

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie des  
Universitätsklinikums Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

# **Corticotropin- und Angiotensin II-unabhängige Mechanismen der adrenokortikalen Stimulation**

**Studien zur Pathophysiologie  
der adrenalen Hormonsynthese und Tumorgenese**

Habilitationsschrift  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
zur Erlangung der Venia Legendi  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von  
Dr. med. Holger Sven Willenberg  
Düsseldorf 2008

**Meiner Familie**

**Vorwort**

Die Hormone der Nebenniere sind an der Regulation des Salzhaushaltes und des Blutdrucks sowie der Stoffwechselfvorgänge und intrazellulären Signale von nahezu allen Zellen grundlegend beteiligt. Dysfunktionen der Nebennierenrindenzellen können zu Hormonexzeßsyndromen oder zur Entstehung von Nebennierentumoren führen. Diese treten vergleichsweise häufig auf, und eine vermehrte Sekretion von Nebennierenrindenhormonen kann komplexe Störungen im Immunsystem, im Glukose-, Eiweiß-, und Fettstoffwechsel, im Kalzium- und Knochenstoffwechsel verursachen oder eine arterielle Hypertonie und Herzrhythmusstörungen zur Folge haben. Die Steuerung der Nebennierenrindenfunktion wird durch zwei wichtige Regelkreise gewährleistet, der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Liegt beispielsweise ein Funktionsausfall der Hypophyse vor, so entsteht als Folge auch eine Unterfunktion der Nebennierenrinde. Liegt hingegen ein adrener Hormonexzeß vor, so ist die Synthese der trophen Mediatoren der Regelkreise auf hypothalamisch-hypophysärer bzw. renaler Ebene durch die negative Rückkopplung gehemmt. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeiten wurden Mechanismen untersucht, die zur Aktivierung der Nebennierenrindenfunktion unabhängig von der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System führen können und damit eine Autonomie auf der Ebene der Nebennierenrinde bewirken.

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Vorwort</b>	1
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	2
<b>I. Einleitung</b>	3
<b>II. Corticotropin-unabhängige Mechanismen der adrenalen Stimulation – Darstellung der Ergebnisse und Diskussion</b>	4
II.1. Einführung	4
II.2. Die Nebenniere ist als Erfolgsorgan des Streßsystems bei Suizidopfern vergrößert	5
II.3. CRH hat eine direkte Wirkung auf die Nebennierenrinde und stimuliert die Steroidbiosynthese, CRH Rezeptoren sind auf Nebennierenrindentumoren aberrant überexprimiert	6
II.4. Nebennierenrindentumoren sind mit Veränderungen der immuno-adrenalen Achse assoziiert	8
II.5. Der Transaktivator CITED2 wird auch unabhängig vom cAMP/Proteinkinase A– Signalweg reguliert	10
II.5.1. CITED2 wird in der Nebennierenrinde exprimiert	10
II.5.2. CITED2 wird durch das Endothel reguliert	10
II.6. Neue Ergebnisse zur Störung der Steroidbiosynthese in der Nebenniere	11
II.6.1. Neuere Daten zur funktionellen Charakterisierung von Nebennierentumoren	11
II.6.2. Neuere Daten zur Identifizierung einer adrenalen Hyperandrogenämie	13
<b>III. Angiotensin II-unabhängige Mechanismen der adrenalen Stimulation – Darstellung der Ergebnisse und Diskussion</b>	14
III.1. Einführung	14
III.2. Das Endothel reguliert direkt die <i>de novo</i> Aldosteronsynthese	15
III.3. Adipokine stimulieren die Aldosteronsekretion unter Beteiligung des Wnt-Signalwegs	16
<b>IV. Zusammenfassung</b>	19
<b>V. Literaturangaben</b>	21
V.1. Literaturangaben zum Text	21
V.2. Publikationen im Rahmen der kumulativen Habilitation / Sonderdrucke und Kopien	28
V.2.1. Originalarbeiten	28
V.2.2. Übersichtsartikel / Reviews / Buchbeiträge	30
<b>Danksagung</b>	A1
<b>A1. Curriculum vitae</b>	A2
<b>A2. Verzeichnis der eigenen Publikationen</b>	A3

## I. Einleitung

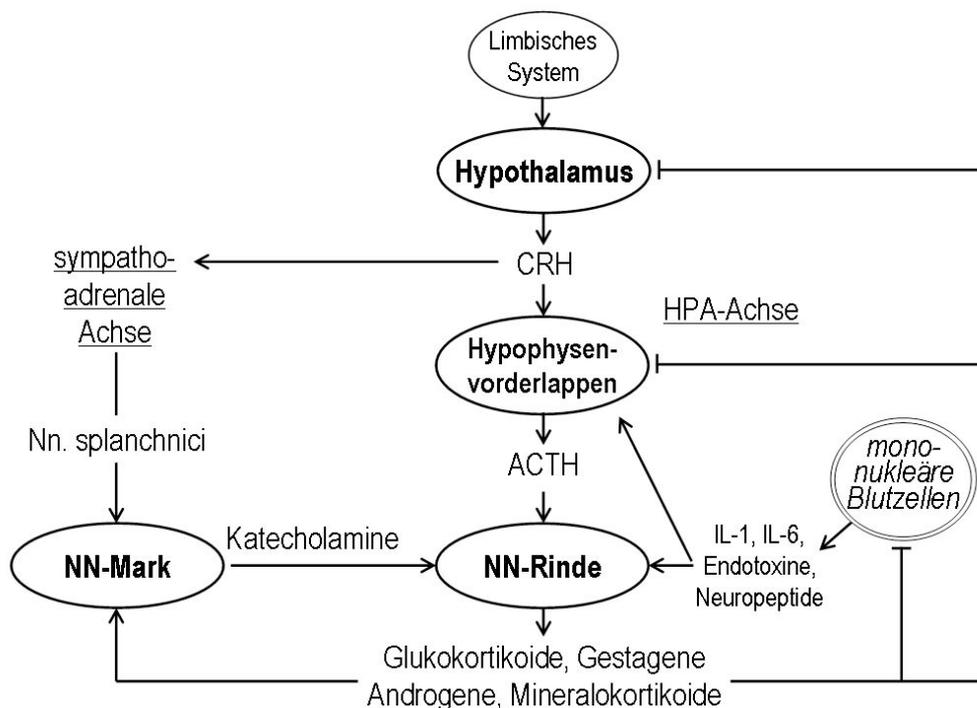
Von Erkrankungen und Fehlfunktionen der Nebenniere sind mehr als 5% der Menschen betroffen. Zu diesen zählen Störungen der Steroidbiosynthese, die ganz mild sein und sich als Zyklus- oder/und Fertilitätsstörung bei der Frau bemerkbar machen können. Am Ende des Spektrums stehen komplexe, zum Teil lebensgefährliche Funktionsveränderungen, die Salzverlustkrisen zur Folge haben können [reviewed in 1–4]. Zu den Erkrankungen der Nebenniere zählen außerdem Nebennierentumore. Diese sind in einem großen Prozentsatz benignen Natur und bewirken oft keinen meßbaren Hormonexzeß. Sie können aber auch maligne sein oder biologisch derart aktiv, daß sie autonom Aldosteron oder Cortisol sezernieren. Bei der autonomen Aldosteronsekretion können sie zu schweren Formen der arteriellen Hypertonie und somit zu einer erheblichen Zunahme des kardiovaskulären Risikos führen. Bei einer autonomen Cortisolsynthese ist oft ein Cushing-Syndrom die Folge, welches in einem schweren Verlauf durch Immunsuppression, Osteoporose, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Eiweiß- und Fettstoffwechselstörungen mit Muskel und Hautatrophie, psychischen Veränderungen und Suppression von anderen endokrinen Drüsen charakterisiert ist [reviewed in 5, 6, 7: Willenberg *et al.* Internist 2007]. Die Morbidität und Mortalität sind bei derartigen Hormonexzeßsyndromen deutlich erhöht.

In den vorliegenden Arbeiten bin ich zusammen mit meiner Arbeitsgruppe der Frage nachgegangen, welche Mechanismen zu einer Autonomie der Nebennierenrinde führen können. Für die Beantwortung der Fragestellung haben wir normales und tumoröses Nebennierenrindengewebe, normale humane Nebennierenzellen und die Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295R untersucht. Wir haben dabei *in situ* und *in vitro* die Expression von Rezeptoren, die Effekte spezifischer Faktoren, Endothel- und Fettzellprodukte, Signalwege und die Expression von Faktoren analysiert, die für eine intakte Nebennierenrindenfunktion essentiell sind.

## II. Corticotropin-unabhängige Mechanismen der adrenalen Stimulation – Darstellung der Ergebnisse und Diskussion

### II.1. Einführung

Die Anatomie, die Vorgänge und Wirkungen der Glukokortikoide, die der Umstellung des Stoffwechsels bei Streß und zur Organisation der Anpassungsreaktion im Model von Hans Selye und Walter Cannon dienen, haben wir in einer großen Referenzyklopädie dargestellt und diskutiert [8: Willenberg *et al.* Encyclopedia of Stress 2007]. Hier sind wir insbesondere auf die Frage des Aufbaus und der Interaktion zwischen humoralem und nervalem Schenkel des Streßsystems und des sympathisch-adrenomedullären/parasympathischen Systems eingegangen. Beide Schenkel des Streßsystems werden durch Corticotropin-Relasing Hormone (CRH) aktiviert und stimulieren in der Endstrecke die Synthese von Katecholaminen und den Glukokortikoiden.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Streßsystems mit Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und dem Sympathoadrenalen System ohne Berücksichtigung des systemischen Nervensystems, aber unter Berücksichtigung von Komponenten des Immunsystems. Abkürzungen: ACTH – Corticotropes Hormon, CRH – Corticoliberin, HPA-Achse – Hypothalamus-pituitary-adrenal-Axis, IL-1 – Interleukin-1, IL-6 – Interleukin-6, NN-Mark – Nebennierenmark, NN-Rinde – Nebennierenrinde. Abbildung nach [9: Willenberg *et al.* Störungen der neuro-, immuno- und endokrinen Regulation in der Nebenniere 2006].

Die hypothalamische Sekretion von CRH steuert die hypophysäre Synthese und Sekretion von Corticotropin (ACTH). Die Wirkungen von ACTH auf die Zielzellen der Nebennierenrinde sind vielfältig. Nachdem ACTH an seinem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (MC2R) mit akzessorischem Protein gebunden hat, wird die Synthese der Steroidhormone in der Hauptsache über die Aktivierung einer Adenylatzyklase mit der Bildung von cAMP und dem Proteinkinase A-Weg bis zur Produktion des Steroidogenen Faktors-1 (SF-1) vermittelt. Bindungsstellen für SF-1 finden sich in den Promotoren von StAR (steroidogenic acute regulatory protein) und in mehreren Cytochromen, die an der Steroidbiosynthese beteiligt sind. Die durch die Nebennierenrindenzellen daraufhin gebildeten und sezernierten Glukokortikoide unterdrücken die Bildung von CRH und ACTH. Damit schließt sich ein Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse, welche dem humoralen Schenkel des Streßsystems entspricht (Abbildung 1).

## II.2. Die Nebenniere ist als Erfolgsorgan des Streßsystems bei Suizidopfern vergrößert

Die Synthese und Sekretion der Glukokortikoide kann im Rahmen einer Vielzahl von systemischen, neurodegenerativen und affektiven Erkrankungen gestört oder verändert sein. Eine chronische Streßreaktion führt zu Adaptationsvorgängen, die über funktionelle Veränderungen hinausgehen und in morphologischen Veränderungen sichtbar werden. So wurde nach Einführung der Computertomographie in die Medizin als bildgebendes Verfahren gefunden, daß die Nebennieren bei Patienten mit Depression vergrößert sind [10]. Nachfolgend fand die Arbeitsgruppe um Zis und Dorovini-Zis ein größeres Nebennierengewicht bei Suizidopfern [11]. Wir zeigten in postmortalen gewebe-morphometrischen Untersuchungen, daß die Nebennieren von Suizidopfern gegenüber Kontrollen ca. 1,6-fach vergrößert sind [12: Willenberg *et al.* Endocr Res 1998].

Das Erklärungsmodell berücksichtigte, daß die Depression die häufigste Ursache für Suizid ist und als Form endogenen Stresses mit einer vermehrten Aktivität der HPA-Achse einhergeht. Auf gewebe-struktureller Ebene beschrieben wir eine Verbreiterung der *Zona reticularis* und der *Zona fasciculata*. Um zu überprüfen, ob eine gestörte Apoptose oder eine vermehrte Proliferation zugrunde liegt, untersuchten wir die Nebennieren von Suizidopfern mittels TUNEL-Assay und Ki-67- sowie PCNA-Immunohistochemie und verglichen die Befunde mit denen, die an Nebennieren von Straßenverkehrso-pfern, Akutverstorbenen nach Myokardinfarkt oder Nierenkarzinomoperierten erhoben wurden. Wir sahen bei den Suizidopfern eine veränderte Regulation von Proliferation und Apoptose, wobei die absolute Anzahl an apoptotischen Zellnuklei, aber auch der Zellen, die proliferierten, konstant blieb. Dafür war die Dichte der apoptotischen Zellen in den betroffenen Zonen relativ zur

Größenzunahme reduziert [11: Willenberg *et al.* Endocr Res 1998]. Der Mechanismus war also am ehesten eine Größenzunahme durch Hypertrophie. In den 1990er Jahren wurde auch versucht, die Veränderungen bei Suizidopfern für forensische Zwecke zu verwenden, wobei die Überschreitung eines Grenzgewichtes der Nebennierenrinde eines Verstorbenen als Hinweis für einen Suizid verstanden wurde [13].

### **II.3. CRH hat eine direkte Wirkung auf die Nebennierenrinde und stimuliert die Steroidbiosynthese, CRH Rezeptoren sind auf Nebennierenrindentumoren aberrant überexprimiert**

Eine Hypophysektomie führt normalerweise zu einer vollständigen Atrophie der Nebennierenrinde. Die Arbeitsgruppe Bornstein und Scherbaum konnte in einem Rattenmodell zeigen, daß diese Atrophie durch eine Behandlung der Tiere mit CRH verhindert werden kann [14]. *In vitro* zeigte sich an isolierten fetalen Nebennierenzellen ebenfalls eine Hormonsekretion, die über die basale Hormonsynthese hinausging, wenn die Zellen mit CRH inkubiert wurden [15, 16]. Um zu untersuchen, ob sich auch ein Effekt bei adulten Nebennieren ergibt, führten wir Zellkulturuntersuchungen mit primären adulten Nebennierenzellen durch. In diesem *in vitro*-Modell fanden wir mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für ACTH und CRH-Rezeptoren kodierende Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) sowie eine stimulierende Wirkung von CRH auf die adrenale Steroidogenese mit Steigerung der Cortisolsekretion. Zur Identifizierung des CRH-Rezeptor-Subtyps, über den diese Wirkung vermittelt werden könnte, setzten wir den spezifischen nichtpeptidischen CRH Typ 1-Rezeptor-Antagonisten Antalarmin in der Zellkultur ein. Da die CRH-Wirkung durch Koinkubation mit Antalarmin blockiert werden konnte, schlußfolgerten wir, daß die steroidogene Wirkung von CRH spezifisch über CRH Typ 1-Rezeptoren vermittelt wird [17: Willenberg *et al.* Mol Psych 2000].

Zunächst gingen andere und wir davon aus, daß die Bindungsstellen für CRH im Nebennierenmark, z.B. auf chromaffinen Zellen, lokalisiert sind und CRH über dort synthetisiertes ACTH die Nebennierenrindenzellen stimuliert. Später griffen wir die Frage nochmal auf, welcher Zelltyp Rezeptoren für CRH trägt. Durch die Verfügbarkeit eines CRH-Rezeptor-Antikörpers wurden wir in die Lage versetzt, Nebennierengewebe zu untersuchen. Hierbei fanden wir, daß vor allem Nebennierenrindenzellen immunoreaktive Rezeptoren für CRH tragen. Als Konsequenz studierten wir mittels *in situ*-Hybridisierung, ob ob sich das Muster aus der Immunhistochemie mit der Expression von mRNA deckt und fanden eine Übereinstimmung derart, daß wiederum das Signal für CRH-Rezeptoren in Nebennierenrindenzellen lokalisiert wurde. In einem nächsten Schritt isolierten wir mittels

Lasermikrodissektion Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen aus normalen humanen Nebennieren und aus benignen Nebennierentumoren, isolierten die mRNA und quantifizierten die mRNA Expression für CRH Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren durch PCR [18: Willenberg *et al.* Methods Enzymol 2002, 19: Willenberg *et al.* Neuroendocrinology 2005]. Auch hierbei zeigte sich, daß Nebennierenrindenzellen Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren für CRH tragen.

Präparationen aus Nebennierenmarktumoren, Pheochromozytomen, die reich an chromaffinen Zellen und arm an Nebennierenrindenzellen waren, zeigten nur einen geringen Gehalt an CRH-Rezeptor-mRNA, was indirekt die Hypothese stützt, daß die CRH-Wirkung auf die Steroidbiosynthese direkt an der Nebennierenrindenzelle und nicht über den Umweg durch chromaffine Zellen im Nebennierenmark und die von ihnen sezernierten Produkte vermittelt wird [19: Willenberg *et al.* Neuroendocrinology 2005]. Weiterhin fanden wir, daß die CRH-Rezeptoren bei hormoninaktiven, vor allem aber auch bei hormonaktiven Nebennierenrindenadenomen im Vergleich zur normalen humanen Nebennierenrinde deutlich überexprimiert sind. Der Grund der Überexpression von CRH-Rezeptoren bei Nebennierenrindenadenomen ist nicht bekannt, für Tumorgenesestudien ist das Konzept einer ektopten Expression bzw. eutopten Überexpression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren jedoch interessant, weil es ein gutes Erklärungsmodell für die Entstehung einer adrenalen Autonomie darstellt. Die aberrant exprimierten Rezeptoren gewinnen Anschluß an die Signaltransduktionskaskade von ACTH und können Faktoren binden, die durch Glukokortikoide in physiologischen Konzentrationen nicht negativ zurückgekoppelt werden [20, 21]. Die Folge können Hormonexzeß sowie Nebennierenrindenhyperplasie oder sogar die Formation von Nebennierenrindentumoren sein [20]. Dieser Mechanismus wurde in verschiedenen Fällen einer ACTH-unabhängigen makronodulären adrenalen Hyperplasie mit Hypercortisolismus und beim Nebennierenrindenkarzinom beschrieben. Identifiziert wurden bisher Rezeptoren für das Gastrische Inhibitorische Polypeptid, Luteinisierendes Hormon, Thyreoliberin, Vasopressin, Serotonin, Adrenalin und auch andere [20, 21].

Daß dieses Konzept auch klinische Auswirkungen hat, zeigt unter anderem die Tatsache, daß die Behandlung mit spezifischen Rezeptorantagonisten im Falle einer aberranten Hormonrezeptorexpression erfolgreich sein kann. Dies wurde bisher für die medikamentöse Behandlung mit  $\beta$ -Blockern bei der ektopten Expression von  $\beta$ -Adrenorezeptoren und für die Therapie mit Leuprolid bei einem adrenalen Cushing-Syndrom aufgrund einer Überexpression von Rezeptoren für Luteinisierendes Hormon im Heilveruch demonstriert [20, 21]. Wie unsere *in vitro*-Daten zeigen, ist eine solche Strategie für die Anwendung von Antagonisten des CRH Typ 1 Rezeptors ebenfalls denkbar, generell aber auch für andere Substanzen, die an Peptidrezeptoren binden, wert untersucht zu werden [17: Willenberg *et al.* Mol Psych 2000].

#### II.4. Nebennierenrindentumoren sind mit Veränderungen der immuno-adrenalen Achse assoziiert

Ein zweiter, kaum wahrgenommener, klinisch aber bedeutsamer Regelkreis, der die Nebennierenrindenfunktion beeinflusst, schließt sich unter der Beteiligung des Immunsystems. Die Immunmediatoren Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), die vor allem bei chronischer Inflammation und bei Sepsis stark hochreguliert werden, stimulieren auf der Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse die Steroidogenese [22]. Dies wurde mittels intrathekaler Injektionen der Zytokine bei Nagern, durch intravenöse Applikation bei Menschen und in Zellkulturuntersuchungen demonstriert [23–26]. Die Bildung von Interleukinen ist auf genomischer Ebene durch NF- $\kappa$ B positiv reguliert, welches durch I $\kappa$ B gebunden wird. Letzteres wird dann induziert, wenn Cortisol an den Glukokortikoidrezeptor gebunden hat. Auf diese Weise hemmt Cortisol die Synthese von Interleukinen und damit Kommunikation und Stimulation der Immunzellen untereinander, worin sich ebenfalls ein inhibitorischer Feed-back-Mechanismus ergibt [27] (Abbildung 1). Wichtig ist dieser Regelkreis für Adaptationsvorgänge bei Infektionen und betrifft die Feineinstellung zwischen dem Glukokortikoidbedarf für Stoffwechselumstellungen auf der einen Seite und die Gefahr der Immunsuppression auf der anderen.

**Interleukin-1** wurde als potenter Stimulator der HPA-Achse identifiziert und deshalb auch als "glucocorticoid-inducible factor" bezeichnet. Da durch die Arbeitsgruppe Bornstein-Scherbaum IL-1 mRNA und Protein auch in normalen humanen Nebennierenrindenzellen nachgewiesen werden konnte [28], aber offen blieb, ob IL-1 auch auf Ebene der Nebennierenrinde wirkt, untersuchten wir, ob Interleukin-1 auch einen direkten Effekt auf die Steroidbiosynthese ausübt. Für diese Untersuchungen benutzen wir immunhistochemische, molekularbiologische und Zellkulturmethoden und inkubierten primäre Nebennierenrindenzellen mit Interleukin-1. Hierbei fanden wir eine mäßige Steigerung der Steroidbiosynthese unter dem Einfluß von IL-1 im Vergleich zur basalen Steroidogenese [29: Willenberg *et al.* New Engl J Med 1998]. Weil wir durch PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) isolierter mRNA und Immunhistochemie auf Nebennierenrindenzellen keine Interleukin-1 Rezeptoren (IL1R) nachweisen konnten, diskutierten wir eine Aktivierung der adrenalen Steroidbiosynthese indirekt über chromaffine Zellen. Anhaltspunkte dafür, daß Interleukin-1 über chromaffine Zellen die Adrenalinsekretion fördert und darüber die Steroidogenese aktiviert, ergaben sich aus Arbeiten an Rattennebenierenkulturen, bei denen die Blockade von catecholaminergen  $\alpha$ -Rezeptoren durch Phentolamin den stimulierenden Effekt von IL-1 auf die Corticosteroidsekretion aufhob [30].

Ob dieses Phänomen bei Nebennierentumoren verändert ist, war weiterhin unklar. Wir untersuchten deshalb das Nebennierentumorgewebe von Patienten mit ACTH-unabhängigem Hyperkortisolismus.

Hierbei fanden wir in einem Fall, eine überschießende Stimulierbarkeit von Cortisol durch IL-1 *in vitro*. Die Analyse der monoklonalen Tumorzellen mittels RT-PCR und anschließendem Endonukleaseverdau ergab, daß in diesem Fall eine aberrante Expression des IL1R vorlag. Das Signal der mRNA Expression konnte in der *in situ*-Hybridisierung in die Tumorzellen lokalisiert werden. Das bestätigte sich auch in der Immunhistochemie. Wir schlußfolgerten deshalb, daß in diesem Fall die aberrante Überexpression des IL1R1 mit der Entwicklung eines Cortisol-produzierenden Nebennierentumors assoziiert war. Der ektop exprimierte Rezeptor könnte den steroidogenen Effekt von IL-1 vermittelt haben. Es fand sich außerdem eine starke Infiltration des Tumors durch CD45- und CD68-tragende Immunzellen, die durch einen parakrinen Mechanismus zur Cortisolsekretion und zum Gewebewachstum geführt haben könnten. In den anderen untersuchten Nebennierenrindentumoren fanden wir keine Überexpression von IL1R, sodaß wir kein generelles Prinzip ableiten konnten [29: Willenberg *et al.* New Engl J Med 1998].

**Interleukin-6** wird nicht nur von Immunzellen, sondern auch in anderen Geweben synthetisiert und sezerniert, so zum Beispiel im Fettgewebe und Gefäßendothel [31, 32, 33: Willenberg *et al.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008). Dieses Zytokin spielt eine Rolle bei generalisierten Entzündungsreaktionen, wie z.B. bei Vaskulitiden. Wie wir und andere zeigen konnten, stimuliert es außerdem die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse auf zentraler und peripherer Ebene [24–26]. Interleukin-6 selbst und sein Rezeptor-System findet sich in und auf normalen Nebennierenrindenzellen [26, 34]. Um zu untersuchen, ob dieses System auch in autonomen Nebennierenrindenzellen intakt ist, führten wir molekulare und *in vitro*-Untersuchungen an gefrorenen, paraffin-eingebetteten und kultivierten Nebennierenadenomen sowie an der Nebennierenrindenkarzinomzelllinie NCI-H295R durch [35: Willenberg *et al.* Ann NY Acad Sci 2002]. Hierbei fanden wir mit semiquantitativer RT-PCR, daß bei adenomatösen und karzinomatösen Nebennierenzellen die Rezeptoren für IL-6 und ACTH im Vergleich zu normalen humanen Nebennieren tendenziell zwar niedriger, jedoch nicht signifikant unterschiedlich exprimiert sind, daß aber – gemessen am steroidogenen Effekt von IL-6 *in vitro* – die Funktionalitäten gegenüber ihren physiologischen Liganden IL-6 und ACTH deutlich niedriger als in normalen humanen Nebennierenrindenzellen sind. Möglicherweise werden physiologische Regulatoren durch diesen Schritt in der adrenalen Tumorgenese von ihrem Einfluß auf die Steroidbiosynthese und auf die Zelldifferenzierung entkoppelt [35: Willenberg *et al.* Ann NY Acad Sci 2002].

## II.5. Der Transaktivator CITED2 wird auch unabhängig vom cAMP/Proteinkinase A-Signalweg reguliert

### II.5.1. CITED2 wird in der Nebennierenrinde exprimiert

CITED2 ist ein CBP/p300 interagierender Transaktivator mit ED-reichem Anhang. Mäuse, die CITED2 nicht exprimieren, sind unter anderem durch eine adrenale Agenesie charakterisiert [36]. Da die Mäuse auch durch Defekte der Neuralleiste auffallen, wurde die CITED2-Expression primär im Nebennierenmark vermutet. Eine Analyse zur Lokalisation der CITED2-Expression wurde jedoch nicht durchgeführt. Wir untersuchten deshalb Gewebe von fötalen und adulten humanen Nebennieren mit einem Antikörper gegen CITED2. Hierbei zeigte sich, daß CITED2 in der frühen Embryogenese (8. Woche) bereits in Nebennieren detektiert werden konnte, obwohl zu diesem Zeitpunkt chromaffine Zellen noch gar nicht in das später Nebennierenmark eingewandert waren [37: Haase *et al.* J Endocrinol 2007]. Auch in den adulten Nebennieren fand sich die CITED2-Immunoreaktivität in den Kernen der Rindenzellen.

Bisher existierten keine Daten, an denen ablesbar war, wie CITED2 reguliert wird. Daher führten wir *in vitro*-Studien durch, wobei die Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295R verwendet wurde. Wir fanden bei den *in vitro* Untersuchungen an kultivierten Nebennierenrindenzellen, die den Rezeptor für ACTH tragen, daß CITED2 über eine Aktivierung der Proteinkinase A, aber auch über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) angeschaltet werden kann [37: Haase *et al.* J Endocrinol 2007]. MAP Kinasen sind intrazelluläre Enzyme, die eine Signalkaskade bilden und in die Kontrolle von Differenzierung, Proliferation und Überleben von Zellen involviert sind [38]. Der ACTH-Stimulus und die konsekutive Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs führt chronisch auch zur Aktivierung von MAP-Kinasen, hauptsächlich unter Einbeziehung von ERK1/2 [39–41].

### II.5.2. CITED2 wird durch das Endothel reguliert

Aus verschiedenen Studien wurde bekannt, daß ACTH den Grad der Vaskularisation und den Blutfluß durch die Nebenniere reguliert und damit auch indirekt einen Einfluß auf die Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde ausübt [42, 43]. Die Nebenniere besitzt ein ausgedehntes Kapillarnetz, wobei nahezu jede Nebennierenrindenzelle Kontakt zu einer Endothelzelle unterhält und damit eine große Oberfläche zum Austausch von Stoffen zwischen Endothel und Nebennierenrinde zur Verfügung steht [42–45]. Möglicherweise wird dies durch eine ACTH-vermittelte NO- und Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese in der Gefäßwand vermittelt [46]. Dieser Mechanismus führt außerdem auch kurzfristig zu einer Steroidsekretion, wie an Nebennieren von Ratten gezeigt werden konnte. Einerseits können über die große Kontaktfläche Steroidhormone aus dem Organ ausgeschwemmt und in den systemischen

Blutkreislauf eingebracht werden, andererseits können Endothelzellen ihre Produkte an Nebennierenrindenzellen weitergeben.

Da die Interaktion zwischen Endothelzellen und Nebennierenrindenzellen bei der Organogenese eine Voraussetzung ist, untersuchten wir, ob Endothelzellen Faktoren sezernieren, die CITED2 regulieren. Hierbei fanden wir eine konzentrationsabhängige Aktivierung des CITED2-Promoters in mit Reporterplasmiden transfizierten NCI-H295R-Nebennierenrindenzellen, welche durch Koinkubation mit dem MEK1-Inhibitor, einem MAP-Kinase-Hemmer, reversibel war. Die Promoteraktivierung von CITED2 hatte auch eine gesteigerte Synthese von CITED2-mRNA und CITED2-Protein zur Folge, wie wir mittels quantitativer RT-PCR und Western-Blot gezeigt haben [47: Haase *et al.* Cell and Tissue Res 2009].

In anderen Untersuchungen an NCI-H295R-Zellen, die mit einem CITED2-Reportergen transfizierten wurden, demonstrierten wir, daß der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) unabhängig von ACTH den Promotor von CITED2 dosisabhängig hochreguliert und daß die Hemmung von MAPKs durch PD98059 ebenfalls in einer verminderten Promotoraktivierung von CITED2 resultiert [37: Haase *et al.* J Endocrinol 2007]. Die Promotoraktivierung führte auch hier zur Expression von mRNA, wie durch quantitative RT-PCR sichtbar wurde, und zur CITED2-Proteinsynthese. Letzteres konnten wir mit Immununfluoreszenzzytologie sichtbar machen.

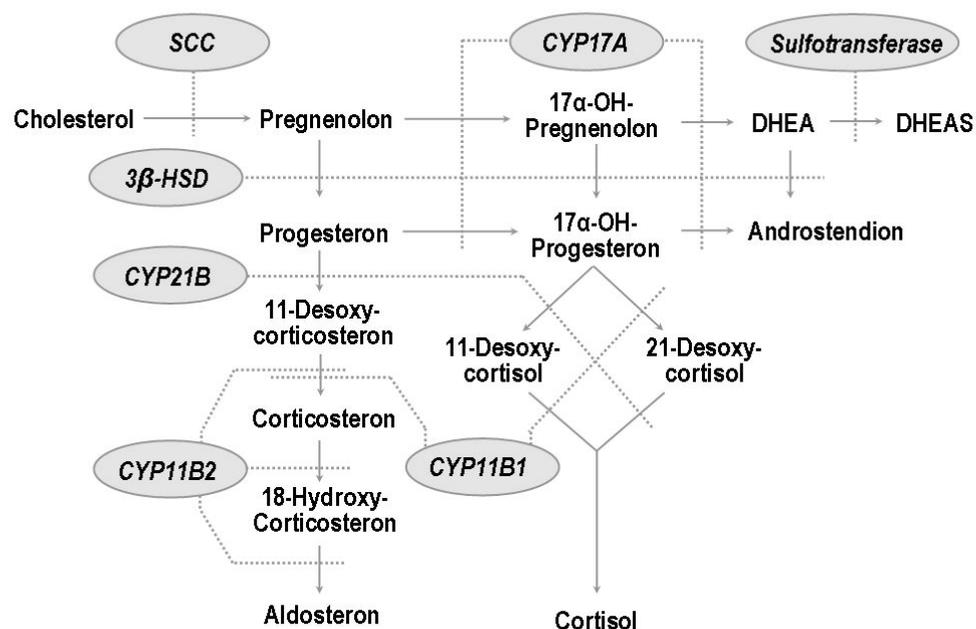
Da eine CITED2-Überexpression zur onkogenen Transformation und gesteigerten Zellproliferation führen kann [48–50], schlußfolgerten wir, daß CITED2 eine wichtige Rolle während der adrenokortikalen Organogenese spielt und möglicherweise auch in die adrenokortikale Tumorgenese einbezogen zu sein scheint.

## **II.6. Neue Ergebnisse zur Störung der Steroidbiosynthese in der Nebenniere**

### *II.6.1. Neuere Daten zur funktionellen Charakterisierung von Nebennierentumoren*

In der Nebennierenrinde werden eine Reihe von Steroidhormonen und Peptiden gebildet. Ausgangsstoff der Steroidbiosynthese ist das Cholesterin, welches in veresterter Form in den Rindenzellen gespeichert werden kann. Der limitierende Schritt in der Synthesekette von Steroidhormonen ist die Bildung von Pregnenolon aus Cholesterol in den Mitochondrien. Dieser Schritt wird von ACTH gesteuert und durch Faktoren wie SF-1 und StAR vermittelt. Unter der Beteiligung verschiedener Enzyme und Cytochrome können die Zellen der Nebennierenrinde in mehreren Schritten mit Elektronentransferprozessen mineralokortikoid-, glukokortikoid- und schwach androgen wirksame Steroide produzieren (Abbildung 2).

Die Steroidbiosynthese ist bei Nebennierenrindentumoren häufig gestört [51]. Obwohl Nebennierentumore zu den häufigsten Tumoren beim Menschen zählen – im Alter über 70 Jahren liegen sie in 7-10% der Fälle vor, wie Autopsie-Studien und Untersuchungen mittels Computertomographie und Magnetresonanztomographie gezeigt haben –, sind ausgeprägte Hormonexzeßsyndrome vergleichsweise selten [reviewed in 5, 6; 7: Willenberg *et al.* Internist 2007]. Diese Steroidbiosynthesestörungen können mittels ACTH-Test durch überschießende Anstiege von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron und 11-Desoxycortisol erkannt und charakterisiert werden [51]. Wir gingen bei unserer Untersuchung einen Schritt weiter und zeigten in diesem Zusammenhang, daß man dieses Phänomen klinisch nutzen kann, um primäre Nebennierenrindenläsionen von sekundären Nebennierentumoren und Nebennierenmarkgeschwülsten zu unterscheiden [52: Willenberg *et al.* Endocr Res 2002].



**Abbildung 2:** Übersicht über die wichtigsten Schritte der Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde, die Produkte und die Intermediate der Steroidogenese und die daran beteiligten Enzyme. Die Enzyme werden in den unterschiedlichen Zonen differentiell exprimiert, so die  $17\alpha$ -Hydroxylase nur in den inneren beiden Zonen und die Aldosteronsynthese (CYP11B2) nur in der *Zona glomerulosa*. Abkürzungen: 3-HSD – 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase, CYP11B1 – 11β-Hydroxylase Typ 1, CYP11B2 – 11β-Hydroxylase Typ 2, CYP17A – 17α-Hydroxylase, CYP21 – 21α-Hydroxylase, DHEA – Dehydroepiandrosteronsulfat, DHEAS – DHEA-Sulfat, SCC – "Side Chain Cleavage"-Enzym.

Patienten mit Metastasen und Phäochromozytomen reagierten nicht mit einem überschießenden Anstieg von Intermediärsteroiden nach ACTH-Gabe, während Patienten mit Nebennierenrindenzellenläsionen dies in ca. 80% der Fälle taten. So konnte bei 9 von 16 Patienten mit Malignom und Verdacht auf Nebennierenmetastasen eine Filialisierung unwahrscheinlich gemacht werden. Dies ist insbesondere von klinischer Bedeutung, da der Ausschluß von Nebennierenmetastasen eine Korrektur des Stageings zur Folge haben kann und dem Patienten unter Umständen Operationen und Punktionen erspart [52: Willenberg *et al.* Endocr Res 2002].

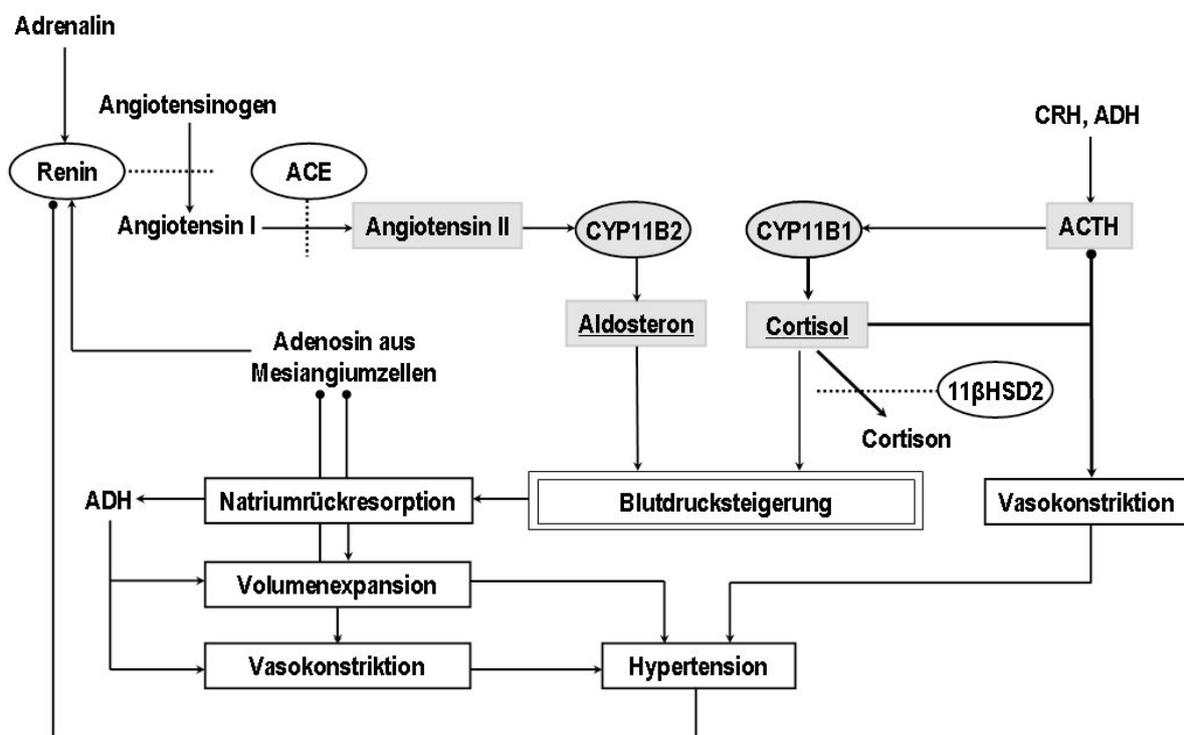
#### *II.6.2. Neuere Daten zur Identifizierung einer adrenalen Hyperandrogenämie*

Differentialdiagnostisch muß allerdings auch eine angeborene Steroidbiosynthesestörung, wie sie zum Beispiel bei einem heterozygoten 21-Hydroxylasemangel oder 11 $\beta$ -Hydroxylasemangel bzw. Cytochrom-P450 Oxidoreduktasedefekt in Erwägung gezogen werden [53]. Diese sind in der Regel ebenfalls mittels ACTH-Test diagnostizierbar und können durch Messung anderer Steroidhormone wie Androstendion und DHEA aufgrund der Hyperandrogenämie bei Frauen identifiziert werden [54: Willenberg *et al.* Steroids 2008]. Hintergrund der Studie war das Ziel der Klärung von der Frage, ob die Messung von Testosteron und DHEAS zur Identifizierung einer adrenalen Hyperandrogenämie ausreichend ist. Wir konnten bei der Untersuchung von 464 Frauen mit klinischen Zeichen einer Hyperandrogenämie zeigen, daß die Testosteronbestimmung und die Bildung des freien Androgenindex zwar hilfreich sind, aber nicht ausreicht, um alle Patienten zu identifizieren, die nach labordiagnostischen Kriterien eine adrenale Steroidbiosynthesestörung haben. Hierfür ist die Bestimmung von Androstendion und DHEA ebenfalls notwendig und hilfreicher als DHEAS. Das könnte auch Konsequenzen für das Management von Nebennierentumoren haben. Da eine Hyperandrogenämie auch die Folge eines Nebennierenrindentumors sein kann, ist es möglich, daß die Bestimmung von Testosteron oder DHEAS nicht ausreichend ist, um eine Androgen-produzierende Nebennierenrindenzellenläsion zu charakterisieren. Dieses Problem wurde zwar durch unsere Arbeiten jedoch noch nicht hinreichend gelöst, weil keine Fälle mit Androgen-produzierenden Nebennierenrindenzellenläsionen in die Studie eingeschlossen waren, dafür liefert sie aber erstmalig gute Referenzwerte [54: Willenberg *et al.* Steroids 2008].

### III. Angiotensin II-unabhängige Mechanismen der adrenalen Stimulation – Darstellung der Ergebnisse und Diskussion

#### III.1. Einführung

Während die Glukokortikoide über den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel Einfluß auf Stoffwechselwege von Zellen nehmen, bedingen die Mineralokortikoide rezeptorvermittelt im wesentlichen die Rückresorption von Natrium in der Niere. Die Natriumretention führt zur Ausschüttung von Vasopressin und über Aquaporine zum Durchtritt freien Wassers vom Primärharn in den Blutkreislauf und damit zur Volumenexpansion. Sowohl der hohe Natriumgehalt der *Vasa efferentia* der Nierenglomeruli und die durch die Mesangiumzellen verbundene Adenosinfreisetzung als auch die mit der Natrium- und Wasserretention verbundene Volumenexpansion führen zur Suppression der Reninbildung (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) im Zusammenhang mit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse). Abkürzungen: 11βHSD2 – 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2, ACE – Angiotensin-converting Enzyme, ACTH – Adrenocorticotropes Hormon, ADH – Antidiuretisches Hormon/Vasopressin. Abbildung nach [55: Willenberg HS, Roman J Endocrinol Metab 2007].

Cortisol besitzt ebenfalls eine hinreichende Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor (früher auch als Glukokortikoidrezeptor Typ 1 bezeichnet) und ist aufgrund seiner im Vergleich zu Aldosteron viel höheren Konzentration im Blut ein kompetitiver Ligand. Cortisol wird jedoch durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase in der Niere zu Cortison umgewandelt, welches kaum noch Affinität zu Mineralokortikoid- und Glukokortikoidrezeptoren besitzt. Somit steht die Aktivierung des renalen Mineralokortikoidrezeptors auf indirektem Wege erheblich unter der Regulation durch Renin.

### III.2. Das Endothel reguliert direkt die *de novo* Aldosteronsynthese

Endothelin-1 (ET-1), ein Endothelzellprodukt, erhöht nach intravenöser Applikation bei Hunden den Blutdruck [56], was man zunächst auf die vasokonstriktiven Eigenschaften des Peptids zurückführte. Später konnte gezeigt werden, daß ET-1 direkt die Synthese von Aldosteron über Typ B Rezeptoren stimuliert und Nebennierenrindenzellen über Typ A Rezeptoren zur Proliferation anregt [57–60].

Gut charakterisiert ist ein 3000 Dalton Protein, dem der Anstieg der Aldosteronproduktion kultivierter *Zona glomerulosa* Zellen nach Inkubation mit Endothelzellmedium oder nach Koinkubation mit Endothelzellen zugeschrieben wird [61, 62]. Hierbei ist die Aldosteronsekretion ein akuter Prozeß und unabhängig von cAMP. Wie bei der Ang II- und Kalium-vermittelten Stimulation wird der Anstieg der Aldosteronkonzentration im Zellkulturüberstand durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration begleitet [62].

In eigenen Arbeiten fanden wir einen bis jetzt unbekanntem Faktor, der an der Regulation der Aldosteronsynthese beteiligt ist. In einer Reihe von *in vitro* Untersuchungen, bei denen der Zellkulturüberstand von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht wurde, konnten wir zeigen, daß dieses Endothelzell-konditionierte Medium (ECCM) eine *de novo* Synthese von Aldosteron bewirkt und die Effekte von Angiotensin II (Ang II) und Forskolin signifikant potenziert [63: Ansurudeen *et al.* Horm Metab Res 2006]. Versuche mit Hitzeinaktivierung lassen vermuten, daß es sich hierbei um ein kleines Protein bzw. Peptid handelt, welches schneller und langanhaltender als Ang II wirkt. Die Koinkubation mit AT1-Antagonisten und mit Salzen, die Endothelin-A- und -B-Rezeptoren blockieren, zeigte, daß es sich um einen Ang II und Endothelin-unabhängigen Mechanismus handelt, der durch den Endothelzellfaktor ausgelöst wird [63: Ansurudeen *et al.* Horm Metab Res 2006, 64: Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007]. Da Endothelzellen eine Quelle von IL-6 darstellen, haben wir untersucht, ob der IL-6-Signalweg in den Nebennierenrindenzellen die Effekte des ECCMs vermittelt. Durch Hemmung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges konnten wir ausschließen, daß

das vom Endothel produzierte IL-6 die Aldosteronsynthese in den Nebennierenrindenzellen signifikant aktiviert [33: Willenberg *et al.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008].

In einer Reihe von Experimenten konnten wir nachweisen, daß die Aldosteronsynthese unter Einbeziehung von Proteinen wie StAR, SF-1 und CREB stattfindet und daß die Aldosteronsynthese (CYP11B2) auf Promotor- und mRNA-Ebene reguliert wird [64: Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007]. Der Nachweis einer vermehrten CREB-Phosphorylierung in Nebennierenrindenzellen unter ECCM-Einfluß und die Aktivierung des CRE-Enhancer-Elements deuten auf die Einbeziehung von CREB als Mediator der ECCM-induzierten Wirkung auf die Aldosteronsynthese hin [64: Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007]. Dies wird unterstützt durch unsere *in vitro* Arbeiten, in denen wir zeigten, daß ECCM über einen cAMP-abhängigen, durch Bredfeldin-A hemmbaren, also Proteinkinase A-unabhängigen Mechanismus die Aldosteronsynthese reguliert und dabei sehr wahrscheinlich die Proteinkinase B involviert [65: Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009].

Damit bestehen Hinweise dafür, daß das Gefäßendothel auch unabhängig von ACTH oder Ang II bei der Regulation von Nebennierenrindenzellen und somit möglicherweise auch bei der Organo- bzw. Tumorgenese, z.B. bei der Entstehung eines primären Aldosteronismus, involviert sein kann [reviewed in 66: Willenberg *et al.* Horm Metab Res 2008].

### III. 3. Adipokine stimulieren die Aldosteronsekretion unter Beteiligung des Wnt-Signalwegs

Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Bluthochdruck ist schon lange bekannt. Gegenüber Normalpersonen haben übergewichtige und adipöse Menschen erhöhte Aldosteronblutspiegel, die man teilweise mit einer Aktivierung des RAAS erklärt [67–72]. Es konnte außerdem durch Beobachtungs- und Interventionsstudien gezeigt werden, daß eine Gewichtsabnahme die Blutdruckwerte verbessert und Aldosteronwerte senkt [67, 68, 71, 72]. Mehrere Studien konzentrierten sich auf einzelne Komponenten des RAAS, zum Beispiel auf die Reninaktivität [67, 69, 70], Angiotensinogen [73, 74] bzw. das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) [73, 75].

Fettzellprodukte, die durch Filtration von konditioniertem Medium aus primären kultivierten Fettzellen isoliert werden, können die Wirkung von Ang II auf die Aldosteronsynthese verstärken. Dazu sind auch zum Beispiel LDLs (Low-density Lipoproteine) in der Lage [76]. Auch dieser Vorgang wäre eine Erklärung, die den Zusammenhang zwischen Adipositas und Hypertonie erklären könnte. Der Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und erhöhtem Plasma-Aldosteronspiegel im Blut übergewichtiger Menschen wurde durch eine andere Gruppe beobachtet, die bei ihren

Untersuchungen zu der Auffassung gelangt ist, daß bestimmte Oxidationsprodukte von Fettsäuren die Aldosteronproduktion in Nebennierenzellen stimulieren [77].

Wir fokussierten uns in unseren Arbeiten auf Mechanismen, die die beobachteten erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten bei adipösen Patienten mit Bluthochdruck erklären könnten, und suchten sowie charakterisierten deshalb spezifische Faktoren, die sich aus Adipozyten isolieren ließen. Wir fanden in Adipozyten-konditionierten Medien eine Aktivität, die eine Ang II unabhängige Aldosteronfreisetzung aus humanen Nebennierenzellen vermittelte [78: Ehrhart-Bornstein *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2003]. Einer dieser Faktoren ist sehr wahrscheinlich ein Protein mit einer Größe von >50kDa. Dieses Protein bewirkt die Hochregulation von StAR auf mRNA-Ebene, und die Aktivierung tritt unabhängig von gebildetem cAMP und der Proteinkinase A-Aktivität auf. Durch Hemmung der MAP-Kinasen ERK 1/2 läßt sich der Effekt auf die Aldosteronsekretion aufheben [79].

Um den Faktor besser zu charakterisieren, untersuchten wir die Beteiligung verschiedener Signalwege, um dann auf das Protein rückschließen zu können. Da bereits gezeigt werden konnte, daß Wnt-Moleküle eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung von Gonaden und Nebenniere spielen [80, 81] und neben der Stimulation der Steroidbiosynthese auch eine vermehrte Expression der Gene der 17 $\alpha$ -Hydroxylase und 21-Hydroxylase unabhängig von cAMP bewirken [82], studierten wir, ob der Wnt-Signalweg bei der Entstehung des steroidogenen Effektes durch Fettzellprodukte involviert ist. Wnt-Moleküle sind Liganden spezifischer Membranrezeptoren, Frizzled, und Wnt-Signaltransduktion ist bei der Regulation von Entwicklungsprozessen sowie bei der Entstehung verschiedener Karzinomarten beteiligt [83, 84].

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Schinner fanden wir zunächst in der Immunhistochemie, daß immunoreaktive Frizzled-Rezeptoren für Wnt-Proteine auf und  $\beta$ -Catenin in normalen Nebennierenrindenzellen exprimiert werden. Durch *in vitro* Experimente in der NCI-H295R-Zelllinie zeigten wir, daß transkribierte  $\beta$ -Catenin-abhängige Reportergene (TOPFLASH) durch Adipozyten-konditioniertes Medium konzentrationsabhängig aktiviert werden [85: Schinner *et al.* Int J Obes 2007]. Dieser Effekt war auch imitierbar durch Stimulation kultivierter Nebennierenrindenzellen mit wnt-Molekülen-angereichertem Medium sowie durch Transfektion einer konsekutiv-aktiven Mutante von  $\beta$ -Catenin. Hierbei wurde auch die Beteiligung von SF-1 bei der Aktivierung des StAR-Promoters in den Reportergenassays sichtbar. Durch lösliche wnt-Rezeptoren, solubles Frizzled, welches wnt-Signalmoleküle binden kann und an der Membranbindung hindert, war die Aktivierung reversibel. Daraufhin haben wir das Adipozyten-konditionierte Medium nach der Präsenz von Wnt-Molekülen untersucht und fanden sowohl Wnt3a und Wnt10b als typische Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs. Wir schlußfolgerten, daß die Aktivierung des wnt-Signalwegs zur StAR- und SF-1 vermittelten Hochregulation der Steroidbiosynthese in der Nebenniere, gemessen am Cortisol und

Aldosteron, bewirken und daß über den Wnt-Signalweg ein Teil der Effekte der von Adipozyten sezernierten Produkte vermittelt wird [85: Schinner *et al.* Int J Obes 2007].

Die Ergebnisse von Forschungsarbeiten anderer Gruppen stützen unsere Hypothese. So wurde außerdem gefunden, daß bestimmte Wnt-Moleküle die Bildung von Nebennierenrindentumoren bewirken können, insbesondere aber die *Zona glomerulosa* stimulieren [82]. Andere Arbeitsgruppen entdeckten, daß Aldosteron-produzierende Nebennierenadenome oft durch aktivierende Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen charakterisiert sind und eine überaktive wnt-Signaltransduktion aufweisen [86]. Molekulare Analysen erbrachte außerdem, daß in nahezu 40 % der Nebennierenrindenadenome und 75 % der Nebennierenrindenzinome eine aktivierende somatische Mutation im  $\beta$ -Catenin-Gen vorliegt [87].

Die Ergebnisse unserer Forschungsarbeiten geben einen weiteren Beleg dafür, daß das Fettgewebe nicht nur Energie in Form von Fett speichert, sondern als endokrines Organ begriffen werden kann, welches in viele metabolische Zusammenhänge eingreift. Sie stellen außerdem einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Phänomenen her, die beim metabolischen Syndrom beobachtet werden und bieten damit Anhaltspunkte für die Entwicklung spezifischer Therapien, die nicht nur einzelne Krankheiten oder Komplikationen betreffen, sondern das metabolische Syndrom in einem Gesamtkonzept behandeln helfen könnten.

### IV.3. Zusammenfassung

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sind die zwei Hauptregelkreise, die die Funktion der Nebennierenrinde kontrollieren. Bei adrenalen Hormonexzeßsyndromen sind die trophen Stimulatoren der Nebennierenrinde, ACTH und/oder Angiotensin II, supprimiert. Zusammen mit meiner Arbeitsgruppe habe ich Mechanismen charakterisiert, die bei der Entstehung von Nebennierenrindentumoren, von Hormonexzeßsyndromen oder bei der adrenalen Organogenese beteiligt sind.

Dabei haben wir gefunden, daß Produkte von Endothelzellen, Fettzellen und Immunzellen unabhängig von den bisher bekannten Regelkreisen Einfluß auf die Funktion von Nebennierenrindenzellen nehmen. Wir fanden, daß Endothelzellprodukte die adrenale Steroidbiosynthese und die Expression essentieller Transkriptionsfaktoren wie SF-1 und CITED2 regulieren. Wir charakterisierten die beteiligten Signalwege und konnten zeigen, daß die Aktivität nicht durch Proteine vermittelt wird, die als Endothelzellprodukte schon lange bekannt sind. Die sekretorischen Effekte setzen die Bildung von zyklischem AMP voraus und beziehen nicht die Proteinkinase A mit ein. Bei Wachstumsprozessen scheint hingegen die Proteinkinase A und die Signaltransduktion über MAP-Kinasen involviert zu sein.

Weiterhin zeigten wir, daß durch Fettzellprodukte die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription verstärkt wird. Hier haben wir Wnt-Moleküle, die von Fettzellzellen sezerniert werden, als Mediatoren identifiziert, die den kanonischen Wnt-Signalweg über ihre Rezeptorbindung aktivieren. Die Charakterisierung der beteiligten Signalwege erlaubt nun die Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen und eröffnet die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie von Nebennierenautonomien. Durch eine solche Strategie könnte nicht nur ein Hormonexzeß, sondern auch das Wachstum bei Nebennierenrindentumoren unterdrückt werden.

Außerdem haben wir gezeigt, auf welche Weise und über welche molekulare Prozesse, Regulationsprinzipien ausgehebelt werden. Wir fanden in Nebennierenrindentumoren eine im Vergleich zu normalem Nebennierengewebe stärkere Expression von CRH-Rezeptoren, die bei hormonaktiven Adenomen noch ausgeprägter war als bei hormoninaktiven Nebennierenrindenneoplasien. Wir fanden in einem Fall auch eine ektope Expression von Interleukin-1-Rezeptoren und eine gesteigerte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Interleukin-1. In einem die Nebennierenfunktion regulierenden System aus Zell-Zell-Interaktion, bei dem Endothelzellen, Immunzellen oder auch Fettzellen beteiligt sind, können diese Veränderungen zu Hormonexzeß und Tumorgenese führen, ohne daß der physiologische Stimulus präsent sein muß. Aus unseren Daten ergibt sich nun die Option, spezifische Rezeptorantagonisten für den Einsatz bei Patienten mit Nebennierenrindentumoren zu entwickeln.

In einem klinisch orientiertem Ansatz untersuchten wir angeborene und erworbene Steroidbiosynthesstörungen. Während die angeborenen Formen häufig eine Ursache für eine Hyperandrogenämie mit Hirsutismus, Zyklusstörungen und verminderter Fertilität bei Frauen darstellen, sind erworbene Steroidbiosynthesstörungen häufig bei Patienten mit Nebennierenrindentumoren anzutreffen. Wir zeigten, daß die Messung von Testosteron und Dehydroepiandrosteron-Sulfat nicht ausreicht, um adrenale Enzymdefekte zu diagnostizieren, sondern daß der Bestimmung von Intermediärsteroiden wie Androstendion und Dehydroepiandrosteron eine größere Rolle zukommt.

Wir zeigten außerdem, daß erworbene Störungen der adrenalen Steroidbiosynthese bei Nebennierenrindenläsionen eintreten und daß aus diesem Grund diese Tumoren mittels ACTH-Test von Metastasen abgrenzbar sind. So können nun primäre Nebennierenrindenläsionen von sekundären Tumoren differenziert werden. Das ist vor allem für diejenigen Patienten vorteilhaft, die eine maligne Grunderkrankung und einen Nebennierentumor haben, und bei denen das Vorliegen einer isolierten Metastase über das Tumorstadium und damit über die Therapie entscheidet. Die Labordiagnostik kann in diesen Fällen die Aussage der Bildgebung ergänzen, sodaß eine Computertomographie-gesteuerte Punktion verzichtbar wird.

## V. Literaturangaben

### V.1. Literaturangaben zum Text

- [1] Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349:776–788.
- [2] New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:75–83.
- [3] Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005;365:2125–2136.
- [4] Arlt W, Krone N. Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007;68 S5:158–164.
- [5] Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JK, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med* 2003;138:424–429.
- [6] Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: Update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004;25:309–340.
- [7] Willenberg HS, Zschucke D, Bornstein SR. Nebennierentumoren. *Internist* 2007;48:971–986.
- [8] Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Disease, stress induced. In: Fink G (Ed.): *Encyclopedia of stress*. Vol. 1. 824–7. Academic Press, Oxford, 2007.
- [9] Willenberg HS, Vrezas I, Bornstein SR. Störungen der neuro-, immuno- und endokrinen Regulation in der Nebenniere. In: Ganten, Ruckpaul & Köhrlé (Eds.): *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. 323–332. Springer 2006.
- [10] Amsterdam JD, Marinelli DL, Arger P, Winokur A. Assessment of adrenal gland volume by computed tomography in depressed patients and healthy volunteers: a pilot study. *Psychiatry Res*. 1987;21:189–197.
- [11] Dorovini-Zis K, Zis AP. Increased adrenal weight in victims of violent suicide. *Am J Psychiatry*. 1987;144(9):1214–5.
- [12] Willenberg HS, Bornstein SR, Dumser T, Ehrhart-Bornstein M, Barocka A, Chrousos GP, Scherbaum WA: Morphologic changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. *Endocr Res* 1998;3/4:963–967.
- [13] Dumser T, Barocka A, Schubert E. Weight of adrenal glands may be increased in persons who commit suicide. *Am J Forensic Med Pathol*. 1998;19:72–76.
- [14] Bornstein SR, Ehrhart M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF. Adrenocortical atrophy of hypophysectomized rats can be reduced by corticotropin-releasing hormone (CRH). *Cell Tissue Res* 1990;260:161-266.

- [15] Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffé RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2916–2920.
- [16] Chakravorty A, Mesiano S, Jaffé RB: Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3732–3738.
- [17] Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Páth G, Goretzki PE, Scherbaum WA, Chrousos GP: Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type 1 antagonist on human adrenal function. *Mol Psych* 2000;5:137–141.
- [18] Willenberg HS, Walters R, Bornstein SR: Use of laser microdissection in complex tissue. *Methods Enzymol* 2002;356:216–223.
- [19] Willenberg HS, Haase M, Papewalis C, Schott M, Scherbaum WA, Bornstein SR: Corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells. *Neuroendocrinology* 2005;82:274–281.
- [20] Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 2001;22:75–110.
- [21] Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:375–382.
- [22] Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 1993; 329:1246–53.
- [23] Besedovsky H, del Ray A, Sorkin E, and Dinarello CA: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986;233:652–654.
- [24] Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K, and Imura H: Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:1459–1463.
- [25] Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1690–1694.
- [26] Páth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2343–2349.
- [27] Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283–286.
- [28] González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G, Scherbaum WA. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol* 1995;99:137–141.
- [29] Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR: Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *New Engl J Med* 1998;339:27–31.

- [30] O'Connell NA, Kumar A, Chatzipanteli K, Mohan A, Agarwal RK, Head C, Bornstein SR, Abou-Samra AB, Gwosdow AR. Interleukin-1 regulates corticosterone secretion from the rat adrenal gland through a catecholamine-dependent and prostaglandin E<sub>2</sub>-independent mechanism. *Endocrinology*. 1994;135:460–467.
- [31] Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2126-2133.
- [32] Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* 1989;142:144–177.
- [33] Willenberg HS, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M, Scherbaum WA. The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces adrenal IL-6 generation that does not interfere with the effect of endothelial cells on aldosterone synthesis. *Exp Clin Endocr Diab* 2008;116:S70–S74.
- [34] González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Jirikowski G, Scherbaum WA. Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1492–1497.
- [35] Willenberg HS, Páth G, Vögeli TA, Scherbaum WA, Bornstein SR: Role of Interleukin-6 in the stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:304–314.
- [36] Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfp2 co-activator. *Nat Genet* 2001;29:469–474.
- [37] Haase M, Schott M, Bornstein SR, Malendowicz LK, Scherbaum WA, Willenberg HS. CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor. *J Endocrinol* 2007;192:459–465.
- [38] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001;410:37–40.
- [39] Le T, Schimmer BP. The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 2001;142:4282–4287.
- [40] Ferreira JG, Cruz CD, Neves D, Pignatelli D. Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *J Endocrinol* 2007;192:647–658.
- [41] Winnay JN, Hammer GD. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 2006;20:147–166.
- [42] Vinson GP, Pudney JA, Whitehouse BJ. The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *Endocrinology* 1985;105:285–294.

- [43] Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* 2003;61:247–251.
- [44] Dobbie JW, Symington T. The human adrenal gland with special reference to the vasculature. *J Endocrinol* 1991;34:479–489.
- [45] Bassett JR, West SH. Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microsc Res Tech* 1997;36:546–557.
- [46] Mohn CE, Fernandez-Solari J, DeLaurentis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:6213–6218.
- [47] Haase M, Ansurudeen I, Paramonova I, Schinner S, Schott M, Papewalis C, Scherbaum WA, Willenberg HS. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. *Cell Tissue Res. In Press*.
- [48] Sun HB, Zhu YX, Yin T, Sledge G, Yang YC. MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13555–13560.
- [49] Kranc KR, Bamforth SD, Braganca J, Norbury C, van Lohuizen M, Bhattacharya S. Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Mel18 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF. *Mol Cell Biol* 2003;23:7658–7666.
- [50] Tien ES, Davis JW, Vanden Heuvel JP. Identification of the CREB-binding protein/p300-interacting protein CITED2 as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha coregulator. *J Biol Chem* 2004;279:24053–24063.
- [51] Seppel T, Schlaghecke R. Augmented 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone response to ACTH stimulation as evidence of decreased 21-hydroxylase activity in patients with incidentally discovered adrenal tumours (incidentalomas). *Clin Endocrinol* 1994;41:445–451.
- [52] Willenberg HS, Mansmann G, Fritzen R, Schott M, Feldkamp J, Schulte KM, Scherbaum WA, Bornstein SR: The short synacthen test in the evaluation of adrenal masses in patients with malignancies. *Endocr Res* 2002;4:793–797.
- [53] New MI. Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4205–4214.
- [54] Willenberg HS, Bahlo M, Wertenbruch T, M Schott, J Feldkamp, Scherbaum WA. Helpful diagnostic markers for defining hyperandrogenemia in hirsute women, *Steroids* 2008;73:41-46.
- [55] Willenberg HS. Diagnostik und Therapie von Mineralokortikoidexzeßsyndromen. *Rom J Endocrinol Metab* 2007;2:13–23.
- [56] Miller WL, Redfield MM, Burnett JC Jr. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest* 1989;83:317–320.
- [57] Hinson JP, Kapas S, Teja R, Vinson GP. Effect of the endothelins on aldosterone secretion by rat zona glomerulosa cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:43743–43749.

- [58] 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 Cytology* 1997;171:267–308.
- [59] Mazzocchi G, Rossi GP, Rebuffat P, Malendowicz LK, Markowska A, Nussdorfer GG. Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C-and tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Endocrinology* 1997;138:2333–2338.
- [60] Rossi GP, Belloni AS, Nussdorfer GG, Pessina AC. Endothelin-1 and the adrenal gland. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:S17–S20.
- [61] Rosolowsky LJ, Campbell WB. Endothelial cells stimulate aldosterone release from bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol (Endocrinol Metab 29)* 1994;266:E107–E117.
- [62] Rosolowsky LJ, Hanke CJ, Campbell WB. Adrenal capillary endothelial cells stimulate aldosterone release through a protein that is distinct from endothelin. *Endocrinology* 1999;140:4411–4418.
- [63] Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Funk RHW, Krug AW, Bornstein SR. Vascular-adrenal niche – endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II. *Horm Metab Res* 2006;38:476–480.
- [64] Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007;265–266:150–156.
- [65] Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. *Mol Cell Endocrinol. In press, Epub November 2008.*
- [66] Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm Metab Res* 2008;40:435–441.
- [67] Tuck ML, Sowers J, Dornfeld L, Kledzik G, Maxwell M. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N Engl J Med* 1981;304:930–933.
- [68] Rocchini AP, Katch VL, Grekin R, Moorehead C, Anderson J. Role for aldosterone in blood pressure regulation of obese adolescents. *Am J Cardiol* 1986;57:613–618.
- [69] Licata G, Scaglione R, Ganguzza A, Corrao S, Donatelli M, Parrinello G, Dichiaro MA, Merlino G, Cecala MG. Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young obese subjects. *Am J Hypertens* 1994;7:314–320.
- [70] Egan BM, Stepniakowski K, Goodfriend TL. Renin and aldosterone are higher and the hyperinsulinemic effect of salt restriction greater in subjects with risk factors clustering. *Am J Hypertens* 1994;7:886–893.
- [71] Goodfriend TL, Kelley DE, Goodpaster BH, Winters SJ. Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obes Res* 1999;7:355–362.

- [72] El-Gharbawy AH, Nadig VS, Kotchen JM, Grim CE, Sagar KB, Kaldunski M, Hamet P, Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Kotchen TA. Arterial pressure, left ventricular mass, and aldosterone in essential hypertension. *Hypertension* 2001;37:845–850.
- [73] Harp JB, Henry SA, DiGirolamo M. Dietary weight loss decreases serum angiotensin-converting enzyme activity in obese adults. *Obes Res* 2002;10:985–990.
- [74] Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. Body fat, resting and exercise blood pressure and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study. *Obes Res* 1999;7:423–430.
- [75] Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997;11:107–111.
- [76] Lamounier-Zepter V, Rotthoff T, Ansurudeen I, Kopprasch S, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Increased aldosterone/renin quotient in obese hypertensive women: a novel role for low-density lipoproteins? *Horm Metab Res* 2006;38:471–475.
- [77] Payet MD, Goodfriend TL, Bilodeau L, Mackendale C, Chouinard L, Gallo-Payet N. An oxidized metabolite of linoleic acid increases intracellular calcium in rat adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1160–E1167.
- [78] Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid releasing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14211–14216.
- [79] Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II – sensitization in human adrenocortical cells. *Int J Obes* 2007;31:1605–1616.
- [80] Heikkila M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* 2002;43:4358–4365.
- [81] Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ $\beta$ -catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10866–10871.
- [82] Chen M, Hornsby PJ. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm Metab Res* 2006;38:549–555.
- [83] Gilbert S. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 2003.
- [84] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:477–487.
- [85] Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt signaling pathway. *Int J Obes* 2007;31:864–870.

[86] Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. Frequent mutations of  $\beta$ -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. Clin Endocrinol 2008;68:264–270.

[87] Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. Cancer Res 2005;65:7622–7627.

## V.2. Publikationen im Rahmen der kumulativen Habilitation / Sonderdrucke und Kopien

### V.2.1. Originalarbeiten

Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR: Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1998;339:27–31.

Seite 31

Willenberg HS, Bornstein SR, Dumser T, Ehrhart-Bornstein M, Barocka A, Chrousos GP, Scherbaum WA: Morphologic changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. **Endocr Res** 1998;3/4:963–967.

Seite 37

Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Páth G, Goretzki PE, Scherbaum WA, Chrousos GP: Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type 1 antagonist on human adrenal function. **Mol Psych** 2000;5:137–141.

Seite 43

Willenberg HS, Páth G, Vögeli TA, Scherbaum WA, Bornstein SR: Role of Interleukin-6 in the stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci** 2002;966:304–314.

Seite 49

Willenberg HS, Mansmann G, Fritzen R, Schott M, Feldkamp J, Schulte KM, Scherbaum WA, Bornstein SR: The short synacthen test in the evaluation of adrenal masses in patients with malignancies. **Endocr Res** 2002;4:793–797.

Seite 61

Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR: Human adipocytes secrete mineralocorticoid releasing factors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003;100:142111–1426.

Seite 65

Willenberg HS, Haase M, Papewalis C, Schott M, Scherbaum WA, Bornstein SR: Corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells. **Neuroendocrinology** 2005;82:274–281.

Seite 72

Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Funk RHW, Krug AW, Bornstein SR. Vascular-adrenal niche – endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II. **Horm Metab Res** 2006;38:476–480.

Seite 81

Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt signaling pathway. **Int J Obes** 2007;31:864–870.

Seite 87

Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. **Mol Cell Endocrinol** 2007;265–266:150–156.

Seite 95

Haase M, Schott M, Bornstein SR, Malendowicz LK, Scherbaum WA, Willenberg HS. CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor. **J Endocrinol** 2007;192:459–465.

Seite 103

Willenberg HS, Bahlo M, Wertenbruch T, M Schott, J Feldkamp, Scherbaum WA. Helpful diagnostic markers for defining hyperandrogenemia in hirsute women. **Steroids** 2008;73:41-46.

Seite 111

Willenberg HS, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M, Scherbaum WA. The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces adrenal IL-6 generation that does not interfere with the effect of endothelial cells on aldosterone synthesis. **Exp Clin Endocr Diab** 2008;116:S70–S74.

Seite 118

Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. **Mol Cell Endocrinol**. *In press, Epub November 2008.*

Seite 124

Haase M, Ansurudeen I, Paramonova I, Schinner S, Schott M, Papewalis C, Scherbaum WA, Willenberg HS. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. **Cell Tissue Res**. *In Press.*

Seite 130

**V.2.2. Übersichtsartikel / Reviews / Buchbeiträge**

Willenberg HS, Walters R, Bornstein SR: Use of laser microdissection in complex tissue. **Methods Enzymol** 2002;356:216–223.

Seite 138

Willenberg HS. Diagnostik und Therapie von Mineralokortikoidexzeßsyndromen. **Roman J Endocrinol Metab** 2007;2:13–23.

Seite 147

Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Disease, stress induced. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 824–827. Academic Press, Oxford 2007.

Seite 159

Willenberg HS, Zschucke D, Bornstein SR. Nebennierentumoren. **Internist** 2007;48:971–986.

Seite 166

Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. New mechanisms to control aldosterone synthesis. **Horm Metab Res** 2008;40:435-441.

Seite 223

## Danksagung

Dieses Manuskript faßt Arbeiten zusammen, die von mir in den vergangenen 10 Jahren zu meinem hier angegebenen speziellen Thema an verschiedenen Orten, hauptsächlich in Düsseldorf durchgeführt und publiziert wurden. Bei einer Reihe von Menschen möchte ich mich für deren Unterstützung bedanken.

Mein Dank geht in erster Linie an meine geliebte Familie, meine Frau Claudia Victoria und meine Tochter Luisa Maria, daneben an meinen Vater und an meine Groß- und Schwiegereltern, die alle mit viel Verständnis sowie Humor und persönlichem Einsatz eine unschätzbare große Hilfe und auch wichtiger Rückhalt waren. Mit Anleitungen zur Ausdauer und mit Aufmunterungen war es vor allem meine Frau, die mich in der Zielkurve angefeuert und zum erfolgreichen Einlauf begleitet hat.

Zu meinen Lehrern in der Endokrinologie zähle ich vor allem Herrn Professor Stefan R. Bornstein und Herrn Professor Werner A. Scherbaum, die mich wissenschaftlich und klinisch geführt haben.

Herrn Professor Bornstein habe ich die Bekanntschaft und Zusammenarbeit vieler Arbeitsgruppen und Persönlichkeiten zu verdanken. Er, seine Frau Monika Ehrhart-Bornstein und die Professoren Chrousos und Stratakis von den National Institutes of Health, haben mir immer und uneingeschränkt ihre Ressourcen zur Verfügung gestellt.

Mit ihnen und vor allem auch mit Herrn Professor Scherbaum, der zusammen mit Herrn Privatdozent Feldkamp meine klinische Ausbildung geprägt hat, war es möglich, zu jeder Tages- und Nachtzeit, wissenschaftliche Fragestellungen und Probleme zu diskutieren. Für die zuverlässige Überarbeitung von Manuskripten, für die Anstiftung zur Kreativität, für die kritischen Bemerkungen, das Interesse an der Forschungsarbeit und die Großzügigkeit bei der Gewährung von Freiräumen sowie für die Stimulation in der Hormonforschung gebührt allen ein außerordentlicher Dank.

Erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang auch die Unterstützung von Freunden und Mitarbeitern in unserer Klinik wie Dr. Reimar Fritzen, Prof. Matthias Schott und Dr. Sven Schinner sowie die unermüdliche Arbeit der in meiner Arbeitsgruppe engagierten technischen Assistenten und Doktoranden, die mir mit ihrem Engagement eine unersätzbare Hilfe waren.

Besonders stolz bin ich, daß ich die Arbeit einer Fakultät vorlegen kann, an der die Wiege der klinischen Endokrinologie und Diabetologie in Deutschland steht und an der die endokrinologische Forschung weltweit einen hervorragenden Ruf genießt.

**Curriculum vitae**

Name	Holger Sven Willenberg, Dr. med.
geboren	2. Oktober 1969 in Leipzig
Familienstand	verheiratet mit Claudia Willenberg, geb. Burcuşel 1 Tochter Luisa Maria
1981 – 1985	Kinder- und Jugendsportschule der Deutschen Hochschule für Körperkultur Leipzig
1987 – 1989	Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium an der Universität Halle-Wittenberg <i>Abitur</i>
1989 – 1990	Wehrdienst in Weißenfels und Bad Frankenhausen; Ungelernte Hilfskraft im Institut für Medizinische Biochemie, Universität Leipzig; Prof. Dr. E. Hofmann
1990 – 1997	Studium Humanmedizin mit Vertiefungsrichtung Biochemie, Universität Leipzig; 2 Forschungssemester <i>Teilapprobation</i>
11/97 – 4/98	Arzt im Praktikum am National Institute for Child Health and Human Development, Bethesda, MA, USA; Prof. Dr. G. P. Chrousos
5/98 – 9/99	Arzt im Praktikum und Assistent an der Deutschen Diabetesklinik Düsseldorf, Prof. Dr. W. A. Scherbaum
6/99	<i>Vollapprobation</i>
10/99 – 5/05	<i>Assistenzarzt</i> für Innere Medizin am Universitätsklinikum Düsseldorf - Deutsche Diabetes-Klinik; Prof. Dr. W. A. Scherbaum - Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie; Prof. Dr. W. A. Scherbaum - Klinik für Hämatologie und Onkologie; Prof. R. Haas - Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie; Prof. Dr. E. Strauer - Klinik für Stoffwechselkrankheiten und Ernährung; Dr. M. Schwarz
ab 09/04	<i>Facharzt</i> für Innere Medizin
ab 04/05	<i>Endokrinologe</i>
ab 12/07	Hypertensiologe DHL
ab 06/05	<i>Oberarzt</i> Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie, UKD; Prof. Dr. W.A. Scherbaum
12/01	<i>Dissertation</i> Morphologische, molekulare und funktionelle Studien zur Expression und Regulation von Interleukin-1 und Interleukin-1 Rezeptor in der gesunden Nebenniere und bei der Entwicklung von Nebennierentumoren
Mitglied- schaften	Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie 2003 Deutsche Hypertonie Gesellschaft / Hypertonieliga 2004 Deutsche Diabetes Gesellschaft 2004 Nordrhein-Westfälische Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie 2004 Endocrine Society 2006 European Society of Endocrinology 2007

**Verzeichnis der eigenen Publikationen (Stand 02/2009)**

1. Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR. Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. **N Eng J Med** 1998;339:27–31.
2. Willenberg HS, Bornstein SR, Dumser T, Ehrhart-Bornstein M, Barocka A, Chrousos GP, Scherbaum WA. Morphologic changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. **Endocr Res** 1998;3/4:963–967.
3. Bornstein SR, Willenberg HS, Scherbaum WA. Progress in molecular medicine: "laser capture microdissection". **Med Klin** 1998;93 (12):739–743.  
*Review.*
4. Stratakis CA, Carney JA, Kirschner LS, Willenberg HS, Brauer S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Synaptophysin immunoreactivity in primary pigmented nodular adrenocortical disease: neuroendocrine properties of tumors associated with Carney complex. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:1122–1128.
5. Willenberg HS, Hauner H, Scherbaum WA. A man with diabetes and a swollen leg. **Lancet** 1999;353:1527–1528.  
*Letter.*
6. Willenberg HS, Wiefels K, Driesch E, Hauner H. Diabetischer Muskelfarkt. **Dtsch Med Wochenschr** 2000;125:114–118.
7. Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Páth G, Goretzki PE, Scherbaum WA, Chrousos GP. Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type 1 antagonist on human adrenal function. **Mol Psych** 2000;5:137–141.
8. Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Adrenal Insufficiency. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 47–51. Academic Press, Oxford 2007.  
*Review.*
9. Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Disease, stress induced. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 824–827. Academic Press, Oxford 2007.  
*Review.*
10. Maurer M, Trajanoski Z, Frey G, Hiroi N, Galon J, Willenberg HS, Gold PW, Chrousos GP, Scherbaum WA, Bornstein SR. Differential gene expression profile of glucocorticoids, testosterone, and dehydroepiandrosterone in human cells. **Horm Metab Res** 2001;33:691–695.
11. Willenberg HS, Páth G, Vögeli TA, Scherbaum WA, Bornstein SR. Role of Interleukin-6 in the stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci** 2002;966:304–314.
12. Willenberg HS, Walters R, Bornstein SR. Use of laser microdissection in complex tissue. **Methods Enzymol** 2002;356:216–223.  
*Review.*

13. Willenberg HS, Mansmann G, Fritzen R, Schott M, Feldkamp J, Schulte KM, Scherbaum WA, Bornstein SR. The short synacthen test in the evaluation of adrenal masses in patients with malignancies. **Endocr Res** 2002;4:793–797.
14. Vrezas I, Willenberg HS, Mansmann G, Hiroi N, Fritzen R, Bornstein SR. Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: Basic and clinical aspects. **Microsc Res Techniq** 2003;61:308–314.  
*Review.*
15. Beery E, Middel P, Bahn A, Willenberg HS, Hagos Y, Koepsell H, Bornstein SR, Muller GA, Burckhardt G, Steffgen J. Molecular evidence of organic ion transporters in the rat adrenal cortex with adrenocorticotropin-regulated zonal expression. **Endocrinology** 2003;144:4519–4526.
16. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid releasing factors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003;100:14211–14216.
17. Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M. Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:965–970.
18. Schott M, Morgenthaler NG, Fritzen R, Feldkamp J, Willenberg HS, Scherbaum WA, Seissler J. Levels of autoantibodies against human TSH receptor predict relapse of hyperthyroidism in Graves' disease. **Horm Metab Res** 2004;36:92–96.
19. Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR. Vitamin C is an important co-factor for both adrenal cortex and adrenal medulla. **Endocr Res** 2004;30:871–875.  
*Review.*
20. Vrezas I, Willenberg HS, Bornstein SR. Adrenal cortex, anatomy. In: Luciano Martini (Ed.): **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, 50–52. Academic Press, 2004.  
*Review.*
21. Mansmann G, Willenberg HS, Bornstein SR. Inzidentalome der Nebennieren. In: Hauner und Mann (Eds.): **Intensivkurs Endokrinologie & Diabetologie** Herne 2005;157–169. Syllabus, 2005.  
*Review.*
22. Wolf A, Willenberg HS, Cupisti K, Schott M, Geddert H, Raffel A, Bornstein SR, Scherbaum WA, Knoefel WT. Adrenal pheochromocytoma with contralateral cortisol-producing adrenal adenoma: diagnostic and therapeutic management. **Horm Metab Res** 2005;37:391–395.
23. Schott M, Minich WB, Willenberg HS, Papewalis C, Seissler J, Feldkamp J, Bergmann A, Scherbaum WA, Morgenthaler NG. Relevance of TSH receptor stimulating and blocking autoantibody measurement for the prediction of relapse in Graves' disease. **Horm Metab Res** 2005;37:741–744.
24. Willenberg HS, Haase M, Papewalis C, Schott M, Scherbaum WA, Bornstein SR. Corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells. **Neuroendocrinology** 2005;82:274–281.

- 
25. Willenberg HS, Bahlo M, Scherbaum WA. Hirsutism. **N Engl J Med** 2006;354:1533–1535. *Letter*.
  26. Papewalis C, Fassnacht M, Willenberg HS, Domberg J, Schinner S, Bornstein SR, Scherbaum WA, Schott M. Induction of antitumour immunity in adrenocortical carcinoma. **Clin Endocrinol** 2006;65:215–222.
  27. Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Funk RHW, Krug AW, Bornstein SR. Vascular-adrenal niche – endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II. **Horm Metab Res** 2006;38:476–480.
  28. Willenberg HS, Vrezas I, Bornstein SR. Störungen der neuro-, immuno- und endokrinen Regulation in der Nebenniere. In: Ganten, Ruckpaul & Köhrle (Eds.): **Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen**, 323–332. Springer, 2006. *Review*.
  29. Willenberg HS, Feldkamp J, Lehmann R, Schott M, Goretzki PE, Scherbaum WA. A case of catecholamine-excess and Cushing's syndrome due to a corticotropin-secreting paraganglioma. **Ann N Y Acad Sci** 2006;1073:52–58.
  30. Willenberg HS, Schott M, Saeger W, Tries A, Scherbaum WA, Bornstein SR. Expression of connexins in chromaffin cells of normal human adrenals, benign and malignant pheochromocytomas. **Ann N Y Acad Sci** 2006;1073:578–583.
  31. Willenberg HS. Diagnostik und Therapie von Mineralokortikoidexzeßsyndromen. **Roman J Endocrinol Metab** 2007;2:13–23. *Review*.
  32. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt signaling pathway. **Int J Obes** 2007;31:864–870.
  33. Schott M, Eckstein A, Willenberg HS, Nguyen TBT, Morgenthaler NG, Scherbaum WA. Improved prediction of relapse of Graves' thyrotoxicosis by combined determination of TSH receptor and thyroperoxidase antibodies. **Horm Metab Res** 2007;39:56–61.
  34. Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. **Mol Cell Endocrinol** 2007;265–266:150–156.
  35. Haase M, Schott M, Bornstein SR, Malendowicz LK, Scherbaum WA, Willenberg HS. CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor. **J Endocrinol** 2007;192:459–465.
  36. Schott M, Willenberg HS, Jung G, Nguyen TB, Knoefel WT, Scherbaum WA. Identification of occult metastases of medullary thyroid carcinoma by pentagastrin-stimulated intravenous sampling followed by targeted surgery. **Clin Endocrinol** 2007;66:405–409.
-

- 
37. Wertenbruch T, Willenberg HS, Sagert C, Nguyen TBT, Feldkamp J, Groeger C, Scherbaum WA, Schott M. Serum selenium levels in patients with remission and relapse of Graves' disease. **Med Chem** 2007;3:281–4.
  38. Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Adrenal Insufficiency. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 47–51. Academic Press, Oxford, 2007.  
*Review.*
  39. Bornstein SR, Gruber M, Willenberg HS, Stratakis CA, Chrousos GP. Cushing's Syndrome, Medical Aspects. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 682–687. Academic Press, Oxford, 2007.  
*Review.*
  40. Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Disease, stress induced. In: Fink G (Ed.): **Encyclopedia of Stress**. Vol. 1. 824–827. Academic Press, Oxford, 2007.  
*Review.*
  41. Willenberg HS, Bahlo M, Schott M. Polycystic ovary syndrome and infertility. **JAMA** 2007;297:2582–2583.  
*Letter.*
  42. Schott M, Sagert C, Willenberg HS, Ramp U, Varro A, Schinner S, Eisenberger C, Raffel A, Zacharowski K, Scherbaum WA, Perren A. Carcinogenic hypergastrinemia: Signet ring cell carcinoma in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1 with Zollinger–Ellison's Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2007;92:3378–3382.
  43. Willenberg HS, Zschucke D, Bornstein SR. Nebennierentumoren. **Internist** 2007;48:971–986.  
*Review.*
  44. Schinner S, Fritzen R, Schott M, Willenberg HS, Scherbaum WA. Spontaneous remission of primary hyperparathyroidism. **Exp Clin Endocr Diab** 2007;115:619-621.
  45. Willenberg HS, Bahlo M, Wertenbruch T, M Schott, J Feldkamp, Scherbaum WA. Helpful diagnostic markers for defining hyperandrogenemia in hirsute women. **Steroids** 2008;73:41-46.
  46. Papewalis C, Jacobs B, Wuttke M, Ullrich E, Baehring T, Fenk R, Willenberg HS, Schinner S, Cohnen M, Seissler J, Zacharowski K, Scherbaum WA, Schott M. IFN- $\alpha$  skews monocytes into CD56<sup>+</sup>-expressing dendritic cells with potent functional activities *in vitro* and *in vivo*. **J Immunol** 2008;180:1462-1470.
  47. Papewalis C, Wuttke M, Jacobs B, Domberg J, Willenberg HS, Baehring T, Cupisti K, Raffel A, Chao L, Fenk R, Seissler J, Scherbaum WA, Schott M. Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma. **Horm Metab Res** 2008;40:108–116.
  48. Domberg J, Liu C, Papewalis C, Pflieger C, Xu K, Willenberg HS, Hermsen D, Scherbaum WA, Schloot NC, Schott M. Circulating chemokines in patients with autoimmune thyroid diseases. **Horm Metab Res** 2008;40:416–421.
-

- 
49. Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. New mechanisms to control aldosterone synthesis. **Horm Metab Res** 2008;40:435–441.  
*Review.*
  50. Sell MA, Schott M, Tharandt L, Cissewski C, Scherbaum WA, Willenberg HS. Functional central hypothyroidism in the elderly. **Aging Clin Exp Res** 2008;20:207–210.
  51. Papewalis C, Wuttke M, Seissler J, Meyer Y, Kessler C, Jacobs B, Ullrich E, Willenberg HS, Schinner S, Baehring T, Scherbaum WA, Matthias Schott M. Dendritic cell vaccination with xenogenic polypeptide hormone induces tumor rejection in neuroendocrine cancer. **Clin Cancer Res** 2008;14:4298–4305.
  52. Ramos-Lopez E, Lange B, Kahles H, Willenberg HS, Meyer G, Penna-Martinez M, Reisch N, Hahner S, Seissler J, Badenhoop K. Insulin gene polymorphisms in type 1 diabetes, Addison's disease and the polyglandular autoimmune syndrome type II. **BMC Med Genet** 2008;9:65.
  53. Willenberg HS, Lehnert H. Grundlagen und Management der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose. **Internist** 2008;49:1186–96.  
*Review.*
  54. Wuttke M, Papewalis C, Meyer Y, Kessler C, Jacobs B, Willenberg HS, Schinner S, Kouatchoua C, Baehring T, Scherbaum WA, Matthias Schott M. Amino acid-modified calcitonin immunization induces tumor epitope-specific immunity in a transgenic mouse model for medullary thyroid carcinoma. **Endocrinology** 2008;149:5627–5634.
  55. Schinner S, Kempf K, Overmann H, Willenberg HS, Schott M, Rose B, Scherbaum WA, Herder C. Association of impaired glucose metabolism in morbid obesity with hypoadiponectinaemia. **Exp Clin Endocr Diab** 2008;S64–S69.
  56. Willenberg HS, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M, Scherbaum WA. The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces adrenal IL-6 generation that does not interfere with the effect of endothelial cells on aldosterone synthesis. **Exp Clin Endocr Diab** 2008;116:S70–S74.
  57. Fassnacht M, Johansen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B for the German ACC Registry group and the ENSAT ACC working group. Limited prognostic value of the 2004 UICC staging classification for adrenocortical carcinoma – proposal for a revised TNM classification. **Cancer** 2008;115:243–250.
  58. Willenberg HS, Kolentini C, Quinkler M, Cupisti K, Krausch M, Schott M, Scherbaum WA. The sodium to urinary sodium to (potassium)<sup>2</sup> to urinary potassium (SUSPPUP) ratio in primary aldosteronism. **Eur J Clin Invest** 2009;39:43–50.
  59. Lehwald N, Cupisti K, Willenberg HS, Schott M, Krausch M, Raffel A, Wolf A, Brinkmann K, Eisenberger CF, Knoefel WT. Standard-radical vs. function-preserving surgery of benign nodular goiter – a sonographic and biochemical 10 years-follow-up study. **Langenbecks Arch Surg** 2009;394:279–283.
  60. Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. **Mol Cell Endocrinol**. *In Press, Epub Nov 2008.*
-

61. Haase M, Ansurudeen I, Paramonova I, Schinner S, Schott M, Papewalis C, Scherbaum WA, Willenberg HS. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. **Cell Tissue Res**. *In Press*.
62. Lachenmayer A, Lichtenauer UD, Cox T, Schott M, Malendowicz LK, Goretzki PE, Cupisti K, Scherbaum WA, Bornstein SR, Willenberg HS. Nestin as a valuable marker in the classification of adrenocortical tumors. **Horm Metab Res**. *Accepted*.
63. Björklund P, Cupisti K, Mårten Fryknäs, Isaksson A, Willenberg HS, Åkerström G, Hellman P, Westin G. Microarray expression analysis of human pheochromocytoma: Differential expression of stathmin. **Exp Clin Endocrinol Diab**. *Accepted*.