ließ. Etomidat bewirkte eine Wachstumsinhibition unbehandelter Zellen, zeigte jedoch bei ACTH-vorbehandelten Zellen eine Steigerung der Proliferationsrate (205)

Betrachtet man die Signaltransduktionsebene, so lässt sich für Dexamethason eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von Erk1/2 (extracellular signal regulated kinase 1 und 2), einem Schlüsselprotein der MAP Kinase Kaskade und c-Jun N-terminal kinase (JNK) nachweisen (206, 207). Beide Proteine sind in wachstumsaktivierende Signalwege involviert. Es ließ sich beobachten, dass der Glukokortikoidrezeptor nach Bindung mit seinem Liganden die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, (u. a. AP-1, NF κ B) durch Protein-Protein-Interaktion antagonisieren konnte (208). Fernandes

et al. konnten für Glukokortikoide einen hemmenden Effekt auf die Cyclin D1-Synthese nachweisen, ein Einfluss auf die Erk-Aktivierung war nicht feststellbar (209).

Diese Daten machen den Mangel an Glukokortikoiden durch Etomidat-Behandlung als Ursache für eine wachstumshemmende Wirkung eher unwahrscheinlich. Da neben der Synthese von Cortisol als Hauptvertreter der Glukokortikoide in höheren Dosen auch die Synthese der adrenalen Androgene und der Mineralokortikoide inhibiert wird, wäre der Mangel an diesen Hormonen als wachstumshemmender Mechanismus zu überlegen. Die Inkubation der Nebennierentumorzelllinie SW-13 mit Testosteron, DHEA, 17β Östradiol, Cortisol und Aldosteron über 24 Stunden führte in einer Studie von Brown et al. zu folgendem Ergebnis: 17β Östradiol und Testosteron führten zu einer deutlichen Erhöhung der Erk1- und Erk2-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen, während DHEA, Cortisol und Aldosteron ohne Einfluss auf die Erk-Aktivierung blieben (210). Peterziel et al. demonstrierten ebenfalls die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges durch Dihydrotestosteron in Prostatakarzinomzellen (211). Im Gegensatz dazu beschreibt die Gruppe um degli Uberti einen hemmenden Effekt von Dihydrotestosteron auf das Proliferationsverhalten von NCI-h295 Zellen (212, 213).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ETO in einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ zu einer Hemmung der ERK-1 und -2-Phosphorylierung und damit zu einer Hemmung des MAPK-Signaltransduktionsweges führt. Die in den Wachstumskurven festgestellten proliferationshemmenden Effekte zeigten sich bei Konzentrationen, bei denen bereits auch das P450_{scc}-Enzym gehemmt wurden, d. h. auch die adrenalen Androgene erniedrigt waren. Man könnte also anhand der oben aufgeführten Daten zur Androgen-induzierten Aktivierung der MAPK davon ausgehen, dass die verminderte ERK-Phosphorylierung Resultat einer Androgendefizienz ist und eine Verminderung der Zellproliferation zur Folge gehabt hat. In niedrigeren Konzentrationen, in denen es infolge der initialen P450_{c11}-Inhibition zu einer Androgenakkumulation kommt, wäre demnach ein gegenteiliger Effekt mit Aktivierung von ERKs und Zellproliferation zu erwarten.

In den MTT-Tests ließ sich der proliferationshemmende Effekt von ETO auf NCI-h295-Zellen nicht bestätigen. Für die weiter untersuchten adrenalen Zellen (SW-13 und Rinder-NNR-Primärkultur) ließ sich lediglich in hohen Konzentrationen eine Wachstumsverzögerung feststellen.

HT-29- und MCF-7-Zellen zeigten keine Proliferationshemmung durch ETO, möglicherweise ein Hinweis, dass es sich um einen NN-spezifischen Effekt handelt.

Es stellt sich die Frage, wie diese Diskrepanz zwischen den beiden unterschiedlichen Methoden der Zellproliferationserfassung zu erklären ist.

Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen und setzt voraus, dass die Zahl der intrazellulär vorhandenen Mitochondrien konstant bleibt und mit der Zellzahl korreliert.

Diese Konstanz der Mitochondrienzahl ist jedoch nicht immer gegeben. So konnte beobachtet werden, dass Skelettmuskeln, die über einen längeren Zeitraum zur Kontraktion stimuliert wurden, mit einer starken Zunahme der Mitochondrienzahl bis auf das 5-10fache reagierten (99). Da die beiden durch ETO inhibierten Steroidbiosynthese-Enzyme P450_{sc} und P450_{c11} mitochondrial lokalisiert sind, könnte eine Veränderung der Morphologie sowie der Zahl der Mitochondrien ein Erklärungsmodell für die unterschiedlichen Ergebnisse der Zellzählungsversuche der Wachstumskurven und der MTT-Tests sein.

Es wäre also vorstellbar, dass eine reaktive Vermehrung der Mitochondrienzahl infolge Inkubation mit ETO erfolgt sein könnte.

Aus diesem Grund wurden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Hierbei ließ sich zumindest eine Veränderung der Mitochondrienmorphologie durch ETO ausschließen. Die Frage nach der Zahl der Mitochondrien bei ETO-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen war nicht eindeutig zu beantworten, es kam zumindest zu keiner gravierenden Veränderung der Mitochondrienzahl.

Weiterhin könnte die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase, die für die Farbstoffumwandlung beim MTT-Test verantwortlich ist, durch ETO gesteigert werden. Für die MTT-Test-Versuche wurde die adhärent wachsende Form der NCI-h295-Zellen eingesetzt, während für die Wachstumskurven die in Suspension wachsende Form

verwendet wurde. Es ist bekannt, dass eine Reihe von Membranproteinen einen wesentlichen Einfluss auf intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse haben (96), so dass hier eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der beiden Zellformen zu vermuten ist.

Desweiteren stellte sich die Frage, ob die in den Wachstumskurven nachgewiesene Verminderung der Zellzahl Folge einer Verlangsamung des Zellzyklus ist oder durch die Auslösung von Apoptose zustande kam.

Das Wachstumsmuster im Zeitverlauf ließ eine Verzögerung des Zellzyklus mehr als eine Verminderung der Zellzahl durch apoptotische Prozesse vermuten, denn auch bei den ETO-behandelten Zellen zeigte sich eine kontinuierliche, wenn auch verminderte Zunahme der Zellzahl, während bei Apoptoseprozessen eine rasche und kontinuierliche Abnahme der Zellzahl zu erwarten wäre.

Die durchgeführte Zellzyklusanalyse zeigte keine signifikante Verzögerung des Zellzyklus durch ETO, eine gewisse Tendenz lässt sich jedoch erkennen (s. Tab 8)

So befanden sich nach 24-stündiger Inkubationszeit 4,6% der Kontrollzellen in der Interphase nach Durchlaufen eines weiteren Zellzyklus gegenüber 1,3% der Zellen, die mit 60 μM ETO behandelt worden waren und nach 48-stündiger Inkubationszeit 40,8% der Kontrollzellen versus 28,6% der mit 60 μM ETO behandelten Zellen. Nach 72 Stunden ließen sich 59,2% der Kontrollzellen in der Interphase nach erfolgter weiterer Replikation nachweisen, während sich 72,4% der mit ETO behandelten Zellen in dieser Phase befanden, was sich dadurch erklären lässt, dass bereits mehr Zellen der Kontrolle in die folgende Synthesephase übergegangen sind.

Die ergänzend durchgeführten Untersuchungen zur Apoptose schlossen wie erwartet diesen Mechanismus als entscheidenden Effekt einer antiproliferativen Wirkung Etomidats aus. Der Anteil apoptotischer sowie nekrotischer Zellen war bei ETO-behandelten und bei unbehandelten Kontrollzellen gleich groß.

5. Zusammenfassung

Etomidat wird aufgrund seines raschen Wirkungseintrittes, einer hohen adrenostatischen Potenz und seiner verhältnismäßig guten klinischen Verträglichkeit zunehmend in der Behandlung des ausgeprägten Hyperkortisolismus verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Etomidat auf die adrenale Steroidbiosynthese, die ACTH-Rezeptor-Expression und das Proliferationsverhalten der Nebennierenrinde untersucht. Als Antwort auf die einleitend genannten Fragestellungen lässt sich folgendes zusammenfassen:

Bezüglich der Wirkung auf die **Steroidbiosynthese** erwies sich Etomidat als bislang potentestes Adrenostatikum, das eine frühzeitige Inhibition von P450c11 und in höheren Konzentrationen eine Inhibition von P450scc zeigte. Weiterhin besitzt ETO eine bislang noch nicht beschriebene inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der DHEA-Sulphotransferase. Auf mRNA-Ebene führte ETO zu einer leichtgradigen Verminderung der Expression von P450c17 und P450c21, auf Proteinebene ließ sich dahingegen eine deutlich vermehrte Expression von P450scc und eine leichtgradig vermehrte Expression von StAR nachweisen.

Die Expression des **ACTH-Rezeptors** wird durch Etomidat sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zumindest in hohen Konzentrationen gehemmt, ein Hinweis darauf, dass die ACTH-R-Expression durch intrazellulär vorhandene Steroidhormone beeinflusst wird. Der für die ACTH-R-Expression als wesentlich relevant beschriebene Transkriptionsfaktor SF-1 bleibt zumindest im Ausmaß seiner Proteinexpression durch ETO unbeeinflusst.

Ein signifikanter dosisabhängiger Einfluss von ETO auf das **Proliferationsverhalten** adrener Zellen lässt sich in den Wachstumskurven nachweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die reduzierte Phosphorylierung von ERK-1 und -2, die möglicherweise partiell als Folge eines intrazellulären Androgenmangels zu sehen ist. Die Ergebnisse der MTT-Tests zeigen in sehr hohen Konzentrationen einen proliferationshemmenden Effekt auf adrenale Zellen, die nichtadrenalen Tumorzellen

MCF-7 und HT-29 bleiben unbeeinflusst. Die Verminderung der Zellzahl ist eher durch eine Verzögerung des Zellzyklus als durch die Auslösung von Apoptose zu erklären. Morphologische Veränderungen durch ETO ließen sich in den elektronenmikroskopischen Darstellungen nicht nachweisen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Addison T : "On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules." London, Highley, 1855
- 2 Brown-Sequard, C. E.: Recherches experimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules suprarenales. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'academie des sciences. Paris 1856; 43: 422 425, 542 546
- 3 Labhart Alexis : „Klinik der inneren Sekretion“, Springer Verlag, 3. Neubearbeitete Auflage 1978
- 4 Langman J : Medizinische Embryologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1989, 8. Auflage, 342-343
- 5 Fleischhauer K : Nebennieren, in Drenckhahn D. Zenker (Hrsg.) Benninghoff : Anatomie, Urban und Schwarzenberg Verlag 1994, Band 2, 200-208
- 6 Schmidt RF, Thews G (Hrsg.) : Physiologie des Menschen. Springer Verlag Berlin 1995, 26. Auflage
- 7 Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M : Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. Z Rheumatol 2000; 59(2):II/12-7
- 8 Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW : Cellular immune-endocrine interaction in adrenocortical tissues. Eur J Clin Invest 2000; 30(S3):1-5
- 9 Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lubke C, Ehrhart-Bornstein M : Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. Endocrinology, 1998, 139(2):772-80
- 10 Bornstein SR : Adrenocortical Tumors: Recent Advances in Basic Concepts and Clinical Management. Ann Intern Med. 1999;130:759-771
- 11 Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA : Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. Cell Tissue Res 1991, 265:1-9
- 12 Andreis PG, Neri G, Prayer-Galetti T, Rossi GP, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG : Effects of adrenomedullin on the human adrenal glands : an in vitro study. J Clin Endocrinol Metab; 1997, 82: 1167-1170
- 13 Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum W, Vinson GP : Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocrine Reviews 1998, 19(2):101-143

- 14 Takahashi K, Yoshinoya A, Murakami O, Totsune Kazuhito, Shibahara Shigeki : Secretion of Endothelin-1 and Adrenomedullin by SW-13 human adrenocortical carcinoma cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000, 36(S1):393-394
- 15 L'Allemand D, Biason-Lauber A : Intra-adrenal regulation of androgen synthesis. *Eur J Clin Invest*, 2000;30(S3):28-33
- 16 Nussdorfer GG, Rossi GP, Belloni AS : The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol* 1997, 171:267-308
- 17 Belloni AS, Pacheco YG, Markowska A, Andreis PG, Meneghelli V, Malendowicz LK, Nussdorfer GG: Distribution and functional significance of the endothelin receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1997, 288:345-52
- 18 L'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Baehr V, Oelkers W, Saez JM : Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:3892-3897
- 19 Zatelli MC, Rossi R, Del Senno L, Degli Uberti EC : Role of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in mediating androgen-induced growth inhibition in human adrenal cortex in vitro. *Steroids*, 1998, 63:243-245
- 20 Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon HB, Fenster BD, Martin MB : The role of transforming growth factor β in the regulation of estrogen receptor expression in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrinology*, 1997, 138:1498-1505
- 21 Kim IY, Kim JH, Zelner DJ, Ahn HJ, Sensibar JA, Lee C : Transforming growth factor β 1 is a mediator of androgen-regulated growth arrest in an androgen-responsive prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinology*, 1996, 137 : 991-999
- 22 Lebrethon MC, Jaillard C, Naville D, Begeot, M, Saez JM : Effects of transforming growth factor- β 1 on human adrenocortical fasciculata-reticularis cell differentiated functions. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79:1033-1039
- 23 Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ, Engelhardt D : Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells. *Endocrinology* 1997, 138(5):2207-2210
- 24 Páth G, Bornstein SR, Spáth-Schwalbe E, Scherbaum WA : Direct effects of interleukin-6 on human adrenal cells. *Endocr Res* 1996, 22:867-873
- 25 Jäättelä M, Ilvesmäki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E : Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and

-
- steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991,128:623-629
- 26 Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Scherbaum WA, Bornstein SR : Human adrenal cells express tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid : evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 81:807-813
- 27 Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW, Peter M, Sippell WG, Scherbaum WA : Relevance of major histocompatibility complex class II expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:3136-3140
- 28 Marx C, Wolkersdörfer GW, Brown JW, Scherbaum WA, Bornstein SR : MHC class II expression – a new tool to assess dignity in adrenocortical tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:4488-4491
- 29 Nickerson PA, : Quantitative study on the effect of an ACTH-producing pituitary tumor on the ultrastructure of the mouse adrenal gland. *Am J Pathol* 1975, 80:295-308
- 30 Mesiano S, Jaffe RB : Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 1997, 18:378-403
- 31 Ramachandran J, Suyama AT : Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975, 72:113-117
- 32 Di Blasio AM, Fuji DK, Yamamoto M, Martin MC, Jaffe RB : Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotropic hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings. *Biol Reprod* 1990, 42: 683-91
- 33 Estivaritz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ : Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature* 1982, 297:419-22
- 34 Estivaritz FE, Hope J, McLean C, Lowry PJ : Purification and characterization of a gamma-melanotropin precursor from frozen human pituitary glands. *Biochem J* 1980, 191:125-32
- 35 Bransome ED : Regulation of adrenal growth: Differences in the effects of ACTH in normal and dexamthasone-suppressed guinea pigs. *Endocrinology* 1968, 83:956-64
- 36 Lowry PJ, Estivaritz FE, Silas L, Linton EA, McLean C, Crocombe K : The case for pro-gamma-MSH as the adrenal growth factor. *Endocr Res* 1984, 10:243-58

-
- 37 Estivaritz FE, Morano MI, Carino M, Jackson S, Lowry PJ : Adrenal regeneration in the rat is mediated by mitogenic N-terminal pro-opiomelanocortin peptides generated by changes in precursor processing in the anterior pituitary. *J Endocrinol* 1988, 116:207-16
- 38 Bicknell AB, Hutchinson EG, Lomthaisong K, Gladwell RT, Lowry PJ : Three dimensional structure of an adrenal protease predicts substrate specificity and retention at site of secretion in compensatory growth. *J Endocrinol* 1998, 159:OC31
- 39 Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HPJ, Gladwell TR, Lowry PJ: Characterization of a serine protease that cleaves pro- γ -melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell*, 2001, 105:903-912.
- 40 Peter M, Dubuis JM : Transcription factors as regulators of steroidogenic P450-Enzymes. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(S3): 14-20
- 41 Karlson P, Doenecke D, Koolman J : Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 14 Auflage 1994, 276-284
- 42 Stryer L, Biosynthese von Membranlipiden und Steroidhormonen, in *Biochemie*, Spektrum Verlag 1994, 573-600
- 43 Stocco DM : Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol*, 2001, 15 (8): 1245-54
- 44 Kallen CB, Arakane F, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Strauss JF : Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 145:39-45
- 45 Heitz PU, Klöppel G : Nebennieren. In Böcker, Denk, Heitz (Hrsg.): *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg-Verlag, 1. Auflage 1997, 381-393
- 46 Williams G, Dluhy R: Erkrankungen der Nebennierenrinde. In (Hrsg): *Harrisons Innere Medizin*, 13. Auflage, 2285-2298.
- 47 Deetjen P, Speckmann E-J: *Physiologie*. 1. Auflage; Urban und Schwarzenberg München Wien Baltimore, 1992, 376-379, 386-387, 514-516, 520-522.
- 48 Orth D, Kovacs W, De Bold C: The adrenal cortex. In Wilson J und Foster DNA (Hrsg): *Williams Textbook of Endocrinology*. 8. Auflage; Saunders Philadelphia; 1992:489-621
- 49 Esteban NV, Vergey AL: Cortisol production rates measured by liquid chromatography/mass spectrometry. *Steroids* 1990, 55:152-158
- 50 Herold G: *Innere Medizin*. Gerd Herold Köln 1999, 625-28

-
- 51 Saeger W : Histopathological classification of adrenal tumours. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30 (S3):58-62
 - 52 Reincke M, Beuschlein F, Slawik M, Borm K : Molecular adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30(S3):63-68
 - 53 Allolio B: Adrenal Incidentalomas. In: Margioris AN, Chrousos GP (Hrsg.) *Contemporary Endocrinology: Adrenal Disorders*, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey 2001; 249-261
 - 54 Schulte HM : Hyperkortisolismus – Cushing-Syndrom. In : Allolio B und Schulte H (Hrsg.): *Praktische Endokrinologie 1. Auflage*, Urban und Schwarzenberg, 1996:219-27
 - 55 Chrousos GP. Recent Advances in Diagnostic and Therapeutic Strategies, pp 764-769. In: Bornstein SR, moderator. *Adrenocortical tumors : recent advances in basic concepts and clinical management*. *Ann Intern Med*. 1999;130:759-771
 - 56 Allolio B. : Nebennierenrindenzarzinom. In : Allolio B und Schulte H. (Hrsg.): *Praktische Endokrinologie. 1. Auflage*; Urban und Schwarzenberg;1996:228-30
 - 57 Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Ferreira Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA : Adrenocortical carcinoma : clinical and laboratory observations. *Cancer*, 2000,88(4):711-36
 - 58 Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonnin A, Bricaire H : Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990, 322:1195-201
 - 59 Kopf DNA, Goretzki PE, Lehnert H : Clinical management of malignant adrenal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127(3):143-55
 - 60 Tritos NA, Cushing GW, Heatley G, Libertino JA : Clinical features and prognostic factors associated with adrenocortical carcinoma : Lahey Clinic Medical Center Experience. *The american surgeon* 2000
 - 61 Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuls Y, Luton JP : Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol*, 1994, 40:465-77.
 - 62 Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis W, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP, Allolio B: Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res*, 1994, 54:4927-32.

-
- 63 Wachenfeld C, Beuschlein F, Zwermann O, Mora P, Fassnacht M, Allolio B, Reincke M : Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful ? *Eur J Endocrinol* 2001, 145:335-341
- 64 Hansen P, Bax T, Swanstrom L. Laparoscopic adrenalectomy: history, indications and current techniques for a minimally invasive approach to adrenal pathology. *Endoscopy* 1997, 29 :309-14
- 65 Terzolo M, Pia A, Berruti A, Osella G, Ali A, Carbone V, Testa E, Dogliotti L, Angeli A : Low-Dose Monitored Mitotane Treatment Achieves the Therapeutic Range with Manageable Side Effects in Patients with Adrenocortical Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 84(6):2234-38
- 66 Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P: Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1195-1201
- 67 Hogan TF, Citrin DL, Johnson BM, Nakamura S, Davis TE, Borden EC: o,p-DDD (mitotane) therapy of adrenal cortical carcinoma: observations on drug dosage, toxicity and steroid replacement. *Cancer* 1978, 42:2177-81
- 68 Haak HR, van Seters AP, Moolenaar AJ: Mitotane therapy of adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* 1990, 323:758
- 69 Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, Krans HM: Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer* 1994, 69:947-51
- 70 Johnson DH, Greco FA : Treatment of metastatic adrenal cortical carcinoma with cisplatin and etoposide (VP-16). *Cancer* 1986, 58:2198-202
- 71 Schlumberger M, Ostronoff M, Bellaiche M, Rougier P, Droz JP, Parmentier C : 5-Fluorouracil, doxorubicin and cisplatin regimen in adrenal cortical carcinoma. *Cancer* 1988, 61:1492-4
- 72 Allolio B, Reincke M, Arlt W, Deuss U, Winkelmann W, Siekmann L : Suramin for treatment of adrenocortical carcinoma. *Lancet* 1989, 2:277
- 73 Arlt W, Reincke M, Siekmann L, Winkelmann W, Allolio B : Suramin in adrenocortical cancer: limited efficacy and serious toxicity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994, 41:299-307
- 74 Engelhardt D, Weber MM : Therapy of Cushing's Syndrome with Steroid Biosynthesis Inhibitors. *J Steroid Biochem.* 1994, 49:(4-6):261-267

-
- 75 Allolio B, Arlt W, Reincke M : Medical treatment of Cushing's syndrome. In: von Werder K, Fahlbusch R. (Hrsg.): Pituitary adenomas: from basic research to diagnostic and therapy. Elsevier Science 1996:223-9
- 76 Krakoff J, Koch CA, Calis KA, Alexander RH, Nieman LK: Use of parenteral propylene glycol-containing etomidate preparation for the long term management of ectopic Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:4104-4108
- 77 Drake WM, Perry LA, Hinds CJ, Lowe DG, Reznick RH, Besser GM: Emergency and prolonged use of intravenous etomidate to control hypercortisolemia in a patient with Cushing's syndrome and peritonitis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:3542-3544
- 78 Ledingham I, Watt I : Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet*, 1983, June 4, p1270
- 79 Lee Wagner R, White PF : Etomidate versus thiopental – comparative effects on adrenocortical function. *Anesthesiology*, 1984, 81
- 80 Fellows W, Bastow MD, Byrne AJ, Allison SP : Adrenocortical suppression in multiple injured patients: a complication of etomidate treatment. *Br Med J*, 1983, 287:1835-37
- 81 Allolio B, Stuttmann R, Leonhard U, Fischer H, Winkelmann W : Adrenocortical suppression by a single induction dose of etomidate. *Klin Wochenschr*, 1984, 62 (21):1014-7
- 82 Schulte HM, Benker G, Reinwein DNA, Sippell WG, 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: 1426-1430
- 83 Varga I, Racz K, Kiss, R, Füto L, Toth M, Sergev O, Glaz E : Direct inhibitory effect of etomidate on corticosteroid secretion in human pathologic adrenocortical cells. *Steroids*; 1993; 58:64-68
- 84 Lambert A, Frost J, Mitchell R, Robertson, WR : On the assessment of the in vitro biopotency and site(s) of action of drugs affecting adrenal steroidogenesis. *Ann Clin Biochem*; 1986; 23:225-229
- 85 Lamberts SWJ, Bons EG, Bruining HA, De Jong FH : Differential effects of the imidazole derivatives etomidate, ketoconazole and miconazole and of metyrapone on the secretion of cortisol and its precursors by human adrenocortical cells. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1987; 240:259-64

-
- 86 Kenyon CJ, Young J, Gray CE, Fraser R : Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984;58(5):947-49
- 87 Lambert A, Mitchell R, Robertson WR : Effect of propofol, thiopentone and etomidate on adrenal steroidogenesis in vitro. *Br J Anaesth*, 1985;57:505-508
- 88 Kenyon CJ, McNeil LM, Fraser R : Comparison of the effects of etomidate, thiopentone and propofol on cortisol synthesis. *Br J anaesth*, 1985;57,509-511
- 89 De Jong FH, Mallios C, Jansen C, Scheck PAE, Lamberts SWJ : Etomidate suppresses adrenocortical function by inhibition of 11 β -hydroxylation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59:1143-47
- 90 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, 71:933-938
- 91 Fry DE, Griffith H : The inhibition by etomidate of the 11 β -hydroxylation of cortisol. *Clin Endocrinol*, 1984, 20:625-629
- 92 Allolio B, Dörr H, Stuttmann R, Knorr DNA, Engelhardt DNA, Winkelmann W : Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin Endocrinol*, 1985, 22
- 93 Satre M, Vignais PV : Steroid 11beta-hydroxylation in beef adrenal cortex mitochondria. Binding affinity and capacity of ¹⁴Csteroids and for 3Hmetyrapon, an inhibitor of the 11beta-hydroxylation reaction. *Biochemistry* 1974,13:2201-9
- 94 Miller J, Crapo L : The medical treatment of Cushing's syndrome with steroid biosynthesis inhibitors. *Endocr Rev* 1993,14:443-58
- 95 Vanden Bossche H : Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis : from research to medical treatment. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 1992, 43(8) : 1003-1021
- 96 Danen EHJ, Yamada KM: Fibronectins, integrins and growth control. *J Cell Physiol* 2001, 189:1-13
- 97 Johnson DG, Walker CL : Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39:295-312
- 98 Jockusch B : Die Vermehrung der Zellen. In Campbell NA (Hrsg.), *Biologie*, Spektrum Verlag 1998, 223-242
- 99 Alberts B, Bray DNA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD : Der Zellteilungszyklus. In *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, VCH-Verlag 1995, 1019-1076

-
- 100 Molinari M : Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation* 2000, 33(5):261-274
- 101 Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A : The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Reviews* 1999, 20(4):501-534
- 102 Dhanasekaran N: Cell signaling: an overview. *Oncogene* 1998, 17:1329-1330
- 103 Hetts SW : To die or not to die, an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998, 279(4):300-307
- 104 Renehan AG, Booth C, Potten CS : What is apoptosis and why is it important ? *BMJ* 2001,322:1536-1538
- 105 Ueda N, Shah SV : Apoptosis. *J Lab Clin Med* 1994, 124:169-177
- 106 Raff M : Cell suicide for beginners. *Nature* 1998, 396:119-122
- 107 Cohen JJ : Apoptosis : physiologic cell death. *J Lab Clin Med* 1994, 124:761-765
- 108 Matsuzawa A, Ichijo H : Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase-1. *J Biochem* 2001, 130:1-8
- 109 Sjöström J, Bergh J : How apoptosis is regulated and what goes wrong in cancer. *BMJ* 2001,322:1538-1539
- 110 Guo M, Hay BA : Cell proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 1999, 11:745-752
- 111 Schioth HB, Chhajlani V, Muceniece R, Klusa V, Wikberg JE : Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci* 1996, 59:797-801
- 112 Clark AJ, Cammas FM : The ACTH-receptor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996, 10:29-47
- 113 Kapas S, Cammas FM, Hinson JP, Clark AJ : 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
- 114 Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M : ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol* 2001, 144:199-206
- 115 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 adenoma. *Endocr J* 1994, 41:107-13
- 116 Arola J, Heikkila P, Voutilainen R, Kahri AI : Protein kinase C signal transduction pathway in ACTH-induced growth effect of rat adrenocortical cells in primary culture. *J Endocrinol* 1994, 141:285-93
- 117 Parissenti AM, Kirwan AF, Kim SA, Colantonio, Schimmer B : Molecular strategies for the dominant inhibition of protein kinase C. *Endocr Res* 1996, 22:621-30
- 118 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
- 119 Yamazaki T, Higuchi K, Kominami S, Takemori S : 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediates adrenocorticotropin action in bovine adrenal steroidogenesis. *Endocrinology* 1996, 137:2670-5
- 120 Wikberg JES, 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
- 121 Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD : The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992, 257:1248-51
- 122 Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD : ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994, 99,R17-R20
- 123 Naville DNA, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P, Begeot M : Genomic structure and promote characterization of the human ACTH receptor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997,230:7-12
- 124 Qiu R, Tsao J, Kwan WK, Schimmer BP : Mutations to forskolin resistance result in loss of adrenocorticotropin receptors and consequent reductions in levels of G protein- α subunits. *Molecular Endocrinology* 1996, 10:1708-1781
- 125 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM : Regulation of bovine adrenal cell corticotropin receptor mRNA levels by corticotropin (ACTH) and angiotensin-II (A-II). *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994, R7-R10
- 126 Lebrethon MC, Naville DNA, Begeot M, Saez JM : Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest* 1994, 93:1828-1833

-
- 127 Darbeida H, Durand P : Glucocorticoid enhancement of adrenocorticotropin-induced 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate production by cultured ovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 1987, 121:1051-1055
- 128 Picard-Hagen N, Penhoat A, Hue DNA, Jaillard C, Durand P : Glucocorticoids enhance corticotropin receptor mRNA levels in ovine adrenocortical cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 1997, 19:29-36
- 129 Fassnacht M, Beuschlein F, Vay S, Mora P, Allolio B, Reincke M : Aminoglutethimide suppresses adrenocorticotropin receptor expression in the NCI-h295 adrenocortical tumor cell line. *Journal of Endocrinology* 1998, 159:35-42
- 130 Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P : DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 1998, 139:4237-4243
- 131 Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD: Interaction between Dax-1 and SF-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 2002. 143, 665-673
- 132 Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P: DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implication for steroidogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83:2597-2600
- 133 Allolio B, Reincke M : Adrenocorticotropin receptor and adrenal disorders. *Med Klin* 1996, 91, 1, 24-32
- 134 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, 24:845-849
- 135 Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV : Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 1990, 50:5488-96
- 136 Rainey WE, Bird IM, Mason JI : The NCI-h295 cell line : a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994, 100:45-50
- 137 Staels B, Hum DW, Miller W : Regulation of steroidogenesis in NCI-h295 cells : a cellular model of the human fetal adrenal. *Molecular Endocrinology* 1993, 7:423-433
- 138 Rainey WE, Bird IM, Sawetawan C, Hanley NA, McCarthy JL, McGee EA, Wester R, Mason I : Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-h295) production of C₁₉-steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77:731-737

-
- 139 Zatelli MC, Rossi R, Degli Uberti EC : Androgen influences transforming growth factor- β 1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*,2000,85:847-852
- 140 Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE : Human NCI-h295 adrenocortical carcinoma cells : a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 1993, 133:1555-1561
- 141 Bird IM, Mason JI, Rainey WE : Regulation of type 1 angiotensin II receptor messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical carcinoma h295 cells. *Endocrinology* 1994, 134:2468-2474
- 142 Reincke M, Fassnacht M, V ath S, Mora P, Allolio B : Adrenal incidentalomas : a manifestation of the metabolic syndrome. *Endocrine Research* 1996, 22(4):757-761
- 143 Bodart V, Rainey WE, Fournier A, Ong H, DeLean A : The h295R human adrenocortical cell line contains functional atrial natriuretic peptide receptors that inhibit aldosterone biosynthesis. *Mol Cell Endocrinol* 1996, 118:137-44
- 144 Rossi GP, Albertin G, Bova S, Belloni AS, Fallo F, Pagotto U, Trevisi L, Palu G, Pessina AC, Nussdorfer G: Autocrine-paracrine role of endothelin-1 in the regulation of aldosterone synthase expression and intracellular Ca^{2+} in human adrenocortical carcinoma NCI-h295 cells. *Endocrinology* 1997, 138:4421-4426
- 145 Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B . New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest*, 2000(S3), 76-82
- 146 Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G :Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Research* 1966, 26:529
- 147 Schimmer BP : Adrenocortical Y1 cells. *Methods in Enzymology* 1979, 58:570-574
- 148 Rae PA, Tsao J, Schimmer BP: Evaluation of receptor function in ACTH-responsive tumor cells. *Can J Biochem* 1979, 57 (6):509-16
- 149 Leibovitz A, McCombs WM, Johnston DNA, McCoy CE, Stinson JC: New human cancer cell culture lines. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst* 1973, 51:691-7
- 150 Itoh S, Tanaka K, Horiuchi T, Kumagae 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

-
- 151 Weber MM, Michl P : Primary culture of bovine and human adult adrenocortical cells. *Endocrine Methods* 1996, :393-416
- 152 Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975, 98:503-17
- 153 Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR: Method of detection of specific RNAs with agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 16:4743-51
- 154 Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1984, 137:266-67
- 155 Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD: The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992, 257:1248-51
- 156 Leader DP, Gall I, Campbell P, Frischauf AM: Isolation and characterization of cDNA clones from mouse skeletal muscle actin mRNA. *DNA* 1986,5:235-8
- 157 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970.227:680-5.
- 158 Mosmann T :Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55-63
- 159 Denizot F, Lang R : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods* 1986, 89:271-277
- 160 Böhmer RM, Ellwart J: Combination of BudR-quenched Hoechst fluorescence with DNA-specific ethidiumbromide fluorescence for cell cycle analysis with a two-parametrical flow cytometer. *Cell Tissue Kinet* 1981, 14:653-658
- 161 van Engeland Manon, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM : Annexin V-affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, 31:1-9
- 162 Rossi M : Structural studies of metyrapone: a potent inhibitor of cytochrome P-450. *J Med Chem* 1983, 26:1246-52
- 163 Cheng S, Harding B, Carballeira A: effects of metyrapone on pregnenolone biosynthesis and on cholesterol-cytochrome P450 interaction in adrenal. *Endocrinology* 1974, 94:1451-8
- 164 Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD: Insuline like growth factor type I increases concentrations of messenger RNA encoding cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990, 127:2481-8

-
- 165 Puryear TK, McLean MP, Khan I, Gibori G: Mechanism for control of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and cytochrome P450 side chain cleavage message and enzyme in the corpus luteum. *Endocrinology* 1990,126:2910-8
- 166 Reincke M, Beuschlein F, Latronico AC, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B: Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms: correlation with P450 expression. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997, 46:619-26
- 167 Penhoat A, Ouali R, Viard I, Langlois D, Saez J : Regulation of primary response and specific genes in adrenal cells by peptide hormones and growth factors. *Steroids* 1996, 61:176-183
- 168 Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Baity LA, Meade LC, Parker KL: A cell-specific nuclear receptor regulates the steroid hydroxylases. *Steroids* 1995,60:10-14
- 169 Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL: Expression profiles of SF-1, DAX-1 and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential intractins in gene regulation. *Endocrinology* 2001,15:57-68).
- 170 Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL: A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 1991,5(10):1552-61 ;
- 171 Shibata H, Ikeda Y, Morohashi K, Mukai T, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Hayashi K, Hayashi M, Saito I, Saruta T: Orphan receptors COUP-TF and DAX-1 as targets of disordered expression in adrenocortical tumors. *Endocr Res* 2000,26(4):1039-44).
- 172 Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC, Rainey W: Transcriptional regulation of human 11 β -hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology* 2000,141:3587-3594
- 173 Lin CJ, Martens JW, Miller WL: NF-1C, Sp1 and Sp3 are essential for transcription of the human gene for P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase) in human adrenal NCI-h295 cells. *Mol Endocrinol* 2001,15(8):1277-93
- 174 Mukai K, Mitani F, Agake R, Ishimura Y: Adrenocorticotrophic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors. *Eur J Biochem* 1998,256:190-200
- 175 Wu CH, Chen YF, Wang JY, Hsieh MC, Yeh CS, Lian ST, Shin SJ, Lin SR: Mutant K-ras oncogene regulates steroidogenesis of normal human adrenocortical cells by the RAF-MEK-MAPK pathway. *Br J Cancer* 2002; 87 (9):1000-5

-
- 176 Nishikawa T, Sasano H, Omura M, Suematsu S: Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by ACTH in bovine adrenal fasciculate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 5; 223
- 177 Brand C, Nury D, Chambaz EM, Feige JJ, Bailly S: transcriptional regulation of the gene encoding the StAR protein in the human adrenocortical cell line, h295R by camp and TGFbeta1. *Endocr Res* 2000.26(4):1045-53
- 178 Huang TJ, Li PS: Dexamethasone inhibits luteinizing hormone induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2001, 64, 163-170
- 179 Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM: ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) Gene. *J Biol Chem* 2001, 276 (37), 34888-34895
- 180 Walsh LP, Kuratko CN, Stocco DM: Econazole and miconazole inhibit steroidogenesis and disrupt steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression post-transcriptionally. *J Steroid Biochem* 2000, 75, 229-236
- 181 Darbeida H, Durand P: Mechanism of glucocorticoid enhancement of the responsiveness of ovine adrenocortical cells to adrenocorticotropin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990,160:1183-1191
- 182 Mokuda O, Ubukata E, Sakamoto Y: Glucocorticoids potentiate effect of ACTH on cortisol secretion in isolated perfused guinea pig adrenal glands. *Exp Clin Endocrinol Diab* 1997.105:119-121
- 183 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM: Regulation of bovine adrenal cell corticotropin receptor mRNA levels by corticotropin (ACTH) and angiotensin-II (A-II). *Mol Cell Endocrinol* 1994, 103:R7-10
- 184 Lebrethon MC, Jaillard C, Naville DNA, Begeot M, Saez JM: Regulation of corticotropin and steroidogenic enzyme mRNAs in human fetal adrenal cells by corticotropin, angiotensin-II and transforming growth factor beta 1. *Mol Cell Edocrinol* 1994, 106:137-143
- 185 Penhoat A, Lebrethon MC, Begeot M, Saez JM: Regulation of ACTH receptor mRNA and binding sites by ACTH and angiotensin-II in cultured human and bovine adrenal fasciculata cells. *Endocr Res* 1995, 21:157-68
- 186 Saez JM, Begeot M, Durand P: ACTH receptors. *Ann Endocrinol* 1989, 50:409-17

-
- 187 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM: Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989,86:4978-81
- 188 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM: Identification and characterization of corticotropin receptors in bovine and human adrenals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993,44:21-27
- 189 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM: Synergistic effects of corticotropin and insulin like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 165:355-359
- 190 Rainey WE, McAllister JM, Byrd EW, Mason JI, Carr BR: Regulation of corticotropin responsiveness in human fetal adrenal cells. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 165:1649-54
- 191 Durand P, Locatelli A: Up regulation of corticotropin receptors by ACTH 1-24 in normal and hypophysectomized rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1980, 96:447-56
- 192 Rainey WE, McAllister JM, Byrd EW, Mason JI, Carr BR: Regulation of corticotropin responsiveness in human fetal adrenal cells. *Am J Obstet Gynecol* 1991,165:1649-54
- 193 Naville D, Penhoat A, Barjhoux L, Jaillard C, Fontanay S, Saez J, Durand P, Begeot M: Characterization of the human ACTH receptor gene and in vitro expression. *Endocr Res* 1996,22:337-48
- 194 Naville D, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P, Begeot M: Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997,230:7-12
- 195 Cammas FM, Pullinger GD, Barker S, Clark AJ: 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
- 196 Morita TM, Imai T, Murata Y, Kambe F, Funahashi H, Takagi H, Seo H: Adrenocorticotropin hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. *Endocr J* 1995,42:475-80
- 197 Naville DNA, Bordet E, Berthelon MC, Durand P, Begeot M: Activator protein-1 is necessary for angiotensin-II stimulation of human adrenocorticotropin receptor gene transcription. *Eur J Biochem* 2001, 268:1802-1810
- 198 Naville DNA, Penhoat A, Durand P, Begeot M: Three steroidogenic factor binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 255(1):28-33

-
- 199 Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD: Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 2002; 143(2):665-673
- 200 Marchal R, Naville DNA, Durand P, Begeot M, Penhoat A: A steroidogenic factor-1 binding element is essential for basal human ACTH receptor gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 1998. 247:28-32
- 201 Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD: Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 2002, 143:3122-3135
- 202 Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I, Saruta T: Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001, 74:206-216
- 203 Szkudlinski M, Lewinski A, Sewerynek E, Zerek-Melen G, Kunert-Radek J: Hydrocortisone inhibits the basal and angiotensin II-stimulated proliferation of rat adrenocortical cells in organ culture. *Exp Clin Endocrinol* 1990,95(2):197-202
- 204 Saito E, Mukai M, Muraki T, Ichikawa Y, Homma M: Inhibitory effects of corticosterone on cell proliferation and steroidogenesis in the mouse adrenal tumor cell line Y-1. *Endocrinology* 1979,104(2):487-92
- 205 Arola J, Heikkila P, Voutilainen R, Kahri AI: Corticosterone regulates cell proliferation and cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of fetal rat adrenals. *Endocrinology* 1994;135(5):2064-9
- 206 Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC: Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J* 2001,20(24):7108-16
- 207 Gonzalez MV, Gonzalez-Sancho JM, Caelles C, Munoz A, Jimenez B: Hormone activated nuclear receptors inhibit the stimulation of the JNK and ERK signalling pathways in endothelial cells. *FEBS Lett* 2000;466(2-3):395
- 208 Almawi WY, Melemedjian OK: Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effect: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 2002,71:9-15

-
- 209 Fernandes D, Guida E, Koutsoubos V, Harris T, Vadiveloo P, Wilson LW, Stewart AG: Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression and Retinoblastoma Protein Phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999,21:77-88
- 210 Brown JW, Kesler CT, Neary T, Fishman LM: Effects of androgens and estrogens and catechol and methoxy-estrogen derivatives on mitogen-activated protein kinase (ERK(1,2)) activity in SW-13 human adrenal carcinoma cells. *Horm Metab Res* 2001,33(3):127-30
- 211 Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC: Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 1999,18(46):6322-9). Im Gegensatz dazu
- 212 Zatelli MC, Rossi R, degli Uberti EC: Androgen influences transforming growth factor beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000,85(2):847-52
- 213 Rossi R, Zatelli MC, Valentini A, Cavazzini P, Fallo F, del Senno L, degli Uberti EC: Evidence for androgen receptor gene expression and growth inhibitory effect of dihydrotestosterone on human adrenocortical cells. *J Endocrinol* 1998;159(3):373-80

Bisherige wissenschaftliche Veröffentlichungen

Fassnacht M, **Hahner S**, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B: New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. Eur J Clin Invest 2000 30:76-82

Fassnacht M, Franke A, Dettling A, **Hahner S**, Zink M, Wudy S, Allolio B: Clodronate inhibits adrenocortical cell proliferation and P450c21 activity. J Endocrinol 2002. 174(3):509-16

Fassnacht M, **Hahner S**, Hansen I, Kreuzberger T, Zink M, Adermann K, Jakob F, Troppmair J, Allolio B: N-terminal pro-opiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. J Clin Endocrinol Metab, Submitted

Fassnacht M, **Hahner S**, Zink M, Schammann M, Beuschlein F, Allolio B 2002: N-terminales Pro-Opiomelanocortin (N-POMC)-ein „neues“ Nebennieren-Mitogen. In 5. Nebennieren-Konferenz, Schattauer Verlag, in press

Poster / Vorträge

Hahner S, Fassnacht M, Zink M, Reincke M, Allolio B: Adrenostatic and antiproliferative activity of etomidate in a human adrenocortical cancer cell line. 1999, Exp Clin Endocrinol Diabetes 107 (Suppl 1) p153

Fassnacht M, **Hahner S**, Zink M, Adermann K, Beuschlein F, Allolio B: N-terminal pro-opiomelanocortin (N-POMC) acts as an adrenal mitogen. 2000 82nd meeting Endocrine Society P-864

Fassnacht M, Franke A, Dettling A, **Hahner S**, Zink M, Allolio B: Growth inhibitory effects of bisphosphonates in human adrenocortical cancer cells. 2000, Exp Clin Endocrinol Diabetes 108 (Suppl 1) pFR 037

Fassnacht M, **Hahner S**, Franke A, Zink M, Adermann K, Beuschlein F, Allolio B: N-terminal proopiomelanocortin stimulates cell proliferation of adrenal cells. 2000, Exp Clin Endocrinol Diabetes 108 (Suppl 1)

Franke A, Fassnacht M, **Hahner S**, Zink M, Blind E, Allolio B : Bisphosphonate hemmen das Wachstum von menschlichen Nebennierenkarzinomzellen. 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2000

Fassnacht M, Hansen I, Kreuzberger T, **Hahner S**, Zink M, Allolio B: The adrenal mitogen 1-28-POMC decreases adrenal hormone secretion. 2002 Exp Clin Endocrinol Diabetes 110

Fassnacht M, **Hahner S**, Dettling A, Zink M, Wudy S, Allolio B: Clodronate inhibits adrenal 21-hydroxylase (P450c21) activity. 2002, Exp Clin Endocrinol Diabetes 110 p093

Hahner S, Fassnacht M, Zink M, Troppmair J, Allolio B: Adrenoproliferin and its signaling pathways in the adrenal gland. 4th perspective conference, DGE young active research 2002

Hahner S, Fassnacht M, Zink M, Troppmair J, Allolio B: The adrenal mitogen 1-28-N-POMC (adrenoproliferin) activates the MAP-kinases ERK 1,2. 2003, Exp Clin Endocrinol Diabetes 111 (angenommen)

Günther S, **Hahner S**, Hammer F, Bender G, Corvi Mora P, Fauteck JD, Arlt W, Allolio B, Superior bioavailability of DHEA ter-clathrate in comparison to native DHEA. 2003, Exp Clin Endocrinol Diabetes 111 (angenommen)

Hammer F, **Hahner S**, Allolio B, Arlt W: Combined pituitary hormone deficiency (CPHD) with adult-onset corticotropin deficiency but without evidence for PROP-1 or HESX1 mutations. 2003, Exp Clin Endocrinol Diabetes 111 (angenommen)

Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Familie danken, die mir das Studium ermöglichte und mir durch mein Studium hindurch konstante Basis und stetige Begleiterin war.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. med. M. Reincke, der mir die Gelegenheit gab, im endokrinologischen Labor der Uniklinik Würzburg tätig zu werden und mich in der ersten Zeit betreute.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Allolio, der die weitere Betreuung übernahm, mir den Freiraum gab, eigene Ideen umzusetzen und mich stetig mit wertvoller konstruktiver Kritik inhaltlich begleitete. Darüber hinaus trägt er einen wesentlichen Anteil an meiner Begeisterung für die experimentelle und die klinische Endokrinologie und ist mir zu meinem wichtigsten medizinischen Lehrer geworden.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Martin Fassnacht-Capeller, durch dessen unermüdliche Hilfe, stetige gedankliche und menschliche Unterstützung vieles erst möglich wurde. Mit außergewöhnlichem Engagement und schier unerschöpflicher Energie war er mir über die Doktorarbeit hinaus und auch im klinischen Alltag ein freundschaftlicher Begleiter.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Sonngard Vay, die mir die ersten Schritte in der Zellkultur beibrachte und besonders auch bei Frau Martina Zink, die mir eine aufmerksame und hilfsbereite Lehrerin und Mitarbeiterin und eine gute Freundin wurde.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im endokrinologischen Labor, die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen und mit dafür verantwortlich sind, dass mir die Arbeit im Labor große Freude bereitet hat. Insbesondere möchte ich mich hier bei Frau Anne Merz bedanken, die geduldig meine ersten RIA-Versuche begleitete.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann für die freundliche Übernahme des Koreferates und weiterhin Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Hoppe und Herrn Dr. med. Axel Franke für die Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen.

LEBENS LAUF

Stefanie Hahner

Petrinstr. 37
97080 Würzburg

Geburtsdatum : 06.09.1974
Geburtsort: Kassel

Eltern : Damian Hahner
Elisabeth Hahner, geb. von Keitz

Schulausbildung

1980-85 Grundschule Lohfelden-Vollmarshausen mit zweijähriger
Eingangsstufe (Schulversuch)
1985-94 Engelsburg-Gymnasium Kassel
6/94 Allgemeine Hochschulreife

Studium

11/94-5/01 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
9/96 Ärztliche Vorprüfung
4/98 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/00 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/01 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

4/98 Innere Medizin, Universitätsklinik Würzburg
4/99 Pädiatrie in einer Kinderarztpraxis in Kassel
9/99 Innere Medizin, Universitätsklinik Würzburg
10/99 Emergency care, US-Army-Hospital Würzburg

Praktisches Jahr

4/00-8/00 Innere Medizin Bezirksspital Zofingen, Lehrkrankenhaus
Universität Basel, Schweiz
8/00-10/00 Chirurgie Universitätsklinik Würzburg
10/00-12/00 Chirurgie Hadassah-Universitätsklinik Jerusalem, Israel
12/00-3/01 Neurologie Universitätsklinik Würzburg

Seit 9/01 Ärztin im Praktikum, Medizinische Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, 15.12.2002

Stefanie Hahner