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

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

Beeinflussen Endothelzellfaktoren die Funktion von Nebennierenrindenzellen?

–

Untersuchungen zur Hormonsekretion und Proliferation von NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss von Endothelzell-konditioniertem Medium und Endothelin-1

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Iryna Schönherr
(2011)

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. Willenberg

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Fenk

Referat

Die Nebenniere wird intensiv durchblutet und enthält eine hohe Anzahl von Blutgefäßen, die die Rinde radiär durchlaufen und engen Kontakt zu Nebennierenzellen haben. Diese große Kontaktfläche ermöglicht den Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen adrenokortikalen und Gefäßendothelzellen und lässt dadurch eine parakrine Interaktion zwischen diesen beiden Zellgruppen vermuten. Endothelin-1, ein bereits bekanntes Endothelzellprodukt, schien bis jetzt, eine Schlüsselrolle bei der Wirkung von Endothelzellen auf die Entwicklung und Funktionen der Nebennierenrinde zu spielen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Nebennierenrindenzellen der NCI-H295R-Zelllinie auf das Endothelzell-konditionierte Medium zeit- und konzentrationsabhängig mit einer erhöhten Aldosteron- und Cortisolsekretion sowie mit einer höheren Zellviabilität und Proliferationsaktivität reagieren. Wir fanden außerdem, dass bezüglich der steroidogenen und proliferativen Wirkungen das Endothelin-1 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Somit zeigen unsere Ergebnisse, dass ein bis jetzt unbekannter Faktor vermutet werden muss, der durch Endothelzellen produziert wird, und dem eine aktivierende Wirkung auf die kortikalen Zellen der Nebenniere zugeschrieben werden kann.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	5
1.1	Anatomie der Nebenniere	5
1.2	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	5
1.3	Nebennierenrinde, Vaskularisation und Endothelium	7
2.	Zielstellung	10
3.	Material und Methoden	11
3.1	Nebennierengewebe	11
3.1.1	Humane Nebennieren	11
3.1.2	Die Nebennierenrindenkarzinomzelllinie NCI-H295R	11
3.2	Gefäßendothelzellen	11
3.3	Immunhistochemie	13
3.3.1	Beschreibung der Primärantikörper	13
3.3.2	Vorbereitung der Objektträger	13
3.3.3	Vorbereitung von Paraffinschnitten	14
3.3.4	Beschreibung der angewendeten Methodik	14
3.3.5	Nachbehandlung der histologischen Schnitte	16
3.3.6	Kontrollen	17
3.3.7	Zellzählung	17
3.4	In vitro Studien	17
3.4.1	Kultivierung	17
3.4.2	Stimulationsversuche	17
3.4.3	Zellproliferationstest mit WST-1-Reagenz	18
3.4.4	Zellviabilitätstest mit Tritium-markiertem Thymidin	19
3.5	Messung der StAR-Promotor- bzw. Cyclin D-Promotor-Aktivität	19
3.6	Hormonbestimmungen mittels Radioimmunoassay	20
3.7	Statistische Analyse	21
4.	Ergebnisse	24
4.1	Immunhistochemie	24
4.2	In vitro Studien (Zellproliferations- und viabilitätstests, Luciferase-Assay, Hormonbestimmungen)	25
	4.2.1 WST-1-Test	25
	4.2.2 Tritium-Thymidin-Inkorporationsassay	25
	4.2.3 Luciferase-Assays, STAR -Promoter- und Cyclin D-Promoter-Aktivitätsmessung	25
	4.2.4 Hormonmessungen	26
4.3	Abbildungen	27
5.	Diskussion	34
6.	Literatur	40
7.	Abkürzungsverzeichnis	47
8.	Danksagung	48
9.	Lebenslauf	49

1. Einleitung

1.1 Anatomie der Nebenniere

Das zentral lokalisierte Mark, *Zona medullaris*, entwickelt sich nach der Einwanderung sympathiko-chromaffiner Stammzellen aus den prävertebralen Ganglien in das adrenale Primordium in der 6. Schwangerschaftswoche. Die Nebennierenmarkzellen sind für die Produktion der Katecholamine zuständig. Die konzentrisch gelegene Nebennierenrinde, *Cortex,* ist mesodermalen Ursprungs, zonal aufgebaut und stellt den Syntheseort von Steroidhormonen dar. Im fetalen Kortex unterscheidet man zwei Strukturen: die fetale *Zona X* und die definitive adulte Zone. Während die apoptotische Aktivität der Zellen im Bereich der fetalen Zone nach der Geburt stark zunimmt, fällt sie im Bereich der definitiven Zone ab. In der Folge bildet sich in den ersten Lebensmonaten nach der Geburt die fetale Zone zurück, die definitive adulte Zone vergrößert sich hingegen und differenziert sich weiter.

Die zonale Einteilung der erwachsenen Nebennienrenrinde wurde 1866 von dem Physiologen Arnold eingeführt: die äußere *Zona glomerulosa*, beteiligt an der Synthese von Mineralokortikoiden, z.B. Aldosteron; die mittlere *Zona fasciculata,* in der vorrangig Glukokortikoide, z.B. Cortisol, synthetisiert werden, und die innere *Zona reticularis*, der Hauptsyntheseort der Androgene, z.B. Dehydroepiandrosteron(-sulfat) und Androstendion. In den beiden inneren Zonen werden auch Glukokortikoide, Gestagene und Estrogene gebildet. Die Regulation der adrenalen Steroidbiosynthese erfolgt sowohl durch die Aktivierung der neuroendokrinen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bzw. ACTH, als auch durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bzw. Angiotensin II (AT2).

Es wurde schon früher beobachtet, dass die Nebennierenrinde sich im Laufe des Lebens weiter entwickelt und verändert. Das Gleichgewicht zwischen den Proliferations- und Apoptoseprozessen in der Nebennierenrinde hat eine wichtige Bedeutung für die Erhaltung der normalen Struktur und Funktion der Nebenniere (Hornsby et al. 1987).

1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Gesteuert vom Zentralnervensystem erfolgt die Sekretion und Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und von Arginin-Vasopressin (AVP) aus der *Eminentia medialis* des Hypothalamus in das hypothalamisch-hypophysäre Portalsystem. CRH führt in den kortikotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens zur enzymatischen Spaltung des ACTH-Precursormoleküls, Proopiomelanocortin (POMC) in ACTH, α-MSH, γ-Lipotropin, β-Endorphin und weitere.

Die Bindung von ACTH an seine Rezeptoren in der Nebennierenrinde reguliert über den zyklischen AMP–Proteinkinase A–Signaltransduktionsweg die Expression des Steroidogenic Factor-1 (SF-1) und des Steroidogenic Acute Regulatory Proteins (StAR) und damit die Schlüsselproteine der Steroidbiosynthese. Das StAR-Protein reguliert den Transport von Cholesterol zur inneren Mitochondrienmembran. Es ist ein 30 kDa großes Phosphoprotein und wird in den steroidproduzierenden Zellen exprimiert. Während der Embryogenese bei Mäusen korreliert die beginnende StAR-Expression mit der Expression der Steroidhydroxylasen und dem Beginn der Steroidbiosynthese (Clark et al. 1995). Die Produktion und Ausschüttung der Glucocorticoide und adrenalen Androgene unterliegt einem Feedbackmechanismus. Hohe Blutkonzentrationen an Glucocorticoiden führen zur Hemmung der Freisetzung von CRH im Hypothalamus und ACTH in der Adenohypophyse.

Proopiomelanocortin-Spaltprodukte regulieren neben der Steroidbiosynthese auch die Proliferation und Replikation der Nebennierenrindenzellen. So führt ein Überschuss an ACTH *in vivo* zunächst zur Hypertrophie und anschließend zur Hyperplasie der Nebennierenrinde. Außerdem scheint ACTH, eine Transformation der *Zona glomerulosa*-Zellen zu den typischen *Zona fasciculata*-Zellen anzuregen (Abayasekara et al. 1989). Ein dauerhafter ACTH-Mangel bedingt dagegen eine kortikale Atrophie (Gill 1972).

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Aktivierung des RAAS erfolgt durch das Absinken des mittleren renalen Blutdrucks und führt zur Freisetzung von Renin aus Gefäßwandzellen der Niere. Renin ist eine Peptidase, die Angiotensinogen in Angiotensin I spaltet, das unter der Wirkung des Angiotensin Converting Enzymes (ACE) zu AT2 umgewandelt wird. AT2 bindet an spezifische Typ 1-Rezeptoren (AT1R) in der *Zona glomerulosa* und führt zum intrazellulären Kalzium-Anstieg und Aktivierung von Calmodulin. Die daraufhin wirksamen Proteinkinase C-gekoppelten Signalwege bedingen eine Mobilisierung von Cholesterol und eine Aktivierung der Aldosteronsynthase mit Aldosteronfreisetzung. Die Bindung von Aldosteron am Mineralokortikoidrezeptor bewirkt eine Stabilisierung epithelialer Natriumkanäle und die Expression von ROMK (Renal Outer Medullary Potassium) - Kanälen und der basolateralen Natrium-Kalium-ATPase. Dies führt zu einer Salzretention mit Hypervolämie und hemmt die renale Reninsekretion, womit sich der negative Rückkopplungsmechanismus schließt (Boon et al. 1997).

Neben AT2 ist auch Kalium ein wichtiger Stimulator der Aldosteronsynthese, wobei Aldosteron in einem Regelkreis den renalen Kaliumverlust steigert. Die Signaltransduktionswege von AT2 und Kalium beeinflussen sich dabei gegenseitig (Aptel et al. 1996).

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass AT2 außer seiner Aldosteronsynthese-stimulierenden Funktion auch an der Regulation der Zellproliferation der Nebennierenrindenzellen sowie am Umbauprozess der Nebenniere beteiligt ist. Eine Induktion der Zellproliferation der kultivierten adrenokortikalen Zellen durch

AT2 wurde von Natarajan et al. 1992 gezeigt. Die Hauptwirkungen von AT2 werden über seinen Rezeptor-Subtyp 1 vermittelt (Gupta et al. 1995, Tanabe et al. 1998, Lumbers 1999), der auch für die Stimulation der Zellproliferation verantwortlich ist.

Neben den gut bekannten Regulatoren, wie AT2, ACTH und Kalium, üben auch andere parakrine Faktoren einen Einfluss auf die Aldosteronsynthese aus. Zu ihnen zählen vor allem Katecholamine, Neuropeptide, Fett- und Endothelzellfaktoren (Ehrhart-Bornstein et al. 1998, Bornstein und Chrousos 1999, Lefebvre et al. 2001, Ehrhart-Bornstein et al. 2003, Willenberg et al. 2008).

1.3 Nebennierenrinde, Vaskularisation und Endothelium

Die Nebenniere wird intensiv durchblutet (Vinson et al., 1985, Bassett und West, 1997; Ehrhart-Bornstein et al. 1998). Das Gewicht der Drüse beträgt beispielweise nur ca. 0,02% des gesamten Körpergewichtes, sie erhält jedoch ca. 0,14% des gesamten kardialen Blutflusses (Breslow et al. 1992, Ehrhart-Bornstein et al. 1998). Auf Grund der hohen Anzahl der Zellkontakte zwischen den Endothel- und Nebennierenrindenzellen ergibt sich eine große Austauschoberfläche für die Produkte dieser Zellen (Vinson et al. 1985, Dobbie et al. 1991, Thomas et al. 2003, Bassett et al. 2007). Über die interzelluläre Kontaktfläche können zum einen die Steroidhormone in den systemischen Kreislauf abgegeben und zum anderen auch Endothelzellprodukte an die Nebennierenrindenzellen weitergegeben werden.

Es ist inzwischen bekannt, dass Endothelzellprodukte nicht nur auf die glatte Gefäßwandmuskulatur wirken, sondern auch hormonähnliche Effekte ausüben können (Campbell und Gomez-Sanchez et al. 1985, Hanke et al. 1998, Morishita et al. 1989, Ehrhart-Bornstein et al. 1998, Hinson et al. 1998, Willenberg et al. 2008).

Endothelin-1 und Nebennierenride

Eine direkte stimulierende Wirkung spezifischer Endothelzellfaktoren auf die Steroidbiosynthese sowie auf die Proliferationsaktivität der Nebennierenrindenzellen wurde über eine längere Zeit dem Endothelin-1 zugeschrieben (Hinson et al. 1991, Rubanyi and Polokoff 1994, Nussdorfer et al. 1997, Mazzocchi et al. 1997, Rossi et al. 2000). Das ET-1 war zunächst als ein hoch potentes vasokonstriktorisches Peptid identifiziert worden (Yanagisawa et al. 1988). Im Verlauf wurden weitere Funktionen, einschließlich der Stimulation von Mitose und Proto-Onkogen-Expression sowie der Regulation von einigen hormonellen Systemen entdeckt (Yanagisawa und Masaki 1989). 1989 wurde gefunden, dass mit ET-1 behandelte Tiere einen Hyperaldosteronismus entwickeln, der durch eine geringe Reninsuppression charakterisiert war (Miller et al. J 1989). Auch *in vitro* konnte ein direkter Effekt von ET-1 auf die Aldosteronsekretion bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ET-1 die Proliferation der Nebennierenrindenzellen beeinflussen kann (Nussdorfer et al. 1997). Es sind mindestens drei Isoformen der Endothelinfamilie

bekannt. ET-1 vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Es werden ET Typ A- und -Typ B-Rezeptoren unterschieden. Die früheren Studien zeigten, dass die steroidogene Wirkung von ET-1 über seine Typ B-Rezeptoren (Nussdorfer et al. 1997; Rossi et al. 2000) und die proliferationsstimulierende Wirkung über Typ A-Rezeptoren vermittelt wird (Mazzocchi et al. 1997).

Die ET-A-Rezeptoren sind unter anderem in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße lokalisiert, wo sie die ET-1-bedingte Vasokonstriktion vermitteln. Im Bereich der Nebennierenrinde finden sich die meisten ET-A-Rezeptoren im Bereich der *Zona glomerulosa* (Belloni et al. 1994). Außerdem konnte innerhalb der *Zona glomerulosa* auch das ET-1-convertierende Enzym nachgewiesen werden und somit die Fähigkeit, das Vorläufer-Protein von ET-1 zu aktivieren (Korth et al. 1999).

Die meisten ET-B-Rezeptoren sind auf Endothel-, Epithel- und glatten Muskelzellen lokalisiert. Ihre Aktivierung kann durch ET-1 oder ET-3 sowohl eine Vasodilatation (indirekt über Stickstoffmonoxid-Freisetzung), als auch eine Vasokonstriktion (direkter Effekt) verursachen.

Weitere Endothelzelllfaktoren und Nebennierenrinde

Ein anderer bekannter Faktor der vaskulären Endothelzellen ist ***Stickstoffmonoxid*** (NO). NO kann neben den anderen Regulationsmechanismen den adrenalen Blutfluss sowie die steroidogene Funktion der Nebennieren regulieren (Natarajan et al. 1997, Hinson et al. 1998). Nitroprussid, ein NO-Donator, bewirkte über Prostglandin E_2 die Freisetzung von Corticosteron aus Ratennnebennieren *in vitro* (Mohn et al. 2005). Der Effekt wurde mit dem von ACTH verglichen und wies darauf hin, dass die schnelle Wirkung von ACTH auf Nebennierenrindenzellen und die Ausschüttung von Corticosteron bei Mäusen unter Beteiligung von NO erfolgt (Mohn et al. 2005).

Ein weiteres Produkt der Gefäßendothelzellen ist ***Adrenomedullin***. Es wurde erstmals von Kitamura et al. 1993 aus einem menschlichen adrenomedullären Tumor extrahiert. Adrenomedullin ist ein Polypeptid, das sowohl im Nebennierenmark als auch in der Nebennierenrinde, besonders im Bereich der *Zona glomerulosa*, lokalisiert ist. Adrenomedullin kann die Funktion der Nebenniere parakrin beeinflussen. Dieses Polypeptid übt im Gegensatz zum Endothelin vor allem einen vasodilatorischen Effekt auf Blutgefäße aus.

Darüber hinaus wird einem weiteren Endothelzellfaktor eine stimulierende Wirkung auf die Nebennieren-rindenzellen zugeschrieben. Es handelt sich um ein ***3000 Da großes Protein***, welches durch kapilläre Endothelzellen gebildet wird (Rosolowsky et al. 1999). Die Effekte des Proteins werden intrazellulär über den Proteinkinase C-Signaltransduktionsweg reguliert. Interessanterweise bleibt die steroidogene Wirkung dieses Proteins nur auf die Aldosteronsekretion beschränkt. Die Annahme, dass die vaskulären Endothelzellen selbst zur Steroidbiosynthese fähig sind (Takeda Y et al. 1994 und 1995, Takeda R et al. 1995), konnte in weiteren Studien nicht bestätigt werden (Ahmad et al. 2004).

Endothel-konditioniertes Medium und Netto-Effekt auf die Nebennierenrinde

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe über den Einfluss des Endothelzell-konditionierten Mediums (ECCM) auf die steroidogene Funktion der Nebennierenrindenzellen wurde gezeigt, dass die Aldosteronsynthese neben den bekannten stimulierenden Faktoren, wie AT2 und ACTH, auch über das Endothel kontrolliert wird (Ansurudeen et al. 2006, Ansurudeen et al. 2007, Ansurudeen et al. 2009). Durch die Anwendung von ET-1-Rezeptor-Antagonisten, BQ123 und BQ788 (ET_A- bzw. ET_B-Rezeptor), sowie AT1Rezeptor-Antagonisten, konnte eine erhöhte Aldosteronsekretion unter dem Einfluss von Endothelzell-konditioniertem Medium über einen Mechanismus festgestellt werden, der unabhängig von AT2 und möglicherweise nicht direkt von ET-1 vermittelt wird (Ansurudeen et al. 2007).

Offene Fragen

Die Ergebnisse der bis jetzt durchgeführten Hormonsynthese- und Zellproliferations-Studien zeigen zusammengefasst, dass Endothelzellfaktoren die Steroidbiosynthese und das Zellwachstum der Nebennierenrindenzellen steigern. Stimulationsversuche der Nebennierenrindenzellen mit ECCM führten zu einer erhöhten Aldosteron- und Cortisolsynthese. Dabei wurde initial gezeigt, dass der Bestandteil ET-1 eine aktivierende Wirkung des ECCM auf die steroidogene Funktion der Nebennierenrinde vermittelt. Außerdem wurde eine Aktivierung der Zellproliferation von Nebennierenrindenzellen unter dem ECCM in erster Linie dem ET-1 zugeschrieben. Die Frage, ob das ET-1 der dominierende Mediator der Effekte von ECCM auf die Nebennierenrindenzellen darstellt, war bislang nicht ausreichend beantwortet.

2. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die erhöhte Steroidkonzentration im Überstand von NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss von Endothelzellfaktoren die Folge einer
   - Steigerung der Steroidbiosynthese oder
   - Steigerung der Proliferation von NCI-H295R-Zellen?
   - Steigerung der Steroidbiosynthese und der Proliferation von NCI-H295R-Zellen?

   1.1 Wird die StAR-Promoteraktivität unter dem Einfluß von Endothelzellfaktoren gesteigert? Übt das ECCM seinen Einfluss auf die steroidogene Funktion der NCI-H295R-Zellen über die klassischen Regulationsproteine der Steroidbiosynthese aus?

   1.2 Wird die Zellviabilität und Zellproliferation unter dem Einfluss von Endothelzellfaktoren gesteigert?

   1.3 Wird die Cyclin-D-Promoteraktivität durch Endothelzellfaktoren reguliert? Wird der Effekt von ECCM auf die Proliferationsaktivität der NCI-H295R-Zellen durch den Zellzyklusregulator Cyclin D vermittelt?

   1.4 Findet in der normalen adulten humanen Nebenniere überhaupt eine relevante Proliferation statt?

2. Entspricht der Netto-Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums dem von ET-1? Wird der Einfluss des ECCMs auf die Steroidbiosynthese und Proliferation der NCI-H295R-Zellen durch die ET-1–Wirkung erklärt?

3. Welche klinischen Konsequenzen könnten sich aus den Kenntnissen über den Einfluss der Endothelzellfaktoren auf die Funktionen der Nebennierenrindenzellen ergeben?

3. Material und Methoden

3.1 Nebennierengewebe

3.1.1 Humane Nebennieren

Für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen wurden 13 humane normale Nebennieren verwendet. Das vermutlich normale Gewebe wurde im Rahmen der operativen Entfernung maligner Nierentumoren mit technisch bedingter ipsylateraler Adrenalektomie gewonnen.

Direkt nach der operativen Entfernung wurden die Nebennieren in einem auf Eis gekühlten sterilen PBS-Bad transportiert und bei 4 ºC aufbewahrt. Anschließend wurde das umgebende Fettgewebe makroskopisch entfernt und die Nebennieren in kleine Schnitte geteilt. Die weitere Behandlung der Schnitte erfolgte mittels einer Fixierung in 4 %-igem Formalin.

3.1.2 Nebennierenrindenkarzinomzelllinie NCI-H295R

Die NCI-H295R-Zellen entstammen einer etablierten primären humanen Nebennierenrindenzelllinie und wurden aus einem Nebennierenrindenkarzinom einer Patientin gewonnen. Sie exprimieren alle Enzyme der Steroidbiosynthese und stellen deswegen ein geeignetes Modell für die Untersuchungen der Proliferationsfähigkeit und der steroidogenen Funktion der Nebennierenrindenzellen dar.

3.2 Gefäßendothelzellen

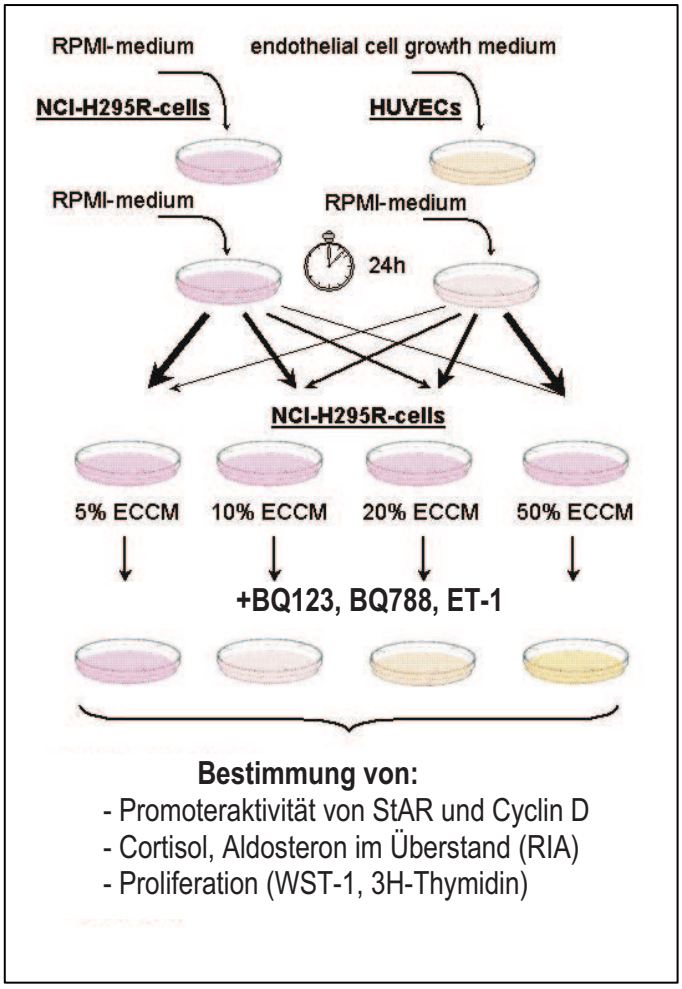
Die verwendeten Endothelzellen entsprechen HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells). Sie wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Kelm bzw. mit dem Institut für Biochemie nach folgendem Protokoll gewonnen (Haase et al. 2009):

Nach der Blutentfernung durch Spülen mit 50 mM Phosphatpuffer wurden die 15 cm-lange Abschnitte der Nabelschnurvene mit 1 mg Kollagenase pro 1 ml Endothelzellmedium gefüllt und bei 37 °C 30 min lang inkubiert. Danach wurde die gewonnene Zellsuspension bei 50×g 5 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Endothelbasalmedium resuspendiert, welchem 10 %-iges fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C unter 5 % CO_2. Zweite und dritte Passagen wurden in dem kurzen Zeitabschnitt (maximal 3 Passagen) unter Anwendung von speziellem Endothelzellmedium hergestellt und kultiviert.

Herstellung des Endothelzell-konditionierten Mediums

Der Stimulation von NCI-H295R-Zellen diente das Endothelzell-konditionierte Medium (ECCM), das in zwei Schritten gewonnen wurde. Zuerst wurden die HUVEC-Zellen mit dem Endothelzellmedium bei 37 °C 24 Stunden lang kultiviert. Die aus dem Endothelzellmedium isolierten HUVEC-Zellen wurden dann für weitere 24 Stunden in RPMI-, DMEM-F12- Medium oder Endothelzellmedium ohne Zusätze kultiviert (Abb. 1). Die Ergebnisse mit unterschiedlichen Medien unterscheiden sich prinzipiell nicht. Im Folgenden wurden die Ergebnisse wiedergegeben, die mit Endothelzell-konditioniertem RPMI-Medium erarbeitet wurden.

Abb. 1
Schematische Darstellung zur Gewinnung des Endothelzell-konditionierten Mediums



Splitten und Aussäen der NCI-H295R-Zellen

Das RPMI-Medium wurde von den Zellen (aus der 75 cm² Flasche) abgesaugt und sie wurden mit dem PBS einmal gewaschen. Im nächsten Schritt wurde Accutase direkt auf die Zellen zum Ablösen gegeben, es wurde 7 min lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum weiteren Ablösen der Zellen wurde die Flasche gegen einen festen Gegenstand geklopft. Danach wurden ca. 10 ml von dem frischen RPMI-Medium dazugegeben und die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falcon-Tube überführt. Bei 1100 U/min

(200 g) wurden die Zellen 6 min lang abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 100 µl Accumax resuspendiert und 4 min lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen.

Zählen der Zellen mit der Neubauer-Kammer

Für die Stimulationsversuche wurde die Zellkonzentration pro Well der Zellplatte folgendermaßen bestimmt:

Das Zellpellet wurde in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und gut gemischt. Davon wurden 100 µl Zellsuspension entnommen, mit 100 µl Accumax gemischt und 7 min lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 200 µl Trypanblaulösung dazugegeben und gut durchgemischt. Anschließend wurden 20 µl von der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer einpipettiert. Nun wurden 4 Großquadrate (à 16 Kleinquadraten) ausgezählt. Danach wurde die Zellzahl pro 2 ml Zellsuspension aus der folgenden Formel errechnet:

Ermittelte Zellzahl × Kammerkonstante (10.000) × Verdünnungsfaktor (4) = Zellzahl / 2 ml

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Beschreibung der Primärantikörper

1) Für die Charakterisierung der proliferierenden Nebennierenrindenzellen wurden zwei Arten der spezifischen Antikörper angewandt:

- der polyklonale Anti-Ki-67-Antikörper (Ki-67-(MIB-1-)Antikörper, DAKO, Hamburg, BRD) ist gegen das nukleäre Ki-67-(MIB-1-)Antigen gerichtet;
- der monoklonale Anti-PCNA-Antikörper (PCNA-Antikörper, DAKO) ist gegen das PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), das als Kofaktor für die DNA-Polymerase δ agiert, gerichtet.

2) Für die Markierung der Endothelzellen wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Zellen-oberflächenantigen, das zu dem Cluster of Differentiation (CD) gehört, CD31 (PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) verwendet (siehe Tabelle 1).

3.3.2 Vorbereitung der Objektträger

Für eine verstärkte Adhäsion der Gewebeschnitte an die Objektträger während des immunhistochemischen Färbungsverfahrens wurden diese vor der Verwendung mit Poly-L-Lysin (in einer Konzentration von 1:10 in Wasser) beschichtet.

3.3.3 Vorbereitung von Paraffinschnitten

Nach dem Fixieren der Gewebeblöcke in 4%-igem Formalin (über 16 Stunden) wurden sie in Paraffin eingebettet und mit einer Dicke von 6 bis 7 µm geschnitten. Die Schnitte wurden dann für 2 Stunden bei 61ºC auf die Objektträger festgebacken. Im nächsten Schritt erfolgte das Entparaffinieren in einer Xylol-Lösung und das Rehydrieren der Schnitte in einer absteigenden Alkohol-Verdünnungsreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%). Anschließend wurden sie in lauwarmem Wasser gespült und im TBS-Bad gewaschen.

Tabelle 1
Übersicht über die verwendeten Antikörper, ihre Verdünnungen und Techniken

Anti-Körper	Antigen-demaskierung	Angewendete Methode	Firma	Klon	Verdünnung
MIB-1 (Ki-67)	notwendig	CSA	DAKO	A 047	1:50
PCNA	notwendig	CSA	DAKO	M 879	1:200
CD31	notwendig	CSA	DAKO	JC/70A	1:50

3.3.4 Beschreibung der angewendeten Methodik

Die Immunmarkierung der proliferierenden Nebennierenrindenzellen sowie der Gefäßendothelzellen erfolgte mittels Catalyzed-Signal-Amplifikation-Methode (CSA, Bobrow et al. 1989), dargestellt in Abbildung 2. In diesem immunhistochemischen Färbungsverfahren bindet ein Primärantikörper zunächst an das zu untersuchende Antigen. Im nächsten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. An die Biotinmoleküle des Sekundärantikörpers bindet nun Streptavidin, welches in Form eines Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes hinzugegeben wird. Im Amplifikationsschritt katalysiert die gebundene Peroxidase eine Radikalreaktion, bei der biotinylierte Phenolmoleküle in eine reaktive Form (mit einem freien Elektron des Sauerstoffatoms) überführt werden und eine chemische Bindung mit Gewebsproteinen eingehen. Die Zugabe von Streptavidin gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-HRP, HRP = horseradish peroxidase) führt zur Bindung des Streptavidins an die Biotinmoleküle und einer hohen Anzahl von Peroxidasen in der Nähe des gesuchten Antigens. Diese setzen zugegebenes Chromogen/Substrat (DAB/H_2O_2) in einen sichtbaren Farbstoff (Chromophor) um.

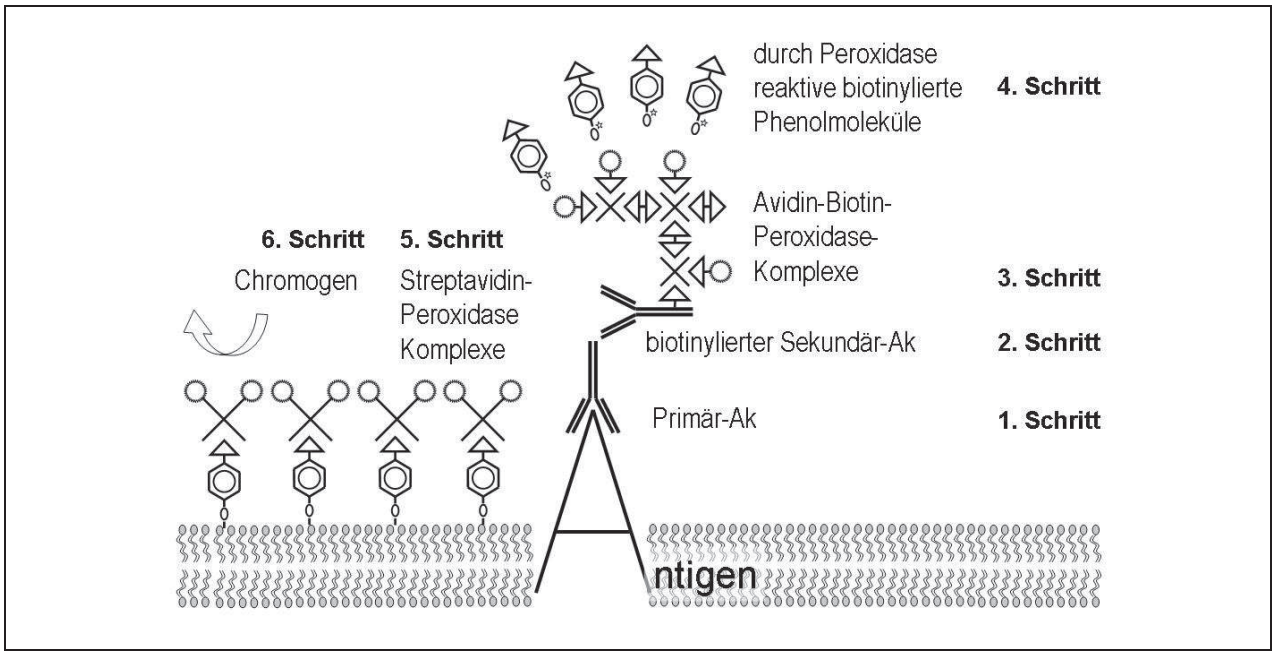
A) Antigendemaskierung

Zur Lösung der fixierungsbedingten Quervernetzungen der Membranproteine und zur Erhöhung der Sensitivität von Immunfärbung wurden folgende Methoden der Antigendemaskierung angewendet:

1) Bei Immunfärbung gegen PCNA und MIB-1-Ag

- „HIER"-Methode (Heat-Induced Epitope Retrieval): die Quervernetzungen im Gewebe werden unter Hitzeeinwirkung physikalisch aufgebrochen. Dies wurde erreicht, indem die Gewebeschnitte in einer 10%-igen Pufferlösung (0,01M NaCitrat-Puffer, pH 6,0) bei 99 °C 3 min lang in der Mikrowelle erhitzt wurden.
- Detergenzeinwirkung auf die Vernetzungen der Membranproteine: die Schnitte wurden für 5 min in ein TBS-Bad getaucht, das 0,5% Triton X-100 enthielt.

Abb. 2
Schematische Darstellung der Catalyzed-Signal-Amplifikation-Methode



2) Bei Immunfärbung gegen CD31-Ag wurde eine enzymatische Epitopdemaskierung angewendet, indem die Gewebeschnitte mit der Proteinase K bei 37°C 20 min lang inkubiert wurden. Danach wurden sie 20 min lang bei Raumtemperatur abgekühlt und anschlieβend in zwei aufeinanderfolgenden Waschpufferbädern gespült.

B) Blocken der endogenen Peroxidase

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken, bzw. die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Schnitte mit einer im CSA-Kit enthaltenen 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung 15 min lang inkubiert.

C) Protein-Block

- Bei Immunfärbung gegen PCNA und MIB-1-Ag wurde zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit dem im CSA-Kit enthaltenen Blockierungsreagenz (serumfreies Protein in PBS mit 0,015 mol/L Natriumazid) 30 min lang inkubiert.
- Bei Immunfärbungen gegen CD31-Ag wurde mit Normalkanninchenserum (bzw. mit Serum derjenigen Tierspezies, aus der Sekundärantikörper stammte) 30 min lang inkubiert.

D) Durchführung der Immunfärbung

1) gegen PCNA und MIB-1-Ag

Nach der Vorbehandlung wurden Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper 40 min lang inkubiert: 0,02% Anti-Ki67(MIB-1) bzw. 0,005% Anti-PCNA in 2%-igem Normalschweineserum. Danach erfolgte die Exposition der Schnitte gegenüber dem biotinylierten Sekundärantikörper (15 min), gefolgt von den Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexen nach einem Waschschritt. Anschließend wurde mit dem Amplifikationgreagenz (biotinyliertes Tyramid und Wasserstoffperoxid) 15 min lang inkubiert und nach einem weiteren Waschschritt für ca. 15 min lang mit Streptavidin-Peroxidase-Komplex.

2) gegen CD31-Ag

Nach der Vorbehandlung wurden Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper 1 Stunde lang inkubiert: 0,02% Ratte-Anti-Maus-CD31-Ak (Dako, Hamburg, BRD) verdünnt in einem im CSA-Kit enthaltenen Verdünnungspuffer. Nach dem Waschen im Waschpuffer (zweimal, jeweils 2 min) wurde mit dem peroxidaseblockierenden Reagenz (3%-ige Wasserstoffperoxidlösung) 10 min lang inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Danach erfolgte die Exposition der Schnitte gegenüber dem biotinylierten Sekundärantikörper (Kanninchen-anti-Ratte-Ak), 30 min lang. Nach anschlieβendem Waschen in einer TBS-Pufferlösung (dreimal, 5 min jeweils) wurde mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex 30 min lang inkubiert und dann wieder im Waschpuffer gespült.

3.3.5 Nachbehandlung der histologischen Schnitte

A) Die Immunfärbung wurde durch die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) oder Aminoethylcarbazol (AEC) als Chromogene abgeschlossen, wobei sich DAB unter Einwirkung von gebundener Meerrettichperoxidase in einen braunen und AEC in einen roten unlöslichen Niederschlag am Bindungsort des Antikörpers umwandeln ließ. Die Dauer der Exposition gegenüber DAB betrug 5 min, die gegenüber AEC 10 min. Anschließend wurden die Objektträger erneut in einem PBS-Bad gewaschen.

B) Nach der Chromogenreaktion wurden die Gewebeschnitte in einem Hämatoxylinbad für ca.40 sec gegengefärbt und anschließend in einem PBS-Bad gewaschen.

C) In dem letzten Schritt erfolgte die Einbettung in flüssige Glyzeringelatine.

Die immungefärbten Schnitte wurden mit dem Deckglas versehen, unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert (Film Kodak DIN 200).

3.3.6 Kontrollen

In Kontrollexperimenten für die immunhistochemische Färbung gegen Proliferationsantigene (MIB-1-Antigen und PCNA) und gegen Endothelzellantigen (CD31) wurden die primären Antikörper durch das negative Kontrollreagenz aus dem CSA-Kit ersetzt bzw. sehr hoch verdünnt, z.B. 1:1.000.000.

3.3.7 Zellzählung

Zur Ermittlung des Infiltrationsgrades der immungefärbten Nebennierenpräparate mit den proliferierenden Zellen wurden die gefärbten Zellen pro hundert Zellen an einem Videomikroskop (Nicon mit Leica-Software) gezählt. Somit wurde der Anteil der gefärbten Zellen als Labeling Index (LI) in Prozent angegeben.

3.4 *In vitro* Studien

3.4.1 Kultivierung

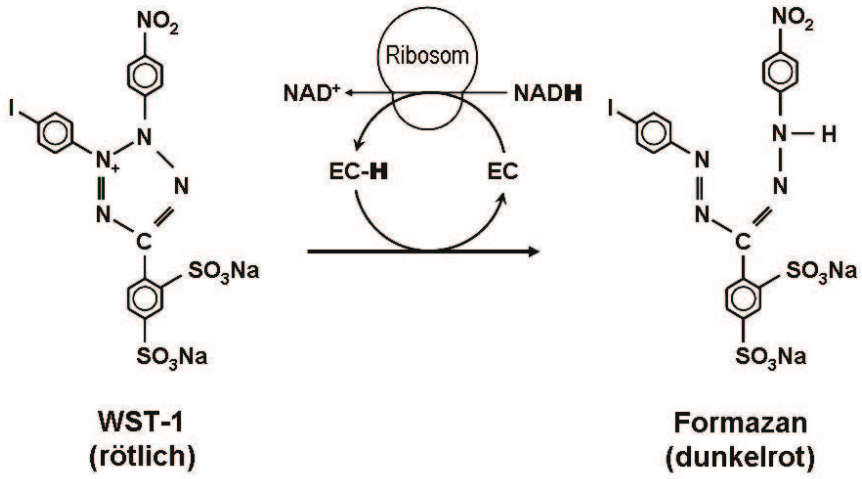
Der Kultivierung von NCI-H295R-Zellen diente DMEM/F12-Medium, das durch die Zugabe von 66 nM Insulin, 10 nM Hydrocortison, 10 nM 17-Estradiol, 10 µg/ml Transferrin, 30 nM Selenit, 100 U/mL Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 10 µg/ml Ascorbinsäure und 2%-iges fetales Kälberserum ergänzt wurde.
Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen bei 37°C in der befeuchteten Atmosphäre unter 5% CO2/ 95% Luft inkubiert. Das Medium wurde 3mal pro Woche gewechselt. Alle 7-10 Tage erfolgte eine Subkultivierung der NCI-H295R-Zellen, wobei die Accutase zur Ablösung der Zellen verwendet wurde. Anschließend wurden die Zellen auf 24-Well- bzw. 96-Well-Platten ausgesät und 48 Stunden lang kultiviert.

3.4.2 Stimulationsversuche

Die ausgesäten NCI-H295R-Zellen wurden zuerst mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend gegenüber dem ECCM in den steigenden Konzentrationen (0%, 1%, 5%, 10%, 20% und 30%) exponiert, mit und ohne Zugabe der Endothelin-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, in einer Konzentration von 10^{-9} M. Die entsprechenden ECCM-Konzentrationen wurden durch eine Verdünnung des 100%-igen ECCM in RPMI- oder DMEM/F12-Medium erreicht. Außerdem wurden die kultivierten NCI-H295R-Zellen für die Hormonmessungen und StAR-Promoter-Aktivitätsmessung gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von Endothelin-1 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-7} M exponiert.

Als Kontrolle der Methode wurden jeweils 4 Wells pro 24-Well-Platte bzw. 16 Wells pro 96-Well-Platte nicht stimuliert. Sie dienten zur Ermittlung der Basalwerte bei den Stimulationsversuchen.

Abb. 3
WST-1 Zellproliferationstest



Umwandlung des WST-1 unter Einwirkung von mitochondrialen Dehydrogenasen zu dem löslichen Formazan

3.4.3 Zellproliferationstest mit WST-1-Reagenz

Prinzip: Der WST-1-Test ermöglicht eine quantitative Aussage über den Zellmetabolismus. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird unter Einwirkung von mitochondrialen Dehydrogenasen zu dem löslichen Formazan (Abb. 3) umgewandelt, dessen Menge direkt mit der Zellzahl korreliert.

Durchführung: Zur Messung der Zellviabilität wurden die NCI-H295R-Zellen zunächst auf die 96-Well-Platte á 10 000 Zellen pro Well ausgesät und mit DMEM/F12-Medium (100 µl pro Well) 24 Stunden lang kultiviert. Danach wurden die Nebennierenrindenzellen gegen das ECCM in den ansteigenden Konzentrationen exponiert und 24 Stunden lang inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das WST-1-Reagenz in der zehnprozentigen Konzentration zugegeben und 6 Stunden lang inkubiert, wobei alle 2 Stunden eine Messung des WST-1-Umsatzes erfolgte.

Auswertung: Die Umwandlung von WST-1-Salz zu dem löslichen Formazan-Salz wurde mittels ELISA-Spektrophotometer bei Lichtabsorptionswellenlänge von 450 nm erfasst. Die Ergebnisse wurden aus der Lichtabsorbtion im Vergleich zu dem „blank“ (i.e. Leerwert) ausgerechnet und als prozentueller Anteil der Lichtabsorbtion im Bezug auf die Kontrollwerte dargestellt. Als Negativ-Kontrollen dienten die NCI-H295R-Zellen, die nur mit dem RPMI-Medium kultiviert wurden.

3.4.4 Zellviabilitätstest mit Tritium-markiertem Thymidin

Prinzip: Als Maß für die Proliferation der Zellen dient der Einbau radioaktiv markierten Tritium-Thymidins in die Desoxyribonucleinsäure (DNS) während der S-Phase des Zellzyklus.

Durchführung: Die NCI-H295R-Zellen wurden wie beim WST-1-Test auf die 96-Well-Platte ausgesät, mit RPMI-Medium (100µl pro Well) 24 Stunden lang kultiviert und mit dem ECCM in den ansteigenden Konzentrationen innerhalb desselben Zeitraums stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 2,5 µCi pro Milliliter Tritium-Thymidin gepulst. Während der nachfolgenden 24-stündigen Inkubation erfolgte der Einbau von Tritium-Thymidin in die DNS der Nebennierenrindenzellen bei deren Replikation. Anschließend wurde die DNS-gebundene Radioaktivität als Maß für die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation gemessen.

Auswertung: Zunächst wurden die Kulturplatten bei -20°C eingefroren, um die Zellen aufzubrechen. Danach wurden die Zellen aufgetaut und mithilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter gesaugt. Der anschließende Waschschritt mit dem destillierten Wasser führte zum Aufbrechen der noch intakt gebliebenen Zellen sowie zum Auswaschen des im Medium gelösten Tritium-Thymidins aus dem Filter, während die Tritium-Thymidin-markierte DNA auf dem Filter zurückgehalten wurde. Die Glasfaserfilter wurden dann in der Mikrowelle getrocknet, in Plastikbeutel eingeschweißt und diese mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt. Anschließend wurde die Radioaktivität im β-Szintillationsmessgerät als Impulse pro Minute („counts per minute“, cpm) gemessen. Als Negativ-Kontrollen dienten die NCI-H295R-Zellen, die mit dem RPMI-Medium kultiviert, jedoch nicht mit dem ECCM stimuliert wurden.

3.5. Messung der StAR-Promotor- bzw. Cyclin D3-Promotor-Aktivität

Prinzip: Um den Effekt des ECCM auf StAR- (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) und Cyclin D- (ein Zellzyklusregulator) Promoter-Aktivität in den NCI-H295R-Zellen zu bestimmen, wurden sie zunächst mit dem 1300-StAR- bzw. mit dem Cyclin D3-Plasmid transfiziert (Sugawara et al. 1996). StAR katalysiert den mitochondrialen Membrantransport von Cholesterin, der Ausgangssubstanz der Steroidbiosynthese, und stellt ein Regulationsprotein der Steroidbiosynthese dar.

Die StAR-Promoter-Aktivität ist ein Maß für die Aktivierung der Steroidbiosynthese in den Nebennierenrindenzellen. Die Höhe der Regulation des Promoters von Cyclin D3-Gen entspricht bestimmten Zellzyklusphasen und erlaubt eine quantitative Aussage über die Proliferationsfähigkeit der Zellen. Zur Messung der Promoter-Aktivität wurde ein Dual-Luciferase-Assay verwendet. Der Dual-Luciferase(TM) Reporter Assay (Promega) ist ein Detektionssystem, das auf der Verwendung von zwei Luciferasen mit unterschiedlichen Eigenschaften beruht, der des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), mit der man die Aktivität des zu untersuchenden Promoters nachweist (s.g. StAR-Luciferase, Cyclin D3-Luciferase), während die kotransfizierte Quallen-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters steht (s.g. pRLTK/Luciferase) und so zur Standardisierung verwendet wird.

Man misst zuerst die Glühwürmchen-Luciferaseaktivität und gibt anschließend in die gleiche Messküvette Renilla-Puffer zu, der die Glühwürmchenreaktion stopt und die Renillareaktion startet.

Durchführung: Splitten und Aussäen der NCI-H295R-Zellen auf die 24-Well-Platte (10^6 Zellen/Well)

1) Vorbereitung der Transfektionsmischung (bezogen auf eine Well): 1µg Cyclin D3 bzw. 1 µg der 1300-StAR-DNA für 1300-StAR Protein, 0,25 µg pRLTK (Renilla Luciferase), 100µl RPMI-Medium und 3,75 µl Fugene. Die Konzentration (µg/µl) von Cyclin D3 bzw. 1300-StAR und pRLTK in der Plasmidlösung wurde mithilfe von Biophotometer (Eppendorf) bei Absorptionswellenlänge von 260 nm gemessen. Dann wurde die für die Transfektion erforderliche Menge der Plasmidlösung ausgerechnet, die Transfektionsmischung für die ganze Platte vorbereitet und auf die Zellen für 24 Stunden aufgetragen.
2) Stimulation der NCI-H295R-Zellen, die mit Cyclin D3 bzw. 1300-StAR und pRLTK transfiziert wurden, durch die ansteigenden Konzentrationen von ECCM (1%, 5%, 10%, 20% und 30%) und von Endothelin-1 (10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}) mit und ohne gleichzeitige Zugabe der Endothelin-1-Rezeptorantagonisten von Typ A und B, BQ123 bzw. BQ788. Anschließende 24-stündige Inkubation bei 37°C:

Auswertung: Dual-Luciferase® Reporter Assay: Nach der 24-stündigen Inkubation wurde das Stimulations-Medium von den Zellen abgesaugt und der „Passive Lysis Buffer" (100 µl PLP pro Well) für 20 min aufgetragen. Danach wurden die lysierten Zellen von dem Boden der 24-Well-Platte mit der Eppendorf-Pippetenspitze abgekratzt und in die Eppendorf-Tubes überführt. Anschließend wurde die gewonnenene Zellsuspension (5 µl jeweils) in das spezielle Messröhrchen gegeben, mit 25 µl von „Luciferase Assay Reagent II" (LARII) gemischt und die Aktivitäten von 1300-StAR-Luciferase bzw. Cyclin D3-Luciferase mittels Luminometer (Lumat LB 9507) gemessen. Danach wurden 25 µl von „Stop & Glo® Reagent" (STG), das die Glühwürmchen-Luciferase-Reaktion stopt und die Renilla-(pRLTK/Luciferase)-Reaktion startet, zur Zellmischung gegeben und die Aktivität von pRLTK/Luciferase mit demselben Luminometer gemessen. Zur Ermittlung der 1300-StAR- bzw. Cyclin D3-Promoter-Aktivitäten wurde die Relation der Cyclin D3/ Luciferase- bzw. der 1300-StAR/ Luciferase-Aktivität zur pRLTK/Luciferase-Aktivität bestimmt.

3.6 Hormonbestimmungen mittels Radioimmunoassay

Prinzip: Zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen (Aldosteron und Cortisol) im Zellkulturüberstand wurden die Radioimmunassaykits (RIA-Kits) verwendet. Die Cortisol- und Aldosteron-RIA's erlauben die *In vitro*-Bestimmung dieser Hormone im Zellkulturüberstand nach dem Prinzip der kompetitiven Substratbindungsanalyse. Dabei konkurrieren die unmarkierten, aus dem Zellkulturüberstand asservierten Hormone mit den Jod-125-markierten Hormonen um eine begrenzte Zahl der Antikörperbindungsstellen in einem antikörperbeschichteten Röhrchen.

Durchführung und Auswertung: Die Messung erfolgte nach Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit den ansteigenden Konzentrationen von ECCM (5 %, 10 %, 20 %) sowie ansteigenden Konzentrationen von Endothelin-1 (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M) mit und ohne Zugabe der Endothelin-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 bzw. BQ788 in einer Konzentration von 10^{-9} M. Danach wurden jeweils 20 ml des Zellkulturüberstandes mit 1ml Jod-125-markierten Cortisol bzw. Aldosteron für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die unmarkierten, nicht an die Antikörper gebundenen Hormone aus dem Röhrchen entfernt und die Radioaktivität der leeren Röhrchen in einem Gamma-Zählgerät gemessen.
Die Nachweisgrenzen der verschiedenen Radioimmunassays waren: 5,5 nmol/l für Cortisol und 16 pg/ml für Aldosteron. Die Kreuzreaktivitäten der RIAs gegenüber anderen Steroiden lagen nach Angaben der Herstellerfirmen unter 1 %.

3.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert von mindestens 4 Vierfachmessungen ± SEM (Standart Error of the Mean) ausgedrückt. Die statistische Analyse wurde nach Bestätigung einer Normalverteilung mit dem ungepaarten Student's t-Test durchgeführt, wobei Interventionen jeweils mit der Kontrolle verglichen wurden, z.B. Basal *vs*. Stimulation bzw. Stimulation *vs*. Stimulation und Signalweghemmung. Differenzen und Unterschiede in den Ergebnissen wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war.

Chemikalien

Substanz	Bezug
Xylol	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol in einer absteigenden Verdünnungsreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%)	Merck, Darmstadt, BRD
TritonX-100	Sigma, München, BRD
Proteinase K	Sigma, München, BRD
Wasserstoffperoxid	CSA, DAKO, Hamburg, BRD
Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	CSA, DAKO, Hamburg, BRD
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, BRD
Tris (hydroxymethyl)aminomethan	Serva, Heidelberg, BRD
Glyceringelatine	Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig, BRD
Paraffin	SÜSSE GMBH, BRD
Isopentan	Merck, Darmstadt, BRD
3%-Paraformaldehyd (pH 7,6)	Sigma, München, BRD

Rotihistol	Roth, Karlsruhe, BRD
Entellan	Merck, Darmstadt
Accumax	Sigma, München, BRD
Kollagenase	Sigma, München, BRD
Biotinyliertes Tyramid und Wasserstoffperoxid (Amplifikationsreagenz)	CSA-Kit, DAKO, Hamburg, BRD
Meerrettichperoxidase	CSA-Kit, DAKO, Hamburg, BRD
Tetrazoliumsalz WST-1	Roche Applied Science, Penzberg, BRD
Accutase	PAA Labor, Cölbe, BRD
Tritium-Thymidin	Amersham, Braunschweig, BRD
0,5M EDTA	Bio Labs, USA
Endothelin-1	Alexis Biochemicals, USA
Radioimmunassaykits (Coat-A-Count System)	DPC Biermann (Siemens), Bad Nauheim, BRD

Reportergen-Assays:

CyclinD3-Luciferase-Plasmid 1300-StAR-Luciferase-Plasmid	Promega, Mannheim, BRD
Renilla Luciferase Plasmid (pRLTK)	Peninsula co., Belmont, CA, USA
Fugene Roche	Mannheim, BRD
Dual-Luciferase® Reporter Assay (anwendungsfertige Reagenzien): „Passive Lysis Puffer“ „Luciferase Assay Reagent II“ (LARII) „Stop & Glo® Reagent“ (STG)	Promega Corporation, Madison, USA
Endothelin-1, Typ A- und B- Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788	Alexis Biochemicals, USA

Zellkulturmedien:

Endothelzellmedium	SupplementPack/ Endothelial Cell Growth Medium, Promo Cell® bioscience alive, USA
Endothelbasalmedium	PAA Labor, Cölbe, BRD
DMEM/F12-Zellkulturmedium	Gibco, Eggenstein, BRD

Mediumzusätze:

Endothelmediumzusatz	PAA Labor, Cölbe, BRD
Insulin	Gibco, Eggenstein, BRD
Hydrocortison	Gibco, Eggenstein, BRD
17β-Estradiol	Gibco, Eggenstein, BRD

Transferrin	Gibco, Eggenstein, BRD
Selenit	Gibco, Eggenstein, BRD
Penicillin G	Gibco, Eggenstein, BRD
Streptomycin	Gibco, Eggenstein, BRD
Ascorbinsäure	Gibco, Eggenstein, BRD
Foetales Kälberserum	Gibco, Eggenstein, BRD

Geräte:

Lichtmikroskop	Zeiss
Pipetten (verstellbar: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, BRD
Wasserbad	Medingen W6, BRD
Analysewaage	SCALTEC Heiligenstadt, BRD
Digitalwaage	SCALTEC Heiligenstadt, BRD
Brutschrank	HERAEUS, BRD
Sterile Werkbank	HERAEUS, BRD
PH-Meter	WTW, Weilheim, BRD
ELISA-Spektrophotometer	Tecan, BRD
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, BRD
Zellerntegerät	LKB, Freiburg, BRD
Mikroszintillationszähler	Canberra Packard, Dreiech, BRD
Falkon-Tubes	Applied Biosystems, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm²	Becton Dickenson, Heidelberg, BRD
Zellkulturplatten (6-, 24- und 96-Well-Platten)	Becton Dickenson, Heidelberg, BRD
Zentrifugenröhrchen (10 und 50 ml Spitzboden)	Greiner, BRD
Kodak DIN 200 Film	
Objektträger	Marienfeld, BRD
Deckglas	Engelbrecht, Edermünde, BRD
Glasfaserfilter 0,2 µm Porengröße	Sartorius, BRD
Luminometer Lumat 9507	Berthold Technologies, USA
Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

Die Färbung gegen PCNA- und MIB-1-Antigene zeigte, dass die Zellen der erwachsenen Nebennierenrinde immer noch eine hohe proliferative Aktivität besitzen (Abb. 4-5).

Es zeigte sich eine positive Färbung gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) in allen drei kortikalen Zonen (Tabelle 2). Der höchste Labeling Index wurde im Bereich der *Zona glomerulosa* mit 43% (SEM ± 4,7%) erreicht. Der Labeling index in der *Zona reticularis* betrug 42% (SEM ± 5,4%) und in der *Zona fasciculata* 41% (SEM ± 5,1%).

Die Färbung gegen das MIB-1-Antigen führte auch zu einem positiven Nachweis der proliferierenden Zellen in allen drei Zonen der Nebennierenrinde (Abb. 5). Der höchste Labeling index zeigte sich im Bereich der *Zona glomerulosa* mit 29% (SEM ± 5,0%). In der *Zona reticularis* betrug der *Labeling index* 26% (SEM ± 7,4%) und in der *Zona fasciculata* 20% (SEM ± 2,1%) (Tabelle 2).

Tabelle 2
Immunhistochemische Färbung zur Ermittlung der Proliferation in der normalen humanen Nebennierenrinde

	Zona glomerulosa				***Zona fasciculata***				***Zona reticularis***			
PCNA	36	42	45	47	37	48	39	38	46	42	34	45
MW ± δ	43 ± 4,7 %				41 ± 5,1 %				42 ± 5,4 %			
MIB-1	31	29	22	34	23	22	18	19	17	23	35	27
MW ± δ	29 ± 5,0 %				20 ± 2,1 %				26 ± 7,4 %			

Ergebnisse, ausgedrückt als der prozentuale Anteil der spezifisch markierten Zellen durch die Immunhistochemische Färbung gegen PCNA und MIB-1 in der normalen humanen Nebennierenrinde (N=4. δ: Standardabweichung)

Durch den Einsatz eines monoklonalen anti-CD31 Antikörpers konnten Endothelzellen in allen drei Zonen der Nebennierenrinde nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen in der Nebennierenrinde radiär verlaufen und unmittelbare Kontakte zu Nebennierenrindenzellen unterhalten (Abb. 6).

4.2 In vitro Studien (Zellproliferations- und viabilitätstests, Luciferase-Assay, Hormonbestimmungen)

4.2.1 WST-1-Test

Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM führte zeit- und konzentrationsabhängig zu einem Anstieg des WST-1-Tetrazoliumsalz-Umsatzes (Abb. 7A). Bereits eine 5%-ige ECCM-Konzentration ergab eine Zunahme des WST-1-Umsatzes auf 121,0%, SEM ± 23,0%, verglichen zu den Basalwerten. Der stärkste WST-1-Umsatz in Höhe von 148,1%, SEM ± 12,3% wurde bei einer 20%-igen ECCM-Konzentration erreicht.

Die Zugabe von Endothelin-1-Rezeptor-Antagonisten BQ123 und BQ788 in einer Konzentration von 10^{-9} M konnte die Zunahme des WST-1-Metabolismus nicht umkehren. Dabei wurden die Werte von, 117,0%, SEM ± 6,8% bei einem 20%-igen ECCM mit gleichzeitiger BQ123-Zugabe und 124,8%, SEM ± 11,3% bei 20%-igem ECCM mit BQ788 erreicht.

4.2.2 Tritium-Thymidin-Inkorporationsassay

Im Tritium-Thymidin-Inkorporationsassay führte die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM zu einer signifikanten Zunahme des Einbaus von Tritium-Thymidin in die Zellen (Abb. 7B). Bereits unter einer 5%-igen ECCM-Konzentration stieg der Tritium-Thymidin-Einbau auf 135,3%, SEM ± 0,4% an. Bei einer 20%-igen ECCM-Konzentration wurden die Werte von 226,4%, SEM ± 0,7% im Vergleich zu basal erreicht.

4.2.3 Luciferase-Assays, STAR -Promoter- und Cyclin D3-Promoter-Aktivitätsmessung

Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber ansteigenden Konzentrationen von ECCM führte zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der 1300-StAR-Promoter-Aktivität. Die 1300-StAR-Promoter-Aktivität ist auf 369,8**%**, SEM ± 5,9% im Vergleich zu basal unter dem Einfluss einer 30%-igen ECCM-Konzentration angestiegen (Abb. 8A). Die gleichzeitige Zugabe der ET1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, bei einer Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem 30%-igen ECCM konnte den stimulierenden ECCM-Effekt nicht signifikant hemmen und führte zu einem Wert von 425,3**%** (SEM ± 10,3%) für BQ788 und 309,6**%**, (SEM ± 8,2%) für BQ123 (Abb. 8A).

Die alleinige Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit den Endothelin-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, konnte die StAR-Promoter-Aktivität mit Ergebnissen von 98,6% (SEM ± 10,1%) für BQ123 bzw. 87,7% (SEM ± 11,5%) für BQ788 im Vergleich zu basal nicht steigern (Abb. 8A). Ebenfalls konnte die 1300-StAR-Promoter-Aktivität durch die alleinige Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem Endothelin-1 in ansteigenden Konzentrationen nicht gesteigert werden (Abb. 8B). Somit konnte kein regulatorischer Einfluß des Endothelin-1 auf die 1300-StAR-Promoter-Aktivität gezeigt werden. Auch die gleichzeitige

Anwendung von Endothelin-1 mit seinen Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, konnte die 1300-StAR-Promoter-Aktivität nicht beeinflussen (Abb. 8B).

Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM über 24 Stunden führte zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Cyclin D3-Promoter-Aktivität (Abb. 9). Bereits unter dem Einfluss von 1%-igem ECCM stieg die Cyclin D3-Promoter-Aktivität auf 109,1%, SEM ± 21,7% an. Ein weiterer Anstieg auf die Werte von 183,5%, SEM ± 0,5% wurde unter einer 30%-igen ECCM-Konzentration erreicht. Die Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit 30%-igem ECCM und der gleichzeitigen Zugabe von BQ123 konnte den stimulierenden ECCM-Effekt nicht reversibel machen und führte zu einem weiteren Anstieg der Cyclin D3-Promoter-Aktivität auf die Werte von 194%, SEM ± 21,3% im Vergleich zu basal. Die alleinige Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem BQ123 (10^{-9}M) führte auch zu einer Erhöhung der Cyclin D3-Promoter-Aktivität auf die Werte von 151,3%, SEM ± 36,5%.

4.2.4 Hormonmessungen

Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber ECCM über 24 Stunden führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Cortisol- und Aldosteronsynthese im Zellkulturüberstand. Die Cortisolsynthese stieg bei einer ECCM-Konzentration von unter 10% nicht an, zeigte jedoch bereits beii einem 10%-igen ECCM eine Erhöhung auf 113,8% (SEM ± 39,9%) und bei einer 20%-igen ECCM-Konzentration die Werte von 192,7% (SEM ± 62,8%) über dem Basalwert (Abb. 10A).

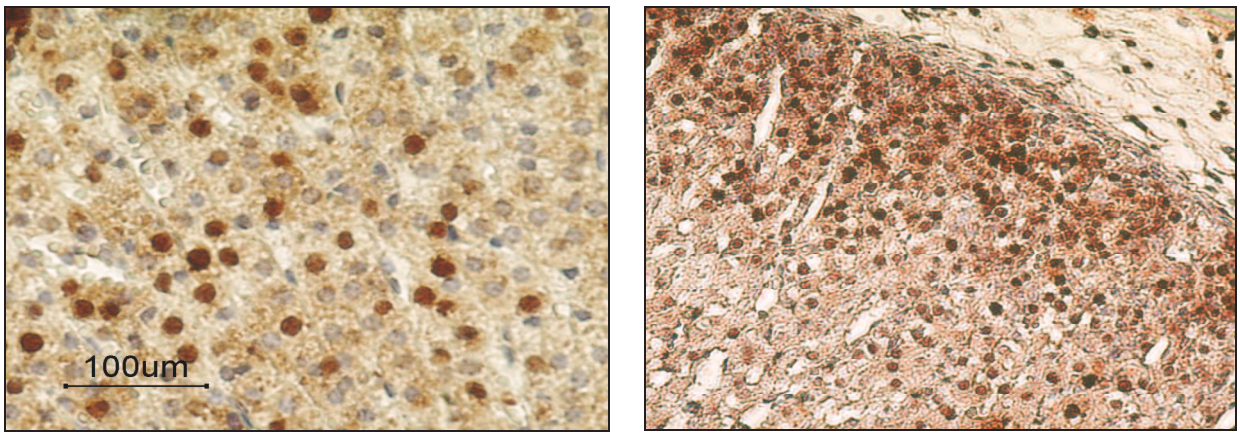
Die Cortisolsynthese stieg unter einer ECCM-Konzentration von 20% und einer gleichzeitigen BQ123-Zugabe auf 175,6% (SEM ± 93,7%) an und die gleichzeitige BQ788-Zugabe führte zu dem Wert von 184,6% (SEM ± 105,1%). Die alleinige Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem Endothelin-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 ergab einen Anstieg der Cortisolsynthese auf 115,7%, SEM ± 74,1% (Abb. 10A). Die Inkubation der NCI-H295R-Zellen nur mit dem Endothelin-1 in ansteigenden Konzentrationen ergab keinen Anstieg von Cortisolsynthese (Abb. 10B). Auch durch einen gleichzeitgen Einsatz von Endothelin-1 mit seinen Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, konnte die basale Cortisolsynthese nicht gesteigert werden (Abb. 10B).

Für Aldosteron wurden nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber 10%-igem ECCM die Werte von 110,2% (SEM ±19,6%) und 20%-igem ECCM von 188,2% (SEM ± 52,3%) über basal erreicht (Abb. 11A). Eine ECCM-Konzentration unter 10% führte zu keinem Anstieg der Aldosteronsynthese. Der aktivierende Effekt von 20%-igem ECCM auf die Aldosteronsynthese konnte durch die gleichzeitige Zugabe von BQ123 und BQ788 in einer Konzentration von 10^{-9} M nicht gehemmt werden. Dabei ist die Aldosteronsynthese unter einer ECCM-Konzentration von 20% und einer gleichzeitigen BQ123-Zugabe auf die Werte von 166,5% (SEM ± 71,2%) angestiegen und bei einer gleichzeitigen BQ788-Zugabe wurden die Werte von 159,2% (SEM ± 92,4%) erreicht (Abb. 11A). Die alleinige Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem

Endothelin-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 ergab einen Anstieg der Aldosteronsynthese auf 126,6% (SEM ± 56,6%). Die alleinige Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem Endothelin-1 in ansteigenden Konzentrationen ergab keinen Anstieg von Aldosteronsynthese (Abb. 11B). Dabei wurden die Werte unterhalb der Basalrate gemessen. Auch ein gleichzeitger Einsatz von Endothelin-1 mit seinen Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, übte keinen Einfluss auf die basale Cortisol- und Aldosteronsynthese aus (Abb. 11B).

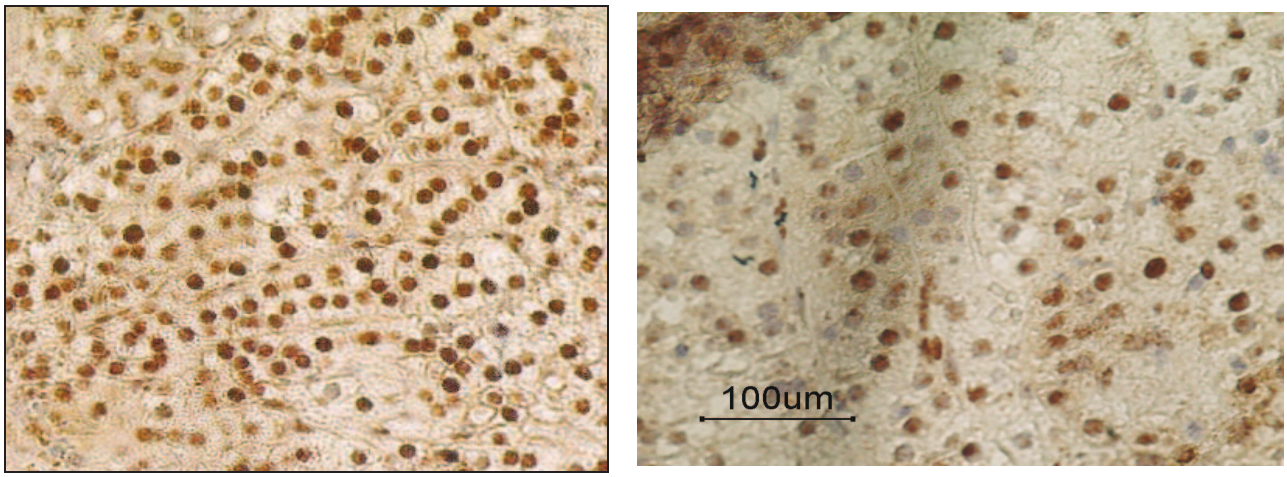
4.3 Abbildungen

Abb. 4
Immunhistochemische Färbung von Nebenniere normaler Erwachsener



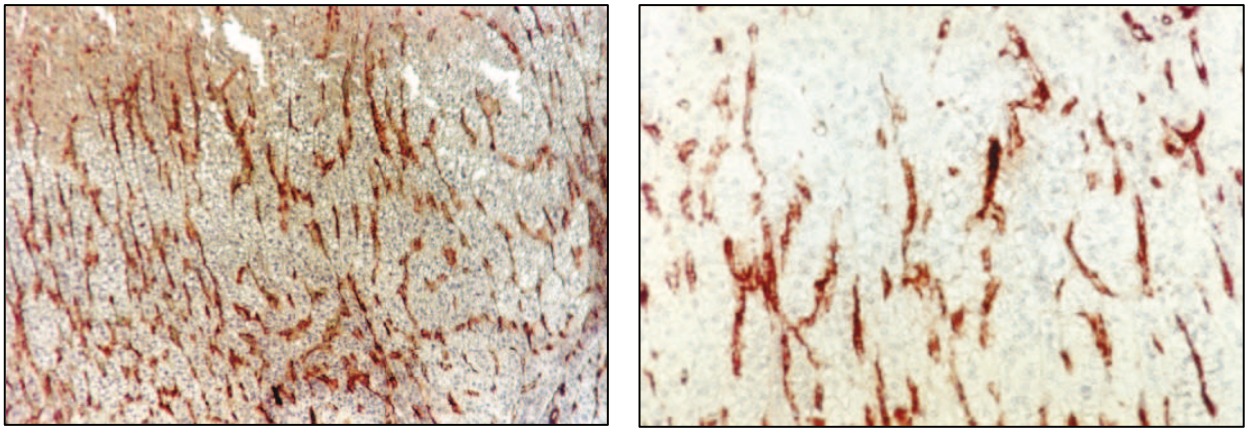
Immunhistochemische Färbung gegen das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). Die PCNA-positiven Zellkerne sind braun gefärbt, die PCNA-negativen Zellkerne sind mit Hämatoxylin blau gefärbt (Vergrößerung ×40, links; ×20, rechts).

Abb. 5
Immunhistochemische Färbung von normalen erwachsenen Nebennieren



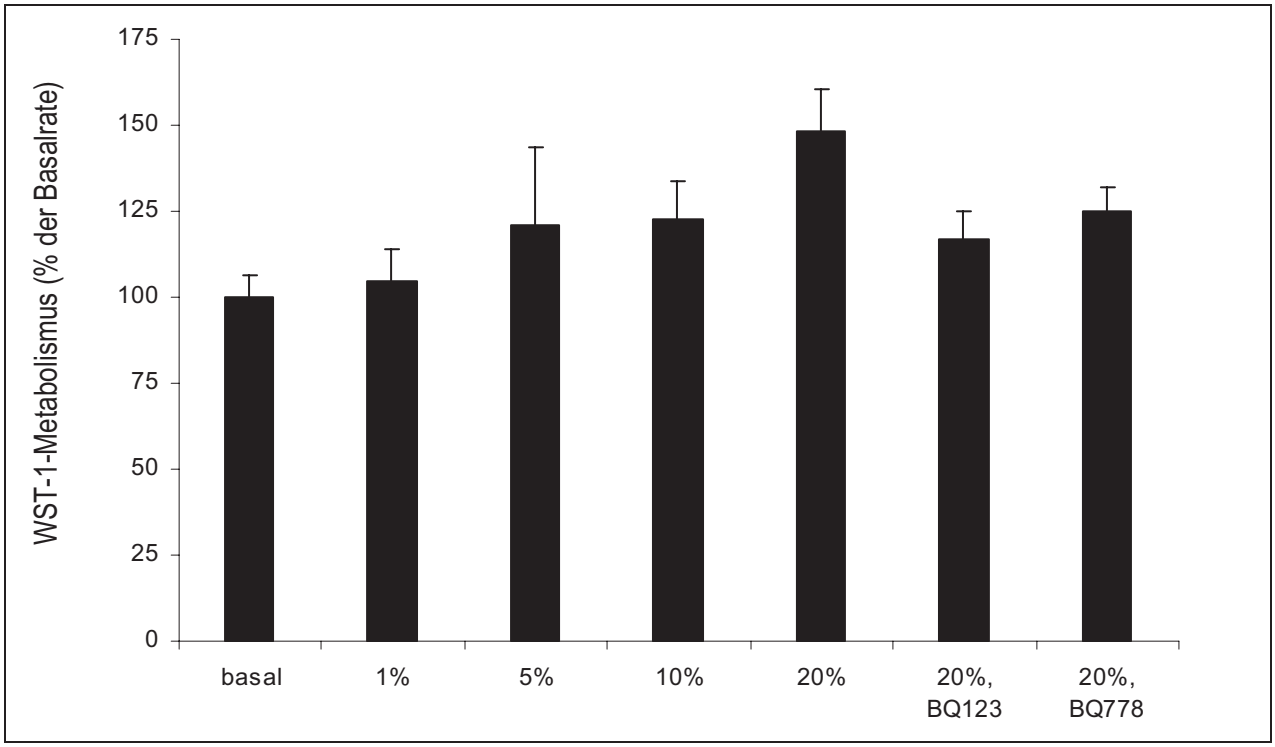
Immunhistochemische Färbung gegen das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, links) bzw. mit einem polyklonalen Anti-Ki-67-Antikörper (rechts). Die positiv gefärbten Zellkerne sind braun, die negativen Zellkerne sind mit Hämatoxylin blau gefärbt (×40).

Abb. 6
Immunhistochemische Färbung von normalen erwachsenen Nebennieren

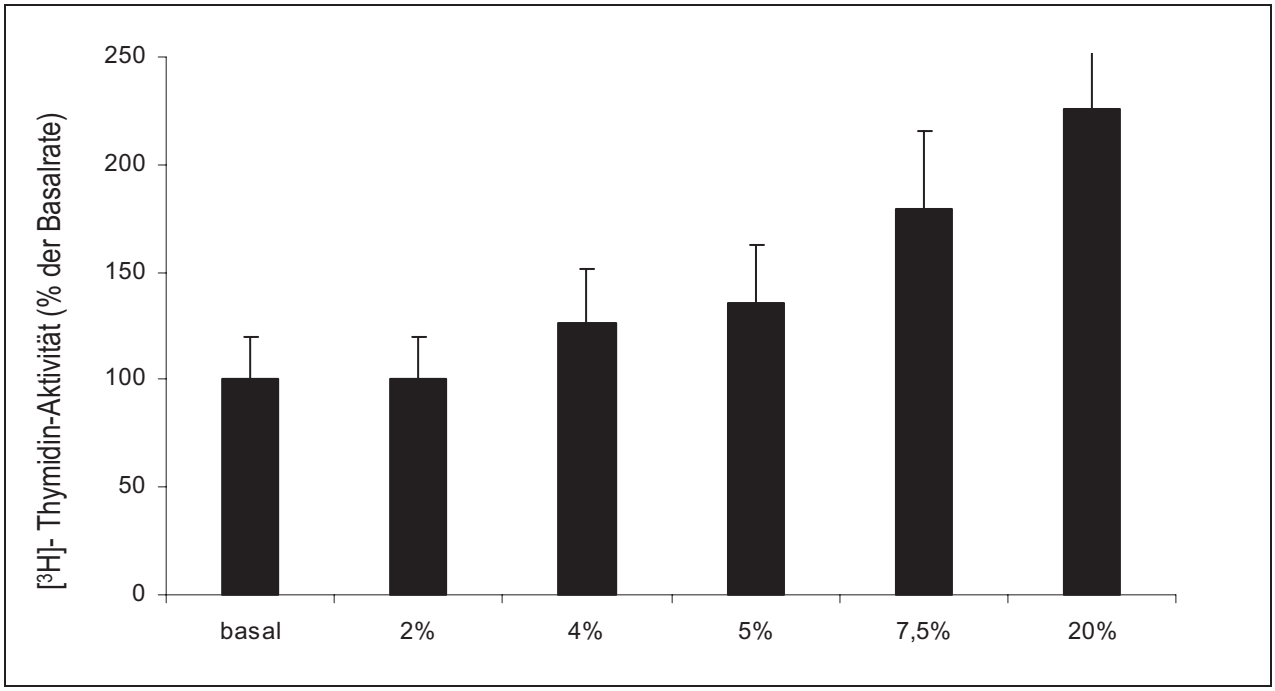


Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen CD31-Antigen (×10, links; ×40, rechts). Die CD31-Antigen-positiven Endothelzellen (rot gefärbt) verlaufen in der Nebennierenrinde radiär und sind in allen drei Zonen nachweisbar.

Abb. 7
WST-1- und [^{3}H]-Thymidin-Test (Zellroliferations- und viablitättests).

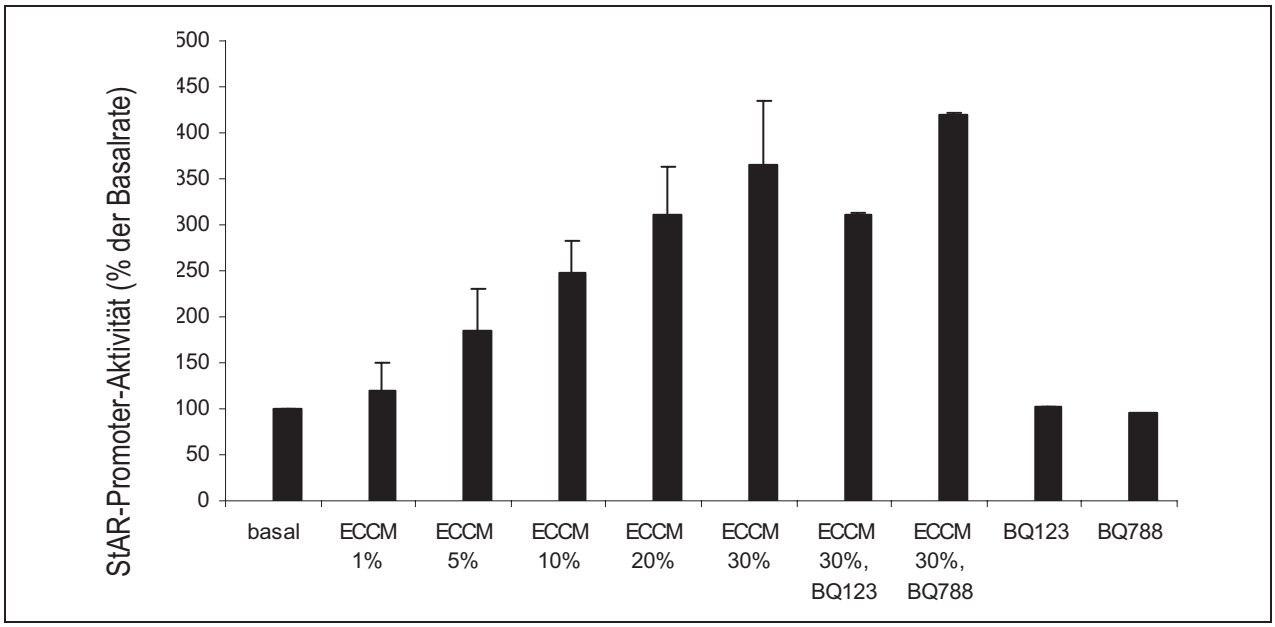


A. Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM führte zu einer Erhöhung des Umsatzes von Tetrazoliumsalz WST-1. Die Zugabe der ET-1-Rezeptor-Antagonisten, BQ123 bzw. BQ788, konnte den ECCM-Effekt nicht verhindern.

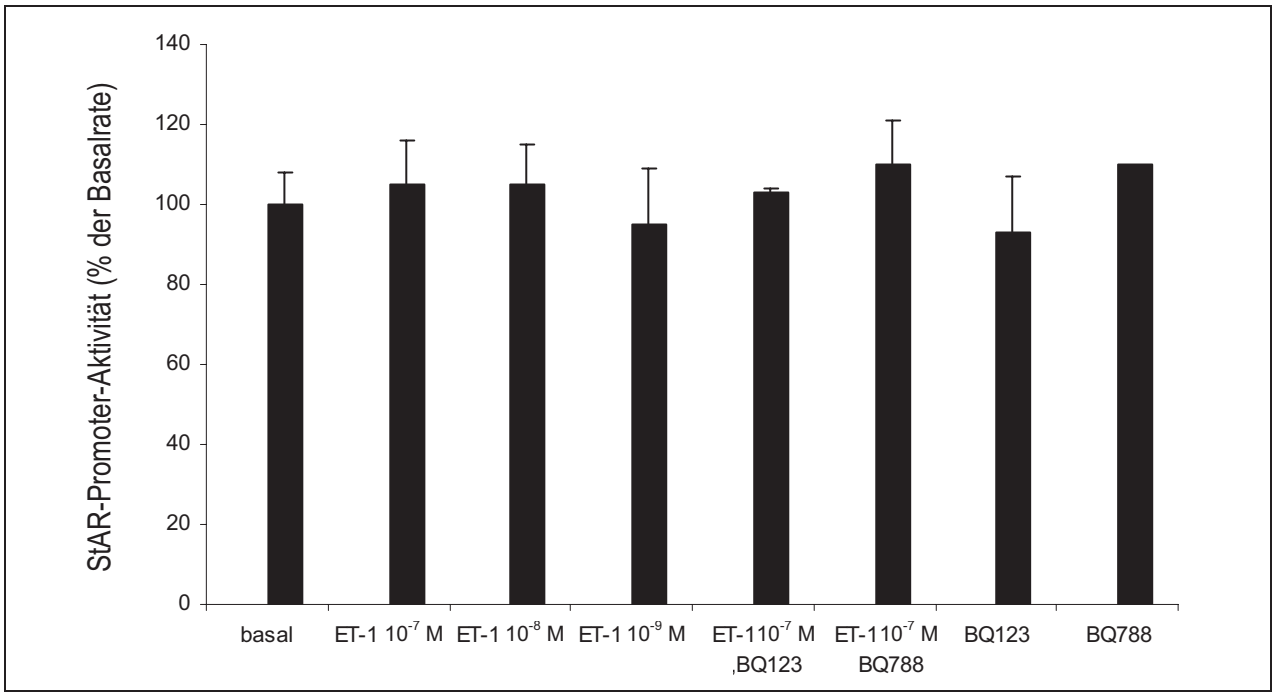


B. Dosisabhängige Zunahme des Einbaus von [^{3}H]-Thymidin in die NCI-H295R-Zellen, nachdem sie den ansteigenden ECCM-Konzentrtionen ausgesetzt waren.

Abb. 8
Luciferase-Assay. StAR-Promoter-Aktivität

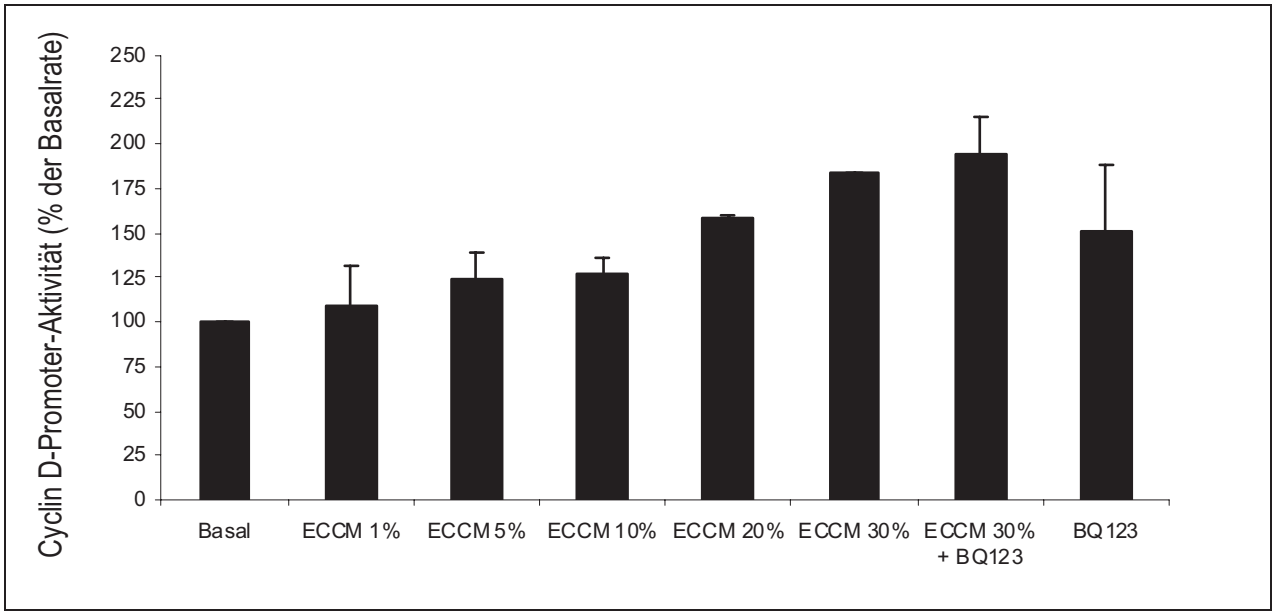


A. Dosisabhängiger Anstieg der StAR-Promoter-Aktivität nach Exposition der transfizierten NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM. Die Zugabe der ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, konnte diese stimulierende Wirkung von ECCM nicht hemmen. Alleinige Inkubation mit BQ123 und BQ788 ergab keinen Einfluss auf die StAR-Promoter-Aktivität.



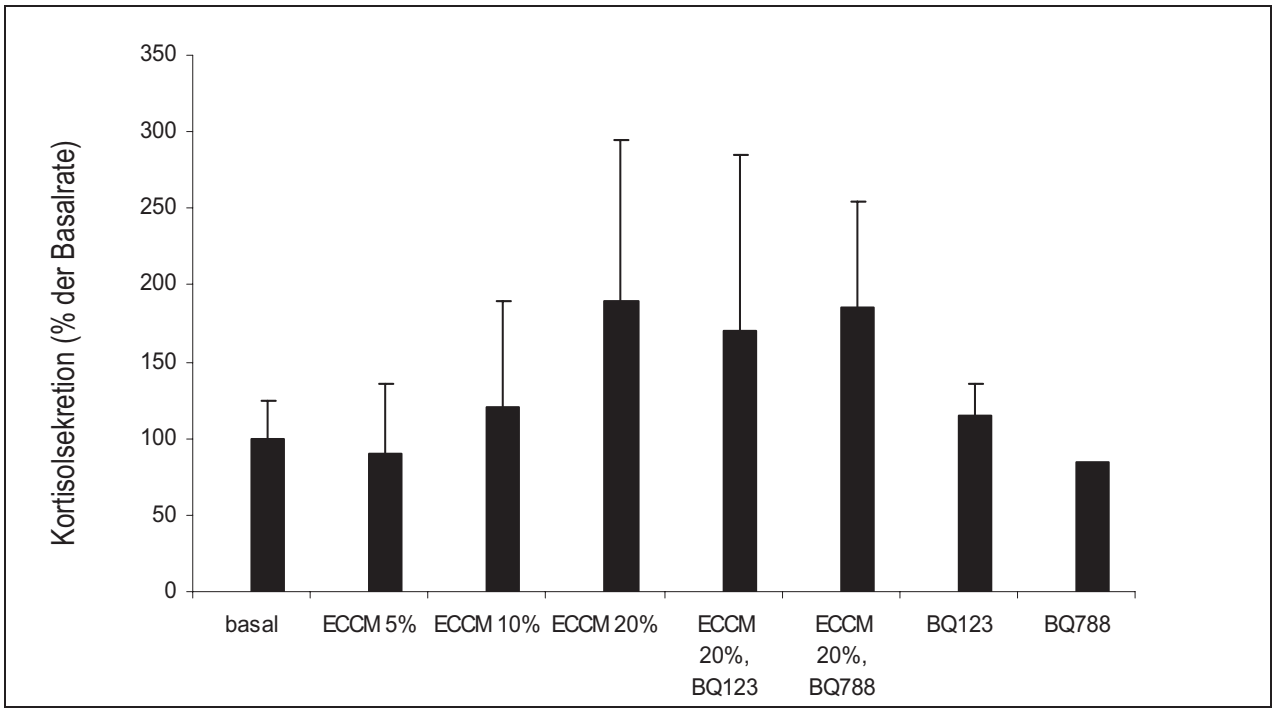
B. Die Exposition der transfizierten NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ET-1 führte zu keinem Anstieg der StAR-Promoter-Aktivität. Die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, ergab keine Änderung der Ergebnisse.

Abb. 9
Luciferase-Assay. CyclinD-Promoter-Aktivität

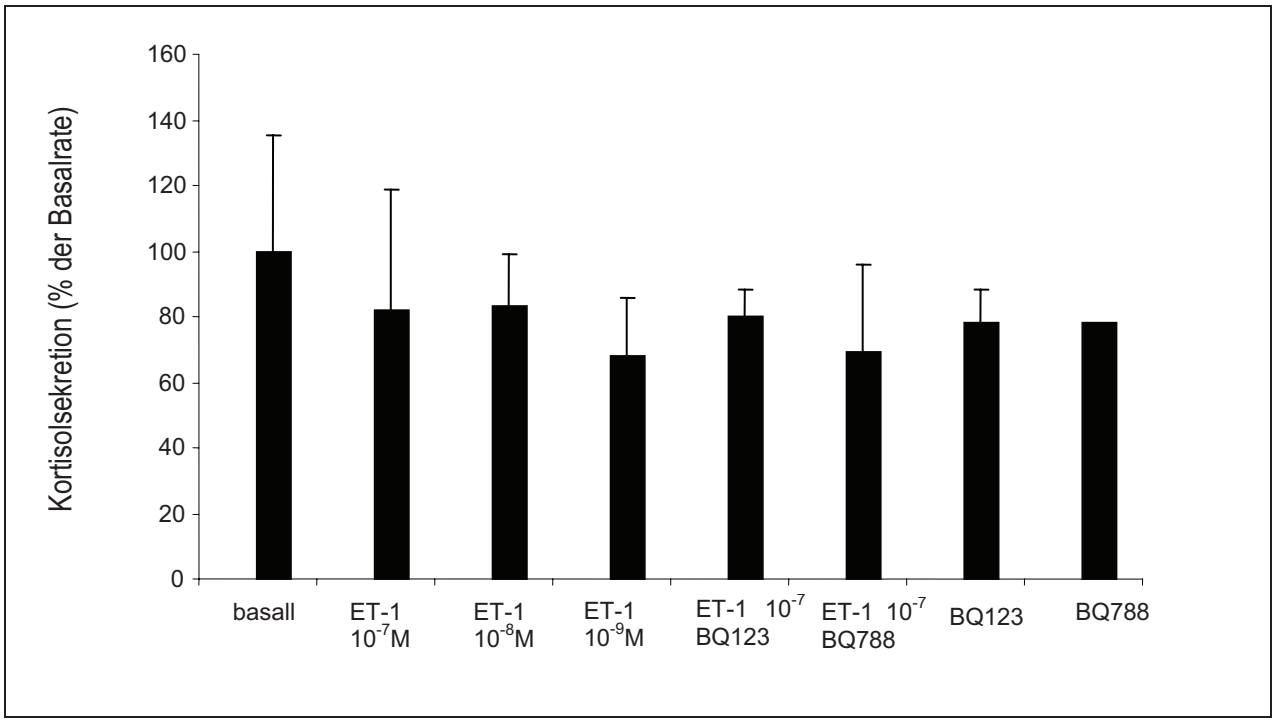


Dosisabhängiger Anstieg der CyclinD-Promoter-Aktivität nach der Exposition der transfizierten NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM. Die Zugabe des ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123, konnte die stimulierende Wirkung von ECCM nicht verhindern. Alleinige Inkubation mit BQ123 ergab keinen hemmenden Einfluss auf die CyclinD-Promoter -Aktivität.

Abb. 10
Kortisolsekretion

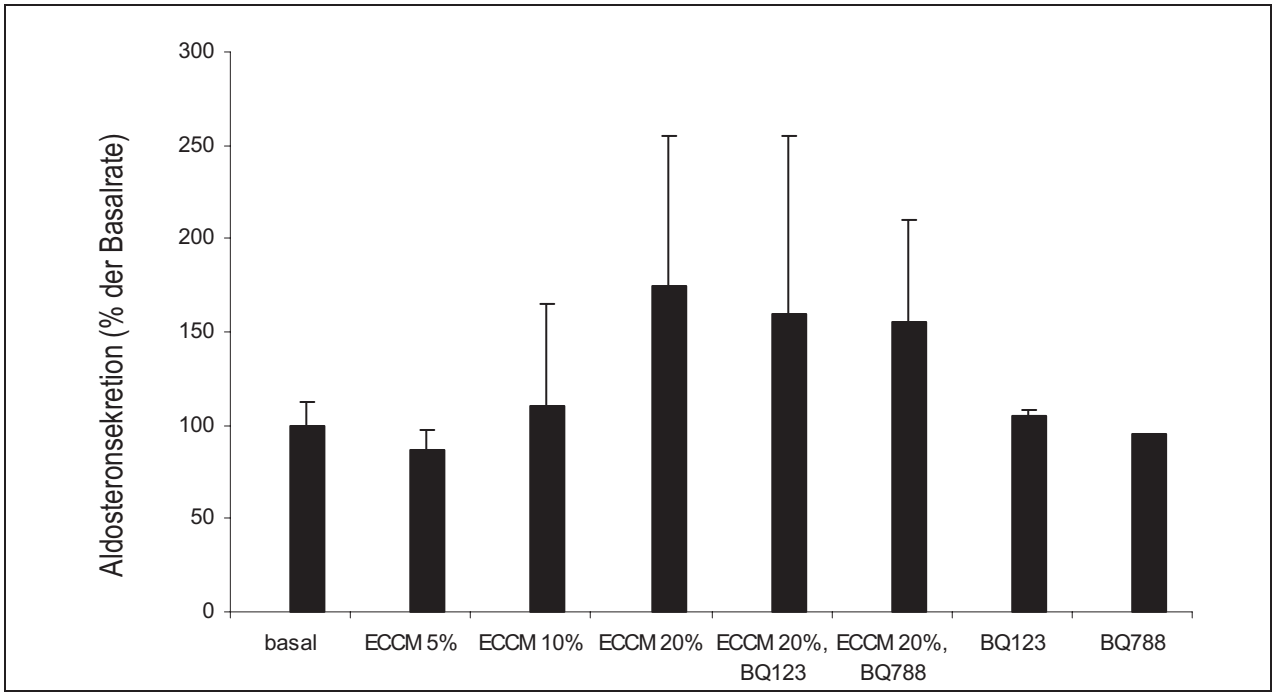


A. Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der Kortisolsekretion. Keine Hemmung der ECCM-Wirkung durch die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788 in einer Konzentration von 10^{-9} M.

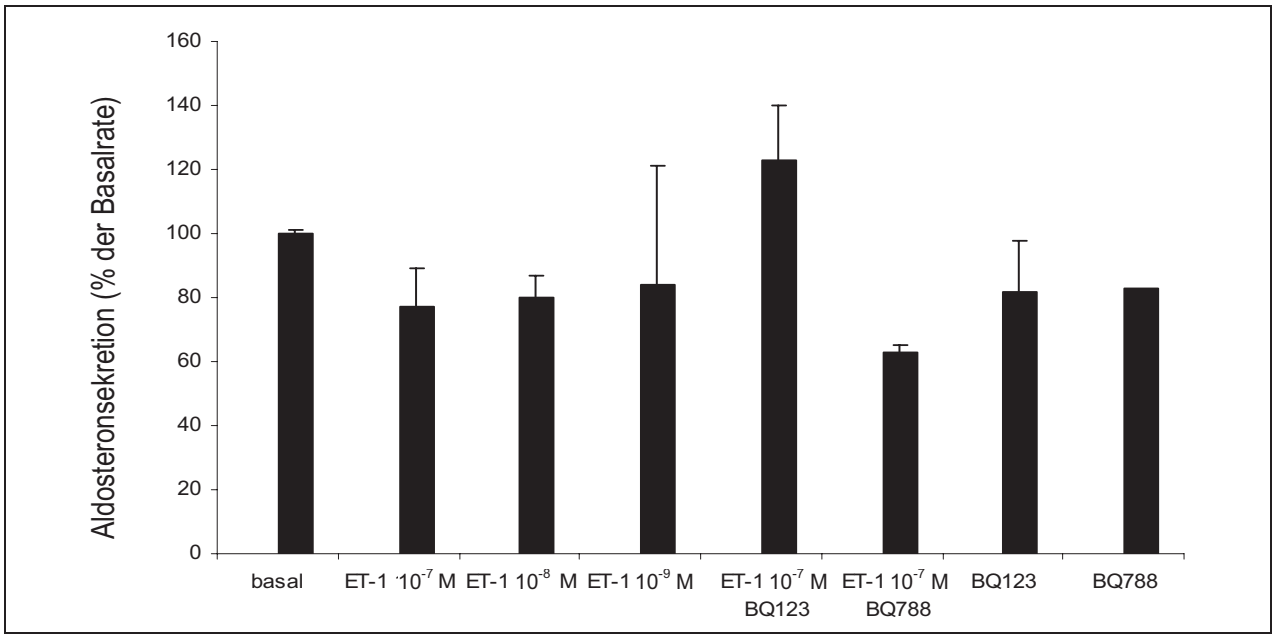


B. Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ET-1 führt zu keinem Anstieg der Kortisolsekretion. Die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, ergab keinen stimulierenden Einfluss auf die Kortisolsekretion.

Abb. 11
Aldosteronsekretion



A. Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ECCM führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Aldosteronsekretion.
Keine Hemmung der ECCM-Wirkung durch die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, in einer Konzentration von 10^{-9} M.



B. Die Exposition der NCI-H295R-Zellen gegenüber den ansteigenden Konzentrationen von ET-1 führt zu keinem Anstieg der Aldosteronsekretion. Die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten, BQ123 und BQ788, ergab keine Änderung der Ergebnisse.

5. Diskussion

Die Nebenniere wird stark durchblutet und von einer großen Anzahl von Kapillaren durchlaufen (Vinson et al. 1985). Unsere immunhistochemischen Untersuchungen mit einem monoklonalen CD31-Antikörper und der CSA-Methode bestätigen, dass die Endothelzellen in der Nebennierenrinde radiär angeordnet sind und alle drei Zonen durchlaufen. Die hier beobachteten zahlreichen Zellkontakte zwischen den steroidogenen Zellen und dem Gefäßendothel unterstützen die Ergebnisse anderer Studien. So wurde eine enge anatomische Assoziation zwischen diesen beiden Zellgruppen von Vinson et al. 1985, Dobbie et al. 1991, Bassett und West, 1997, Thomas et al. 2003 ebenfalls beschrieben.
Bei einer großen Kontaktfläche zwischen den Nebennierenrinden- und Gefäßendothelzellen werden neben der Bereitstellung von Nebennierenhormonen für den systemischen Blutkreislauf, auch parakrine Wirkungen von Nebennierenrindenhormonen auf Endothelzellen und Endothelzellfaktoren auf Nebennierenrindenzellen angenommen (Willenberg et al. 2008). Es wurde bereits gezeigt, dass die Stoffwechselprodukte der Endothelzellen die Steroidbiosynthese (Vinson et al. 1985, Thomas et al. 2003, Dobbie et al. 1991, Bassett et al. 1997) sowie die Proliferation von adrenokortikalen Zellen (Nussdorfer et al. 1997 und 1998, Mazzocchi et al. 1997) beeinflussen können, hauptsächlich vermittelt durch ET-1, (Nussdorfer et al. 1997, Mazzocchi et al. 1997, Hinson et al. 1991, Rossi et al. 2000).

In dieser Arbeit studierten wir nun den Nettoeffekt des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Steroidbiosynthese sowie auf die Proliferation von NCI-H295R-Zellen. Hierbei konnten wir zeigen, dass Endothelzellprodukte sowohl die Aldosteron-, als auch die Cortisolproduktion steigern. Das bestätigt unsere eigenen Ergebnisse und passt zu den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Vinson et al. 1985, Hinson et al. 1991 und 1998, Rosolowsky et al. 1994 und 1999, Rossi et al. 1997, 2000 und 2002, Mazocchi et al. 1997, Nussdorfer et al. 1997, Ansurudeen et al. 2006, Ansurudeen et al. 2007 und 2009).
Der gleichzeitige Einsatz von ET-1-Rezeptorantagonisten konnte jedoch den stimulierenden Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Aldosteron- und Cortisolsynthese nicht hemmen. Auch die Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit ET-1 in ansteigenden Konzentrationen resultierte nicht im Anstieg der Aldosteron- oder Cortisolkonzentrationen im Zellkulturüberstand. Das war ein unerwartetes Ergebnis. Denn im Gegensatz zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Hinson et al. 1991, Nussdorfer et al. 1997, Chii-Whei et al. 2004) weisen unsere Ergebnisse somit auf eine ET-1-unabhängige Wirkung des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Steroidbiosynthese hin (Paramonova et al. 2010). Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit Nebennierenrindenzellen anderer Tierspezies, wie z.B. Ratten- oder Rindernebennieren sowie mit reinen *Zona glomerulosa*-Zellen erfolgten. Außerdem bestanden Unterschiede in der Gewinnung und Herkunft des Endothelzell-konditionierten Mediums und Endothelin-1, die in unseren eigenen und

Experimenten anderer Arbeitsgruppen angewandt wurden. Weiterhin entstammen die NCI-H295R-Zellen dem Nebennierenrindenkarzinom einer Patientin (Gazdar et al. 1990). Sie verfügen zwar über die Haupteigenschaften der adrenokortikalen Zellen, zeigen jedoch eine gemischte Steroidbiosynthese und haben eine stärkere mitotische Aktivität im Vergleich zu den in Primärkultur aufbereiteten Nebennierenrindenzellen normaler Erwachsener. Darüber hinaus untersuchten wir den ET-1-Nettoeffekt durch Inkubation der NCI-H295R-Zellen nur mit ET-1. Im Gegensatz dazu erfolgten die Experimente der Arbeitsgruppe Chii-Whei et al. 2004 zur ET-1-Wirkung auf die Aldosteronsynthese in Anwesenheit des fetalen Kälberserums und zeigten eine sekretionssteigernde Wirkung des ET-1. Es könnte zum einen auf die Existenz eines Serumfaktors hinweisen, der die ET-1-Wirkung vermitteln oder potenziieren, oder zum anderen alleine die Aldosteronsekretion beeinflussen könnte.

Des weiteren wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass die Koinkubation der NCI-H295R-Zellen mit dem Endothelzell-konditionierten Medium zu einer konzentrationsabhängigen Hochregulation der StAR-Gentranskription führt und, dass die Endothelzellprodukte somit einen spezifischen Einfluss auf die Steroidbiosynthese ausüben. Diese Daten konnten die Ergebnisse anderer Studien (Ansurudeen et al. 2006, Ansurudeen et al. 2007) bestätigen und zeigen, dass die ECCM-vermittelte Stimulation der Steroidbiosynthese unter Beteiligung der klassischen Steroidogenese-regulierenden Proteine erfolgt. Durch eine Blockierung der Endothelin-1-Wirkung mittels seiner Rezeptorantagonisten BQ123 und BQ788 konnte die Zunahme der StAR-Promoter-Aktivität nicht verhindert werden. Auch eine alleinige Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit ET-1 ergab keinen signifikanten Anstieg der StAR-Promoter-Aktivität. Diese Daten zeigen einen ET-1-unabhängigen stimulierenden Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde.
Die klinischen Studien an gesunden Probanden, die nach einer ET-1-Gabe keinen Anstieg von Cortisol oder Aldosteron im Serum (Vierhapper et al. 1995) und auch keine Korrelation zwischen ET-1-Konzentration und Aldosteronsekretion im Nebennierenvenenblut bei Patienten mit primärem Aldosteronismus zeigten (Morello et al. 2009), unterstützen unsere *in vitro*-Ergebnisse zur ET-1-unabhängigen Wirkung des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Steroidbiosynthese.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der WST-1- und Tritium-markierten-Thymidin-Tests erstmals ein direkter stimulierender Einfluss des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Proliferation und Zellviabilität der NCI-H295R-Zellen gezeigt werden. Die Koinkubation mit den ET-1-Rezeptorantagonisten BQ123 und BQ788 konnte den stimulierenden Einfluss des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Proliferationsaktivität der NCI-H295R-Zellen nicht hemmen. Wiederum können wir damit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen über eine direkte aktivierende Wirkung des ET-1 auf die Proliferation der Nebennierenrindenzellen nicht bestätigen (Hinson et al. 1991, Nussdorfer et al. 1997, Mazzocchi et al.

1997, Rossi et al. 2000). Vor allem wurde die Vermittlung dieser proliferationsstimulierenden ET-1-Wirkung seinen Typ A-Rezeptoren zugeschriebenen (Mazzocchi et al. 1997). Der Unterschied unserer Ergebnisse zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen könnte möglicherweise wie bei den Studien zur Hormonsynthese dadurch erklärt werden, dass die Nebennierenrindenzellen verschiedener Tierspezies untersucht wurden. Außerdem könnten sich die Kulturbedingungen sowie Gewinnung und Herkunft von Endothelzell-konditioniertem Medium und Endothelin-1 unterscheiden.
Die Untersuchung des Einflusses von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Cyclin D-Promoteraktivität in den transfizierten NCI-H295R-Zellen zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg. Hier ist von einer Cyclin D-Beteiligung an der Regulation der Zellproliferation in der Nebennierenrinde durch das Endothelzell-konditionierte Medium auszugehen. Auch hier konnte die Zugabe der Endothelin-1-Rezeptorantagonisten BQ123 und BQ788 keine hemmende Wirkung auf die Cyclin D-Promoter-Hochregulation ausüben.

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte durch den Einsatz der monoklonalen MIB-1(Ki-67) und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) - Antikörper gezeigt werden, dass auch in erwachsenen Nebennieren eine Zellproliferation weiterhin stattfindet. Der stärkste Proliferationsgrad konnte im Bereich der *Zona glomerulosa* nachgewiesen werden. Diese Daten ähneln denen aus anderen Untersuchungen zur Proliferation in den humanen erwachsenen Nebennierenrindenzellen (Sarría et al. 1995, Sasano et al. 1995, Wolkersdörfer et al. 1996, Willenberg et al. 1998), unterscheiden sich jedoch in der Lokalisation des höchsten Proliferationsgrades. Die immunhistochemischen Untersuchungen mit Einsatz der MIB-1(Ki-67)-Antikörper von Sasano et al. 1995 zeigten die höchste Proliferationsaktivität der Nebennierenrindenzellen im Bereich der mittleren *Zona fasciculata*. Die Untersuchungen von Wolkersdörfer, Ehrhart-Bornstein et al. 1996 und Wolkersdörfer, Marx et al. 1996 mit Einsatz der PCNA-Antikörper zeigten jedoch die höchste Proliferationsrate der adrenokortikalen Zellen im Bereich der inneren *Zona reticularis*. Die Untersuchungen der humanen Nebennierenrinde von Suizidopfern ergaben die höchste Proliferationsaktivität der Nebennierenrindenzellen im Bereich der inneren und mittleren Zonen (Willenberg et al. 1998). Somit bestätigen unsere Ergebnisse eine relevante Proliferation in der adulten humanen Nebennierenrinde. Unterschiede zwischen den einzelnen Studien und meiner Arbeit können an der dualen Regulation der Proliferation durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse oder/und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System liegen. So ist denkbar, dass eine unterschiedliche Ernährung vorlag, vor allem was Natrium- und Kaliumkonsum anbelangt, sowie unterschiedliche Lebensgewohnheiten mit unterschiedlichem Ausmaß an körperlicher Aktivität bzw. biologischem Streß. Retrospektiv ist dies leider nicht mehr zu klären.

Ähnliche Ergebnisse über den stimulierenden Einfluss der Gefäßendothelzellen auf die Nebennierenrindenzellen liefern Tierexperimente (Miller et al. 1989, Morishita et al. 1989, Hinson et al. 1991, Rosolowsky und Campbell 1994 und 1999). Die Studien über die Wirkung der Endothelzellen auf die Steroidbiosynthese durch die adrenokortikalen Zellen bei Rindern zeigten eine direkte stimulierende Wirkung der Endothelzellen auf die Aldosteronsekretion und somit auf die Funktion der Nebennierenrindenzellen der *Zona glomerulosa*. Dieser Effekt konnte auch erreicht werden, wenn die *Zona glomerulosa*-Zellen mit Endothelzell-konditioniertem Medium aus adrenalen Kapillarendothelzellen der Rinder inkubiert wurden (Rosolowsky und Campbell 1994, Rosolowsky et al. 1999). Bei den Nagetieren konnte ebenfalls eine erhöhte Serum-Aldosteronkonzentration unter dem Einfluss des Endothelzell-konditionierten Mediums gemessen werden (Miller et al. 1989).
Die Annahme, dass die Wirkung von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Funktion der Nebennierenrinde durch ET-1 vermittelt wird, bestand auch in den Tierexperimenten (Morishita et al. 1989, Hinson et al. 1991., Belloni et al. 1997, Mazzocchi et al. 1997). Später kamen jedoch Hinweise dafür, dass die Wirkung von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Funktion der Nebennierenrinde durch einen anderen Faktor als ET-1 vermittelt wird (Rosolowsky et al. 1999).

Die hier beschriebenen Ergebnisse der Zellkultur-Untersuchungen deuten ebenfalls auf Existenz eines anderen Nebennierendenzellen-stimulierenden Faktors des Endothelzell-konditioniertem Mediums (ECCM) als ET-1 hin. Sie könnten sich jedoch von *in vivo* Ergebnissen unterscheiden. Die Experimente mit Hitzedeaktivierung sowie Anwendung von Pronase mit kompletter Deaktivierung der ECCM-Wirkung auf die Nebennierenrindenzellen ergaben jedoch starke Hinweise dafür, dass es sich um ein Protein handelt (Ansurudeen et al. 2006, Willenberg et al. 2008). Hier haben wir mit den NCI-H295R-Zellen aus einem humanen Nebennierenrindenkarzinom gearbeitet. Sodass unsere Ergebnisse sich möglicherweise von Ergebnissen anderer Studien unterscheiden, die mit reinen *Zona glomerulosa*-Zellen der Rinder (Rosolowsky et al. 1994) oder der Ratten (Hinson et al. 1991, Mazocchi et al. 1997) erfolgten. Außerdem beziehen sich unsere Ergebnisse auf adultes Nebennierenrindensystem. Es ist möglich, dass der Einfluss der Endothelzellfaktoren auf fetale Nebennierenrinde durchaus anders sein kann als adult.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die Steroidbiosynthese, als auch die Proliferationsaktivität der Nebennierenrindenzellen unter dem Einfluss der Endothelzellfaktoren gesteigert wird. Somit lässt sich die erhöhte Steroidkonzentration im Überstand von NCI-H295R-Zellen durch einen Anstieg der Aldosteron- und Cortisolsynthese auf DNS-Regulationsebene und eine erhöhte Zellprolifertionsaktivität erklären. Außerdem konnten wir unter dem Einfluss von Endothelzell-konditioniertem Medium einen Anstieg der StAR-Promoteraktivität beobachten. Das spricht für einen stimulierenden Effekt der Endothelzellfaktoren auf die steroidogene Funktion der NCI-H295R-Zellen bzw.

für die Vermittlung dieses Effektes durch das klassische Regulationsprotein der Steroibiosynthese. Auch in den Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die ECCM (Endothelzell-konditioniertes Medium) - induzierte Erhöhung der Aldosteronproduktion unter Beteiligung von klassischen Steroidbiosynthese-regulierenden Proteinen wie StAR und SF-1 erfolgt (Ansurudeen et al. 2007).

Des Weiteren konnten wir mittels WST-1- und Tritium-markierten-Thymidin-Tests zeigen, dass die Zellviabilität und Zellproliferation der NCI-H295R-Zellen unter der Einwirkung des Endothelzell-konditionierten Mediums gesteigert wird. Hier konnte eine Beteiligung des klassischen Zellzyklusregulators Cyclin D beobachtet werden. Die Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit dem Endothelzell-konditionierten Medium führte nähmlich zu einer Hochregulation von Cyclin D3-Promoter. Das zeigt einen stimulierenden Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Proliferationsaktivität der Nebennierenrindenzellen und, dass dieser Effekt durch Cyclin D vermittelt wird.
Die hier beschriebenen *In vitro* Studien erfolgten mit den NCI-H295R-Zellen aus einem humanen Nebennierenrindenkarzinom, die eine stärkere mitotische Aktivität im Vergleich zu den in Primärkultur aufbereiteten Nebennierenrindenzellen normaler Erwachsener aufweisen. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Proliferationsversuche mit Tritium-markiertem-Thymidin und WST-1 eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zu normalen Nebennierenrindenzellen ergeben haben. Der erhöhte Einbau von Tritium-markiertem Thymidin weist auf einen stimulierenden Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die proliferative Aktivität der Nebennierenrindenzellen hin und zeigt, dass der angestiegene WST-1-Umsatz eher nicht darauf zurückzuführen ist, dass eine verminderte Apoptoserate der NCI-H295R-Zellen unter dem Einfluss des Endothelzell-konditionierten Mediums eingetreten war.
Da unsere *In vitro* Studien mit den NCI-H295R-Zellen aus einem humanen Nebennierenrindenkarzinom erfolgten, wollten wir zeigen, dass in der normalen adulten humanen Nebennierenrinde auch eine relevante Proliferation stattfindet. Dafür führten wir die immunhistochemische Färbung gegen PCNA- und MIB-1-Antigene durch. Dabei konnten wir zeigen, dass die Zellen der erwachsenen Nebennierenrinde immer noch eine hohe proliferative Aktivität besitzen.

Darüberhinaus wollten wir den Netto-Effekt des Endothelzell-konditionierten Mediums mit dem von Endothelin-1 vergleichen, um die Frage beantworten zu können, ob der Einfluss von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Steroidbiosynthese und Proliferation der NCI-H295R-Zellen durch die Endothelin-1-Wirkung erklärt werden kann. Die Untersuchungen mit den Endothelin-1-Rezeptorantagonisten sowie die Stimulationsversuche mit dem reinen Endothelin-1 zeigten einen Endothelin-1-unabhängigen Mechanismus der stimulierenden Wirkung von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Proliferation und steroidogene Funktion der NCI-H295R-Zellen. Somit kann die Wirkung

von Endothelin-1 den Effekt von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Steroidbiosynthese und Proliferation der NCI-H295R-Zellen nicht erklären.

Die Diskrepanz zwischen dem gesamten Effekt von Endothelzell-konditioniertem Medium und dem alleinigen Endothelin-1-Effekt auf die Funktionen der NCI-H295R-Zellen weist auf die Existenz eines bis jetzt unbekannten Endothelzellfaktors hin, über den die Wirkung von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Nebennierenrinde in erster Linie vermittelt wird.

Zudem stellten wir uns die Frage, welche klinischen Konsequenzen sich aus den Kenntnissen über den Einfluss der Endothelzellfaktoren auf die Funktionen der Nebennierenrindenzellen ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass das Endothelzell-konditionierte Medium die Aldosteronsynthese steigert. In eigenen Vorarbeiten fanden wir, dass Endothelzellfaktoren die Sensibilität der *Zona glomerulosa*-Zellen gegenüber AT2 steigern und somit vor allem die AT2-abhängige Aldosteronsekretion verstärken (Ansurudeen et al. 2006). Somit erscheint eine Beteiligung von Endothelzellfaktoren an der Entwicklung einer autonomen Aldosteronsekretion möglich (Ansurudeen et al. 2006). Die Veränderungen in der Regulation der Aldosteronsynthese spielen offenbar eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie hypertensiver Erkrankungen. Patienten mit normalen Blutdruckwerten, aber einer Aldosteronkonzentration im oberen Normbereich zeigten eine Prädisposition für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie (Vasan et al. 2004).

Des Weiteren wurde eine stimulierende Wirkung des Endothelzell-konditionierten Mediums auf die Proliferation der NCI-H295R-Zellen gezeigt, was auf eine mögliche Rolle der Endothelzellfaktoren bei der Entwicklung der Nebenniere bzw. der Nebennierenneoplasien hinweist. Eine weitere Erforschung und Charakteristik der bis jetzt unbekannten Endothelzellfaktoren, die diese stimulierenden Effekte auf die Nebennierenrindenzellen ausüben, könnten neue Mechanismen in der Entstehung der arteriellen Hypertonie sowie adrenaler Neoplasien identifizieren und der Entwicklung der entsprechenden diagnostischen und therapeutischen Verfahren beitragen.

6. Literatur

Abayasekara DR, Vazir H, Whitehouse BJ, Price GM, Hinson JP, Vinson GP. Studies on the mechanisms of ACTH-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. J Endocrinol 1989; 122(3):625-32

Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Do human vascular endothelial cells produce aldosterone? J Endocrinol 2004; 145(8):3626-9

Aikawa T, Matsumoto I, Hirose T, Morikawa T, Tsujimoto Y. H1 action of histamine on aldosterone and cortisol secretion by perfused dog adrenal. Am J Physiol 1986; 250(5 Pt 1):E523-9

Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Krug AW, Funk RHW, Bornstein SR. Vascular-adrenal Niche – Endothelial Cell-mediated Sensitization of Human Adrenocortical Cells to Angiotensin II. Horm Metab Res 2006; 38(7):476–80

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

Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. Mol Cell Endocrinol 2009; 300(1-2):66–70

Aptel HV, Johnson EIM, Valloton MB, Rossier MF, Capponi AM. Demonstration of an angiotensin II-induced negative feedback effect on aldosterone synthesis in isolated rat adrenal glomerulosa cells. Mol Cell Endocrinol 1996; 119(1):105-11

Bassett JR, West SH. Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. Microsc Res Tech 1997; 36(6):546–57

Belloni AS, Neri G, Andreis PG, Musajo FG, Gottardo G, Mazzocchi G, Nussdorfer GG. A comparative study of the effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on the secretory activity of rat adrenal cortex and angiotensin-II-responsive adrenocortical autotransplants. Exp Toxicol Pathol 1993; 45(5-6):341-4

Bennett MR. One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors. Clin Auton Res 1999; 9(3):145-59

Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iacconi P, Miccoli P, Salvetti A. Angiogenesis in Human Normal and Pathologic Adrenal Cortex. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(11):4961–4965

Blackwell RE, Guillemin R. Hypothalamic control of adenohypophysial secretions. Annu Rev Physiol 1973; 35:357-90

Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KS, Litt GJ. Catalysed reporter deposition, a novel method of signal-amplification: Application to immunoassays. J Immunol Meth 1989; 125(1-2):279-85

Boon WC, Roche PJ, Butkus A, McDougall JG, Jeyaseelan K, Coghlan JP. Functional and expression analysis of ovine steroid 11 beta-hydroxylase (cytochrome P450 11 beta). Endocr Res 1997; 23(4):325-47

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. Cell Tissue Res 1991; 265(1):1-9

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. Endocrinol 1992; 131(6):3126-8

Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84(5):1729-36

Bocian-Sobkowska J, Wozniak W, Malendowicz LK, Ginda W. Stereology of human fetal adrenal medulla. Histol Histopathol. 1996; 11(2):389-93

Burgus R, Guillemin R. Hypothalamic releasing factors. Annu Rev Biochem 1970; 39:499-526

Campbell DJ. Increased steroidogenesis by rat zona glomerulosa cells with increased cell concentration *in vitro*: evidence for a novel aldosterone-stimulating factor and implications regarding aldosterone biosynthesis. J Endocrinol 1982; 94(2):225-41

Campbell WB, Gomez-Sanchez CE. Absence of prostacyclin involvement in angiotensin-induced aldosterone secretion in rat adrenal cells. Endocrinol 1985; 117(1):279–86

Chii-Whei Hu, Randy L. Webb, Arco Y. Jeng. Synergistic stimulation of aldosterone production in human adrenocortical carcinoma NCI-H295R-cells by endothelin-1 and angiotensin II. J Cardiovasc Pharmacol 2004; 44(1):289-292

Clark BJ, Combs R. Angiotensin II and cyclic adenosine 3`5`-monophosphate induce human steroidogenic acute regulatory protein transcription through a common steroidogenic factor-1 element. Endocrinol 1999; 140(10):4390-8

Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Endocrinol 1995; 9(10):1346-1355

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. Purification, cloning, and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein from the MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. J Biol Chem 1994; 269(45):28314-22

Delarue C, Remy-Jouet I, Gras M, Galas L, Fournier A, Vaudry H. Activation of Endothelin A Receptors in Frog Adrenocortical Cells Stimulates Both Calcium Mobilization from Intracellular Stores and Calcium Influx through L-Type Calcium Channels. Endocrinol 2005; 146(1):119–129

Delarue C, Conlon JM, Remy-Jouet I, Fournier A, Vaudry H. Endothelins as local activators of adrenocortical cells. J Mol Endocrinol 2004; 32(1):1–7

Dobbie JW, Symington T. The human adrenal gland with special reference to the vasculature. J Endocrinol 1991; 34(4):479–89

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocr Rev 1998; 19(2):101–43

Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(24):14211–6

Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, T. R. Chen, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV. Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis. Cancer Res 1990; 50(17):5488-96

Gershon MD. Neural crest development. Do developing enteric neurons need endothelins? Curr Biol 1995; 5(6):601-4

Gill GN. Mechanism of ACTH action. Metabol 1972; 21(6):571-88.

Guillemin R. Hypothalamic control of the secretion of adenohypophysial hormones. Adv Metab Disord 1971; 5:1-51

Guillemin R. Hypothalamic polypeptides releasing pituitary hormones. Metabol 1964; 13:1206-10

Haase M, Ansurudeen I, Paramonova I, Schinner S, Schott M, Papewalis C, Scherbaum WA, Willenberg HS. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. Cell Tissue Res 2009; 336(2):337–343

Haidan A, Bornstein SR, Liu Z, Walsch LP, Stocco DM, Ehrhart-Bornstein M. Expression of adrenocortical steroidogenic acute regulatory (StAR) protein is influenced by chromaffin cells. Moll Cell Endocrinol 2000; 165(1-2):25-32

Hanke CJ, Drewett JG, Myers CR, Campbell WB. Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect. Endocrinol 1998; 139(10):4053–60

Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1994; 269(39):24316–20

Hatakeyama H, Miyamori I, Takeda Y, Yamamoto H, Mabuchi H. The expression of steroidogenic enzyme genes in human vascular cells. Biochem Mol Biol Intern 1996; 40(3):639–45

Hinson JP, Kapas S, Teja R, Vinson GP. Effect of the endothelins on aldosterone secretion by rat zona glomerulosa cells in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol 1991; 40(1-3):437–9

Hinson JP, Kapas S. The role of endothelial cell products in the regulation of adrenocortical function: actions of endothelin, nitric oxide, adrenomedullin and PAMP. Horm Metab Res 1998; 30(6-7):334–40

Hoshi H, McKeehan WL. Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(20):6413–7

Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. Trends Endocrinol Metab. 2002; 13(5):200-8

Korth P, Bohle RM, Corvol P, Pinet F. Cellular distribution of endothelinconverting enzyme-1 in human tissues. J Histochem Cytochem 1999; 47(4):447–62

Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, Kuhn JM. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(10):5001–7

Lin D, Sugawara T, Strauss JF 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Sci 1995; 267(5205):1828-31

Mazzocchi G, Rossi GP, Rebuffat P, Malendowicz LK, Markowska A, Nussdorfer GG. Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C-and tyrosine kinase-dependent signaling pathways. Endocrinol 1997; 138(6):2333–7

Miller WL, Levine, LS. Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr 1987; 111(1):1-17

Miller WL, Redfield MM, Burnett JC Jr. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. J Clin Invest 1989; 83(1):317-20

Morello F, Schiavone D, Mengozzi G, Bertello C, Liew CC, Bisbocci D, Mulatero P, Veglio F. Adrenal endothelin-1 levels are not associated with aldosterone secretion in primary aldosteronism. Eur J Endocrinol 2009; 160(3):453-8.

Morishita R, Higaki J, Ogihara T. Endothelin stimulates aldosterone biosynthesis by dispersed rabbit adreno-capsular cells. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160(2):628–32

Mohn CE, Fernandez-Solari J, DeLaurentis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E_2. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(17):6213-8

Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Johnson EF, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DS. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene maping, and recommended nomenclature. DNA Cell Biol 1991; 10(1):1-14

Nussdorfer GG, Rossi GP, Belloni AS. The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. Int Rev Cytol 1997; 171:267-308

Nussdorfer GG, Mazzocchi G. Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: facts and hypotheses. Int Rev Cytol 1998; 183:143-84

Paramonova I, Haase M, Mülders-Opgenoorth B, Ansurudeen-Rafi I, Bornstein SR, Papewalis C, Schinner S, Schott M, Scherbaum WA, Willenberg HS. The effects of the endothelium on adrenal steroidogenesis and growth are mainly mediated by proteins other than endothelin-1. Horm Metab Res 2010. Accepted.

Pellerin S, Keramidas M, Chambaz EM, Feige JJ. Expression of laminin and its possible role in adrenal cortex homeostasis. Endocrinol 1997; 138(3):1321-7

Peterson RE, Guillemin R. The hormones of the hypothalamus. Am J Med 1974; 57(4):591-600

Pitt B. New insights into the role of aldosterone in cardiorenal disease and the clinical implications. Introduction. Am Heart J 2002; 144(5):S1

Pon, LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis: rapid accumulation of a phosphoprotein. J Biol Chem 1986; 261(28):13309-16

Rainey WE, Bird IM, Mason JI. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. Mol Cell Endocrinol 1994; 100(1-2):45-50

Raux-Demay MC, Girard F. The physiology of corticotropin-releasing factor (CRF). Reprod Nutr Dev 1985; 25(5):931-43

Rosolowsky LJ, Campbell WB. Endothelial cells stimulate aldosterone release from bovine adrenal glomerulosa cells. Am J Physiol 1994; 266(1 Pt 1):E107–17

Rosolowsky LJ, Hanke CJ, Campbell WB. Adrenal capillary endothelial cells stimulate aldosterone release through a protein that is distinct from endothelin. Endocrinol 1999; 140(10):4411–8

Rossi GP, Albertin G, Neri G, Andreis PG, Hofmann S, Pessina AC, Nussdorfer GG. Endothelin-1 Stimulates Steroid Secretion of Human Adrenocortical Cells *ex Vivo* Via Both ETA and ETB Receptor Subtypes. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(10):3445–9

Rossi GP, Belloni AS, Nussdorfer GG, Pessina AC. Endothelin-1 and the adrenal gland. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 35(4 Suppl 2):S17 – S20

Rossi GP, Andreis PG, Colonna S, Albertin G, Aragona F, Belloni AS, Nussdorfer GG. Endothelin-1[1–31]: A Novel Autocrine-Paracrine Regulator of Human Adrenal Cortex Secretion and Growth. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(1):322–328

Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. Pharmacol Rev 1994; 46(3):325-415

Sapolsky RM. Stress hormones: good and bad. Neurobiol Dis 2000; 7(5):540-2

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev 2000; 21(1):55-89

Sasano H, Imatani A, Shizawa S, Suzuki S, Nagura H. Cell proliferation and apoptosis in normal and pathological human adrenal. Mod Pathol 1995; 8(1):11-7

Shier DN, Kusano E, Stoner GD, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Production of renin, angiotensin II, and aldosterone by adrenal explant cultures: response to potassium and converting enzyme inhibition. Endocrinol 1989; 125(1):486-91

Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M , Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. Int J Obes 2007; 31(5):864–70

Schwyzer R, Sieber P. Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone. Natur 1963; 199:172-4.

Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T. [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism.] Experientia 1953; 9(9):333-5

Smith PE. Postponed pituitary homotransplants into the region of the hypophysial portal circulation in hypophysectomized female rats. Endocrinol 1963; 73:793-806

Sparrow RA, Coupland RE. Blood flow to the adrenal gland of the rat: its distribution between the cortex and the medulla before and after haemorrhage. J Anat 1987; 155:51-61

Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(10):6517-21

Sternberger LA. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. J Histochem Cytochem 1979; 27(12):1657

Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocr Rev 1996; 17(3):221-44

Stocco DM, Clark BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. Biochem Pharmacol. 1996; 51(3):197-205

Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. Ann NY Acad Sci 1995; 771:1-18

Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. Biochem 1996; 35(28):9052-9

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. Synthesis of corticosterone in the vascular wall. Endocrinol 1994; 135(5):2283-6

Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, Iki K, Miyamori I, Sheng WP, Yamamoto H, Blair IA. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. Steroids 1995; 60(1):120-4

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. Hypertens 1995; 25(2):170-3

Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, Imaki T, Kobayashi M, Miyazaki H, Demura H. Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. J Endocrinol Invest 1998; 21(10):668-72

Taylor AL, Fishman LM. Corticotropin-releasing hormone. N Engl J Med 1988; 319(4):213-22

Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ . Role of adrenocorticotropic hormone in the development and maintenance of adrenal cortical vasculature. Microsc Res Tech 2003; 61(3):247–51

Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. Recent Prog Horm Res 1983; 39:245-70

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. Science. 1981; 213(4514):1394-7

Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, Benjamin EJ, Levy D. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. N Engl J Med 2004; 351(1):33–41

Vierhapper H, Nowotny P, Waldhäusl W. Effect of endothelin-1 in man: impact on basal and

adrenocorticotropinstimulated concentrations of aldosterone. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80(3):948–51

Vinson GP , Ho MM , Puddefoot JR , Teja R , Barker S , Kapas S , Hinson JP. The relationship between the adrenal tissue renin-angiotensin system, internalization of the type I angiotensin II receptor (AT1) and angiotensin II function in the rat adrenal zona glomerulosa cell . Adv Exp Med Biol 1995; 377:319–29

Vinson GP , Pudney JA , Whitehouse BJ. The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. Endocrinol 1985; 105(2):285–94
Willenberg HS, Schinner S, I. Ansurudeen. New Mechanisms to Control Aldosterone Synthesis. Horm Metab Res 2008; 40(7):435–41

Willenberg HS, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M,
Scherbaum WA. The endothelium secretes Interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical Cells. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008; 116 Suppl 1:S70-4

Wisgerhof M, Brown RD. Increased adrenal sensitivity to angiotensin II in Low-Renin essential hypertension. J Clin Invest 1978; 61(6):1456–62

Whitcomb RW, Linehan WM, Wahl LM, Knazek RA. Monocytes stimulate cortisol production by cultured human adrenocortical cells. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66(1):33-8

7. Abkürzungsverzeichnis

ACTH: Adrenokortikotropes Hormon, Kortikotropin

AVP: Arginin-Vasopressin

Ad4BP: Adrenal 4-Binding Protein

ACE: Angiotensin Converting Enzyme

AT2: Angiotensin II

CSA: Catalyzed-Signal-Amplifikation-Methode

CRH: Corticotropin-Releasing-Hormon

DAB: Diaminobenzidin

DNA: Desribonucleic acid, Desribonukleinsäure

ET-1: Endothelin-1

ECCM: Endothelzell-konditioniertes Medium

HUVEC-Zellen: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

3β –HSD: 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

LI: Labeling Index

LARII: Luciferase Assay Reagent II

Cpm: Counts per minute

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

POMC: Proopiomelanocortin

RL: Renilla Luciferase

RIA: Radioimmunassay

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

SEM: Standart Error of the Mean

SF-1: SteroidogeneseFaktor-1

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

ROMK: Renal Outer Medullary Potassium-Kanäle

8. Danksagung

Ich danke meiner Familie, meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Willenberg und allen anderen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Schönherr
Geburtsname	Paramonova
Vorname	Iryna
Geburtsdatum/ -ort	3. Mai 1982, Odessa, Ukraine
Staatsangehörigkeit	ukrainisch, unbefristete Aufenthaltserlaubnis in Deutschland
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

09/1989 – 07/1999	Allgemeinbildende Schule Nr. 101 in Odessa
07/1999	Schulabschlussprüfungen und Eintrittsprüfungen an der staatlichen medizinischen Universität Odessa

Hochschulstudium

09/1999 – 08/2002	Vorklinischer Studienabschnitt an der staatlichen medizinischen Universität Odessa
09/2002	Umzug nach Deutschland
10/2002 – 10/2003	Vorbereitung zu der Deutschen Sprachprüfung für den Hochschulzugang (DSH-Prüfung)
10/2003	Ablegen der Sprachprüfung bei der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Studienzulassung für deutsche Universitäten
10/2003 – 08/2006	Klinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/2006 – 08/2007	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf Schwerpunkt: Neurologie
10/2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (schriftlicher Teil), abgeschlossen
12/2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (mündlicher Teil)

Ausbildung

Ab 02/2008	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik des Nordwestkrankenhauses, Frankfurt am Main