

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Studien zur Expression und Regulation des CITED2-Gens
in der humanen Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie NCI-H295R

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Matthias Haase

(2010)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H.S. Willenberg

Korreferent: Prof. Dr. med. K. Cupisti

meinen Eltern und meiner Familie in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Die Entwicklung der Nebenniere	6
1.2 Der transkriptionelle Koaktivator CITED2	8
1.3 Corticotropin und der cAMP-Signalweg	9
1.4 Wachstumsfaktoren und der MAP-Kinase-Signalweg	10
1.5 Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Zellkultur	13
2.1.1 Die NCI-H295 und NCI-H295R Zelllinien	13
2.1.2 Die Kultivierung der NCI-H295R Zellen	14
2.2 Reporterassay	16
2.2.1 Beschreibung der verwendeten Konstrukte	16
2.2.2 Versuchsaufbau und Transfektion	19
2.2.3 Messung der Luziferaseaktivität und Auswertung	19
2.3 Semiquantitative TaqMan PCR	21
2.3.1 Versuchsaufbau und Stimulation	21
2.3.2 RNA-Isolierung	21
2.3.3 DNase Verdau	22
2.3.4 Messung der RNA-Konzentration und Reinheit	22
2.3.5 cDNA-Synthese	23
2.3.6 Erstellung der Primer und TaqMan-Sonden	23
2.3.7 Semi-quantitative TaqMan PCR	24
2.4 Immunfluoreszenztests	28

3. Ergebnisse	29
3.1 Studien zur CITED2-Promotoraktivität	29
3.2 Studien zur CITED2-mRNA Expression	32
3.3 Studien zur CITED2-Protein Expression	35
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	43
7. Anhang	53
7.1 Abkürzungsverzeichnis	53
7.2 Danksagung	55
7.3 Eigenständigkeitserklärung	56
7.4 Lebenslauf	57
7.5 Veröffentlichungen	58

1. Einleitung

1.1. Die Entwicklung der Nebenniere

In der Entwicklung der regulären Morphologie und Funktion der Nebennieren sind eine Vielzahl zeitlich abgestimmter Prozesse der Genexpression durch die An- und Abschaltung von Genen und dessen Kofaktoren von essenzieller Bedeutung. Die Entwicklung der humanen Nebenniere beginnt mit der Kondensation von Zölomepithelzellen in den medialen Anteilen der Urogenitalleiste zwischen der Aorta und der Wurzel des dorsalen Mesenteriums in der 4. Entwicklungswoche (Else *et al.* 2005, Mesiano *et al.* 1997). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass die durch Proliferation von Zölomepithel entstehende Zellaggregation den gemeinsamen Ursprung der steroidogenen Gewebe einschließlich der Gonaden und des adrenalen Kortex darstellt (Hatano *et al.* 1996). Während sich die zur Zölomhöhle gelegenen Anteile zur Anlage der Gonaden differenzieren, bildet sich aus den zur dorsalen Aorta gelegenen Anteilen das adrenale Primordium (Hatano *et al.* 1996). Bis zur 8. Entwicklungswoche haben sich zwei unterschiedliche Zonen im adrenalen Primordium differenziert. Die fetale innere Zone (*Zona fetal*is) besteht aus großen polygonalen Zellen, exprimiert die 17 α -Hydroxylase und bildet hauptsächlich adrenale Androgene wie das Dehydroepiandrosteron und sein sulfatiertes Derivat (DHEA-S) (Keegan *et al.* 2002, Mesiano *et al.* 1997). Die definitive äußere Zone hingegen besteht aus dicht gepackten kleineren proliferierenden Zellen und wird als Ansammlung adrenokortikaler Vorläuferzellen betrachtet (Mesiano *et al.* 1997, Muench *et al.* 2003). Bis zur 9. Entwicklungswoche wandern Neuralleistenzellen als chromaffine Vorläuferzellen des späteren Nebennierenmarks in das adrenokortikale Primordium ein, wo sie sich zunächst inselförmig verteilt gruppieren (Molenaar *et al.* 1990). Eine bindegewebige Kapsel entsteht ungefähr in der 9. Entwicklungswoche (Hammer *et al.* 2005). In der darauf folgenden Fetalperiode zeigt sich der prinzipielle Aufbau der sich entwickelnden Nebenniere weitgehend konstant. Postnatal kommt es erneut zu deutlichen Veränderungen. Während die chromaffinen Zellinseln zum zentral gelegenen Nebennierenmark konfluieren, beginnt sich die *Zona fetal*is zurückzubilden und es kommt zu der Ausbildung der

für die erwachsene Nebenniere typischen *Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata* und *Zona reticularis*. Ihren Ursprung finden die adulten Zonen in Vorläuferzellen, deren Entwicklungsverlauf bereits in der frühen Embryonalzeit noch vor der Ausbildung der fetalen und definitiven Zone festgelegt wurde (Zubair *et al.* 2008).

Auf molekularer Ebene wird die Entwicklung der Nebenniere durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren gesteuert. Bereits bei der Bildung der Urogenitalleiste und des adrenogonadalen Primordiums interagieren eine Vielzahl verschiedener Faktoren einschließlich des Sonic-Hedgehog Signalwegs, WNT4, Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (PBX1), Forkhead box D2 (Foxd2) und das Adrenocortical Dysplasia (*Acd*) Gen (Else *et al.* 2005).

Eine besondere Rolle für die Entwicklung des adrenogonadalen Primordiums spielt der Steroidogenic Factor-1 (SF-1). Die Ausschaltung des *Ftz-F1* Gens, welches für SF-1 kodiert, führt in Mäusen zum Fehlen der Nebennieren und der Gonaden. In den Vorläuferzellen des adrenogonadalen Primordiums zeigte sich in der Abwesenheit von SF-1 eine erhöhte Apoptoserate, so dass dieser Faktor für das Überleben von steroidogenen Zellen von Bedeutung zu sein scheint (Luo *et al.* 1994). Neben SF-1 stellt DAX-1 einen wichtigen Regulator der Nebennierenrindenentwicklung dar. Ursprünglich wurden Mutationen im DAX-1 Gen als Ursache für die zytomegale Form der X-chromosomalen kongenitalen adrenalen Hypoplasie identifiziert. Diese Erkrankung ist durch das Fehlen der definitiven Zone und durch einen Mangel an Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Androgenen charakterisiert (Zanaria *et al.* 1994). Aufgrund der Kolo-kalisation von SF-1 und DAX-1 während der Entwicklung wurde eine Interaktion in gemeinsamen entwicklungsrelevanten Signalwegen angenommen (Ikeda *et al.* 1996), und in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von DAX-1 durch SF-1 reguliert wird (Kawabe *et al.* 1999). Im Gegensatz zu den Folgen von Mutationen im humanen DAX-1 Gen zeigten sich im DAX-1 Knock-Out-Modell in der männlichen Maus vergleichsweise geringe Veränderungen. Die normalerweise in der Pubertät ausbleibende Regression der fetalen Zone unterblieb und es fand sich bei morphologisch unauffälliger Ausbildung der *Zona fasciculata* und *Zona glomerulosa* eine verringerte Expression des p450_{scc} Enzyms (Cytochrome P450 side chain

cleaving enzyme) in der *Zona fasciculata*, welches die Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon katalysiert (Yu *et al.* 1998).

Neben den oben beschriebenen Faktoren wurde der transkriptionelle Koaktivator CITED2 (CBP interacting transactivator with ED-rich tail 2) als relevanter Faktor für die Organogenese der Nebenniere identifiziert. Das Ausschalten des CITED2-Gens in Mäusen führte zu einem Phänotyp bestehend aus Exencephalus, Neuralleistendefekten, Herzfehlern und einer Nebennierenagenesie (Bamforth *et al.* 2001). Initial wurde spekuliert, dass das Fehlen der Nebennieren die indirekte Folge einer fehlerhaften Entwicklung des Nebennierenmarkes im Rahmen der Neuralleistendefekte sei. Im folgenden Abschnitt soll der transkriptionelle Koaktivator CITED2 näher beschrieben werden.

1.2. Der transkriptionelle Koaktivator CITED2

Das Gen für CITED2 (CBP interacting transactivator with ED-rich tail 2) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 6 an der Position 6q23.3 lokalisiert und besteht aus 2 Introns und 3 Exons, welche für die Isoformen MRG1 (Melanocyte-specific gene-related gene) und p35srj kodieren. Während in der MRG1 Isoform beide Introns durch Splicing-Prozesse herausgeschnitten werden, wird in p35srj das Intron 2 als Sequenz für eine serinhaltige molekulare Brücke exprimiert (Leung *et al.* 1999). Die Bedeutung der Isoformen ist bislang nicht geklärt, wobei p35srj die dominante Form zu sein scheint (Leung *et al.* 1999).

Einerseits ist CITED2 in der Lage die Transkription bestimmter Gene durch molekulare Brückenbildung von Transkriptionsfaktoren wie dem Transcription Factor AP2 (TFAP2) zum CREB Binding Protein (CBP) zu aktivieren (Bamforth *et al.* 2001, Braganca *et al.* 2003). Andererseits inhibiert CITED2 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie dem Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) durch kompetitive Besetzung von Bindungsstellen am CBP (Bhattacharya *et al.* 1999). Die Überexpression von CITED2 in Fibroblasten und Hepatozyten führt zur Proliferationssteigerung (Kranc *et al.* 2003, Tien *et al.* 2004) und die Injektion von CITED2-überexprimierenden Zellen induziert die Entstehung von Tumoren in Nacktmäusen (Sun *et al.* 1998). In Ovarialkarzinomzellen ist CITED2 in wachstumsvermittelnde Signalwege eingebunden und scheint bei der Entstehung von zellulären Resistenzen gegen zytotoxische Platinverbindungen beteiligt zu

sein (Yanagie *et al.* 2008, Young *et al.* 2007). Im Rahmen von hypoxischem Stress in Fibroblasten und Mammakarzinomzellen wirkt CITED2 inhibierend auf pro-apoptotischen Signale, welche durch Hif-1 α vermittelt werden (Bakker *et al.* 2007). Im Gegensatz hierzu fördert CITED2 in Neuronen der Großhirnrinde auch die Apoptose (Gonzales *et al.* 2008). Damit scheint die Funktion von CITED2 in Abhängigkeit des zellulären Kontextes variieren zu können. Die Expression von CITED2 wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren einschließlich Interleukin-1 α , 2, 4, 6, 9, 11, Insulin, Platelet derived growth factor und Lipopolysacchariden in Abhängigkeit vom vorliegenden Zelltyp gesteuert (Sun *et al.* 1998). Transforming growth factor-beta (TGF- β) wurde hingegen sowohl als negativer als auch positiver Regulator der CITED2-Expression identifiziert (Chen *et al.* 2001, Chou *et al.* 2006, Luo *et al.* 2005, Yokota *et al.* 2003).

1.3. Corticotropin und der cAMP-Signalweg

Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH, Corticotropin) ist einer der Hauptregulatoren der Nebennierenrindenfunktion. Ausgelöst durch verschiedene Stressoren und in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus erfolgt im Hypothalamus die Sekretion von Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), welches dann CRH-Rezeptoren vom Typ 1 auf den basophilen Zellen der Adenohypophyse aktiviert. Über verschiedene Signaltransduktionswege kommt es daraufhin zu einer vermehrten Produktion und Freisetzung von Pro-opiomelanocortin (POMC) in das interstitielle Gewebe und den Blutkreislauf. In Abhängigkeit von der Anwesenheit von Proteasen kommt es nun zu einer Freisetzung verschiedener Peptid-Fragmente. Hierzu zählen neben Corticotropin das Lipotropin/Endorphin am C-terminalen Ende und ein Abschnitt am N-terminalen Ende, welcher unter anderem auch die Sequenz von γ -Melanotropin (γ -MSH) enthält (Bicknell *et al.* 2008). Corticotropin (ACTH) ist ein Peptid mit einer Länge von 39 Aminosäuren und entfaltet im wesentlichen seine Wirkung über die Bindung an den Melanocortin Typ 2 Rezeptor (MC2R), welcher in die Gruppe der G-Protein gekoppelten 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren gehört (Costa *et al.* 2004). Der MC2R wird in allen Zonen der Nebennierenrinde exprimiert (Reincke *et al.* 1998). Die Bindung von ACTH an den Rezeptor führt über die Freisetzung einer stimulierenden Untereinheit des G-Proteins und die Aktivierung der Adenylatzyklase zum Anstieg der intrazellulären Konzentration

von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Sala *et al.* 1979). Der Anstieg der cAMP-Spiegel aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche durch die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine die Generierung von mRNA, wie z.B. für SF-1, die Zellfunktion und die Hormonsekretion steuert (Stocco *et al.* 2005). Durch die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ist der cAMP-Signalweg neben der Steroidogenese auch an der Regulation von Wachstum und Proliferation von adrenokortikalen Zellen beteiligt (Robinson-White *et al.* 2006, Winnay and Hammer 2006). Dies wird durch klinische Beobachtungen unterstützt, wobei aktivierende Mutationen in der Alpha-Untereinheit des stimulierenden G-Proteins über eine Aktivierung der Adenylatzyklase im Rahmen des McCune-Albright- Syndroms zur adrenalen Tumorbildung sowie zum Hypercortisolismus führen können (Weinstein *et al.* 1991). Auch Defekte der regulatorischen Unterheit R1alpha der Proteinkinase A, welche eine Aktivierung derselben zur Folge haben, sind im Rahmen des Carney-Complexes an der Tumorgenese und der Aktivierung der Steroidogenese adrenokortikaler Zellen beteiligt (Stratakis *et al.* 2001). Weitere Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe zeigen, dass inaktivierende Mutationen der Phosphodiesterase (PDE) 11A4 über einen reduzierten Abbau von cAMP ebenfalls mit der adrenalen Tumorentstehung assoziiert sind (Horvath *et al.* 2006). Auch durch Mutationen inaktivierte und mit der PDE11A4 assoziierte Proteine können zu Nebennierentumoren führen (Übersicht in Haase *et Willenberg* 2009). Zusammengefasst stellt der cAMP-Signalweg einen zentralen Bestandteil der Regulation von Steroidogenese und Wachstum in der Nebennierenrindenzelle dar. Eine Übersicht über den cAMP-Signalweg ist in Abbildung 1.4. dargestellt.

1.4. Wachstumsfaktoren und der MAP-Kinase-Signalweg

Wachstumsfaktoren regulieren wichtige zelluläre Funktionen wie Proliferation und Überleben. Sowohl in der adulten Nebenniere als auch während der Nebennierenentwicklung wurden der basische Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF) und die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II (insulin-like growth factor, IGF) als wichtige Stimulatoren von Wachstum und Proliferation identifiziert (Bland *et al.* 2003; Mesiano *et al.* 1997)

Intrazellulär werden Proliferation, Überleben und Differenzierung unter anderem durch die Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gesteuert. Sie umfasst die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1, ERK2, ERK5), die Jun-amino terminalen Kinasen (JNK) sowie die p38-MAPK (Pimental *et al.* 2007). Prinzipiell verläuft die Aktivierung der verschiedenen Kinasen ähnlich. Über die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen membranständigen (Tyrosinkinase-) Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung eines G-Proteins, welches dann über eine nachgeschaltete Phosphorylierungskaskade erst die MAPKK Kinasen (MAPKKK) und dann die MAPK Kinasen (MAPKK) und letztendlich die MAPK selbst aktiviert (Roux *et al.* 2004).

Zu den am besten untersuchten MAPK gehört der ERK-Signaltransduktionsweg. Hierbei kommt es durch Wachstumsfaktoren und Mitogene zu einer Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, welche indirekt über Adaptorproteine in der Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras resultiert. Dieses wiederum aktiviert über Raf die nachgeschalteten Proteinkinasen MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase 1/2) und ERK 1/2 (Johnson *et al.* 2002). Die ERK wiederum steuern durch Phosphorylierungen die Funktion einer Vielzahl von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen. Mittlerweile existieren über 160 bekannte Substrate einschließlich von Transkriptionsfaktoren, Proteinen des Zytoskeletts, Phosphatasen, Kinasen und anderen signalübertragende Proteinen, die der Kontrolle der ERK unterliegen (Yoon *et al.* 2006).

Die fehlerhafte Regulation von MAPK wird im Zusammenhang mit vielfältigen pathologischen Zellfunktionen gesehen. Insbesondere im Rahmen der malignen Zelltransformation scheinen die MAPK eine besondere Rolle zu spielen. (Dhillon *et al.* 2007). In adrenokortikalen Zellen sind MAPK sowohl innerhalb von wachstumsregulierenden Prozessen als auch an der Steroidbiosynthese beteiligt (Wu *et al.* 2002). Insbesondere die Synthese und Sekretion von Mineralokortikoiden scheint durch das System der MAPK reguliert zu werden (Otis *et al.* 2006). Eine Übersicht über den MAPK-Signalweg ist in Abbildung 1.4. dargestellt.

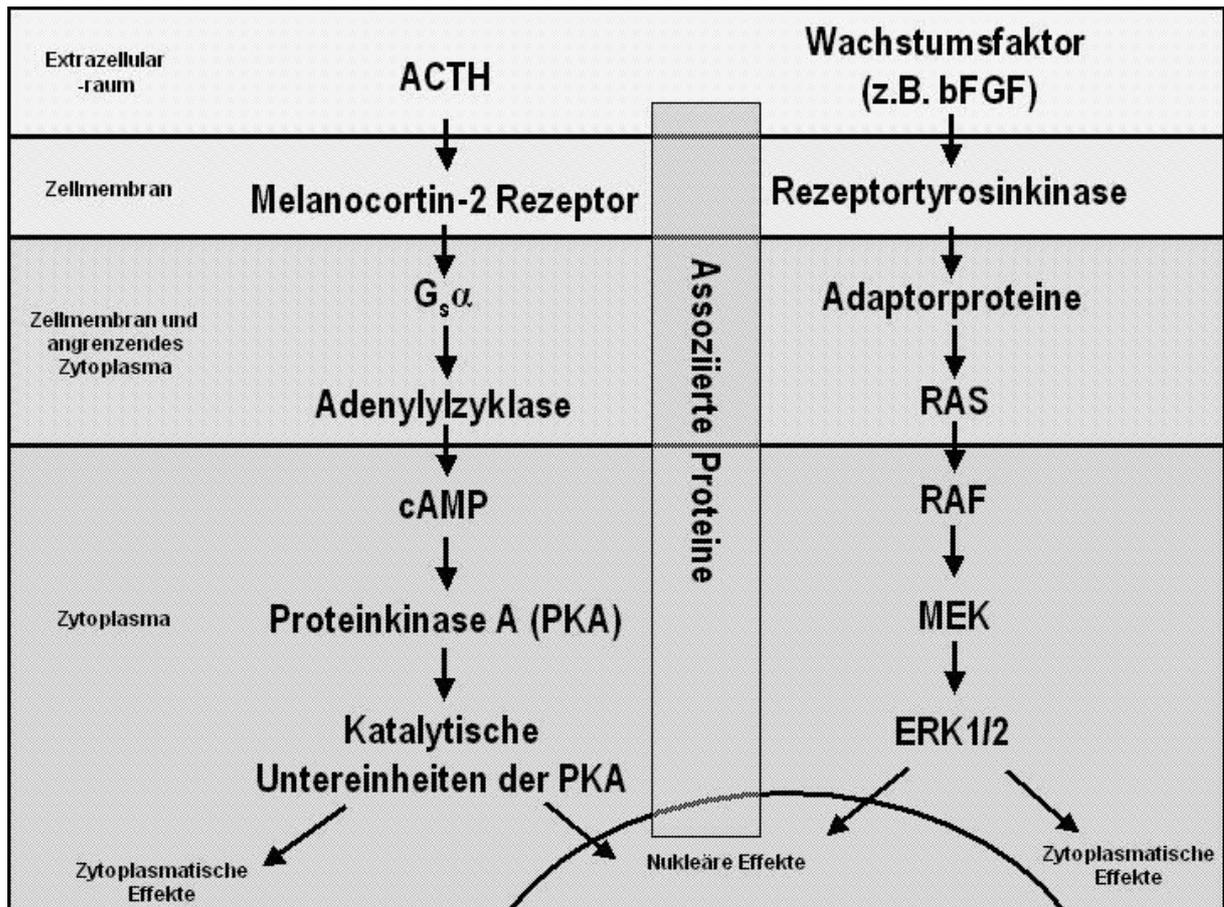


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des cAMP-Signalwegs und des MAPK-Signalwegs. Erläuterungen siehe Text (Abschnitt 1.3. und 1.4.).

1.5. Ziel der Arbeit

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CITED2 eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Nebenniere spielt. Auch in der humanen Nebennierenentwicklung und der adulten Nebenniere wird CITED2 exprimiert (Haase *et al.* 2007). Unklar ist jedoch, wie CITED2 in die physiologischen Abläufe der humanen Nebennierenrindenzelle eingebunden ist. Sowohl die regulierenden Faktoren als auch die assoziierten Signalwege in der humanen Nebennierenrindenzelle sind weitgehend unklar. In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob CITED2 in humanen Nebennierenrindenzellen durch zentrale Faktoren wie ACTH oder den cAMP-Signalweg reguliert wird. Ebenfalls soll der Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF und des MAP-Kinase-Signalweges auf die Expression von CITED2 untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Die NCI-H295 und NCI-H295R Zelllinien

Die NCI-H295 Zelllinie wurde im Jahre 1980 an den National Institutes of Child Health and Human Development aus einem in Lunge und Leber metastasierten und invasiv wachsenden Nebennierenrindenzarzinom einer 48 Jahre alten Patientin etabliert. Klinisch zeigte die Patientin Symptome eines Steroidexzesses einschließlich Akne, Hirsutismus, Ödemen und Irregularitäten der Regelblutung (Gazdar *et al.* 1990).

Die initial aus dem Tumor gewonnenen Zellen zeigten nur eine geringe Tendenz zur Anheftung am Boden der Zellkulturplatten. Durch Verwerfen der nicht am Zellkulturboden angehefteten Zellen wurde aus den NCI-H295 Zellen im weiteren Verlauf dann der in dieser Arbeit verwendete NCI-H295R Stamm selektioniert (Abbildung 2.1.1, Rainey *et al.* 2004).

Die NCI-H295 Zellen zeigen multiple genetische Aberrationen, einen hypertriploiden Chromosomensatz und auch *in vivo* Charakteristika von malignen Zellen (Gazdar *et al.* 1990). Trotz der Vielzahl an genetischen Veränderungen finden sich jedoch noch die typischen Eigenschaften von differenzierten adrenokortikalen Zellen. NCI-H295 Zellen besitzen die Ultrastruktur von steroid-sezernierenden Zellen und ein Enzymsystem, welches die Synthese von mehr als 30 verschiedenen Steroiden ermöglicht (Gazdar *et al.* 1990). Die meisten kultivierten NCI-H295R Zellen exprimieren nur geringe Mengen an mRNA, welche für den MC2R kodiert und sprechen daher nur kaum bis gar nicht auf eine Stimulation mit ACTH an (Mountjoy *et al.* 1994). Die Stimulation des cAMP-abhängigen intrazellulären Signalweges durch Forskolin führt in NCI-H295 Zellen zur gesteigerten Synthese von Steroiden einschließlich von Cortisol, 11-Deoxycortisol, Corticosteron, DHEA, DHEA-S und Androstendion (Rainey *et al.* 1993). Die Aldosteronsynthese kann einerseits über den cAMP-abhängigen Signalweg und Kalium, andererseits aber auch über die Aktivierung von AT-1-Rezeptoren durch Angiotensin 2 und intrazellulär über Phosphoinositidase-C und

den intrazellulären Calciumspiegel reguliert werden (Bird *et al.* 1993, Bird *et al.* 1995, Clyne *et al.* 1995).

Zusammengefasst verfügen die NCI-H295 Zellen hinsichtlich der Steroidbiosynthese über wesentliche Charakteristika der *Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis* und können daher als brauchbares Modell einer adrenokortikalen Zelle betrachtet werden.

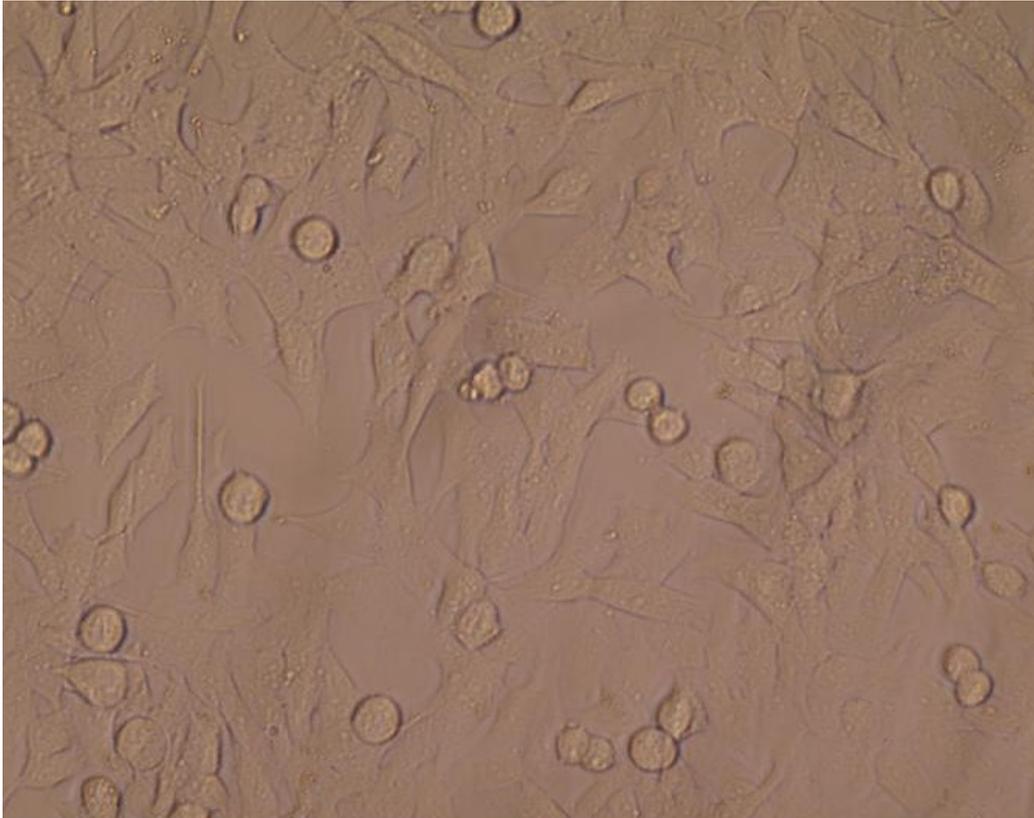


Abbildung 2.1.1. Lichtmikroskopische Darstellung von NCI-H295R Zellen unter Standardbedingungen in der Zellkultur (Nativaufnahme ohne spezifische Färbung).

2.1.2. Die Kultivierung von NCI-H295R Zellen

Die permanente Nebennierenrindencarcinom-Zelllinie NCI-H295R wurde für die Stimulationsexperimente als Modellsystem gewählt. Die Zellen wurden in RPMI1640 + L-Glutamin Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit 2% fetalem Kälberserum (Invitrogen), Insulin 66 nM (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Hydrokortison 10 nM (Sigma-Aldrich), Apo-Transferrin 10 µg/ml (Sigma-Aldrich), Estradiol 10 nM (Sigma-Aldrich), Natrium-Selenit 30 nM (Sigma-Aldrich), Penicillin 100 U/ml (Invitrogen) und Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen)

in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95% Raumluft und 5% Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde in Abhängigkeit der Zelldichte alle 1-3 Tage gewechselt. Bei Konfluenz erfolgte die Aufspaltung mit Hilfe von Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland). Hierzu wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung mit einem pH von 7,4 (PBS, Phosphate Buffered Saline, Gibco/Invitrogen) gewaschen und mit Accutase für 7 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die in Accutase losgelösten Zellen wurden darauf für 6 Minuten mit 1500 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde erneut in Medium suspendiert und die erhaltene Anzahl an Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter Ausschluss nicht vitaler Zellen mittels Trypanblau (Sigma-Aldrich) ausgezählt. In Abhängigkeit vom geplanten Experiment wurden die Zellen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben in Zellkulturmedium entweder auf 6-Well Platten für die RNA-Extraktion, auf 24-Well Platten für die Transfektion oder auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ausgesät.

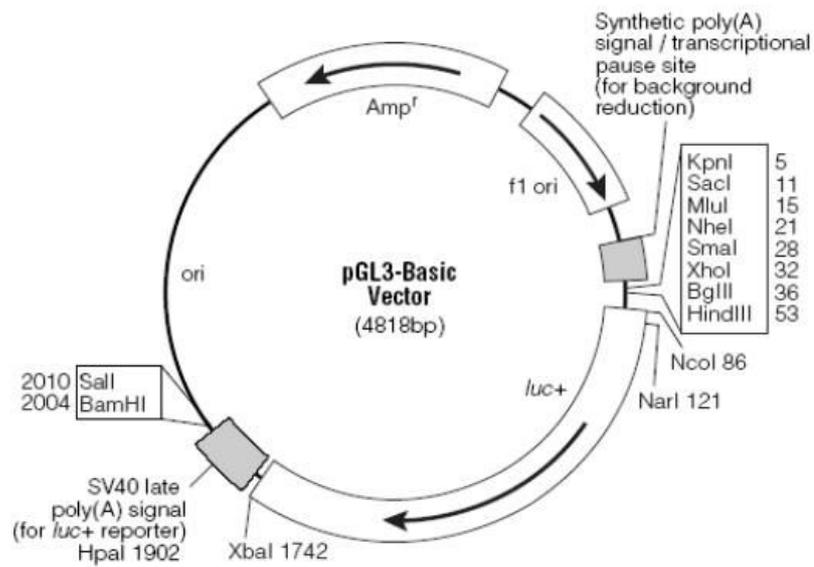
2.2. Reportergenassay

2.2.1. Beschreibung der verwendeten Konstrukte

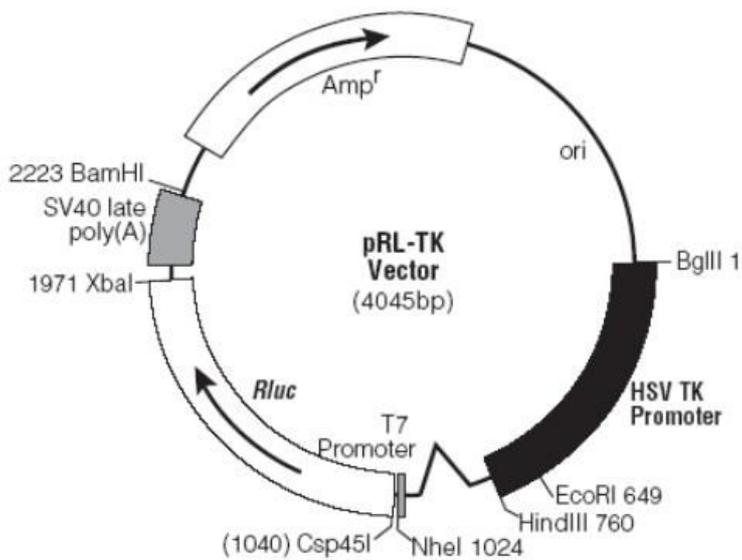
Zur Messung der transkriptionellen Aktivität der 5'-Region des CITED2-Gens kam ein Reportergenassay zur Anwendung. Die Basis des verwendeten Konstrukts bildet ein pGL3-Basic Vektor (Abbildung 2.2.1. A, Promega, Mannheim, Deutschland), welcher die Sequenz der Firefly-Luziferase ohne eukaryotischen Promotor oder eine Enhancer Sequenz enthält. Zur Messung der CITED2-Promotor-Aktivität wurde die 5' flankierende Region des CITED2 Gens in den pGL3-Basic Vektor inseriert.

Das hier verwendete CITED2-Reporter-Plasmid wurde uns freundlicherweise von Professor Battacharya aus Oxford zur Verfügung gestellt. Die Sequenz der flankierenden 5'-Region des CITED2 Gens ist in Abbildung 2.2.2. entsprechend den Beschreibungen von Leung *et al.* 1999 dargestellt. Zur Gütekontrolle des Plasmides erfolgte eine partielle Sequenzierung des Inserts im Uhrzeigersinn des Plasmides mittels eines Primers mit der Sequenz 5' CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3' durch die Fa. GATC Biotech (GATC-Biotech, Konstanz, Deutschland).

Zur internen Kontrolle und zur Normalisierung der transkriptionellen Aktivität kam ein pRL-TK – Konstrukt (Abbildung 2.2.1. B, Promega, Mannheim, Deutschland) zur Anwendung, welches die Sequenz des Herpes-Simplex-Thymidinkinase Promotors enthält. Dieser gewährleistet eine gleichmäßige und moderate Expression der nachgeschalteten *Renilla*-Luziferase, deren Sequenz ursprünglich aus der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis* kloniert wurde.



A.



B.

Abbildung 2.2.1. Plasmidkarten der verwendeten Plasmide pGL3 (A) und pRL-TK (B). Die Plasmidkarten entstammen den Produktinformationen des Herstellers (Promega, Madison, USA).

1 gatcaagtta acatgaggcc agtaggagaa gccctaacc aaaaggacta gaggcctgt
61 caaaagggga accttgaca cagagataca catacagggg ggcggggggg ggaaaacgtc
121 acatgaagat gaaggtgggg atcagtgatga tgcactaca agtcaagga caccaaagat
181 tgccgggaaa ccacaaaag ccaggaaaga gacacggaat agattctctc tcacggctt
241 cagaaccaac cctgccaaca acttgccctt gacacttag cctccagaac tggagacaa
301 taatgtttg ttgttaaag ctgatcagc ctaagtgtg tattagactg gtgcaaaagt
361 aattacagt ttcgccattg cttcaatgg caaaaatcac aattactttt gcaccaacct
421 aaatagtact gtgttatggc agctctggga aatgaataca accattcagt gctgtgaggg
481 ccacagacag atcacttgc cgctaccca gggtcacggg ataaacctg gttatacggg
541 acttctggga gcctgggtt actgtaagt cccctaact ggactccctg tttcctgtct
601 tactttctt aaccattctc cacagactg cctgatctt tctaaaatcc aaatctttcc
661 tatctatgg cttcacaagc tttacctgc ctcccaatgt cttgggata cagcaaaatt
721 tctcagctg aggccacaat gccctggca tccggcccca gcatatttct ccaacctat
781 ttctctatc ttgcatca ctccctagcc atacatttc taccctactc ctaattgggac
841 caaactcca ttatctga ggcctcact tagtcacct ctccaccgga aagccttccc
901 aaagcaccga ggagggggg aggtgtccct cctatgtgct ctcaaagcc ctttcttca
961 atgccttgt ggcattatc acagtgtgt caaggcctgt ttgcagttt tctcctgtg
1021 accatgagtt cctatctgt ttgatctcc aggcaccaag aaagcactg gcactggag
1081 gacattcagt ggacggatga gaataatga acaagcatg ccatgtcca accagctggt
1141 ccagaacta tttgttct cttaaggga tgggggatgg gcaggtgacc ttccaggga
1201 ttccaata gtagtagaa cactggagc tggatggagc tccaccttc ctatgtgtt
1261 gcaagaggaa tttagattag acattcaaaa gctgttctt gtgtcgaag aactgacg
1321 tacaagaag ggaaagtaa caatcccgcg attttcagg ttgggttta ccaatattt
1381 agaatctgt ttttatagg aagtggccc ttcaggtatc caagcctctg atacggtaa
1441 ctgcatgtcc tgacctacag gtaaagggtg tgggagggta ggagaatagg gaattgtgc
1501 aactaacaat gcaatgtgtc atgtgccct atctcaaaa agtaaatatt ttgaggttt
1561 aaaaattatt tgctgcacg gttgcccga gagcctggaa gaggaagaa gacaagacac
1621 aaagtaaca cattacaaa aatagcctg actaggaaaa gacagagggg tcatagacga
1681 aaataatcag gattgggtct ctttgcaa ttctgaacg gggaaatga tcagaattc
1741 cagctctca gaaacagggc cttaaaagt ctgtgtgca agaaggggga aaaagacgag
1801 gggggggcgg ggaggggac tcgctctcg cagcaggaag tottcaatg ctatcgagtt
1861 atgaagaaac aactgcccag aagtcctt atcgagcgt aaactcatt ttaccacata
1921 aagagcaatg taaaagctca gaacagccc atcatggtgt tgggaaaca actcggctc
1981 cccatgtgag aaagccagag agctccgact tggtagtagc ccagacctg gttaggggt
2041 ttattgcaa gtcaatgaac caaacggcg accaggctcg ttgtccgcg ttgtggaagc
2101 aaggtatta ttatgcccc ttgccccact gaacaattc actgaaaagg aagagtcca
2161 gccgtgtgtg tgcgctggt gccatacggg acgtgcagct acgtgccac ctccagaacg
2221 actttatta caaagcatt accacgtat ctattgtt tctttcca gcaagagcag
2281 cttactcag cctcaaat tctaatc aaaccggtt gttctaat caacccaaa
2341 ccgtcaggca gagcccggag ggaggtctg caagttgta cacacccca cctccggat
2401 ccagggcaac agcagaagca agtaactgt tatgtgcaa aaggtggatc tggggacgag
2461 gatcgtgag ttgtttaca gagcagagac gcctcagctc gtagccaaa gctaccaaga
2521 gctgcaaacg caaactagc agaagcacac gtacccggg agcggcaggc gggcccga
2581 gcgaggactg gaattcagg gcgaggagc ggggtggcc gggcctcga gcgctccg
2641 tccacctga gcgctgccc ctcccgc ccagctcctg tcttgaag gattggagga
2701 aaaaatgca tctacaagcg gtgatctaga gtaggtctac cactgcccg tatgaaaaca
2761 caaaggcaca gcttaggaag gcgctcag gaaagggcg attattgtc cgggtctta
2821 aaaccaact cgaggaagca cagcattct tcgctcctg tgaagctt tgcaaaaccg
2881 gggaggcaca agggactct ggagggcggg gggcgtggg cgagtcccct tttccgtag
2941 agagcggggc agatcgtag gtgaaccgag tgagaaagct ggggtggg tagatccagc
3001 ctgagggggg cggtagctc tctcgtggc tatcccgca gctctacct tggggcggg
3061 cggcagggga gaatttccc cctgcctcg ggggtgctga gcaacctc cgtttctgg
3121 ccgggaagaa accagagtcg gggggcagc gggcagctg gcggccccg ggccccgag
3181 cctctcagc acgtccgcg ggaggcggg acgagctcc gggaccggg ccagggtgtt
3241 gcggtgtc cgaatccgc gcttggcg cgcccctt ggaggctct cctccgctt
3301 tccgaaatgc ctatattaac tgtgcaaaa gccctaagaa acacagctca ttgtggcag
3361 ctgcccggcg gtctt

Abbildung 2.2.2. Die hier gezeigte Sequenz stellt die 5'-flankierende Region des CITED2 Gens dar und wurde in den pGL3 Vektor zur Messung der Promotoraktivität des CITED2 Gens inseriert (GenBank Accession Nr. AF129290, Leung *et al.* 1999).

2.2.2. Versuchsaufbau und Transfektion

Für die Experimente wurden NCI-H295R Zellen in der Dichte von 200 000 Zellen / Well in 24-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Germany) ausgesät und bis zu 70% Konfluenz kultiviert. Das Einbringen der Plasmide in die NCI-H295R Zellen erfolgte durch die Anwendung des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche, Mannheim, Deutschland), welches aus einer Mischung verschiedener Lipide und weiteren Zusatzstoffen in 80% Ethanol besteht. Die Transfektion erfolgte im Verhältnis von FuGENE(μ l) zu DNA(μ g) von 3 zu 1 mit jeweils 1,5 μ l FuGENE6, 0,25 μ g des CITED2-Promotor-Gen-Konstrukts und jeweils 0,25 μ g des pRL-TK Kontrollplasmids pro Well für jeweils 24 Stunden. Zur Kontrolle der Hintergrundaktivität wurde der pGL3-Leervektor ersatzweise für das CITED2-Promotor-Gen-Konstrukt transfiziert. Nach Ablauf der Transfektion für 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS (Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit ACTH 100 nM (Synacthen, Ciba-Geigy, Wehr, Deutschland), Forskolin 10 μ M (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) oder bFGF 0,1 ng/ml, 1 ng/ml oder 10 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) entweder mit oder ohne den MEK1/2 Inhibitor PD98059 20 μ M (Promega, Madison, USA) in NCI-H295R Zellkulturmedium. Forskolin und PD98059 wurden vor Gebrauch nach Angaben der Hersteller in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich) suspendiert. Als Kontrolle diente NCI-H295R Medium mit äquivalenten Konzentrationen DMSO alleine beziehungsweise NCI-H295R Medium ohne den Zusatz einer der oben genannten Substanzen. Nach 48 stündiger Inkubation wurde die Aktivität der Renilla und Firefly-Luziferase mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland) gemessen.

2.2.3. Messung der Luziferaseaktivität und Auswertung

Zur Analyse der Expression der Firefly- und Renilla-Luziferase kam ein Dual-Luziferase Reporter Assay System zur Anwendung (Promega, Mannheim, Deutschland). Das System ermöglicht die sequentielle Messung der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität in einem einzelnen Ansatz. In einem ersten Schritt

wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Zellyse durch jeweils 100 μl eines speziellen passiven Lysepuffer (PLB) pro Well für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplattform. Der passive Lysepuffer gewährleistet die Stabilität der Luziferasen bei nur minimaler Autolumineszenz. Im nächsten Schritt wurden jeweils 5 μl des Zellysates durch Zugabe von 25 μl der Substratlösung (Luziferase Assay Reagenz II, LAR II) und nachfolgender Messung der Lumineszenz in einem Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) hinsichtlich der Aktivität der Firefly-Luziferase analysiert. Durch Zugabe von 25 μl einer Stopplösung (Stop&Glo Reagenz), welche auch das Substrat für die Renilla-Luziferase enthielt, wurde daraufhin in der selben Probe die Aktivität der durch das pRL-TK Plasmid exprimierten Renilla-Luziferase im Luminometer bestimmt. Zur weiteren Analyse wurde der Quotient aus der Aktivität der Firefly- und der Renilla-Luziferase bestimmt.

Jedes einzelne Experiment wurde in Quadruplikaten durchgeführt, wobei hieraus der Mittelwert für die weiteren Berechnungen herangezogen wurde.

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten stellen den Mittelwert von mindestens 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung des Mittelwertes dar. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch eine Testung der Einzelmesswerte der verschiedenen Gruppen auf eine Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und nachfolgender Varianzanalyse mit Bonferroni's post hoc Analyse mit Hilfe der Graph Pad 4 Statistik-Software (GraphPad Software, San Diego, USA). Ab einem p-Wert < 0.05 wurden die Daten als statistisch signifikant bezeichnet und mit einem Sternchen gekennzeichnet.

2.3. Semiquantitative TaqMan PCR

2.3.1. Versuchsaufbau und Stimulation

Für die semiquantitative Messung der CITED2-messenger RNA (mRNA) wurden 600 000 NCI-H295R Zellen pro Well in 6-Well Platten (Nunc, Wiesbaden, Germany) in NCI-H295R-Zellkulturmedium ausgesät. Bei etwa 70% Konfluenz erfolgte die Stimulation mit bFGF 0,1 ng/ml, 1 ng/ml oder 10 ng/ml in der An- oder Abwesenheit von PD98059 20 μ M in NCI-H295R Zellkulturmedium für 8 Stunden. Alternativ erfolgte die Stimulation mit ACTH 100 nM oder Forskolin 10 μ M. Forskolin und PD98059 wurden vor Gebrauch nach Angaben der Hersteller in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich) suspendiert. Als Kontrolle diente NCI-H295R Medium mit äquivalenten Konzentrationen DMSO alleine beziehungsweise NCI-H295R Medium ohne den Zusatz einer der oben genannten Substanzen.

2.3.2. RNA-Isolierung

Die totale RNA der Zellen wurde mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, welches die Gewinnung von RNA durch Bindung an eine Membran auf Siliziumbasis ermöglicht. Nach Ablauf der *in vitro* Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschliessend mit 600 μ L/Well eines RNase-inaktivierenden, β -Mercaptoethanol- und Guanidinisothiozyanat-haltigen Puffers (RLT) lysiert. Die Homogenisierung des Lysates erfolgte durch die Bestückung von Qiashreddern (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Zelllysate und anschließender Zentrifugation mit höchster Drehzahl. Hierdurch konnte die Viskosität des Lysates verringert werden, so dass die Bindungseigenschaften der RNA an die Siliziummembranen verbessert wurden. Die Zugabe von 600 μ L 70% Ethanol (Sigma-Aldrich) zum homogenisierten Lysat erfolgte mit der gleichen Zielsetzung. Die so präparierten Zelllysate wurden nun auf die Qiagen RNeasy-Säule übertragen und bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die daraufhin an die Membran gebundene RNA wurde durch die sequentielle Zugabe von 700 μ L RW1-Puffer und 500 μ L RPE-Puffer und jeweiliger anschließender Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sekunden gewaschen. Auf den letzten

Waschschrift mit dem RPE-Puffer folgte eine zweiminütige Zentrifugation zur vollständigen Trocknung der Membran. Die an die Membran gebundene und gereinigte RNA konnte nun durch Zugabe von 30 µL RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 rpm von der Membran gelöst und aufgefangen werden. Die so gewonnene RNA wurde entweder bei –70°C kurzfristig gelagert oder direkt einem DNase-Verdau zugeführt.

2.3.3. DNase-Verdau

Zur Vermeidung einer Kontamination mit DNA wurde die RNA-Probe mit Desoxyribonuklease I (New England Biolabs, Ipswich, USA) behandelt. Hierzu erfolgte die Inkubation der Probe mit 2 Einheiten DNase I für 10 Minuten bei 37°C. Nach Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Endkonzentration von 5 mM wurde die DNase I durch Erhitzung auf 75°C für 10 Minuten deaktiviert.

2.3.4. Messung der RNA-Konzentration und Reinheit

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Photometers durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD260). Die Berechnung der Konzentration wurde mittels folgender Formel durchgeführt:

$$C[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

mit OD260 = optische Dichte bei 260nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (40 für RNA, 50 für DNA, 33 für Oligonukleotide)

Die Messung für RNA-Proben erfolgte nach Verdünnung der RNA-Probe im Verhältnis 1:40 in speziellen Kunststoffküvetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). In diesem Verdünnungsverhältnis entspricht die OD260 direkt der Konzentration der RNA in µg/ml. Zur Bestimmung der Reinheit der zu untersuchenden RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm bestimmt

und der Quotient OD260/OD280 gebildet, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,0 auf eine hohe Reinheit der Probe schließen ließen.

2.3.5. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der RNA erfolgte mit Hilfe des Random-primed first strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Deutschland). Der Reaktionsansatz für die Durchführung einer einzelnen cDNA-Synthese setzte sich aus einem Reaktionspuffer (1×), MgCl₂ (5 mM), Deoxynukleotiden (1 mM), Random Primern p(dN)₆ (3,2 µg), einem RNase Inhibitor (50 Einheiten) und der AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reversen Transkriptase (≥ 20 Einheiten) zusammen. In einem ersten Schritt wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen ein Master Mix erstellt und auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Darauf erfolgte die Zugabe von jeweils 0,5 µg der RNA. Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz bei 25 °C für 10 Minuten inkubiert um die Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Im Rahmen der darauf durchgeführten Inkubation bei 42 °C erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA. Zur Inaktivierung der AMV Reversen Transkriptase wurde das Reaktionsgemisch anschliessend für 5 Minuten auf 99 °C erhitzt und dann für 5 Minuten auf 4 °C abgekühlt. Die so gewonnene cDNA wurde entweder direkt in einer nachfolgenden Applikation verwendet oder vorübergehend bei -20 °C gelagert.

2.3.6. Erstellung der Primer und TaqMan-Sonden

Die CITED2-spezifischen Primer wurden unter Anwendung der Software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) konstruiert. Die Sequenzauswahl erfolgte mit Hilfe der im Internet frei zugänglichen NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), wobei die zugehörige Sequenz den Identifikationscode NM_006079 trägt. In einem ersten Schritt erfolgte die Identifikation einer zu der Sequenz passenden Sonde. Die Sequenz der Sonde wurde so gewählt, dass eine möglichst geringe Anzahl sich wiederholender Nukleotide vorlag. Weiterhin wurde der Anteil der Guanin und Cytosin enthaltenden Nukleotide G und C zwischen 30 und 80 Prozent gehalten. Ein

Guanin enthaltendes Nukleotid am 5' Ende der Sequenz wurde vermieden. Darüberhinaus wurde die Alternative ausgewählt, die mehr Cytosin als Guanin enthielt. Die Zusammensetzung der Nukleotide wurde so gewählt, dass die resultierende Schmelztemperatur der Sonde im Bereich von 68-70 °C lag. Die CITED2-spezifische Sonde wurde mit dem Reporterfarbstoff FAM gekoppelt. Nach Auswahl der Sonde wurden die passenden Primer entworfen. Hierzu erfolgte die Auswahl der Primersequenz in unmittelbarer Nähe zu der Sequenz der Sonde. Auch bei den Primern lag der Anteil der guanin- und cytosinhaltigen Nukleotide zwischen 30 und 80%. Eine Wiederholung von gleichen Nukleotiden wurde ebenfalls so weit wie möglich vermieden. Die Schmelztemperatur der Primer lag im Bereich von 58-60 °C. Die hier verwendeten Primer und Sonden sind in Abbildung 2.3.6. dargestellt. Die Synthese der Primer und Sonden erfolgte durch die Firma Eurogentec (Eurogentec, Köln, Deutschland). Die Sequenzen für das 18S Kontroll-Gen sind ebenfalls in Abbildung 2.3.6. dargestellt und wurden bereits im Vorfeld von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und zur Anwendung gebracht (Webster *et al.* 2002). Die 18S-spezifische Sonde wurde mit dem Reporterfarbstoff JOE gekoppelt.

<u>Name</u>	<u>Oligonukleotid Sequenz (5' → 3')</u>
18S Forward primer	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA
18S Reverse primer	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
18S Labeled probe (Sonde)	TGC TGG CAC GAG ACT TGC CCT C
CITED2 Forward primer	CCA CTA CAT GCC GGA TTT GC
CITED2 Reverse primer	TCT CGG AAG TGC TGG TTT GTC
CITED2 Labeled probe (Sonde)	CCC TGC TGC AGG CCA CCA GAT

Abbildung 2.3.6. Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten 18S- und CITED2-spezifischen Primer und Sonden.

2.3.7. Semi-quantitative TaqMan PCR

Die cDNA Gewinnung erfolgte wie oben beschrieben. Als Negativkontrolle kam RNA zur Anwendung, welche nicht revers-transkribiert wurde. Als endogene Kontrolle wurden für die ribosomale Untereinheit 18S-spezifische Primer und Sonden verwendet (siehe Abbildung 2.3.6). Die Zusammensetzungen der

Reaktionsansätze zur Messung der CITED2- und 18S-cDNA-Spiegel sind in Abbildung 2.3.7. dargestellt.

Reagenz	CITED2	18S
2× TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer	2,5 µl (300 nM)	2,5 µl (200 nM)
Reverse Primer	2,5 µl (300 nM)	2,5 µl (200 nM)
Sonde	2,5 µl (300 nM)	2,5 µl (200 nM)
cDNA	variabel (500 ng)	variabel (500 ng)
Aqua Dest	variabel	variabel
Σ	25 µl	25 µl

Abbildung 2.3.7. Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur Messung der relativen CITED2- und 18S-cDNA Konzentrationen durch eine TaqMan-PCR.

Die semiquantitative TaqMan PCR wurde in 40 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden und Annealing/Elongation bei 58 °C für 1 Minute unter Anwendung des ABI-Prims 7700 Sequence Detectors (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Berechnung der relativen mRNA Expression von CITED2 erfolgte durch die komparative Ct-Methode. Hierbei werden jedem Amplifikationsansatz sogenannte Ct-Werte zugeordnet, welche diejenige Zykluszahl darstellen, bei dem ein Schwellenwert (Threshold) im linear ansteigenden Abschnitt der Amplifikationskurve in halb-logarithmischer Darstellung überschritten wird (siehe Abbildung 2.3.7). Zur Verringerung von zufälligen Abweichungen wurden die Ct-Werte für die CITED2- und 18S-Expression für jede zu untersuchende cDNA-Probe 3-fach bestimmt.

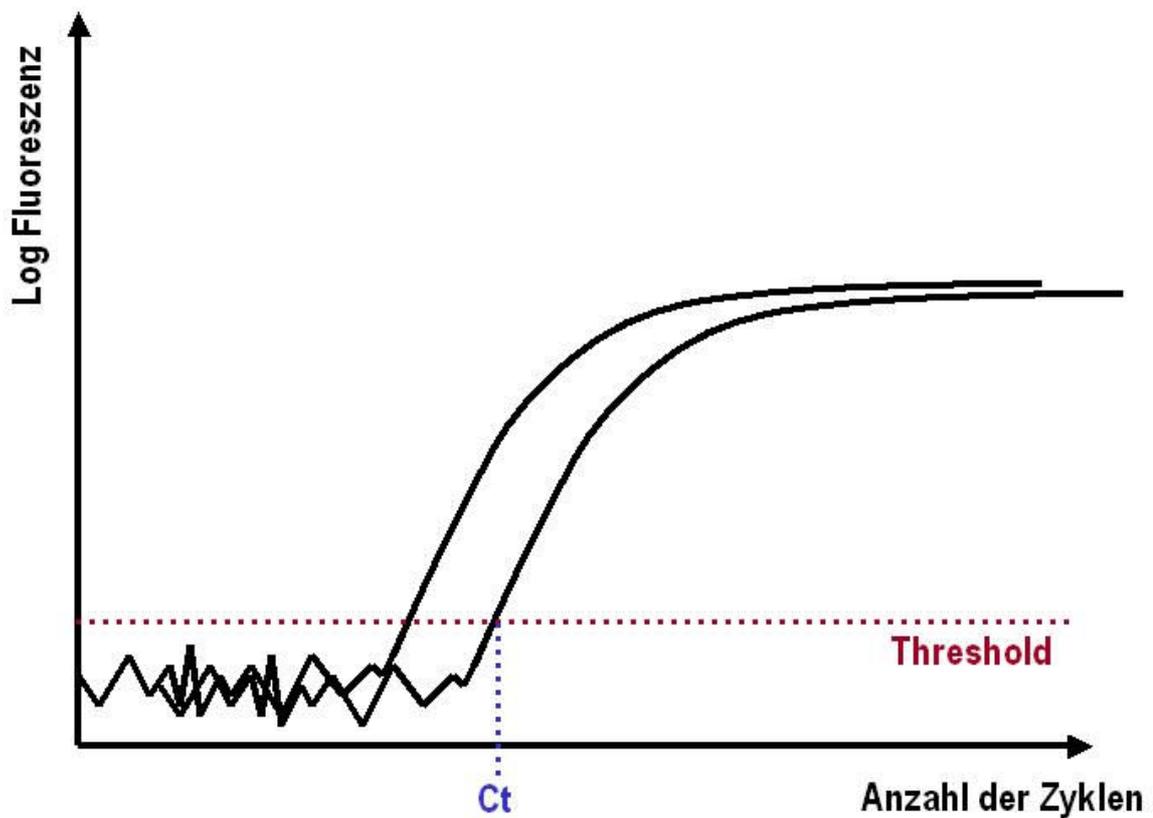


Abbildung 2.3.7. Schematische Darstellung des Amplifikationsverlaufs während einer TaqMan PCR durch Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Zyklen in halb-logarithmischer Darstellung. Der Threshold stellt einen Schwellenwert dar, welcher überhalb des Hintergrundrauschens in halb-logarithmischer Darstellung in den linearen Abschnitt des Amplifikationsverlaufs gelegt wird. Der Ct-Wert stellt den Zyklus dar, bei dem dieser Schwellenwert erreicht wird.

Zum Ausgleich möglicher Schwankungen in der Ausgangskonzentration der RNA wurde durch Bildung der Differenz ΔCt aus den Ct-Werten von dem Zielgen CITED2 und dem Referenzgen 18S die Expression auf das Referenzgen 18S normalisiert. Die Berechnung der relativen Expression bezogen auf einen Kalibrator (in dieser Arbeit die unstimulierte Kontrolle) erfolgte durch Anwendung der folgenden Formel (eine ausführliche mathematische Herleitung ist in User Bulletin 2 von Applied Biosystems beschrieben) :

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Relative Expression bezogen auf einen Kalibrator (in dieser Arbeit bezogen auf die unstimulierte Kontrolle)

mit

Ct = Zyklus bei dem die Amplifikation eines Ansatzes einen definierten Schwellenwert (Threshold) überschreitet

ΔCt = Differenz zwischen Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) von Zielgen und Referenzgen

$\Delta\Delta Ct$ = Differenz zwischen ΔCt eines zu untersuchenden Ansatzes und dem Kalibrator (in dieser Arbeit Differenz zwischen ΔCt des stimulierten Ansatzes und ΔCt der unstimulierten Kontrolle)

Da die komparative Ct-Methode eine annähernd gleiche Amplifikationseffizienz von Zielgen und Kontrollgen voraussetzt, wurde diese zuvor in einem Experiment getestet. Hierzu erfolgte die Auftragung der ΔCt -Werte einer Testprobe gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA Konzentration über mehrere Verdünnungsstufen. Der Betrag der sich aus dieser Darstellung ergebenden Steigung der Regressionsgeraden gibt den Grad des Effizienzunterschiedes an. Bei ähnlicher Effizienz nähert sich die Steigung der Geraden dem Wert Null. Für die CITED2 und 18S-Amplifikation ergaben sich hierbei Werte von $<0,1$, so dass von einer ähnlichen Amplifikationseffizienz ausgegangen werden kann.

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten stellen den Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Prüfung der Ergebnisse aus der RealTime PCR erfolgte durch ein Randomisierungsverfahren unter Durchführung eines „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation“-Test mit Hilfe des „Relative Expression Software Tools“ (Pfaffl *et al.* 2002). Ab einem p-Wert < 0.05 wurden die Daten als statistisch signifikant bezeichnet und mit einem Sternchen gekennzeichnet.

2.4. Immunfluoreszenztests

Für die Immunzytochemische Darstellung wurde der indirekte Immunfluoreszenztest ausgewählt. Hierfür wurden die Zellen auf mit Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen für 24 Stunden in der An- oder Abwesenheit von ACTH 100 nM (Synacthen, Ciba-Geigy, Wehr, Deutschland) oder bFGF 10 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) in NCI-H295R Zellkulturmedium inkubiert. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen mit Methanol (Sigma-Aldrich) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten fixiert und mit 0,3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) für 5 Minuten permeabilisiert. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 prozentigem Ziegen-Serum (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen CITED2-Antikörper aus der Maus (Clone JA22, Novus Biologicals, Littleton, USA) in der Verdünnung von 1:100 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle einer unspezifischen Reaktion des sekundären Antikörpers wurde in jedem Experiment ein Deckgläschen ohne den primären Antikörper inkubiert. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488, Ziege Anti-Maus, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) kam in der Verdünnung von 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Anwendung. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit 4,6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich) für 5 Minuten. Nach jedem Schritt, außer nach der Inkubation mit Serum zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen, wurden die Schnitte dreifach mit PBS gewaschen. Die Abdeckung der Präparate erfolgte schließlich unter Anwendung des wasserlöslichen Einbettmediums Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, USA). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte anhand eines Nikon-Eclipse TE 300 Fluoreszenzmikroskopes. Die Fusion der Bilddaten für die CITED2-spezifische Färbung und die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen Grafiksoftware The Gimp (GNU, General Public License, www.gimp.org). Alle Parameter für die grafische Verarbeitung und die mikroskopische Belichtungszeit wurden innerhalb der Experimente konstant gehalten. Die Darstellungen im Ergebnisteil sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3. Ergebnisse

3.1. Studien zur CITED2-Promotoraktivität

Die Promotoraktivität des CITED2-Gens wurde durch einen Reporterassay erfasst. Es erfolgte die transiente Transfektion eines Reporterplasmids, welches die 5'-flankierende Region des CITED2-Gens vorgeschaltet vor eine Firefly-Luziferase enthielt. Gleichzeitig wurde zur Normalisierung der Transfektionseffizienz ein Kontrollplasmid transfiziert, welches die gleichmäßige Expression einer Renilla-Luziferase durch einen konstitutiv aktivierten HSV-Promotor gewährleistet. Nach der Transfektion wurden die NCI-H295R Zellen wie in „Material und Methoden“ beschrieben mit bFGF, ACTH oder Forskolin für 48 Stunden kultiviert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die in diesem Abschnitt dargestellte relative Luziferaseaktivität ergibt sich als Quotient aus den Aktivitäten der Firefly- und Renillaluziferasen bezogen auf den pGL3 Leervektor oder auf die unstimulierte Kontrolle.

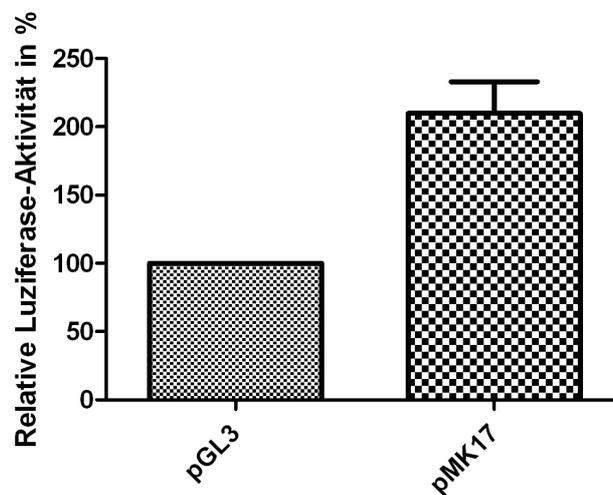


Abbildung 3.1.1. Relative CITED2-Promotor-Aktivität in NCI-H295R Zellen nach 48 Stunden Kultivierung unter Standardkulturbedingungen. Im Vergleich zum Leervektor pGL3 zeigte sich nach Transfektion des pMK17 Plasmids, welches die 5'-Region des CITED2 Gens als cis-aktives Element enthält, eine um das 2,1-fache gesteigerte Luziferaseaktivität.

Im Vergleich zum Leervektor pGL3 zeigte sich nach Transfektion des pMK17-Plasmids, welches die 5'-flankierende Region des CITED2 Gens enthält, eine im

Mittel um das 2,1-fache gesteigerte Luziferaseaktivität (Abbildung 3.1.1.), wobei die Luziferaseaktivität als Maß für die transkriptionelle Aktivität des CITED2-Promotors gewertet werden kann. Diesbezüglich kann davon ausgegangen werden, dass bereits unter Standardkulturbedingungen eine Aktivität des CITED2-Promotors vorliegt.

Die Stimulation von NCI-H295R Zellen mit bFGF erfolgte für 48 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen entweder alleine oder in Kombination mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059. Die Inkubation mit bFGF führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der CITED2 Promotor-Aktivität (Abbildung 3.1.2.).

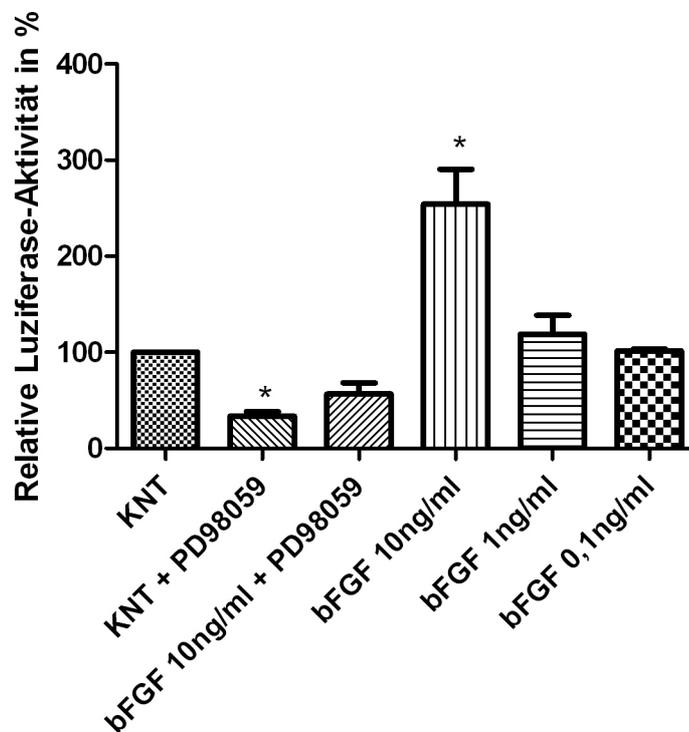


Abbildung 3.1.2. Relative Luziferase-Aktivität in Prozent bezogen auf die unstimulierte Kontrolle als Maß für die CITED2-Promotoraktivität nach Stimulation von NCI-H295R Zellen für 48 Stunden mit bFGF in verschiedenen Konzentration und/oder nach Koinkubation mit PD98059 20 μ M. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch Varianzanalyse und Bonferroni-Post-Hoc-Testung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit $*=p<0.05$.

Der Anstieg der CITED2-Promotor-Aktivität belief sich nach Stimulation mit bFGF in Konzentrationen von 10 ng/ml im Mittel auf das ca. 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle. Der Anstieg war bezogen auf die Kontrolle statistisch signifikant.

Die Koinkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059 in Konzentrationen von 20 μM blockierte den durch bFGF induzierten Anstieg der CITED2 Promotoraktivität vollständig. Damit scheint die Promotoraktivität des CITED2-Gens von der Aktivität von MAP-Kinasen direkt oder indirekt abhängig zu sein. Auch die basale Promotoraktivität konnte durch PD98059 signifikant gehemmt werden ($p < 0.05$), so dass auch eine Bedeutung des MAP-Kinase-Signalweges für die CITED2-Promotoraktivität unter unstimulierten Bedingungen anzunehmen ist.

Zur Untersuchung, in wie weit der cAMP-Signalweg als zentraler Regulator der Nebennierenrindenfunktion an der Regulation der CITED2-Promotoraktivität beteiligt ist, erfolgte ebenfalls die Untersuchung der Effekte von ACTH und Forskolin im Reporterassay (Abbildung 3.1.3.).

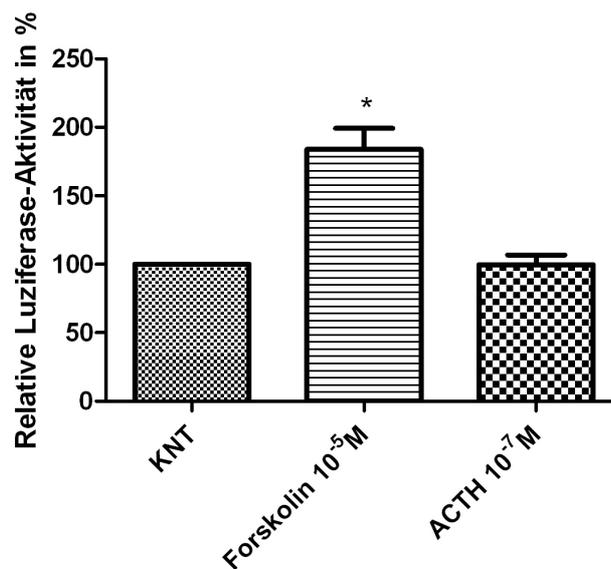


Abbildung 3.1.3. Relative Luziferase-Aktivität in Prozent bezogen auf die unstimulierte Kontrolle als Maß für die CITED2-Promotoraktivität nach Stimulation von NCI-H295R Zellen für 48 Stunden mit ACTH 100 nM oder Forskolin 10 μM . Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch Varianzanalyse und Bonferroni-Post-Hoc-Testung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit $* = p < 0.05$.

Die Stimulation von NCI-H295R Zellen mit ACTH 100 nM oder Forskolin 10 μM erfolgte für 48 Stunden. Während die Inkubation von NCI-H295R Zellen mit Forskolin die CITED2 Promotor-Aktivität um das ca. 1,8-fache steigerte, führte die

Stimulation mit ACTH 100 nM zu keinem Anstieg der CITED2-Promotoraktivität. Die Steigerung der Promotoraktivität nach Stimulation mit Forskolin ist statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle.

3.2. Studien zur CITED2-mRNA Expression

Mittels einer TaqMan-PCR konnte die Expression von CITED2-mRNA in NCI-H295R Zellen nachgewiesen werden. Exemplarisch ist in Abbildung 3.2.1. eine TaqMan-PCR mit CITED2-spezifischen Primern und Sonde mit dem Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Anzahl der PCR-Zyklen dargestellt. Die Analyse von PCR-Proben mit aus NCI-H295R Zellen unter Standardkulturbedingungen gewonnener cDNA zeigten einen typischen Amplifikationsverlauf. Kontrollproben, welche nicht in cDNA umgeschriebene RNA enthielten, zeigten in der Regel keinen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals. Durch die Vorbehandlung der RNA mit DNase und die Wahl der Kontrollen konnte eine bedeutende Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

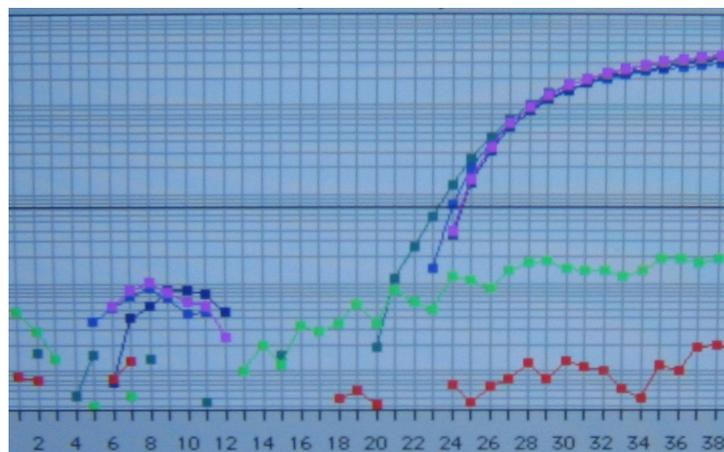


Abbildung 3.2.1. TaqMan-PCR mit CITED2-spezifischen Primern und Sonde sowie exemplarische Darstellung des Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Zyklusanzahl. Während in Kontrollproben mit nicht revers-transkribierter RNA aus NCI-H295R Zellen kein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen werden konnte (rote und hellgrüne Kurve), zeigte sich nach Einsatz von cDNA-Proben, welche aus NCI-H295R Zellen gewonnenen wurden, ein typischer Anstieg des Signals (hellblaue, dunkelblaue, rosa und türkisfarbene Kurve).

Die Regulation der CITED2-mRNA Expression in NCI-H295R Zellen durch bFGF, ACTH und Forskolin wurde ebenfalls mittels semiquantitativer TaqMan-PCR untersucht. Die Stimulation von NCI-H295R Zellen erfolgte mit bFGF in unterschiedlichen Konzentrationen alleine oder in Kombination mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 für jeweils 8 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, durch die komparative Ct-Methode. Die in Abbildung 3.2.2. dargestellten Ergebnisse geben damit die relative mRNA-Expression von CITED2 in Prozent an.

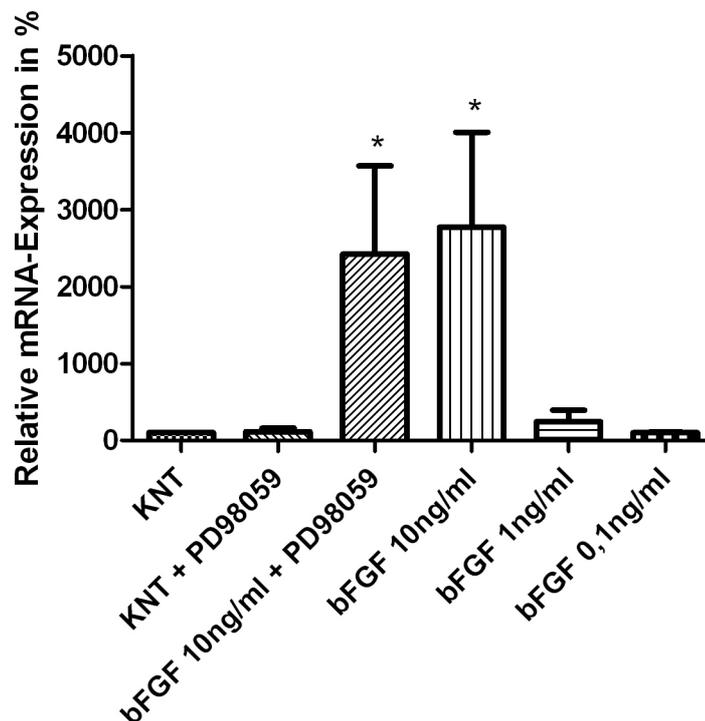


Abbildung 3.2.2. Relative CITED2-mRNA Expression in Prozent bezogen auf die unstimulierte Kontrolle in NCI-H295R Zellen nach Stimulation mit bFGF für 8 Stunden in verschiedenen Konzentrationen und/oder nach Koinkubation mit PD98059 20 μ M.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n=4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch ein Randomisierungsverfahren. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit $*=p<0.05$.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich nach 8-stündiger Stimulation mit bFGF ein signifikanter und dosisabhängiger Anstieg der CITED2-mRNA Spiegel. Der maximale Anstieg der CITED2-mRNA Konzentration nach Stimulation mit bFGF 10 ng/ml für 8 Stunden belief sich im Mittel auf das 27-fache der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 3.2.2.). Die Koinkubation von PD98059 20 μ M und bFGF 10

ng/ml führte im Mittel zu einer Reduktion der CITED2-mRNA Expression um ca. 13% im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit bFGF 10 ng/ml. Zur Untersuchung der Effekte von ACTH und Forskolin auf die CITED2-mRNA Expression erfolgte ebenfalls eine Analyse mittels semiquantitativer TaqMan-PCR (Abbildung 3.2.3.).

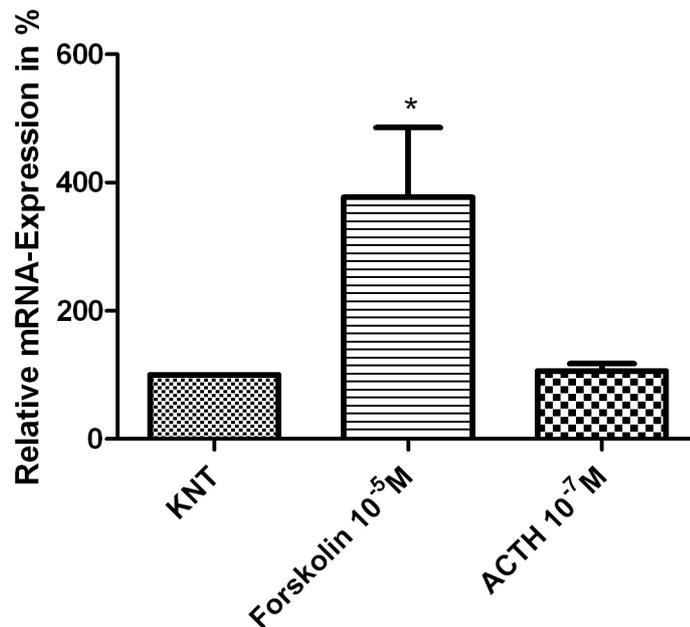


Abbildung 3.2.3. Relative CITED2-mRNA-Expression in Prozent bezogen auf die unstimulierte Kontrolle nach Stimulation von NCI-H295R Zellen für 8 Stunden mit ACTH 100 nM oder Forskolin 10 μ M. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch ein Randomisierungsverfahren. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit * =p<0.05.

Die Stimulation von NCI-H295R Zellen erfolgte für 8 Stunden mit ACTH 100 nM oder Forskolin 10 μ M. Nach Inkubation mit Forskolin 10 μ M konnte ein Anstieg der CITED2-mRNA Spiegel um das ca. 3,8-fache gemessen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten sich nach Stimulation mit ACTH 100 nM keine signifikante Veränderung der CITED2-mRNA Spiegel. Die durch Forskolin induzierte Steigerung der mRNA-Expression war im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant (p<0.05).

3.3. Studien zur CITED2-Protein Expression

Zur Untersuchung der Expression, Lokalisation und Regulation von CITED2 auf der Proteinebene kam die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Anwendung. Hierzu wurden NCI-H295R Zellen mit einem primären monoklonalen Anti-CITED2-Antikörper (JA22) markiert. Der Nachweis des Proteins erfolgte indirekt über einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper (Alexa-Fluor 488-markierter anti-Maus Antikörper aus der Ziege) und die Darstellung im Fluoreszenzmikroskop. Bereits ohne spezifische Stimulation konnte nach 24 Stunden Inkubation im Standardkulturmedium CITED2-Protein als grünes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Abbildung 3.3.1.B). In Kontrollproben ohne primären Antikörper zeigte sich kein Fluoreszenzsignal. Durch eine Kernfärbung mit DAPI (Abbildung 3.3.1.A) und durch Überlagerung mit den Bildern aus der CITED2-Immunfluoreszenz konnte eine nukleäre Lokalisation des interagierenden Proteins demonstriert werden (Abbildung 3.3.1.C). Zur Untersuchung der Regulation der CITED2-Proteinexpression erfolgte die Stimulation von NCI-H295R Zellen mit bFGF 10 ng/ml oder ACTH 100 nM für jeweils 24 Stunden, wobei die Ergebnisse mit einer unstimulierten Kontrolle (Abbildung 3.3.2.A) verglichen wurden. Nach Stimulation mit bFGF 10 ng/ml ließ sich ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals im Zellkern feststellen (Abbildung 3.3.2.C). Eine Stimulation von NCI-H295R Zellen mit ACTH 100 nM für 24 Stunden führte hingegen zu keiner sichtbaren Veränderung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 3.3.2.B).

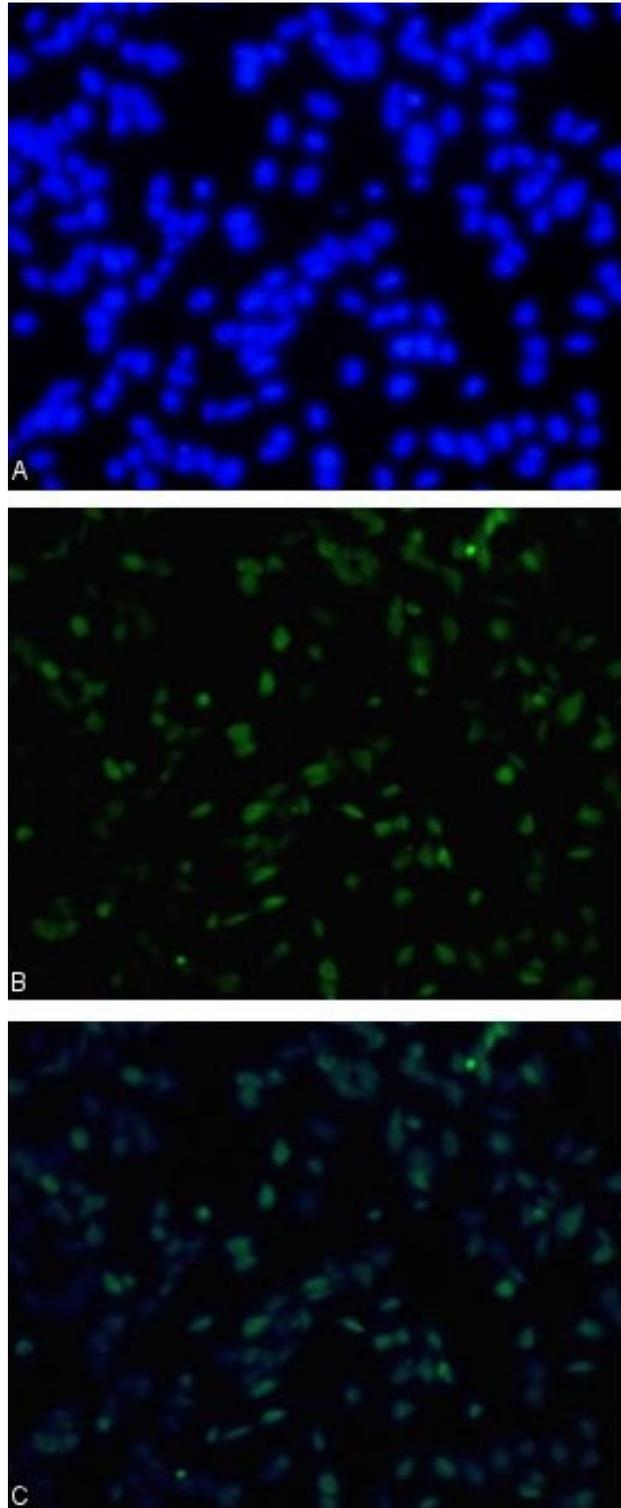


Abbildung 3.3.1. A. Darstellung von Zellkernen von NCI-H295R-Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie durch Färbung mit DAPI (blaue Färbung). B. Markierung mit einem monoklonalen Antikörper, welcher gegen das CITED2-Protein gerichtet ist. C. Die Fusion der DAPI-Färbung mit der CITED2-Immunfluoreszenzfärbung demonstriert die nukleäre Lokalisation des Proteins.

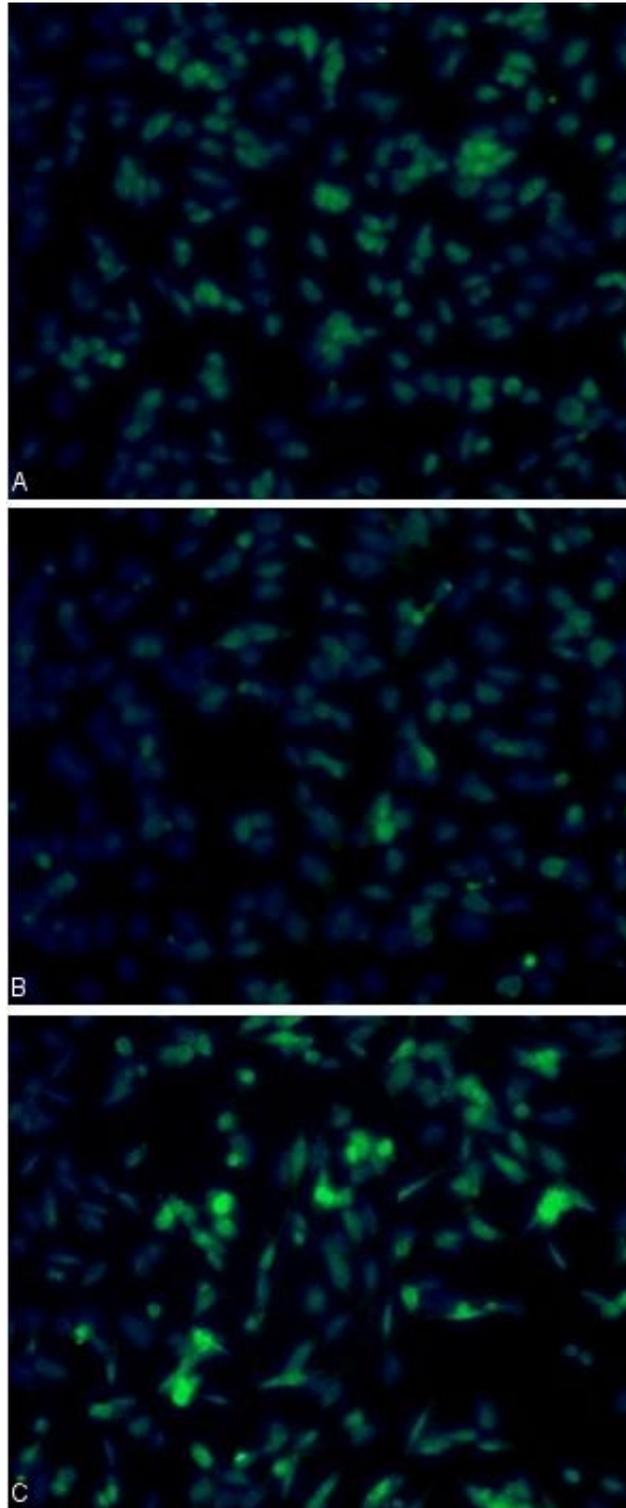


Abbildung 3.3.2. Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem monoklonalen Antikörper gegen CITED2. **A** Nach Kultivierung von NCI-H295R Zellen in Kontrollmedium für 24 Stunden konnte mit dem zweiten Antikörper ein Fluoreszenzsignal im Zellkern nachgewiesen werden (grünes Fluoreszenzsignal). **B** Die Stimulation mit ACTH 100 nM führte nach 24 Stunden Inkubation zu keiner sichtbaren Veränderung der Intensität des Fluoreszenzsignales. **C** Nach Stimulation mit bFGF 10 ng/ml für 24 Stunden zeigte sich eine Verstärkung des nukleären Fluoreszenzsignals im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Darstellungen sind repräsentativ für n=3 Experimente.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression und Regulation von CITED2 im adrenokortikalen NCI-H295R Zellmodell untersucht. Hintergrund dafür war die Beobachtung, dass die Herabregulation von CITED2 im Mausmodell neben Herzfehlern, Exencephalus und Neuralleistendefekten zur vollständigen adrenalen Agenesie führt (Bamforth *et al.* 2001). Initial wurde spekuliert, dass die Nebennierenagenesie die indirekte Folge einer fehlerhaften Entwicklung des Nebennierenmarks sei, da im CITED2 $-/-$ Mausmodell Neuralleistendefekte beobachtet wurden und von chromaffinen Zellen sezernierte Peptide und Katecholamine wesentlich die Nebennierenrindenfunktion beeinflussen (Erhart-Bornstein *et al.* 1998). Daten über die Rolle von CITED2 in der Nebennierenrindenzelle selbst lagen zu diesem Zeitpunkt nicht vor.

In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass CITED2 bereits in der 8. Entwicklungswoche in der definitiven Zone der rudimentären Nebennierenrinde exprimiert wird und nicht mit der Lokalisation von medullären Vorläuferzellen korreliert (Haase *et al.* 2007). Nachfolgende Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigten die Expression von CITED2 im frühen Entwicklungsstadium der humanen Nebennierenrinde (Ferraz-de-Souza *et al.* 2008). Auf molekularer Ebene interagieren das Wilms Tumor-1 (WT-1) Protein sowie CITED2 und aktivieren sowohl einzeln als auch synergistisch die Expression von SF-1 in Mäusen (Val *et al.* 2007). Aufgrund der transienten Expression von WT-1 im Stadium des adrenogonadalen Primordiums wurde angenommen, dass durch die vorübergehende Koexpression von CITED2 und WT-1 und den daraus folgenden erhöhten SF-1 Spiegeln die Differenzierung des Adrenokortex eingeleitet wird (Val *et al.* 2007). Da aber CITED2 und SF-1 auch darüber hinaus in späteren Entwicklungsstadien, im adulten Adrenokortex und in adrenokortikalen Zelllinien exprimiert werden (Ramayya *et al.* 1997, Haase *et al.* 2007, Romero *et al.* 2007, Val *et al.* 2007) scheint die Rolle von CITED2 in der Nebennierenrinde über die isolierte Expression im frühen adrenogonadalen Primordium hinauszugehen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von CITED2 für die Nebennierenrindenzelle, indem einerseits die Expression selbst, aber auch die Vernetzung mit zentralen Regulationssystemen der adrenokortikalen Physiologie demonstriert wurde. Auch wenn das Modell der NCI-

H295R Zelllinie nicht vollständig auf die embryonale, fetale und normale Nebennierenphysiologie übertragbar ist, zeigt diese Zelllinie dennoch wesentliche Charakteristika einer adrenokortikalen Zelle und ist als adrenokortikales Modellsystem insbesondere für die Untersuchung der Steroidogenese anerkannt (Rainey *et al.* 1994).

In den NCI-H295R Zellen führte die Stimulation mit Forskolin zu einer gesteigerten Expression von CITED2, was auf eine Beteiligung des cAMP-Signalwegs an der Regulation von CITED2 schließen lässt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von anderen Arbeitsgruppen gewonnen werden, wobei eine Stimulation mit Forskolin 10 μM in NCI-H295R Zellen zu einem 1,2-fachen Anstieg der CITED2-Expression in der Microarray-Analyse sowie zu einem 1,4-fachen Anstieg der CITED2-mRNA Expression in der Real-Time PCR führte (Romero *et al.* 2007). Interessanterweise führte ACTH zu keiner signifikanten Stimulation der CITED2-Expression, obwohl ACTH in normalen Nebennierenrindenzellen ebenfalls eine Aktivierung des cAMP-Signalwegs zur Folge hat.

Auch in Studien anderer Arbeitsgruppen zeigte sich in der NCI-H295R Zelllinie kein oder nur ein geringes Ansprechen auf die Stimulation mit ACTH, wobei als Ursache hierfür die niedrige Expressionsrate des ACTH-Rezeptors oder Defekte in der Signalübertragung in Frage kommen (Denner *et al.* 1996, Parmar *et al.* 2008, Rainey *et al.* 1994, Staels *et al.* 1993). Im Gegensatz zu ACTH ergab sich nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor bFGF ein starker Anstieg der CITED2-Expression.

Dieser Wachstumsfaktor ist an angiogenetischen Prozessen in der Nebenniere sowie an der Nebennierenentwicklung beteiligt. Die Gefäßbildung der fetalen Nebenniere findet insbesondere in der definitiven Zone der fetalen Nebenniere statt und korreliert damit mit dem Expressionsmuster von bFGF und CITED2 (Haase *et al.* 2007, Ishimoto *et al.* 2008). Ein direkter Einfluss von bFGF auf die Angiogenese konnte in fetalen Nebennierenzellen nachgewiesen werden, wobei bFGF die Expression von Angiopoietin 2 fördert, welches als Induktor der für die Angiogenese notwendigen Blutgefäßdestabilisierung betrachtet wird (Ishimoto *et al.* 2008). Für die Beteiligung von CITED2 an angiogenetischen Prozessen liegen ebenfalls Hinweise vor. CITED2 ist durch Hypoxie sowie durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α induzierbar und kann im Rahmen einer negativen

Rückkopplung die Aktivität von HIF-1alpha hemmen (Bhattacharya *et al.* 1999). Die Herabregulation von CITED2 in Mäusen führt zu einer gestörten Vaskularisierung der Plazenta und CITED2 wurde in Nucleus-Pulposus Zellen als negativer Regulator der Expression von VEGF identifiziert (Agrawal *et al.* 2008, Withington *et al.* 2006). Auch während der Entwicklung der Leber führt die fehlende Expression von CITED2 zu einer gestörten Organisation des Kapillarsystems (Qu *et al.* 2007). Neuere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass von Endothelzellen sezernierte Faktoren die Expression von CITED2 in NCI-H295R Zellen steigern können, so dass diesbezüglich direkte Hinweise für eine Rolle von CITED2 in der Kommunikation von Nebennierenrindenzellen mit Blutgefäßbestandteilen vorliegen (Haase *et al.* 2009).

Neben den Wirkungen auf die Angiogenese ist der Wachstumsfaktor bFGF auch mit anderen physiologischen Prozessen in der Nebennierenrindenzelle assoziiert. In Primärkulturen von Nebennierenrindenzellen aus der Maus konnte durch Hinzugabe von bFGF die Expression von steroidogenen Enzymen und Faktoren einschließlich SF-1, DAX-1 und Cyp11B1 unter Kulturbedingungen verlängert werden (Chu *et al.* 2006). Hinsichtlich einer möglichen differenzierenden Funktion ist bemerkenswert, dass die Überexpression von CITED2 in NCI-H295R Zellen zu einer gesteigerten Expression von den an der Aldosteron- und Cortisol synthese beteiligten Enzymen Aldosteron-Synthase und 11- β -Hydroxylase führt (Romero *et al.* 2007). Auch Studien aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass vom Endothel sezernierte Faktoren nicht nur CITED2, sondern auch konzentrationsabhängig die Steroidbiosynthese durch die Expression von SF-1, StAR und der Aldosteronsynthase regulieren (Ansurudeen *et al.* 2007, Ansurudeen *et al.* 2009). Die Wirkungen von bFGF auf die Proliferation und das Überleben von Zellen scheint vom Zelltyp und den zellulären Umgebungsvariablen abhängig zu sein. Beispielsweise führt bFGF in der adrenokortikalen Tumorzelllinie Y1 aus der Maus, welche das c-k-ras-Onkogen überexprimiert, zu einer Proliferationshemmung (Costa *et al.* 2008). Weiterhin fördert CITED2 proapoptische Prozesse in Neuronen der Großhirnrinde (Gonzales *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu ist bFGF für NCI-H295R Zellen und verschiedene adrenokortikale Primärkulturen ein bekanntes Mitogen (Boulle *et al.* 2000, Gospodarowicz *et al.* 1986). In humanen fetalen Nebennierenrindenzellen wird

ebenfalls bFGF exprimiert und die Stimulation von fetalen adrenokortikalen Zellen mit bFGF führt zu einer erhöhten Proliferationsrate (Mesiano *et al.* 1991). In der definitiven Zone der fetalen Nebennierenrinde, welche auch als Pool von proliferierenden adrenokortikalen Vorläuferzellen gesehen wird, konnte ebenfalls die Expression von bFGF nachgewiesen werden (Ishimoto *et al.* 2008). Interessanterweise führt eine Überexpression von CITED2 in Fibroblasten und Leberzellen ebenfalls zu einer erhöhten Proliferationsrate sowie zur Tumorentstehung in Nacktmäusen (Kranc *et al.* 2003, Sun *et al.* 1998, Tien *et al.* 2004). In Mammakarzinomzellen sowie in Fibroblasten blockierte CITED2 proapoptische Signalwege im Rahmen von hypoxischem Stress (Yanagie *et al.* 2008, Young *et al.* 2007). Die Bindung von bFGF an Tyrosinkinaserzeptoren führt intrazellulär zu der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 (Chabre *et al.* 1995). Durch die Aktivierung dieser Proteinkinasen werden in adrenokortikalen Zellen zentrale Mechanismen wie Proliferation und Zellzyklusregulation gesteuert (Lepique *et al.* 2000 und 2004). In dieser Arbeit konnte sowohl die basale Expression als auch die durch bFGF induzierte Expression von CITED2 durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059 gehemmt werden. Eine Abhängigkeit der CITED2-Expression von MAPK wurde inzwischen auch in einer Phäochromozytom-Zelllinie beschrieben (Dijkmans *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit war die Hemmung insbesondere auf Ebene der CITED2-Promotoraktivität nachweisbar. Daher ist davon auszugehen, dass MAPK bereits auf der Ebene der Genexpression an der Regulation der CITED2-Expression beteiligt sind. Eine Beteiligung von CITED2 an den durch bFGF gesteuerten Zellfunktionen, wie beispielsweise die Stimulation von Wachstum und Überleben, erscheint vor diesem Hintergrund möglich.

Abschließend lässt sich die Frage nach der Funktion von CITED2 im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Jedoch kann durch die enge Vernetzung von CITED2 mit wichtigen Signalwegen auf eine bedeutende Rolle von CITED2 in der humanen Nebennierenrindenphysiologie und möglicherweise auch in der Nebennierenrindenpathologie geschlossen werden. Wie CITED2 hier für die Regulation von Proliferation, Überleben, Angiogenese oder Differenzierung zuständig ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Herabregulation des CITED2-Gens in Mäusen führt zu Exencephalus, Herzfehlern, Neuralleistendefekten und einer Agenesie der Nebennieren. Auch während der menschlichen Nebennierenentwicklung und in der adulten Nebenniere wird CITED2 exprimiert. Bislang war unklar, welche Faktoren die Expression von CITED2 in der adrenokortikalen Zelle regulieren.

In dieser Arbeit untersuchten wir die Expression und Regulation von CITED2 in der humanen adrenokortikalen Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295R. Bereits unter Standardkulturbedingungen konnte die Expression von CITED2 in NCI-H295R Zellen nachgewiesen werden. Der Wachstumsfaktor bFGF konnte als potenter Stimulator der CITED2-Promotoraktivität, der CITED2-mRNA Expression sowie der CITED2-Protein Expression identifiziert werden. Die Blockierung des MAP-Kinase-Signalwegs durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059 hemmte die Expression von CITED2. Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch Forskolin stimulierte ebenfalls die CITED2-Promotoraktivität und die CITED2-mRNA Expression.

Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CITED2 durch Signalwege und Faktoren reguliert wird, welche sowohl in der Organogenese der Nebenniere als auch in der Physiologie und Pathologie von adulten adrenokortikalen Zellen von Bedeutung sind.

6. Literaturverzeichnis

Agrawal A, Gajghate S, Smith H, Anderson DG, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV (2008). Cited2 modulates hypoxia-inducible factor-dependent expression of vascular endothelial growth factor in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc. *Arthritis Rheum* 58, pp. 3798-3808.

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

Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR (2009). Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. *Mol Cell Endocrinol* 300, pp. 66-70.

Bakker WJ, Harris IS, Mak TW (2007). FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Mol Cell* 28, pp. 941-953.

Bamforth SD, Bragança J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S (2001). Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfp2 co-activator. *Nat Genet* 29, pp. 469-474.

Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM (1999). Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, pp. 64-75.

Bicknell AB (2008). The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20, pp. 692-699.

Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE (1993). Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 133, pp. 1555-1561.

Bird IM, Mason JI, Rainey WE (1995). Hormonal regulation of angiotensin II type 1 receptor expression and AT1-R mRNA levels in human adrenocortical cells. *Endocr Res* 21, pp. 169-182.

Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA (2003). Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N Y Acad Sci* 995, pp. 59-72.

Boulle N, Gicquel C, Logié A, Christol R, Feige JJ, Le Bouc Y (2000). Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R. *Endocrinology* 141, pp. 3127-3136.

Bragança J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC, Bhattacharya S (2003). Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem* 278, pp. 16021-16029.

Chabre O, Cornillon F, Bottari SP, Chambaz EM, Vilgrain I (1995). Hormonal regulation of mitogen-activated protein kinase activity in bovine adrenocortical cells: cross-talk between phosphoinositides, adenosine 3',5'-monophosphate, and tyrosine kinase receptor pathways. *Endocrinology* 136, pp. 956-964.

Chen CR, Kang Y, Massagué J (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, pp. 992-999.

Chou YT, Yang YC (2006). Post-transcriptional control of Cited2 by transforming growth factor beta. Regulation via Smads and Cited2 coding region. *J Biol Chem* 281, pp. 18451-18462.

Chu Y, Wu BM, McCabe ER, Dunn JC (2006). Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells. *J Pediatr Surg* 41, pp. 2008-2012.

Clyne CD, Nguyen A, Rainey WE (1995). The effects of KN62, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, on adrenocortical cell aldosterone production. *Endocr Res* 21, pp. 259-265.

Costa ET, Forti FL, Matos TG, Dermargos A, Nakano F, Salotti J, Rocha KM, Asprino PF, Yoshihara CK, Koga MM, Armelin HA (2008). Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* 68, pp. 6215-6223.

Costa JL, Bui S, Reed P, Dores RM, Brennan MB, Hochgeschwender U (2004). Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues. *Gen Comp Endocrinol* 136, pp. 12-16.

Denner K, Rainey WE, Pezzi V, Bird IM, Bernhardt R, Mathis JM (1996). Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells. *Mol Cell Endocrinol* 121, pp. 87-91.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, pp. 3279–3290.

Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E (2009). Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res* 1249, pp. 19-33.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19, pp. 101-143.

Else T, Hammer GD (2005). Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia. *Trends Endocrinol Metab* 16, pp. 458-468.

Ferraz-de-Souza B, Martin F, Mallet D, Hudson-Davies RE, Cogram P, Lin L, Gerrelli D, Beuschlein F, Morel Y, Huebner A, Achermann JC (2009). CBP/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich C-terminal domain, 2, and pre-B-cell leukemia transcription factor 1 in human adrenal development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 94, pp. 678-683.

Gonzalez YR, Zhang Y, Behzadpoor D, Cregan S, Bamforth S, Slack RS, Park DS (2008). CITED2 signals through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma to regulate death of cortical neurons after DNA damage. *J Neurosci* 28, pp. 5559-5569.

Gospodarowicz D, Baird A, Cheng J, Lui GM, Esch F, Bohlen P (1986). Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland: physicochemical and biological characterization. *Endocrinology* 118, pp. 82-90.

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

Haase M, Ansurudeen I, Schinner S, Paramonova I, Schott M, Papewalis C, Bornstein SR, Scherbaum WA, Willenberg HS (2009). Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. *Cell Tissue Res* 336, pp. 337-343.

Haase M, Willenberg HS (2009) Adrenal cortical tumors and multiple endocrine neoplasia-related syndromes. *Minerva Endocrinol.* 34, pp. 123-135.

Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP (2005). Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146, pp. 1018-1024.

Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1, pp. 663-671.

Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libe R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA (2006). A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 38, pp. 794-800.

Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, de Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF, Stratakis CA (2006). Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 66, pp. 11571-11575.

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 10, 1261-1272.

Ishimoto H, Minegishi K, Higuchi T, Furuya M, Asai S, Kim SH, Tanaka M, Yoshimura Y, Jaffe RB (2008). The periphery of the human fetal adrenal gland is a site of angiogenesis: zonal differential expression and regulation of angiogenic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 93, pp. 2402-2408.

Johnson GL, Lapadat R (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, pp. 1911-1912.

Kawabe K, Shikayama T, Tsuboi H, Oka S, Oba K, Yanase T, Nawata H, Morohashi K (1999). Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol Endocrinol* 13, pp. 1267-1284.

Keegan CE, Hammer GD (2002). Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* 13, pp. 200-208.

Kranc KR, Bamforth SD, Bragança J, Norbury C, van Lohuizen M, Bhattacharya S (2003). Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Mel18 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF. *Mol Cell Biol* 23, pp. 7658-7666.

Lepique AP, Forti FL, Moraes MS, Armelin HA (2000). Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr Res* 26, pp. 825-832.

Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA (2004). c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 33, pp. 623-638.

Leung MK, Jones T, Michels CL, Livingston DM, Bhattacharya S (1999). Molecular cloning and chromosomal localization of the human CITED2 gene encoding p35srj/Mrg1. *Genomics* 61, pp. 307-313.

Luo X, Ding L, Xu J, Chegini N (2005). Gene expression profiling of leiomyoma and myometrial smooth muscle cells in response to transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 146, pp. 1097-1118.

Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, pp. 481-490.

Mesiano S, Jaffe RB (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 18, pp. 378-403.

Mesiano S, Mellon SH, Gospodarowicz D, Di Blasio AM, Jaffe RB (1991). Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, pp. 5428-5432.

Mesiano S, Jaffe RB (1997). Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids* 62, pp. 62-72.

Molenaar WM, Lee VM, Trojanowski JQ (1990). Early fetal acquisition of the chromaffin and neuronal immunophenotype by human adrenal medullary cells. An immunohistological study using monoclonal antibodies to chromogranin A, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, and neuronal cytoskeletal proteins. *Exp Neurol* 108, pp. 1-9.

Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD (1994). ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 99, pp. 17-20.

Muench MO, Ratcliffe JV, Nakanishi M, Ishimoto H, Jaffe RB (2003). Isolation of definitive zone and chromaffin cells based upon expression of CD56 (neural cell adhesion molecule) in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 88, pp. 3921-3930.

Otis M, Gallo-Payet N (2007). Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, pp. 126-130.

Parmar J, Key RE, Rainey WE (2008). Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 93, pp. 4542-4546.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, pp. e36.

Pimienta G, Pascual J (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 6, pp. 2628-2632.

Qu X, Lam E, Doughman YQ, Chen Y, Chou YT, Lam M, Turakhia M, Dunwoodie SL, Watanabe M, Xu B, Duncan SA, Yang YC (2007). Cited2, a coactivator of HNF4alpha, is essential for liver development. *EMBO J* 26, pp. 4445-4456.

Rainey WE, Bird IM, Sawetawan C, Hanley NA, McCarthy JL, McGee EA, Wester R, Mason JI (1993). Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 77, pp. 731-737.

Rainey WE, Saner K, Schimmer BP (2004). Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 228, pp. 23-38.

Rainey WE, Bird IM, Mason JI (1994). The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol* 100, pp. 45-50.

Ramayya MS, Zhou J, Kino T, Segars JH, Bondy CA, Chrousos GP (1997). Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. *J Clin Endocrinol Metab* 82, pp. 1799-1806.

Robinson-White A, Meoli E, Stergiopoulos S, Horvath A, Boikos S, Bossis I, Stratakis CA (2006). PRKAR1A Mutations and protein kinase A interactions with other signaling pathways in the adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 91, pp. 2380-2388.

Romero DG, Rilli S, Plonczynski MW, Yanes LL, Zhou MY, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE (2007). Adrenal transcription regulatory genes modulated by angiotensin II and their role in steroidogenesis. *Physiol Genomics* 30, pp. 26-34.

Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, pp. 320-344.

Sala GB, Hayashi K, Catt KJ, Dufau ML (1979). Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis. *J Biol Chem* 254, pp. 3861-3865.

Staels B, Hum DW, Miller WL (1993). Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 7, pp. 423-433.

Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19, pp. 2647-2659.

Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA (2001). Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 86, pp. 4041-4046.

Sun HB, Zhu YX, Yin T, Sledge G, Yang YC (1998). MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, pp. 13555-13560.

Tien ES, Davis JW, Vanden Heuvel JP (2004). Identification of the CREB-binding protein/p300-interacting protein CITED2 as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha coregulator. *J Biol Chem* 279, pp. 24053-24063.

Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A (2007). Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development* 134, pp. 2349-2358.

Webster JC, Huber RM, Hanson RL, Collier PM, Haws TF, Mills JK, Burn TC, Allegretto EA (2002). Dexamethasone and tumor necrosis factor- α act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* 143, pp. 3866-3874.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325, pp. 1688-1695.

Winnay, JN, Hammer, GD (2006). Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 20, pp. 147-166.

Withington SL, Scott AN, Saunders DN, Lopes Floro K, Preis JI, Michalicek J, Maclean K, Sparrow DB, Barbera JP, Dunwoodie SL (2006). Loss of *Cited2* affects trophoblast formation and vascularization of the mouse placenta. *Dev Biol* 294, pp. 67-82.

Wu CH, Chen YF, Wang JY, Hsieh MC, Yeh CS, Lian ST, Shin SJ, Lin SR (2002). Mutant K-ras oncogene regulates steroidogenesis of normal human adrenocortical cells by the RAF-MEK-MAPK pathway. *Br J Cancer* 87, pp. 1000-1005.

Yanagie H, Hisa T, Ogata A, Miyazaki A, Nonaka Y, Nishihira T, Osada I, Sairenji T, Sugiyama H, Furuya Y, Kidani Y, Takamoto S, Takahashi H, Eriguchi M (2009). Improvement of sensitivity to platinum compound with siRNA knockdown of upregulated genes in platinum complex-resistant ovarian cancer cells in vitro. *Biomed Pharmacother* 63, pp. 553-560.

Yokota H, Goldring MB, Sun HB (2003). *CITED2*-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J Biol Chem* 278, pp. 47275-47280.

Yoon S, Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, pp. 21-44.

Young TW, Mei FC, Rosen DG, Yang G, Li N, Liu J, Cheng X (2007). Up-regulation of tumor susceptibility gene 101 protein in ovarian carcinomas revealed by proteomics analyses. *Mol Cell Proteomics* 6, pp. 294-304.

Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 20, pp. 353-357.

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, pp. 635-641.

Zubair M, Parker KL, Morohashi K (2008). Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol* 28, pp. 7030-7040.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
AMV	Avian myeloblastosis virus
bFGF	Basic fibroblast growth factor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB binding protein
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNS
CITED2	CBP-interacting transactivator with ED-rich tail 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	Corticotropin-releasing hormon
Cyp11B1	Cytochrome P450, subfamily 11B, polypeptide 1, Steroid 11 β -Hydroxylase
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal (DSS) - adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on the X chromosome, gene 1
DHEA (-S)	Dehydroepiandrosteron (-Sulfat)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease, Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular (signal-)regulated kinases
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α , Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
IGF	Insulin-like growth factor, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
JNK	Jun-amino terminale Kinasen
MAPK	Mitogen-activated protein kinases , Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	MAPK kinases, MAPK Kinasen

MAPKKK	MAPKK kinases, MAPKK Kinasen
MC2R	Melanocortin Typ 2 Rezeptor
MEK	MAPK/ERK Kinase
MRG1	Melanocyte-specific gene (MSG1) related gene
mRNA	messenger RNA, Boten-RNS
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
POMC	Proopiomelanocortin
RNA, RNS	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SF-1	Steroidogenic factor-1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
TFAP2	Transcription factor AP2
TGF- β	Transforming growth factor- β
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT-1	Wilms tumor-1

7.2. Danksagung

Herrn PD Dr. med. H.S. Willenberg danke ich besonders herzlich für die fortwährende und stetige Hilfe, Betreuung und Förderung sowohl in wissenschaftlichen als auch in klinischen Belangen.

Herrn Prof. Dr. med. W.A. Scherbaum und Herrn Prof. S.R. Bornstein danke ich herzlich für die Anvertraung des Themas sowie für die fortwährende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des endokrinologischen Forschungslabors bedanken, welche mich bei meinen Arbeiten unterstützten und in dessen Umfeld die Studien mit Freude verrichtet werden konnten.

Herrn Prof. C.A. Stratakis und dem Boeringer Ingelheim Fonds möchte ich für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthalts und eines methodischen Trainings an den National Institutes of Health (NIH, Bethesda, USA) sowie Herrn Prof. Bornstein und der Hedwig- und Waldemar-Hort-Stiftung für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden danken.

Meinen lieben Angehörigen einschließlich meiner Mutter Frau Barbara Haase und meinem Vater Herrn Dr. Georg Haase, meinen Freunden und meiner Lebensgefährtin Frau Sarah Langer, welche mir trotz der vielen im Labor und am Schreibtisch verbrachten Stunden Verständnis für meine Arbeiten entgegenbrachten.

7.3. Eigenständigkeitserklärung (Eidesstattliche Versicherung)

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt. Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

(Matthias Haase)

7.4. Lebenslauf

25.12.1979	Geburt in Haltern am See
1986-1990	Wittenbrink-Grundschule Dorsten-Wulfen
1990-1999	Gymnasium Petrinum Dorsten
1999	Abitur
1999-2000	Zivildienst und Ausbildung zum Rettungssanitäter beim kommunalen Rettungsdienst der Stadt Dorsten
2001-2007	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf <ul style="list-style-type: none">• Ärztliche Vorprüfung (April 2003)• Forschungsaufenthalt an den National Institutes of Child Health and Human Development (NIH, Bethesda, USA) in der Arbeitsgruppe um C.A. Stratakis und Reisestipendium des Boehringer Ingelheim Fonds (Februar bis März 2005)• Forschungsaufenthalt am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden in der Arbeitsgruppe „Molekulare Endokrinologie“ um Prof. S. Bornstein und Stipendium der Hedwig- und Waldemar-Hort-Stiftung (August bis September 2005).• Ärztliche Prüfung (Dezember 2007) und Approbation als Arzt (Januar 2008)
Seit 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Rheumatologie am Universitätsklinikum Düsseldorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum)

(Matthias Haase)

7.5. Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

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

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

Willenberg HS, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M, Scherbaum WA (2008). The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 116, pp. 70-74.

Haase M, Ansurudeen I, Schinner S, Paramonova I, Schott M, Papewalis C, Bornstein SR, Scherbaum WA, Willenberg HS (2009). Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. *Cell Tissue Res*. 336, pp. 337-343.

Übersichtsartikel:

Haase M, Willenberg HS (2009). Adrenal cortical tumors and multiple endocrine neoplasia-related syndromes. *Minerva Endocrinol*. 34, pp. 123-135.

Buchartikel:

Haase M, Willenberg HS, Schinner S, Schott M. (2009). Mechanisms of adrenocortical growth and tumorigenesis. In: *New Cancer Research Developments* (Ford TD, Ed.), pp. 255-269. Nova Science Publishers, New York.