

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Studien zur Regulation der Beta-Catenin-Aktivität
durch Endothelzell-sezernierte Faktoren in humanen
Nebennierenrindenzellen

Dissertation

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

vorgelegt von
Carolin Schwafertz

2013

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. Willenberg

Korreferent: Prof. Dr. Raffel

Gewidmet meiner Familie und meinem Freund
in Dankbarkeit für ihre Unterstützung.

Zusammenfassung:

Beinahe jede Nebennierenrindenzelle ist mit einer Endothelzelle verbunden. Bisher sind bereits einige Mechanismen der Regulation der Nebennierenrindenzellenfunktion durch Endothelzelloktoren beobachtet worden, wie z.B. die Stimulation der Cortisol- und Aldosteron-Synthese und die Stimulation des für die Organogenese der Nebenniere essentiellen Proteins CITED2. Ein weiteres solches Protein stellt Beta-Catenin dar.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Endothelzelloktoren und der Beta-Catenin Aktivität in Nebennierenzellen unter Betrachtung der beteiligten Signalwege. Dafür wurden Ergebnisse von Transfektions-, Westernblot-, ELISA- und PCR-Experimenten ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in NCI-H295R-Zellen als auch in primären immortalisierten Nebennierenrindenzellen die Beta-Catenin-Aktivität durch Endothelzell-sezernierte Faktoren reguliert wird.

Experimente zur Analyse der beteiligten Signalwege zeigten, dass für dieses Phänomen weder der Wnt-Signalweg noch die Signalwege der Proteinkinasen A, B oder C relevant sind. Durch Transfektionen und Westernblot-Experimente konnte jedoch eine Aktivierung der MAP- und PI3-Kinasen-Signalwege nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mit bFGF ein Endothelzellfaktor gefunden werden, der die Regulation der Beta-Catenin-Aktivität in Nebennierenrindenzellen beeinflusst.

Wie bereits in der Literatur bekannt, zeigte sich auch in unseren ELISA- und PCR-Experimenten, dass bFGF durch Endothelzellen synthetisiert wird. Die Regulation der Beta-Catenin-Aktivität durch bFGF konnte mittels Transfektionen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde bFGF auch als ein Regulator der Steroidbiosynthese in der Nebenniere charakterisiert.

Somit wurde mit bFGF ein wichtiger, von Endothelzellen-sezernierter Faktor gefunden, der vermutlich über Aktivierung von MAP- und PI3-Kinasen die Beta-Catenin-Aktivität in Nebennierenrindenzellen reguliert.

Dies ist besonders mit Hinblick auf die adrenale Pathogenese und Organogenese interessant, die vermutlich durch Beta-Catenin und bFGF beeinflusst wird und die es nun auf einen direkten Zusammenhang zwischen beiden Faktoren zu untersuchen gilt.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
APC	Adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AT1R	Angiotensin 2 Typ 1-Rezeptor
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BIM I	Bisindolylmaleimid I
C	Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CITED2	<i>CBP interacting transactivator with ED-rich tail 2</i>
CKI- α	Caseinkinase I α
cm ²	Quadratzenimeter
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cu ²⁺ /Cu ¹⁺	Kupferionen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	DHEA sulfat
Dkk-1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECCM	Endothelzell-konditioniertes Medium
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated proteinkinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FGF2	humanes bFGF

g	Gramm
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 β
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>Horse radish peroxides</i>
HSP	Heparan sulfat Proteoglykane
HSV-TK	Herpes simplex Virus Thymidinkinase
hTERT	<i>humane Telomerase reverse transcriptase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinase/ <i>stress-activated protein kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> /Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK 1/2	MAPK/Erk Kinase 1/2
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
μ l	Mikroliter
mA	Milliampere
ml	Milliliter
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> /Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat

PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
P450 _{scc}	<i>Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	<i>Lauryl sulfat sodium salt</i>
sFRP-1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>
SF-1	<i>steroidogenic factor 1</i>
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
Tcf/Lef	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
U	<i>Unit</i>
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

- 1.1 Die Nebenniere
- 1.2 Endothelzell-sezernierte Faktoren
- 1.3 Beta-Catenin Aktivität
- 1.4 Signaltransduktionswege: PKA, PKB, PKC, MAP-Kinasen und bFGF
- 1.5 Ziele der Arbeit

2 Material und Methoden

- 2.1 Die Zellreihe NCI-H295R
 - 2.1.1 Allgemeine Informationen
 - 2.1.2 Kultivierung von NCI-H295R Zellen
- 2.2 Humane immortalisierte Nebennierenrindenzellen
- 2.3 Endothelzellen
 - 2.3.1 *Human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC)
 - 2.3.2 Gewinnung von Endothelzell-konditioniertem Medium (ECCM)
- 2.4 Transfektion
 - 2.4.1 Verwendete Plasmide
 - 2.4.2 Versuchsaufbau und Transfektion
 - 2.4.3 Stimulationsmedium
 - 2.4.4 Luziferaseaktivität-Messung und Auswertung
- 2.5 Analysen mittels Westernblot-Technik
 - 2.5.1 Verwendete Antikörper
 - 2.5.2 Kernelution und Proteingewinnung
 - 2.5.3 Westernblot nach Lämmli
 - 2.5.3.1 Gelelektrophorese
 - 2.5.3.2 Blotting

2.5.3.3 Immunreaktion und Messung

2.6 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Analyse der *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)-Konzentration in ECCM

2.6.1 Humanes bFGF ELISA Kit (Ray Biotech, Norcross, USA)

2.6.2 Ablauf

2.7 Qualitative *Polymerase chain reaction* (PCR)-Analysen

2.7.1 RNA-Extraktion aus HUVECs und NCI-H295R Zellen

2.7.2 cDNA Synthese

2.7.3 PCR

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionsexperimente mit ECCM-Stimulation

3.2 Transfektionsexperimente mit Wnt-Signalweg-Inhibitoren und Hemmern der Proteinkinasen A, B und C

3.3 Identifizierung von Signalwegen, die bei der Regulation der Beta-Catenin-Aktivität involviert sind

3.4 Experimente zur Beteiligung des bFGF-Signalwegs an der Beta-Catenin-Aktivität

4 Diskussion

5 Schlussfolgerung

6 Literaturverzeichnis

7 Anhang

7.1 Danksagung

7.2 Eidesstattliche Erklärung

1 Einleitung

1.1 Die Nebenniere

Die Nebenniere wurde erstmals 1564 von dem italienischem Anatomen Eustachius dargestellt. Die überlebenswichtige Funktion wurde jedoch erst über 300 Jahre später von Arthur Biedl in Experimenten an Knorpelfischen gezeigt, der diese einer totalen und partiellen Adrenalektomie unterzog. Bis die in der Nebennierenrinde synthetisierten Hormone identifiziert wurden, dauerte es bis Mitte der 1930er Jahre. 1936 bis 1940 wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen das 17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron (Cortison) entdeckt (Kendall *et al.* Ann Intern Med 1950; Glyn *et al.* J R Soc Med 1998), und 1953 konnte die Struktur von Aldosteron identifiziert werden (Simpson *et al.* Experientia 1954).

Die Nebennierenrinde wird über Hypothalamus/Hypophyse sowie Renin/Angiotensin angesteuert, wobei Glukokortikoide in allen drei Rindenzonen, *Zona fasciculata*, *Zona glomerulosa* und *Zona reticularis* synthetisiert werden. Aldosteron wird in der *Zona glomerulosa* und Vorstufen gonadaler Steroidhormone in der *Zona reticularis* gebildet.

Alle Schritte der Hormonbiosynthese der Nebennierenrinde beginnen mit Cholesterin, welches das Grundgerüst der Steroidhormone darstellt. Das StAR (*steroidogenic acute regulatory*)-Protein ist zuständig für den Transport von Cholesterin durch die äußere zur inneren Mitochondrienmembran, an der die Steroidbiosynthese initiiert wird, und stellt damit deren limitierenden Schritt dar (Miller *et al.* J Steroid Biochem Mol Biol 1999). Die StAR-Expression wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst, ein wichtiger davon ist SF-1 (*steroidogenic factor 1*) (Sugarawa T, Biochemistry 1996). SF-1 ist nicht nur ein Regulator für die StAR-Expression, sondern unter anderem auch für die Expression der Cytochrom P450-Steroid-Hydroxylasen, welche für die Differenzierung und Umwandlung von Pregnelonon in die Steroidhormone verantwortlich sind (Parker *et al.* Endocr Rev 1997). Außerdem konnten Parker und Luo 1994 am Mausmodel zeigen, dass es bei einer Nichtexpression von SF-1 zur Agenesie von Nebennieren und Gonaden kommt (Luo *et al.* Cell 1994). Ein weiterer wichtiger Regulator der Nebennieren-Organogenese ist

CITED2 (*CBP interacting transactivator with ED-rich tail 2*). Bei *in vivo*-Experimenten mit Mäusen, die kein CITED2 exprimieren, zeigte sich ebenfalls eine Nebennierenagenesie (Bamforth *et al.* Nat Genet 2001).

Eine gute Durchblutung ist Voraussetzung dafür, dass die Nebenniere jederzeit schnell und adäquat auf Stresssituationen reagieren kann. Mit einer Durchblutungsrate von geschätzten 5 ml pro Minute (Vrezas *et al.* Adrenal Disease and Function, Adrenal Cortex, Development, Anatomy, Physiology Chapter 1 in Endotext.org) gehört die Nebenniere im Vergleich zu ihrer Größe zu den am besten durchbluteten Organen. Immunhistochemische Experimente haben gezeigt, dass so gut wie jede Nebennierenrindenzelle in direktem Kontakt zu einer Endothelzelle steht (Ehrhart-Bornstein *et al.* Endocr Rev 1998). Die Durchblutung der Nebennierenrinde wird unter anderem von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) reguliert (Thomas *et al.* Microsc Res Tech 2003; Zhang *et al.* Endocrinology 2007; Mohn *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2005). Im Gegenzug nehmen die zahlreichen Endothelzellen durch Sekretion von Faktoren Einfluß auf die Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde.

1.2 Endothelzell-sezernierte Faktoren

In einem erwachsenen Körper befinden sich ca. 1×10^{13} Endothelzellen, welche ein ca. 1 kg wiegendes „Organ“ bilden (Sumpio, Int J Biochem Cell Biol 2002). Dieses Multifunktionsorgan dient als Bestandteil des Gefäßsystems nicht nur der Versorgung von Geweben, sondern ist auch für die Koagulation, immunmodulatorische Antworten, den Gefäßtonus und Modulation des Zellwachstums zuständig und nimmt an parakrinen sowie klassischen endokrinen Regulationsmechanismen teil.

Im Laufe der Jahre wurden bereits zahlreiche von Endothelzellen sezernierte Faktoren wie Angiotensin II (Kifor *et al.* Circ Res 1987), Endothelin-1 (Botting *et al.* Arch Mal Coeur Vaiss 1989; Vane J Lipid Mediat. 1993) oder Interleukin-6 (Podor *et al.* Ann. N Y Acad Sci 1989; Willenberg *et al.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 2008) identifiziert. Rosolowski *et al.* beschrieben ein 3.000 Da-Protein, welches von Endothelzellen sezerniert wird (Rosolowsky *et al.* Am J Physiol 1994) und in bovinen Nebennierenrindenzellen zu einem Endothelin-

unabhängigen Anstieg der Aldosteronkonzentration führt (Rosolowsky *et al.* Endocrinology 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass Endothelzellen nicht nur VEGF (*vascular endothelial growth factor*) für die Angiogeneese produzieren, sondern auch bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Schweigerer *et al.* Nature 1987; Hannan *et al.* Growth Factors 1988).

Während die Wirkung einzelner Faktoren auf die Nebennierenrindenfunktion in verschiedenen Arbeiten charakterisiert wurde (Übersicht in Willenberg *et al.* Horm Metab Res 2008), gibt es nur wenige Untersuchungen zu Nettoeffekten von Endothelzellprodukten auf die Nebennierenrindenfunktion.

So führt die Stimulation von humanen Nebennierenrindenzellen mittels Endothelzell-konditioniertem Medium (ECCM) über einen Proteinkinase A-unabhängigen Signalweg (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009) zu einer erhöhten basalen Aldosteronsekretion und einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Angiotensin II (Ansurudeen *et al.* Horm Metab Res 2006). Auch die weitere Steroidogenese wird durch ECCM beeinflusst. Sowohl die StAR-, als auch die SF-1-Expression wird durch ECCM stimuliert (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007) und auch die Cortisol-Synthese wird ECCM-abhängig und Endothelin-1-unabhängig erhöht (Paramonova *et al.* Horm Metab Res. 2010). Das für die Organogenese der Nebennierenrinde wichtige CITED2 wird ebenfalls durch ECCM über die Einbeziehung von MAP-Kinasen (Haase *et al.* Cell Tissue Res 2009) stimuliert. Es sind bereits einige Auswirkungen des ECCM auf adrenokortikale Zellen bekannt, jedoch wurden die verursachenden Faktoren und beeinflussten Signalwege in der humanen Nebennierenrindenzelle bisher nur unzureichend charakterisiert.

1.3 Beta-Catenin Aktivität

Das humane Beta-Catenin-Gen (*CTNNB1*) ist an der p21-Stelle im kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisiert (Kraus *et al.* Genomics 1994). Beta-Catenin interagiert mit Cadherin und Alpha-Catenin zur Bildung von Zell-Zell-Kontakten (Lilien *et al.* Curr Opin Cell Biol 2005). Mindestens genauso wichtig ist seine Funktion im kanonischen Wnt-Signalweg. Bei Bindung von Wnt-Molekülen an ihre „frizzled“-Rezeptoren, welche auch in der Nebennierenrindenzelle

vorhanden sind (Chen *et al.* Horm Metab Res 2006; Schinner *et al.* Int J Obes 2007), kommt es zur Freisetzung von Beta-Catenin aus dem „*destruction complex*“ bestehend aus Axin, CKI α (Caseinkinase I α), APC (Tumorsuppressorprotein *Adenomatous Polyposis Coli*) und GSK-3 β (Glykogensynthasekinase-3 β) und zur Translokation in den Zellkern. Dort bindet Beta-Catenin an einer Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie und führt damit zur Transkription von Wnt-Zielgenen (Eastman *et al.* Curr Opin Biol 1999). Wenn andererseits der Wnt-Signalweg nicht ausgelöst wird, wird Beta-Catenin im „*destruction complex*“, phosphoryliert, dadurch für die Ubiquitinierung markiert und schließlich in Proteasomen abgebaut (Abb. 1.3.1) (Aberle *et al.* EMBO J 1997; van Amerogen *et al.* Sci Signal 2008; Seidensticker *et al.* Biochim Biophys Acta 2000). Ein Komplex aus Axin und CKI α phosphoryliert Beta-Catenin an Serin-45 und bereitet es somit auf die Phosphorylierung durch GSK-3 β an Serin-33 und -37 sowie Threonin-41 vor (Amit *et al.* Genes Dev 2002; Liu *et al.* Cell 2002). Phosphorylierungen an anderer Stelle des Beta-Catenins wie beispielsweise Serin-675 durch Proteinkinase A können auch zu einer Stabilisierung durch Verhinderung des Abbaus von Beta-Catenin führen (Hino *et al.* Mol Cell Biol 2005).

Die Beta-Catenin Aktivität ist bereits bei der embryonalen Entwicklung der Nebenniere relevant (Übersicht Berthon *et al.* Mol Cell Endocrinol 2011). Kim *et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass es bei Beta-Catenin-Inaktivierung zu einer Nebennierenaplasie in neugeborenen Mäusen kommt (Kim *et al.* Development 2008). Der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg ist außerdem in zahlreichen pathogenen Prozessen wie der Tumorgenese involviert (Kikuchi Cancer Sci 2003; Ragazzon *et al.* Cancer Res 2010; Übersicht Berthon *et al.* Mol Cell Endocrinol 2011). Tissier *et al.* konnten Mutationen im Wnt-/Beta-Catenin-Signalweg sowohl in malignen als auch benignen adrenokortikalen Tumoren nachweisen (Tissier *et al.* Cancer Res 2005). Bei anderen pathogenen Veränderungen kann die Beta-Catenin-Aktivität konstitutiv erhöht (Berthon *et al.* Hum Mol Genet 2010) oder das Beta-Catenin-Gen selbst durch Mutationen verändert sein (Tadjine *et al.* Clin Endocrinol 2008; Gaujoux *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2008).

Die Aktivierung von Beta-Catenin führt darüber hinaus zu einer gesteigerten Steroidogenese. Die Aldosteron- und Cortisolsynthese in Nebennierenrinden–

zellen wird über den Wnt/Beta-Catenin Signalweg stimuliert (Schinner *et al.* Int J Obes 2007) und Mutationen in diesem Signalweg führen zu einer autonomen Sekretion der Steroidhormone in Nebennierenrindenadenomen (Tadjine *et al.* Clin Endocrinol 2008). Ein Ausfall im Wnt-/Beta-Catenin-Signalweg bewirkt hingegen eine verminderte Aldosteronsekretion (Heikkilä *et al.* Endocrinology 2002).

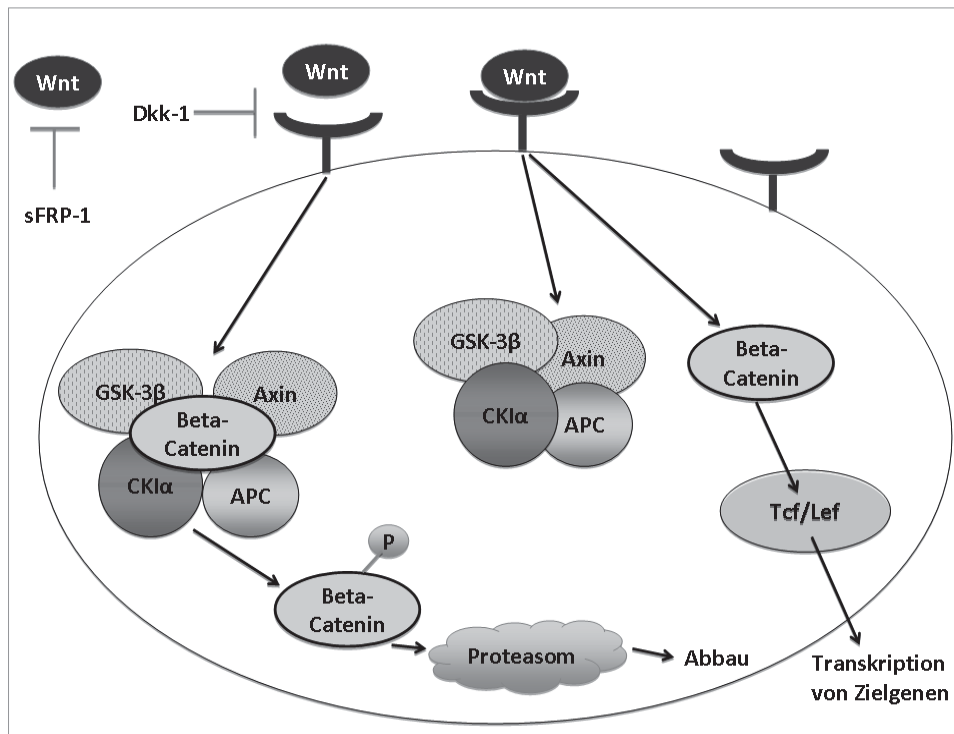


Abb. 1.3.1 **Schaubild des kanonischen Wnt-/Beta-Catenin-Signalwegs in einer adrenokortikalen Zelle.** Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs wird durch Abfangen von Wnt-Molekülen durch sFRP-1 und Blockierung der Rezeptorbindung durch Dkk-1 verhindert. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von Beta-Catenin im „destruction complex“ bestehend aus GSK-3β, Axin, APC und CK1α, und anschließendem Abbau in Proteasomen. Bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Bindung an den Rezeptor, wird Beta-Catenin aus dem „destruction complex“ gelöst und transloziert in den Zellkern. Dort bindet Beta-Catenin an der Tcf/Lef-Bindungsstelle, um die Transkription der Zielgene zu aktivieren.

1.4 Signaltransduktionswege: PKA, PKB, PKC, MAP-Kinasen und bFGF

Von humanen Endothelzellen werden zahlreiche Faktoren sezerniert (s. 1.2), die verschiedene Signalwege und Mechanismen aktivieren, die auch die Funktion der Nebennierenrindenzellen regulieren. Die meisten Signalwege beinhalten eine Kinase, die Phosphatreste von Nucleosidtriphosphaten auf ein Substrat, zumeist Hydroxygruppen einer Aminosäure, überträgt.

Die Proteinkinase A (PKA), eine Serin-/Threonin-Kinase, wird durch Bindung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) aktiviert. Sie hat eine wichtige Funktion im Energiestoffwechsel und führt über Phosphorylierung eines *cAMP-responsive element-binding proteins* (CREB) und dadurch folgender Bindung von CREB an einer *cAMP response element* (CRE)-Sequenz im Promoter zur Aktivierung von speziellen Transkriptionsfaktoren. Hino *et al.* konnten zeigen, dass es zu einer Proteinkinase A-abhängigen Stabilisierung und Akkumulation von Beta-Catenin kommt (Hino *et al.* Mol Cell Biol 2005). Die Steroidogenese, insbesondere die Aldosteronsekretion, wird Proteinkinase A-unabhängig durch Endothelzell-sezernierte Faktoren gesteigert (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009).

Die Proteinkinase B (PKB) besitzt drei Gene, die sogenannte AKT1, AKT2 und AKT3, und gehört ebenfalls zu den Serin-/Threonin-Kinasen. Der Signalweg zur Aktivierung der PKB beginnt mit der Phosphoinositid-3-(PI3)-Kinase, welche das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert (Rassow *et al.* Biochemie, Thieme Verlag, 2006). Studien zeigten, dass eine durch Endothelzellmedium gesteigerte Aldosteronsekretion in humanen Nebennierenrindenzellen sowohl durch einen PI3-Kinaseinhibitor und einen PKB-Inhibitor gehemmt werden konnte (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009).

Die Proteinkinase C (PKC) ist für die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine verantwortlich und benötigt zur eigenen Aktivität Diacylglycerin, Calciumionen und Phospholipide (Nakamura *et al.* J Biochem 2010).

Die Familie der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen umfasst drei bisher bekannte Signalwege: Die p38-MAPK-Kaskade, die JNK/SAPK (*c-Jun amino-*

terminal kinase/stress-activated protein kinase)-Kaskade und die ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*)-Kaskade. Die MAPK-Familie wird durch verschiedene extrazelluläre Reize wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stress mittels Phosphorylierung spezieller Threonin- und Tyrosinstellen durch vorangehende spezifische Kinasen aktiviert (Strnisková *et al.* Gen Physiol Biophys 2002). Durch mehrstufige Phosphorylierungsprozesse kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der Zielproteine (Roux *et al.* Microbiol Mol Biol Rev 2004). Die ERK-Kaskade hat über den Ras-/Raf-Signalweg, der die nachgeschalteten Kinasen MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase 1/2) phosphoryliert, um schließlich ERK zu aktivieren, über eine Erhöhung der Cortisolsekretion Einfluss auf die Steroidogenese (Wu *et al.* Br J Cancer 2002). Zusätzlich ist die ERK-Kaskade in der Endothelzell-vermittelten Expression von CITED2 in der Nebenniere involviert (Haase *et al.* Cell Tissue Res 2009).

Der *basic fibroblast growth factor* (bFGF) ist ein Teil der bisher entdeckten 22-köpfigen *Fibroblast growth factor* (FGF)-Familie. Deren Aufgaben liegen embryologisch im Bereich der Zelldifferenzierung, -Migration und -Proliferation, wobei im adulten Organismus die Angiogenese und Wundheilung hinzutreten (Ornitz *et al.* Genome Biol 2001). Die Bindung von FGFs ist rezeptorvermittelt, wobei vier Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bekannt sind: FGFR-1, -2, -3 und -4. Durch Spleißvorgänge auf mRNA-Ebene kommen noch eine Vielzahl anderer Rezeptorvarianten vor (Cross 2001, <http://tips.trends.com>). Bei Bindung von FGF an einen FGFR kommt es nicht automatisch zur RTK-typischen Dimerisierung der Rezeptoren und zu nachfolgenden Phosphorylierungsvorgängen, da FGF als Monomere vorliegen und somit nur mithilfe ihrer Cofaktoren, den HSP (Heparan Sulfat Proteoglykanen) (Ornitz *et al.* Bioessays 2000), zur vollständigen Aktivierung der Rezeptoren führen (Plotnikov *et al.* Cell 1999). Dabei bindet humanes bFGF, auch FGF2 genannt, vor allem an FGFR-1. Nach Bindung von bFGF an den FGFR-1 kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signalwege, wobei die genauen Mechanismen noch nicht komplett erforscht sind. So wird unter anderem der MEK/ERK- (Choi *et al.* PLoS One 2010) und auch der PI3-K/AKT-Signalweg durch bFGF aktiviert (Pratsinis *et al.* Eur Spine J 2007). Auch die PKC wird durch Bindung von bFGF an FGFR-1 stimuliert (Cross 2001, <http://tips.trends.com>).

1.5 Ziele der Arbeit

Es ist bekannt, dass die Nebennierenrinde eine ausgeprägte Durchblutung und dadurch eine Vielzahl von Kontakten zwischen Endothelzellen und Nebennierenrindenzellen besitzt. Die Nebennierenrindenzellen beeinflussen dabei nicht nur die Endothelzellen, sondern die von Endothelzellen sezernierten Faktoren beeinflussen ihrerseits wiederum die Organogenese und Funktion der Nebennierenrinde. Eine Expressionsstörung von SF-1 und CITED2 führt bereits embryologisch zu einer Nebennierenagenesie (Luo *et al.* Cell 1994; Bamforth *et al.* Nat Genet 2001). Sowohl SF-1 als auch CITED2 können durch Endothelzell-sezerniertes Medium stimuliert werden (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007; Haase *et al.* Cell Tissue Res 2009). Da sich auch die Beta-Catenin-Aktivität als wichtiger Bestandteil der Nebennieren-Organogenese herausstellte und bei Inaktivierung zu einer Nebennierenaplasie führt (Kim *et al.* Development 2008), stellt sich die Frage, ob Endothelzellefaktoren auch Auswirkungen auf die Beta-Catenin-Aktivität besitzen.

In dieser Arbeit ging man deshalb von folgender Hypothese aus:

- Endothelzellen regulieren durch sezernierte Faktoren die Aktivität von Beta-Catenin in Nebennierenrindenzellen.

Die Ziele dieser Arbeit bestanden deshalb in der Untersuchung,

- ob Nebennierenrindenzellen mit einer erhöhten Beta-Catenin-Aktivität auf eine Stimulation mit ECCM reagieren,
- wenn ja, durch welchen Signalweg der Einfluß auf die Aktivität von Beta-Catenin in Nebennierenrindenzellen genommen wird und
- welche(r) Faktor(en) über einen solchen Signalweg maßgeblich zur Aktivierung von Beta-Catenin führen könnten.

Die Ergebnisse sollen dazu dienen, die Interaktion zwischen Endothelzell- und Nebennierenrindengewebe näher zu charakterisieren und mögliche Faktoren zu identifizieren, die eine wichtige Rolle in der Organogenese oder in der Pathogenese der Nebennierenrinde spielen können.

2 Material und Methoden

2.1 Die Zellreihe NCI-H295R

2.1.1 Allgemeine Informationen

Um die Auswirkungen von Endothelzell-sezernierten Faktoren auf humane Nebennierenzellen zu untersuchen, wurde die NCI-H295-Zelllinie als Model gewählt, weil sie humaner Abstammung ist und ein großes Spektrum an Nebennierenrindenhormonen synthetisieren kann. Die Zelllinie entstammt einem adrenokortikalen Karzinom einer 48-jährigen Frau von den Bahamas, welche 1980 klinisch durch Gewichtsverlust, Akne, Hirsutismus, Ödeme, Diarrhö und unregelmäßige Regelblutungen auffällig wurde. In den Laboruntersuchungen fand sich ein starker Anstieg aller Nebennierensteroide. Aufgrund der ausgeprägten Malignität des Tumors kam es im Verlauf zu einer Metastasierung in die Leber und die Lunge (Gazdar *et al.* Cancer Res 1990). Nachdem es gelungen war, die Zellen erfolgreich zu kultivieren, wurden sie elektronenmikroskopisch untersucht. Es wurden typische ultrastrukturelle Eigenschaften von Steroidhormon-produzierenden Zellen, zahlreiche genetische Aberrationen, sowie mikroskopische Malignitätszeichen in den NCI-H295 Zellen gefunden (Gazdar *et al.* Cancer Res 1990).

Die NCI-H295R-Zellen, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind adaptierte Zellen der NCI-H295 Zelllinie, welche im Monolayer adhärent auf dem Zellkulturboden wachsen und nicht wie die pluripotenten NCI-H295 Zellen in einer Suspension. Außerdem hat sich die Populationsverdopplungszeit im Gegensatz zu den NCI-H295 Zellen von fünf auf zwei Tage verkürzt.

Nachdem Gazdar *et al.* 1990 über 30 sezernierte Steroide im Kulturmedium gefunden hatten, wurden zur genaueren Spezifizierung der Steroidogenese in NCI-H295-Zellen weitere Experimente durchgeführt. Die NCI-H295 Zellen reagieren auf Forskolin stärker als auf ACTH-Stimulation, mittels gesteigerter Steroidogenese inklusive Cortisol, Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA-Sulfat (DHEAS) und Androstendion (Rainey *et al.* J Clin Endocrinol Metab 1993). Die NCI-H295 Zellen sind auch ein gutes Model für die Aldosteron–

synthese, welche sich durch Angiotensin II und Kalium-Ionen stimulieren lässt. Die Synthese wird über eine Aktivierung des von den Zellen exprimierten Angiotensin-1 (AT-1)-Rezeptor, über die Phosphoinositidase-C und einen erhöhten intrazellulären Calciumspiegel vollzogen (Bird *et al.* Endocrinology 1993). Trotz einer konstitutiven Aktivierung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription (Doghman *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2008) wurde die NCI-H295R-Zelllinie aufgrund der Adhärenzfähigkeit, der schnellen Teilungsrate und der ansonsten großen Ähnlichkeit in der Steroidogenese im Vergleich zu nicht veränderten humanen Nebennierenrindenzellen ausgewählt.

2.1.2 Kultivierung von NCI-H295R Zellen

Die Kultivierung der Nebennierenrindenzellen NCI-H295R wurde in DMEM/F12-Glutamax-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid durchgeführt. Das Medium wurde mit 2 % fetalem Kälberserum (Invitrogen), 66 nM Insulin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 10 nM Hydrocortison (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml Apo-Transferrin (Sigma-Aldrich), 10 nM Estradiol (Sigma-Aldrich), 30 nM Natriumselenit (Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin (Invitrogen) und Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen) angereichert.

Bei Konfluenz > 80 % wurden die Zellen mittels Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) von den Zellkulturflaschen gelöst. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS/Phosphat Buffered Saline, Invitrogen) gewaschen und dann nach Accutasezugabe für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde frisches Kulturmedium den gelösten Zellen hinzugefügt und bei 1.400 rpm und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde im Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) bestimmt, wobei tote Zellen angefärbt und dadurch nicht mitgezählt wurden.

Nun wurden die Zellen für die Experimente in eine 24-Well Platte ausgesät. Bei Weiterkultivierung der Zellen in der Zellkulturflasche wurde das Medium in Abhängigkeit von der Zelldichte alle 2–4 Tage gewechselt.

2.2 Humane immortalisierte Nebennierenrindenzellen

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Peter J. Hornsby zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um humane Nebennierenrindenzellen, die mittels *Telomerase reverse transcriptase* (hTERT) immortalisiert wurden, wie in Thomas *et al.* (Neoplasia 2002) beschrieben. Diese Zelllinie wurde bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid in einem Brutschrank inkubiert. Dabei wurden die Zellen in Kulturflaschen kultiviert und das Medium abhängig von der Zelldichte, spätestens aber nach drei Tagen gewechselt. Das verwendete Medium bestand aus DMEM/F12-Glutamax-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) welches mit 10 % fetalen Kälberserum (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin (Invitrogen) und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) versetzt wurde. Nachdem die Zellen eine Dichte von mehr als 80 % besaßen, wurden sie gesplittet. Dafür wurde das Kulturmedium entfernt und nach einem Waschprozess mittels Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS/*Phosphat Buffered Saline*, Invitrogen) mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die sich lösenden Zellen wurden anschließend mit Zellmedium versetzt und bei 1.400 rpm und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde in frischem Zellmedium resuspendiert und die Zellen analog zu den NCI-H295R Zellen (s.1.2.) in einer Neubauer Zählkammer für die weitere Verwendung in Transfektionsexperimenten oder zur Weiterkultivierung ausgezählt.

2.3 Endothelzellen

2.3.1 *Human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC)

Die humanen Endothelzellen sind käuflich zu erhalten, z.B. bei Lonza aus Walkersville, USA. Die Zellen wurden bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen wurden 2.500-5.000 Zellen pro cm² ausgesät. Das zugefügte Medium bestand aus Endothelzell-Basalmedium mit zugefügtem Supplementpack (beides PromoCell, Heidelberg, Deutschland), so dass

folgende Konzentrationen an Zusätzen bestanden: 2 % fetales Kälberserum, 0,4 % Endothelzell Wachstumssupplement/Heparin, 0,1 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor, 1 µg/ml Hydrocortison und 1 ng/ml *basic Fibroblast Factor*. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig nach mikroskopischer Kontrolle alle drei Tage gewechselt, bis die Zellen nach neun Tagen zu 90 % Konfluenz im Monolayer (Abb. 2.3.1.1.) gewachsen waren. Daraufhin konnten die Zellen für die weitere Kultivierung zur Gewinnung von Endothelzell-konditioniertem Medium (ECCM)(s. 2.3.2) bzw. zum Aussäen für die PCR-Experimente gesplittet werden.

2.3.2 Gewinnung von Endothelzell-konditioniertem Medium (ECCM)

Die HUVECs wurden in ihrem vorher angesetzten Endothelzell Medium (s.o.) im Brutschrank bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Bei einer Konfluenz der Zellen über 80 % wurde das Medium entnommen und anschließend bei 1.400 rpm und 4° C für 2 Minuten zentrifugiert. Das zentrifugierte Medium wurde entfernt, so dass die restlichen Festkörper im Pellet gebunden blieben. Das nun zellfreie Medium wurde steril filtriert (Minisort, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) und anschließend bei -20°C für den baldigen Gebrauch eingefroren. Die Medien wurden vor dem experimentellen Gebrauch gepoolt, da sie unterschiedlich lange (zwischen 2-4 Tagen) und bei unterschiedlicher Konfluenz (80 %-100 %) gewonnen wurden.

2.4 Transfektion

2.4.1 Verwendete Plasmide

Für die Reportergenassays wurden verschiedene Plasmidkonstrukte benötigt. Die meisten Experimente bezogen sich auf die Beta-Catenin abhängige Transkription in der untersuchten Zellreihe. Dafür wurde das Plasmidkonstrukt TOPFLASH (Abb. 2.4.1.1) benutzt, erhältlich bei UPSTATE biotechnology (Lake Placid, USA). Der Wildtyp des *T cell factor (Tcf)* Reporter Plasmids enthält drei Kopien einer Tcf-Bindungsstelle und eine Firefly-Luziferase-Sequenz. Bei Bindung von transloziertem Beta-Catenin an die Tcf-Bindungsstelle im Zellkern, kommt es zur Amplifikation des Genprodukts, welches sich spektrometrisch anhand der Luziferase Expression quantifizieren lässt. Zur Kontrolle der Beta-Catenin Selektivität wurden zusätzliche Experimente mit dem Plasmid FOPFLASH (Abb. 2.4.1.1) als Negativkontrolle durchgeführt. Dieses Plasmid ist auch bei UPSTATE biotechnology erhältlich. Es besitzt ebenfalls eine Firefly-Luziferase-Sequenz, aber im Gegensatz zu TOPFLASH eine mutierte Tcf-Bindungsstelle, so dass Beta-Catenin im Kern nicht binden kann und dadurch keine erhöhte Luziferaseaktivität spektrometrisch gemessen wird.

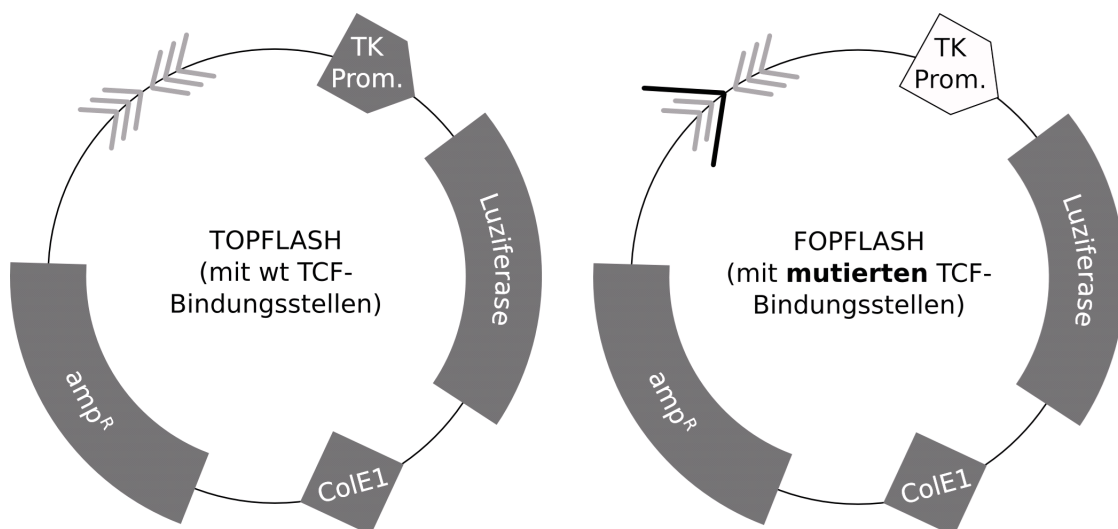


Abb. 2.4.1.1 **Plasmidkarten der verwendeten Plasmide.** TOPFLASH und FOPFLASH nach der Produktinformation von UPSTATE biotechnology (Lake Placid, USA).

Weitere Reporterassays befassten sich stellvertretend durch Nutzung eines StAR-Plasmids mit den Auswirkungen auf die Steroidogenese. Dieses besitzt ebenfalls eine Firefly-Luziferase-Sequenz und wurde bereits bei Caron *et al.* (Mol Endocrinol 1997) beschrieben.

Um die Auswirkungen auf den Proteinkinase A- und cAMP-Signalweg zu untersuchen, stellte uns freundlicherweise Fr. Dr. Oetjen das pT81-Plasmid zur Verfügung, beschrieben bei Oetjen *et al.* (J Biol Chem 1994). Dieses ist auch mit einer Firefly-Luziferase-Sequenz und darüber hinaus mit einer *cAMP response element (CRE)*-Bindungsstelle ausgestattet.

Bei allen Transfektionsexperimenten wurde als interne Kontrolle und zur Normalisierung der transkriptionellen Aktivität ein pRL-TK-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieses Plasmid besitzt einen Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK)-Promoter, der für die Erbringung einer moderaten Expression der nachgeschalteten Renilla-Luziferase verantwortlich ist.

2.4.2 Versuchsaufbau und Transfektion

Für die Transfektionsexperimente wurden die jeweils verwendeten Zellreihen, also die NCI-H295R Zellreihe und die immortalisierten Nebennierenzellen, in 24-well-Platten (Nunc Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät, so dass eine Dichte von 200.000 Zellen/well erreicht wurde.

Anschließend wurden die Zellen kultiviert, bis sie eine Konfluenz > 60 % besaßen. Zum Einbringen der Plasmide in die verwendeten Zellen wurde Nanofectin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) benutzt. Dabei handelt es sich um ein Transfektionsreagenz, das ein positiv geladenes Polymer mit DNA-Bindungskapazität enthält, welches wiederum in einen porösen Nanopartikel eingebettet ist. Durch diese Kombination wird die DNA vor einem Abbau geschützt und gut von den Zellen aufgenommen. Die verwendete Plasmid-DNA wurde in einem Verhältnis von 1 : 3,2 DNA (μg) zu Nanofectin (μl) verwendet. Pro Well wurde folgender Ansatz (Tabelle 2.4.2.1) benutzt.

Die Plasmidmischung wurde in Serum-freiem Medium angesetzt und für 24 Stunden zu den kultivierten Zellen gegeben. Anschließend wurde das

Transfektionsmedium abgesaugt und das Stimulationsmedium mit je nach Experiment (s. 2.4.3) unterschiedlicher Zusammensetzung zu den Zellen hinzugefügt und ebenfalls für 24 Stunden weiterkultiviert. Dabei waren die Zellen regelmäßig unter mikroskopischer Kontrolle, um mögliche zytotoxische Reaktionen der verschiedenen Stimulanzen rechtzeitig erkennen zu können. Nach der Stimulation wurde die Aktivität der Renilla- und Firefly-Luziferase mittels des Dual-Luziferase Reporter Assay System (Promega) gemessen.

Plasmid DNA	Kontrollplasmid	Nanofectin
TOPFLASH 0,5 µg oder FOPFLASH 0,5 µg oder StAR 0,5 µg oder pT81 0,5 µg	pRL-TK 0,1 µg	1,92 µl

Tabelle 2.4.2.1 Transfektionsansatz pro Well. Je nach Experiment mit TOPFLASH, FOPFLASH, StAR bzw. pT81 mit zusätzlich zugefügtem Kontrollplasmid und Nanofectin.

2.4.3 Stimulationsmedium

Um ein möglichst breites Spektrum an Signalwegen zu überprüfen, wurden zahlreiche Stimulanzen und Inhibitoren verwendet. Als Kontrolle diente das der jeweiligen Zellreihe zugehörige Kulturmedium. Die Verdünnung des ECCM mit Kulturmedium zu 50 % ECCM wurde als Standardstimulationsmedium eingesetzt. Die zugefügten Substanzen wurden sowohl im Kulturmedium als auch im 50 % ECCM benutzt, um eine Zytotoxizität durch die Substanz selbst oder das Lösungsmedium auszuschließen.

Für die erste Versuchsreihe wurden die Wnt-Inhibitoren sFRP-1 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) und Dkk-1 (R&D Systems, Inc.) benutzt. sFRP-1 wurde als Konzentrationsreihe 1, 10, 25 und 50 ng/ml und Dkk-1 in der Konzentration 1 µg/ml verwendet.

Zur Analyse der Proteinkinasen-Signalwege wurden der Proteinkinase A-Inhibitor H98 10 µM (Calbiochem Merck, Darmstadt, Deutschland), der Proteinkinase B-Inhibitor Akt-Inhibitor-VIII 1 µM (Calbiochem) und der

Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid I 3 μM (Calbiochem) eingesetzt. Alle drei Inhibitoren wurden nach Herstellerprotokoll in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gelöst und verwendet.

Für weitere Experimente wurden außerdem noch folgende Substanzen benutzt: 20 μM Forskolin (Sigma-Aldrich), 50 μM Ly-294002 (Sigma-Aldrich) ein PI3-Kinase-Inhibitor, 50 μM Genistein (Sigma-Aldrich), ein Tyrosinkinase-Rezeptor Inhibitor, und U0126, ein MEK-Inhibitor (Promega, Madison, USA), in den Konzentrationen 5, 10 und 25 μM . Alle vier Substanzen wurden nach Herstelleranweisung in DMSO gelöst und in den Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

Der in DMSO gelöste bFGF-Inhibitor Su5402 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 22 μM benutzt. Zusätzlich wurde humanes bFGF 1 ng/ml und 10 ng/ml (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) gelöst in Kulturmedium, als Stimulationsmedium verwendet.

2.4.4 Messung und Auswertung der Luziferaseaktivität

Zur Auswertung der Transfektionen wurde das Dual-Luziferase Reporter Assay System (Promega) verwendet. Nach 24 Stunden Stimulationszeit im Inkubator wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden pro Well 100 μl eines speziellen passiven Lysepuffers des Assay Systems hinzugefügt und die Zellen für 15 Minuten auf einer Schüttelplattform bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Lysepuffer soll zu einer verminderten Hintergrund-Autolumineszenz führen. Die Messungen wurden mit einem Lumat LB 9507-Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden 25 μl Substrat (Luziferase Assay Reagenz II, LAR II) vorgelegt und zusammen mit 5 μl der Zellysatprobe hinsichtlich der Firefly-Luziferase-Aktivität untersucht. Um im nächsten Schritt die Aktivität der Renilla-Luziferase des pRL-TK Plasmids zu messen, wurden 25 μl der Stopplösung (Stop & Glo Reagenz) hinzugefügt und abermals gemessen. Für die weitere Auswertung wurde die

relative Luziferaseaktivität als Quotient aus der Firefly- und der Renilla-Luziferase verwendet.

Jede Experimentreihe wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Zu jedem Stimulationsansatz gab es Triplikate und der daraus erhaltene Mittelwert der relativen Luziferaseaktivität wurde für weitere Berechnungen herangezogen. Nach Überprüfung einer Normalverteilung durch den Kolmogorow-Smirnow-Test mit Dallal-Wilkinson-Lilliefors-Korrektur wurde ein *t*-Test, je nach Standardabweichungen mit oder ohne Welchs-Korrektur durchgeführt. Alternativ wurde der ANOVA (*analysis of variance*)-Test mit Bonferroni-Korrektur eingesetzt. Zur statistischen Berechnung wurde das Graph Pad Prism 4.1 (San Diego, Californien, USA) benutzt.

2.5 Analysen mittels Westernblot-Technik

2.5.1 Verwendete Antikörper

Für weiterführende Experimente wurde die Westernblot-Technik durchgeführt. Um eine Aussage zum Beta-Catenin-Haushalt auf Proteinebene machen zu können, wurde ein β -Catenin (6B3) Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) eingesetzt. Er besitzt ein Molekulargewicht von 92 kDa und wurde im Verhältnis 1:1.000 benutzt, um das totale humane Beta-Catenin darstellen zu können.

Als Positivkontrolle wurde monoklonales Anti- β -Actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aus der Maus im Verhältnis 1:1.000 mit einem Molekulargewicht von 42 kDa eingesetzt. Der Antikörper detektiert unter anderem humanes β -Actin, welches sich in fast allen Körperzellen befindet.

Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler biotinylierter Multi-Link-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) benutzt, der mit Primärantikörpern aus Ziege, Maus und Kaninchen reagiert. Der Antikörper stammt vom Schwein und wurde im Verhältnis 1:5.000 verwendet.

2.5.2 Kernelution und Proteingewinnung

Um eine Aussage zu der Beta-Catenin-Translokation und deren Beeinflussung machen zu können, wurde eine Kernelution mittels speziellen Lysepuffern durchgeführt.

Die NCI-H295R Nebennierenrindenzellen wurden in 24-Well Platten mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well ausgesät und für 24 Stunden bis zu einer Konfluenz von > 70 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden stimuliert. In den Stimulationsansätzen befand sich Kulturmedium als Basalmedium, Endothelzell stimuliertes Medium (ECCM) mit Kulturmedium im Verhältnis 1:1 und 50 % ECCM mit Inhibitoren versetzt. Bei den Inhibitoren handelte es sich um 50 µM Ly-294002 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), einen PI3-Kinase-Inhibitor, und um 25 µM U0126 (Promega, Madison, USA), einen MEK-Inhibitor. Nach der Stimulationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (Phosphate Buffered Saline, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurde 100 µl/Well Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) hinzugefügt und für 5 Minuten zur Ablösung der adhärenen Zellen inkubiert. Die gelösten Zellen wurden bei 1.400 rpm, 4° C für 5 Minuten zentrifugiert und schließlich das Zellpellet mit 10-15° C kaltem PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1.400 rpm, 4° C für 5 Minuten wurde das PBS abpipettiert und das Zellpellet mit 50 µl Niedrigsalz-Lysepuffer mit Phosphatase-Inhibitor (Calbiochem Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:10 und Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:100 versetzt, resuspendiert. Der verwendete Niedrigsalzpuffer bestand aus 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, Sigma Aldrich), 10 mM KCl (Kaliumchlorid, Merck) und 0,1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat, Sigma-Aldrich), gelöst in destilliertem Wasser (Demi Wasser, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken-Scheidt, Deutschland) pH 7,9. Die mit Niedrigsalzpuffer versetzten Zellen wurden für 10 Minuten eisgekühlt. Anschließend wurden 2,5 µl 1 % Nonident P40 (Biomol, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit die zytosolische Membran durchlässig wurde und somit die Proteine des Cytoplasmas in gelöster Form vorlagen. Damit die Zellen

gleichmäßig von dem Niedrigsalzpuffer und Nonident P40 umgeben waren, wurden die Zellen für 25 Sekunden auf einem Vortex-Apparat vermischt und anschließend bei 1.100 rpm und 4° C für 2 Minuten zentrifugiert. Der dann entstandene Überstand wurde bis zur Proteinkonzentrationsanalyse durch das BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) bei -80°C eingefroren und schließlich mittels Westenblot Technik analysiert (s. 5.4.). Das zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 100 µl Niedrigsalzpuffer gewaschen und erneut bei 1.400 rpm, 4° C für 2 Minuten zentrifugiert.

Um nun die Proteine des Zellkerns aus den Zellresten auswaschen zu können, wurden sie mit 50 µl eines Hochsalzpuffers vermischt, der ebenfalls mit Phosphatase-Inhibitor im Verhältnis 1:10 und mit Protease Inhibitor Cocktail im Verhältnis 1:100 versetzt war. Zur Herstellung des Hochsalzpuffers wurden 20 mM HEPES, 0,4 M NaCl (Natriumchlorid, Merck) und 0,1 mM EDTA in destilliertem Wasser gelöst. Die Zellen und der Hochsalzpuffer wurden für 20 Minuten auf der Schüttelplattform bei 4° C vermischt und anschließend wieder bei 4.500 rpm und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert, um alle Zellreste von den nukleären Proteinen abzutrennen. Der anschließend gewonnene Überstand mit gelösten Proteinen aus dem Zellkern wurde ebenfalls bei -80° C, bis zur weiteren Analyse und Nutzung im Westernblot eingefroren.

Zur Analyse der Proteinkonzentration wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, USA) eingesetzt. Dabei wird die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine und der einsetzende Farbumschlag ausgenutzt, der bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Zunächst wurden die Standardkalibrierungsproben nach Angaben des Herstellers zubereitet und je 10 µl von einer Kalibrierungsprobe in 2 Wells der ELISA-Platte (Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert. Anschließend wurden von den zu analysierenden Proben auch jeweils 10 µl in je 2 Wells eingefüllt. Für den BCA-Test wurde pro Well 200 µl Reagenz hinzugegeben, die ELISA-Platte für 30 Sekunden auf ein Schüttelgerät gestellt und anschließend für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Das zugefügte Reagenz bestand aus einem Bicinchoninsäure-Gemisch und Kupfersulfat im Verhältnis 50:1. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben in der ELISA-Platte photometrisch gemessen (Sunrise Remote, Tecan, Grödling, Österreich) und anhand der Kalibrierungskurve

quantifiziert. Anschließend wurden die Proteinproben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5.3 Westernblot nach Lämmli

2.5.3.1 Gelelektrophorese

Um die im vorherigen Schritt beschriebenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu unterteilen, mussten die Proteine zunächst in einem Trenngel in Proteinbanden aufgetrennt werden.

Als erstes wurde ein Trenngel erstellt und zwischen zwei abgedichtete Glasscheiben gegossen. Nach einem Polymerisationsvorgang von 45 Minuten, wurde ein Sammelgel über das Trenngel geschichtet, ein Kamm zur Taschenbildung für die Proteinproben eingesetzt und erneut für 45 Minuten der Polymerisationvorgang abgewartet.

Das verwendete 10 %-Trenngel wurde in einem 5 ml-Ansatz pro Gel hergestellt. Dabei wurden 2,0 ml destilliertes Wasser (Demi Wasser, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken-Scheidt, Deutschland), 1,7 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 1,3 ml 1,5 molares Tris-HCl pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 0,05 ml 10 % SDS (*Lauryl sulfat sodium salt*, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland), 25 μl 10% APS (Ammoniumpersulfat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und zum Schluss 2,5 μl TEMED (Tetramethylethyldiamin, Sigma-Aldrich) verwendet. Das TEMED führt zur Verstärkung der Polymerisation von Acrylamid/Bisacrylamid, indem es die Bindung von freien Radikalen des Polymerisationsinitiators Ammoniumpersulfat katalysiert. Für die Herstellung der 1,5 molaren Tris-HCl-Lösung wurde 27,23 g Tris-Base (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 80 ml destilliertem Wasser vermischt, mittels Salzsäure der pH-Wert eingestellt (pH 330, WTW, Weilheim, Deutschland) und anschließend auf 150 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Bei der Herstellung von 10 % SDS wurden 10 g SDS in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für das verwendete 5 %-Sammelgel wurde ein 2 ml-Ansatz pro Gel verwendet. Dafür wurde 1,14 ml destilliertes Wasser zusammen mit 0,34 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,5 ml 0,5 molares Tris-HCl pH 6,8, 0,02 ml 10 % SDS, 10 µl 10 % APS und 2 µl TEMED vermischt. Die hierbei verwendete 0,5 molare Tris-HCl-Lösung wurde aus 6 g Tris-Base, gelöst in 60 ml destilliertem Wasser, hergestellt. Anschließend wurde durch Salzsäure-Zugabe der pH-Wert auf 6,8 eingestellt, mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und schließlich bei 4°C gelagert.

Nun wurden die Gele mit dem Laufpuffer in eine Elektrophorese-Apparatur (Mini-PROTEAN 3 Cell, Biometra, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Zur Zubereitung des Laufpuffers wurde 3,03 g Tris-Base mit 14,4 g Glycine (Sigma-Aldrich) und 1,0 g SDS in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und bei 4° C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und für 4 Minuten bei 95° C auf dem Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erhitzt. Der Probenpufferansatz bestand aus 3,55 ml destilliertem Wasser mit 1,25 ml 0,5 molarem Tris-HCl, 2,5 ml Glycerol (Sigma-Aldrich), 2,0 ml 10 % SDS und 0,2 ml 0,5 % Bromphenolblau (Merck). Vor einem Experiment wurde der Probenpuffer frisch angesetzt und 950 µl Probenpuffer mit 50 µl β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) versetzt, das Disulfidbrücken in den Proteinen reduziert und dadurch zur Denaturierung der Proteine beiträgt.

Vorab wurde berechnet, wie viel Mikroliter der Proteinlösung benötigt werden, damit pro Probe 50 µg des Proteingemisches aufgetrennt werden. Diese Probe wurde dann mit Zelllyse-Puffer (Sigma Aldrich) auf 10 µl aufgefüllt und anschließend mit 10 µl *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad Laboratories) versetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe entstand. Mithilfe dieses Standards konnte die Qualität der Elektrophorese beurteilt und die gesuchten Proteine schneller lokalisiert werden. Die Negativkontrolle, um Verunreinigen auszuschließen, bestand aus 10 µl Zelllyse-Puffer (Sigma Aldrich) und 10 µl *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad Laboratories). Nach dem Einfüllen der Proben in die Geltaschen wurde an die Elektrophorese-Apparatur für ca. 90 Minuten eine Spannung von 90 V angelegt, um die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Größe elektrophoretisch aufzutrennen.

2.5.3.2 Blotting

Nachdem die Proteine des Probengemisches elektrophoretisch in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, begann der Transfer mittels *Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories). Zunächst wurde Filterpapier (Bio-Rad) in Elektrodenpuffer getränkt und die ECL-Nitrocellulose-Transfermembran (Whatman, Dassel, Deutschland) in destilliertem Wasser (Demi Wasser, Otto Fischer GmbH) inkubiert. Der Elektrodenpuffer bestand aus 2,9 g Glycin (Sigma-Aldrich), 5,8 g Tris-Base (Merck), 3,7 ml 10 % SDS (*Lauryl sulfat sodium salt*, Merck-Schuchardt) und 200 ml Methanol (Merck) auf einen Liter mit destilliertem Wasser (Otto Fischer GmbH) aufgefüllt. Nun wurden auf die Graphit-Anode sechs getränkte Filterpapiere, die ECL-Membran und anschließend luftblasenfrei das SDS-Gel aufgebracht. Um das Gel weiterhin zu befeuchten, wurden noch einmal sechs getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt, festgewalzt und die Blotting-Zelle mit der Kathode verschlossen (Abb. 2.5.3.2.1).

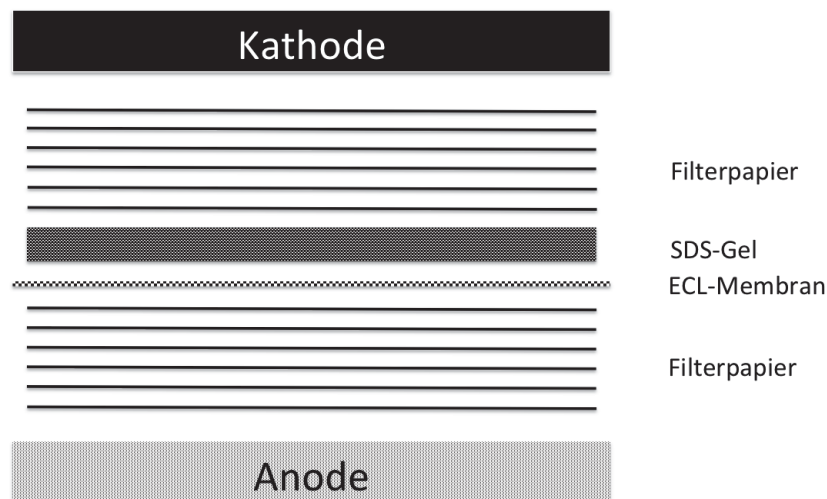


Abb. 2.5.3.2.1 **Anordnungsschema in der Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell** (Bio-Rad Laboratories). Das SDS-Gel und die ECL-Membran wurden zwischen je 6 feuchten Filterpapieren auf die Graphit-Anode platziert und von der Kathode verschlossen.

Der anzulegende Strom richtete sich nach der Fläche der Membran, nämlich $0,8 \text{ mA/cm}^2$, also 47 mA pro Gel bzw. Membran für 120 Minuten. Anschließend wurden die Membranen für die Immunreaktion vorbereitet.

2.5.3.3 Immunreaktion und Messung

Nach der irreversiblen Fixierung der Proteine an der ECL-Membran wurde diese für die Immunreaktion vorbereitet. Alle folgenden Schritte wurden stets auf einer Schüttelplattform durchgeführt.

Zunächst wurde zur Verhinderung der Bindung von Antikörpern an freien Bindungsstellen auf der Membran ein Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben. Der Blockpuffer setzte sich zusammen aus 5 % bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) und 0,5 % Magermilchpulver (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), gelöst in TBS. Dieses bestand aus 0,1 molarem Tris/HCl (Sigma-Aldrich) mit 0,9 % Natriumchlorid (Merck) bei einem pH von 7,5.

Für die Bindung des Primärantikörpers wurde der Antikörper im Verhältnis 1:1.000 in Verdünnungspuffer gelöst, der Blockpuffer von der Membran abgegossen und die Antikörperlösung direkt zur Membran gegeben. Nun wurde der Antikörper über Nacht bei 4° C gleichmäßig auf der Membran verteilt, so dass er an den Proteinbanden binden konnte. Der verwendete Verdünnungspuffer bestand aus 0,5 % BSA und 0,5 % Magermilchpulver, ebenfalls gelöst in TBS. Im nächsten Schritt wurde die Primärantikörperlösung abgeschüttet und TBS-Waschpuffer für 5 Minuten zu der Membran gegeben. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, um alle Reste von unspezifisch gebundenen Antikörpern auszuwaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5.000 in Verdünnungspuffer, zur Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert, damit der sekundäre Antikörper nun an den primären Antikörper binden konnte. Nach 45 Minuten wurde der oben beschriebene Waschschrift dreifach wiederholt und anschließend Streptavidin-HRP (*Horse radish peroxidase*, Jackson Immuno Research, Suffolk, Großbritannien) für 30 Minuten auf die Membran gegeben, welches 1:10.000 in Verdünnungspuffer gelöst war. Auch das ungebundene Streptavidin-HRP wurde durch eine dreifache Wiederholung des Waschens mit TBS-Waschpuffer wieder ausgewaschen. Das an die biotinylierten Primär-/Sekundärantikörperkomplexe gebundene Streptavidin-HRP katalysierte die zu detektierende Lumineszenzreaktion. Nun wurde die Membran für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Amersham ECL (*Enhanced chemiluminescence*) plus

Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) nach Hersteller-Anweisung versetzt. Dabei wurde durch die Zugabe der ECL-Reagenzien eine Oxidation von Acridan, katalysiert durch HRP und Peroxid, ausgelöst. Bei der Oxidation entstanden Acridinium-Ester, welche durch Reaktion mit Peroxid ein Chemilumineszenz-Signal aussenden. Die Messung dieses Signals erfolgte durch eine Filmaufnahme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) mit 60 Sekunden Belichtungszeit und anschließender Filmentwicklung im Curix 60 (AGFA, Belgien).

2.6 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Analyse der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)-Konzentration in ECCM*

2.6.1 *Humanes bFGF ELISA Kit* (Ray Biotech, Norcross, USA)

Das bFGF-Kit von Ray Biotech besteht aus einer 96-Well Platte, deren Boden mit einem spezialisiertem Antikörper gegen humanes bFGF beschichtet ist. Somit ist es möglich, gelöstes bFGF aus Serum, Plasma, Urin oder wie in dem hier gewählten Fall Überstände der Zellkultur nach Anleitung der Hersteller zu analysieren. Dabei wurde zunächst der Zellkulturüberstand auf die mit Antikörper beschichteten Wells gegeben, so dass im Überstand gelöstes bFGF binden konnte. Anschließend wurden unspezifisch gebundene oder ungebundene Substanzen ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde biotinyliertes anti-humanes-bFGF hinzugefügt das an dem Antikörper-/bFGF-Komplex binden konnte. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Nun wurde Streptavidin HRP (*horse radish peroxidase*) dazugegeben, das die folgende Enzymreaktion katalysierte. Nach Zugabe des Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrates kam es durch eine Peroxidase-getriggerte Oxidation von TMB zu einem blauen Farbumschlag. Um diese Reaktion abzustoppen und zu stabilisieren, wurde 2-molare Schwefelsäure hinzugefügt, so dass es zu einer Gelbfärbung kam, deren Intensität bei 450 nm photometrisch quantifiziert werden konnte.

2.6.2 Ablauf

Sofern nicht anders beschrieben befanden sich alle verwendeten Substanzen im oben beschriebenen Human bFGF ELISA Kit. Um die gemessenen Farbumschläge quantifizieren zu können, wurde zunächst ein Standard mit humanem bFGF hergestellt. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von 0 pg/ml bis 10.000 pg/ml angesetzt.

Alle Substanzen bei diesem Experiment wurden auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Proben wurden in je zwei Wells verteilt, um einen statistischen Mittelwert bilden zu können. Zunächst wurden je 100 µl der Standardproben und der zu analysierenden Proben in die 96-Well-Platte pipetiert und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den zu analysierenden Proben handelte es sich um eine Verdünnungsreihe von Endothelzell-konditioniertem Medium (ECCM) mit Konzentrationen an ECCM von 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 65 %, 75 % und 100 %, wobei die Verdünnung mittels Basalzellmedium der NCI-H295R Zellen (s. 1.2.) hergestellt wurde.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben entfernt und die verbleibenden Reste in vier Waschschritten mit je 300 µl Waschpuffer pro Well ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl verdünnter biotinylierter anti-humaner bFGF Antikörper pro Well hinzugefügt und für eine Stunde auf der Schüttelplattform inkubiert. Danach folgte ein weiterer vierfacher Waschschrift, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Das ebenfalls verdünnte HRP-Streptavidin wurde mit je 100 µl pro Well für 45 Minuten hinzugefügt und auf der Schüttelplattform inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift analog zu dem oben beschriebenen. Der folgende Inkubationsschritt von 30 Minuten und der Farbumschlag durch 100 µl TMB pro Well wurde im Dunklen durchgeführt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 molarer Schwefelsäure pro Well abgestoppt. Nun wurde die unterschiedliche Absorption und damit die Intensität bei 450 nm photometrisch gemessen (Sunrise Remote, Tecan, Grödling, Österreich). Anhand der Kalibrationskurve konnte die Konzentration der ECCM-Verdünnungsreihe quantifiziert werden. Dieses Experiment wurde unabhängig voneinander mit je zwei Wells pro Probe durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus den Mittelwerten der Experimente berechnet.

2.7 Qualitative *Polymerase chain reaction* (PCR)-Analysen

2.7.1 RNA-Extraktion aus HUVECs und NCI-H295R Zellen

Um die RNA der zu vergleichenden Zellreihen NCI-H295R Zellen und HUVECs zu extrahieren, wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Dabei wurde die Bindung der RNA an einer Kieselgelmembran genutzt. Zunächst wurden die Zellen in 24-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, bis die Zellen adhärent und konfluent gewachsen waren. Nach Entfernung des Kulturmediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen pro Well mit 350 μ l eines speziellen Lysepuffers (RLT) versetzt, welcher aus Guanidinthiocyanat und β -Mercaptoethanol zur Inaktivierung von RNasen bestand. Anschließend wurden die Zelllysate zur Homogenisierung in einen Qiashredder (Qiagen) pipettiert und schließlich für zwei Minuten bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde dem Zelllysate 350 μ l 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt, um die Bindungsfähigkeit der RNA an der Kieselgelmembran zu erhöhen. Das Zelllysate konnte dann auf die Qiagen RNeasy-Säule aufgetragen und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert werden. Anschließend erfolgten drei Waschschrte, so dass am Ende ausschließlich reine RNA an der Kieselgelmembran haften blieb. Zunächst wurde 700 μ l RW-1 Puffer auf die Säule aufgetragen und ebenfalls bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die nächsten Waschschrte wurden mit je 500 μ l RPE Puffer durchgeführt und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert, wobei nach dem zweiten Waschschrte die Zentrifugation zwei Minuten dauerte, damit die Kieselgelmembran trocknen konnte. Zur RNA-Gewinnung wurde schließlich 50 μ l RNase freies Wasser auf die Membran gegeben und bei 10.000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert.

Um die eluierte RNA nutzen zu können, wurde die Konzentration photometrisch (Biophotometer 6131, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 260 nm bestimmt. Die eluierte RNA wurde dann der cDNA-Synthese zugeführt.

2.7.2 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) durchgeführt. Das dem Kit beigefügte Reaktionsreagenz besteht aus einem Salzpuffer, Deoxynukleotiden, *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor, RNase- und DNase freies Serumalbumin und Not I-d(T)₁₈ Primer. Den Hersteller-Anweisungen folgend wurden zunächst 500 ng RNA der NCI-H295R Zellen und der HUVECs in 33 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gelöst und für 5 Minuten bei 65° C inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Lösung in einem Wasserbad bei 37° C für 5 Minuten abgekühlt und gleichzeitig das Reaktionsreagenz für 5 Minuten bei 37° C vorgewärmt.

Nun wurde die RNA-Lösung zu dem Reaktionsreagenz hinzugefügt und beides zusammen noch einmal für 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Schließlich wurde das Gemisch bei 37° C für 60 Minuten inkubiert, damit nach Bindung der Primer die reverse Transkription der RNA zu cDNA vollzogen werden konnte. Anschließend wurde die neu erstellte cDNA direkt zur PCR-Amplifikation benutzt.

2.7.3 PCR

Die verwendeten Primer (Tabelle 2.7.3.1) wurden von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) nach den Angaben von Colla *et al.* (Blood 2003) hergestellt. Als Kontrolle wurden β -Actin-Primer von Qiagen verwendet.

bFGF-Primer

forward	5'-GGCTTCTTCCTGCGCATCCAT-3'
reverse	5'-GGTAACGGTTAGCACACACTCCTTT-3'

Tabelle 2.7.3.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten bFGF Primer nach Colla et al. (Blood 2003).

Für die PCR-Analysen wurde das *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) benutzt. Der darin enthaltene Master Mix beinhaltet die HotStar Taq DNA-Polymerase, welche erst nach 15 Minuten bei 95°C enzymatisch aktiv wird und dadurch eine vorzeitige Amplifikation von falschen Produkten verhindert. Außerdem ist in dem Master Mix enthalten: Magnesiumchlorid und Deoxynukleotide, QuantiTect SYBR Green PCR Puffer für eine spezifischere Primer-Bindung in der Annealing Phase der PCR, zusätzlich auch SYBR Green I, das bei Bindung an doppelsträngige DNA-Moleküle fluoresziert, und ROX als passiver Referenzfarbstoff, der eine Basisfluoreszenz emittiert, damit die Werte der PCR normiert werden können. Um die PCR durchführen zu können, wurde ein Reaktionsansatz vorbereitet (Tabelle 2.7.3.2).

Reaktionsansatz	NCI-H295R	HUVEC	Kontrolle
10 µl Master Mix			
6,5 µl RNase-freies Wasser			+ 1,5 µl
1 µl forward-Primer (bFGF/Beta-Actin)	+ 1,5 µl cDNA	+ 1,5 µl cDNA	RNase- freies Wasser
1 µl reverse-Primer (bFGF/Beta-Actin)			

Tabelle 2.7.3.2 PCR-Reaktionsansatz pro Well mit bFGF-Primer und Beta-Actin-Primer als Positivkontrolle. Die cDNA von NCI-H295R-Zellen im Vergleich zu der von HUVECs, mit RNase freiem Wasser als Negativkontrolle.

Anschließend begann die Messung im *Step One Plus RT-PCR System* (AB Applied Biosystems, California, USA). Die cDNA wurde bei 95° C für 15 Sekunden denaturiert, danach folgte bei 55° C für 60 Sekunden die Annealing-Phase mit Anlagerung der Primer an die DNA. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 95° C für 15 Sekunden inkubiert. Dieses Experiment wurde mit einem Triplet-Ansatz durchgeführt, wobei die Ergebnisse in Relation zur Expression in NCI-H295R-Zellen dargestellt werden. Zur Berechnung der relativen Expression wurde der C_T (Cycle Threshold / Schwellenwert)-Wert der HUVEC- und der NCI-H295R-Zellen zueinander in Beziehung gesetzt. Der C_T -Wert kennzeichnet den Beginn der Amplifikationsphase, wenn die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschritten wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionsexperimente mit ECCM-Stimulation

Um die Auswirkungen der von Endothelzellen sezernierten Faktoren auf die Beta-Catenin vermittelte Transkription in Nebennierenrindenzellen zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit dem TOPFLASH-Plasmid durchgeführt, da dieses zusätzlich zu seiner Firefly-Luziferase-Sequenz multiple TCF/LEF-Bindungsstellen besitzt, die durch Beta-Catenin aktiviert werden.

Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription von 200 % bei 5 %-ECCM bis zu über 700 % bei 100 %-ECCM (Abb. 3.1.1) in NCI-H295R-Zellen.

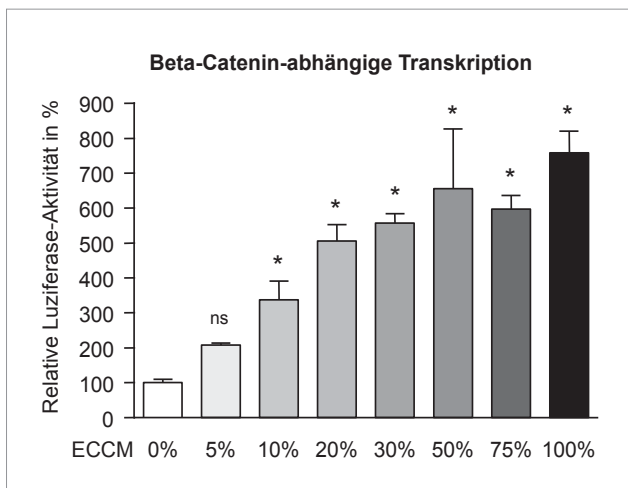


Abb. 3.1.1 **Konzentrationsabhängiger Anstieg der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch ECCM in NCI-H295R-Zellen.** Relative Luziferaseaktivität in Prozent der TOPFLASH Transfektion, bezogen auf die Kontrolle, der NCI-H295R-Zelllinie nach Stimulation der Zellen für 24 Stunden unter Standardbedingungen mit 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 %, 100 % ECCM. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch ECCM. Signifikanter Anstieg ab 10 %, berechnet aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels t-Test, ns : nicht signifikant, * : $p < 0,05$.

Außerdem wurden immortalisierte Nebennierenrindenzellen mit dem TOPFLASH-Plasmid transfiziert und ebenfalls für 24 Stunden mit ECCM stimuliert. Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription von 120 % bei 25 %-ECCM auf maximal über 200 % bei 75 %-ECCM (Abb. 3.1.2).

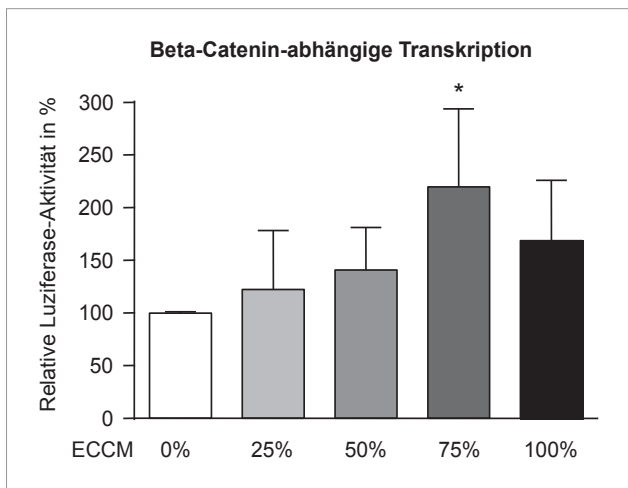


Abb. 3.1.2 **Konzentrationsabhängiger Anstieg der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch ECCM in immortalisierten Nebennierenrindenzellen.** Transfektion mit TOPFLASH und Stimulation der immortalisierten primären Nebennierenrindenzellen mit steigenden ECCM-Konzentrationen (0 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) für 24 Stunden unter Standardbedingungen, führte zu einem konzentrationsabhängigem Anstieg der relativen Luziferaseaktivität (hier dargestellt in %, bezogen auf die Kontrolle) mit einem signifikantem Maximum bei 75 %, berechnet aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels t-Test, * : $p < 0,05$.

3.2. Transfektionsexperimente mit Wnt-Signalweg-Inhibitoren und Hemmern der Proteinkinasen A, B und C

Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen ECCM und dem Wnt-Signalweg wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50 %-ECCM stimuliert, versetzt mit den Wnt-Inhibitoren sFRP-1 in steigender Konzentration und Dkk-1. Als Negativkontrolle wurde die Transfektion mit FOPFLASH durchgeführt. Die sFRP-1 Konzentrationsreihe von 1, 10, 25 und 50 ng/ml war nicht in der Lage, die Beta-Catenin-abhängige Transkription zu hemmen (Abb. 3.2.1).

Auch der Inhibitor Dkk-1 in der Konzentration 1 µg/ml führte zu keiner verminderten Luziferase-Aktivität in den Nebennierenrindenzellen (Abb. 3.2.2). Dadurch erscheint eine direkte Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalweges an der Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch ECCM unwahrscheinlich.

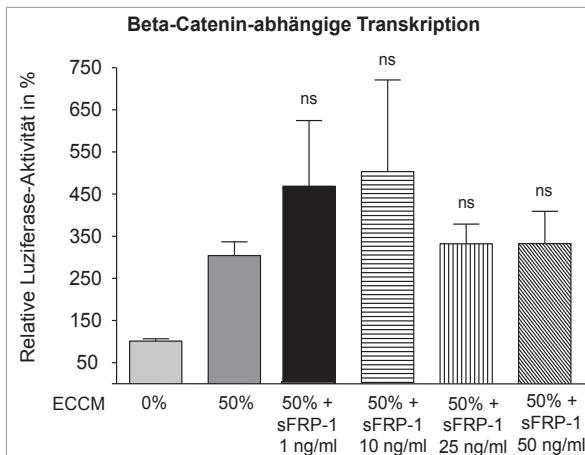


Abb. 3.2.1 Keine konzentrationsabhängige Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität durch sFRP-1. TOPFLASH-Transfektion von NCI-H295R-Zellen und Stimulation für je 24 Stunden. Die verwendeten Stimulations-medien bestehen aus 0 % und 50 % ECCM. Zusätzlich wurde sFRP-1 in den Konzentrationen 1, 10, 25 und 50 ng/ml zu 50 %-ECCM hinzugefügt. Es ist kein signifikanter Abfall der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch sFRP-1 gegenüber der Stimulation mit 50 % ECCM erkennbar. Die Berechnung wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten durch ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, ns : nicht signifikant.

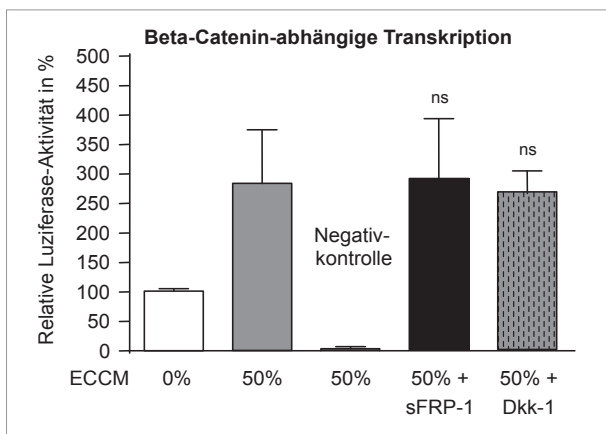


Abb. 3.2.2 Keine Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität durch sFRP-1 oder Dkk-1. NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit TOPFLASH und als Negativkontrolle mit FOPFLASH, wurden für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Stimulationsmedien enthielten 0 % ECCM, 50 % ECCM, 50% ECCM mit sFRP-1 (25 ng/ml) bzw. Dkk-1 (1 µg/ml). Die Inhibitoren sFRP-1 und Dkk-1 führten zu keiner signifikanten Hemmung der ECCM-angestimmten Stimulation der relativen Luciferaseaktivität. Die Berechnung wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten durch ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, ns : nicht signifikant.

Weitere Transfektionsexperimente zur Identifizierung der von Endothelzellen sezernierten Faktoren wurden mit Inhibitoren der Proteinkinasen A, B und C durchgeführt. Die Proteinkinase A wurde mittels H89 10 μ M inhibiert, Proteinkinase B mittels Akt-VIII-Inhibitor 1 μ M und Proteinkinase C mittels Bisindolylmaleimid I 3 μ M. Keiner der Inhibitoren konnte die Stimulation der Beta-Catenin abhängigen Transkription durch ECCM signifikant hemmen (Abb. 3.2.3).

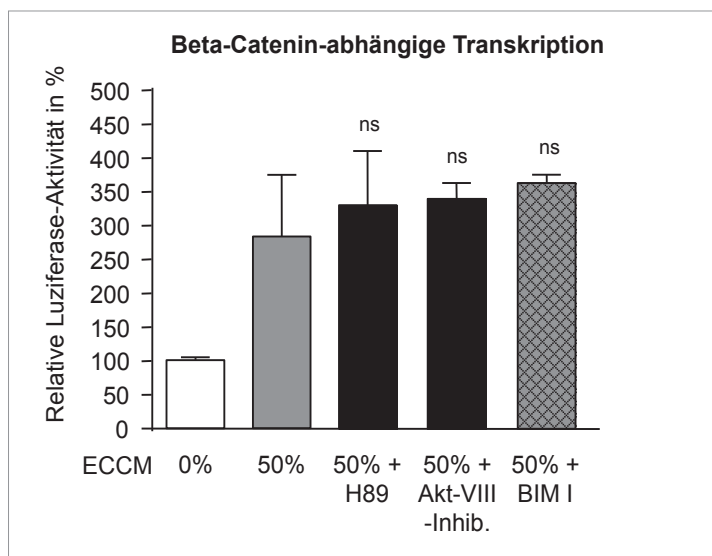


Abb. 3.2.3 Keine Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität durch Inhibitoren der PKA, PKB, PKC. Transfektion mit TOPFLASH und Stimulation der NCI-H295R-Zellen für 24 Stunden unter Standardbedingungen mit 0 % ECCM, 50 % ECCM und 50 % ECCM versetzt mit Inhibitoren der Proteinkinasen, Proteinkinase A-Inhibitor H89 (10 μ M), Proteinkinase B-Inhibitor Akt-VIII-Inhibitor (1 μ M) bzw. Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I, 3 μ M). Die Inhibitoren führten zu keiner signifikanten Hemmung der relativen Luciferaseaktivität gegenüber der Stimulation durch 50 % ECCM. Die Berechnung wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten durch ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, ns : nicht signifikant.

Zur besseren Kontrolle einer cAMP-abhängigen PKA-Aktivität wurden die NCI-H295R-Zellen mit dem pT81-Plasmid transfiziert, das CRE-Bindungsstellen aufweist. Die Zellen wurden mit Kontrollmedium, 50 % ECCM und als Positivkontrolle mit Forskolin inkubiert. Dabei kam es durch Forskolin zu einer Erhöhung der relativen CRE-Aktivität auf das 6-fache des Kontrollmediums. ECCM hingegen konnte die CRE-Aktivität und damit den cAMP-Spiegel im Rahmen des PKA-Signalweges nur minimal steigern (Abb. 3.2.4).

Somit scheinen die Signalwege der Proteinkinasen A, B und C nicht wesentlich an der Regulation der Beta-Catenin-Aktivität durch ECCM beteiligt zu sein.

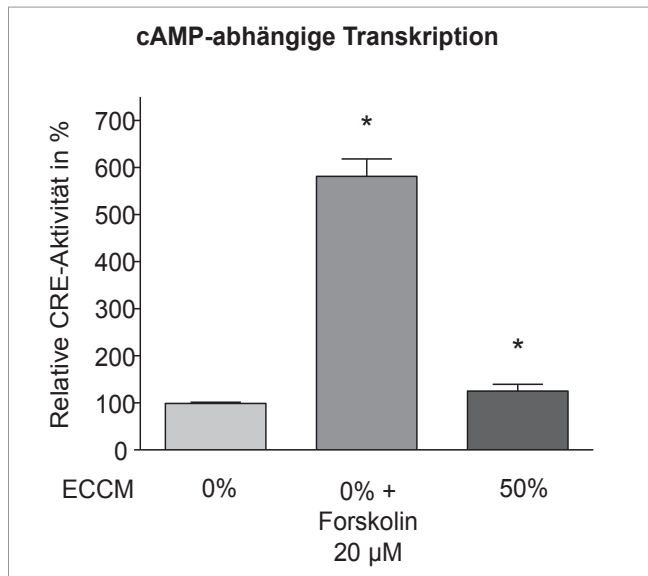


Abb. 3.2.4 Minimale Steigerung der cAMP-abhängigen Transkription durch ECCM. Transfektion mit pT81, anschließende Stimulation der NCI-H295R-Zellen mit 0 %, 50 % ECCM und Forskolin 20 µM. Anstieg der relativen CRE-Aktivität auf 600 % durch Forskolin und auf über 125 % durch 50 % ECCM. Die Signifikanzberechnung wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels t-Test durchgeführt, * : $p < 0,05$.

3.3 Identifizierung von Signalwegen, die bei der Regulation der Beta-Catenin-Aktivität involviert sind

Zur Charakterisierung weiterer, möglicherweise an der Beta-Catenin-Aktivierung beteiligter Signalwege wurden der MAP-Kinase-Inhibitor U0126, der PI3-Kinase-Inhibitor Ly-294002 bzw. Genistein als Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor verwendet. Es zeigte sich, dass alle drei Inhibitoren die ECCM-getriggerte Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription signifikant hemmen konnten. Der Inhibitor der MAP-Signalkaskade U0126 senkte die Transkriptionsrate dosisabhängig um 25 % (5 µM) bis 65 % (25 µM, Abb. 3.3.1). Der PI3-Kinase-Inhibitor und der RT-Kinase-Inhibitor konnten die relative Luziferaseaktivität ebenfalls um fast 60 % vermindern (Abb. 3.3.2).

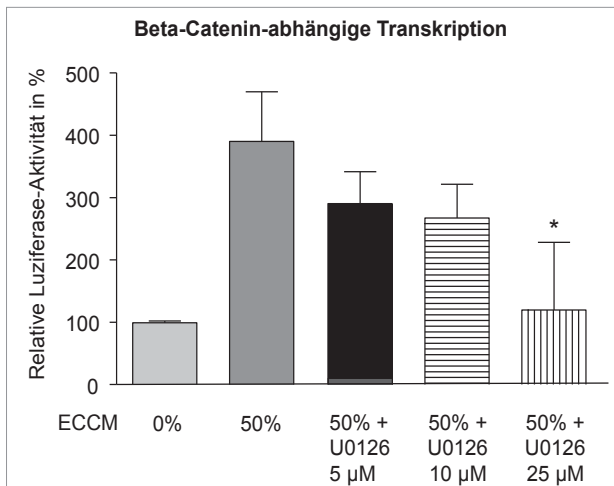


Abb. 3.3.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität durch MEK-Inhibitor U0126. NCI-H295R-Zellen wurden mit TOPFLASH transfiziert und für 24 Stunden unter Standardbedingungen mit 0 % ECCM oder 50 % ECCM stimuliert. Dem 50 % ECCM wurde U0126 in den Konzentrationen 5 µM, 10 µM bzw. 25 µM hinzugefügt. Es lässt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Beta-Catenin-abhängigen Transkription bei steigender U0126-Konzentration erkennen. Die Berechnung der Signifikanz wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels t-Test durchgeführt, * : $p < 0,05$.

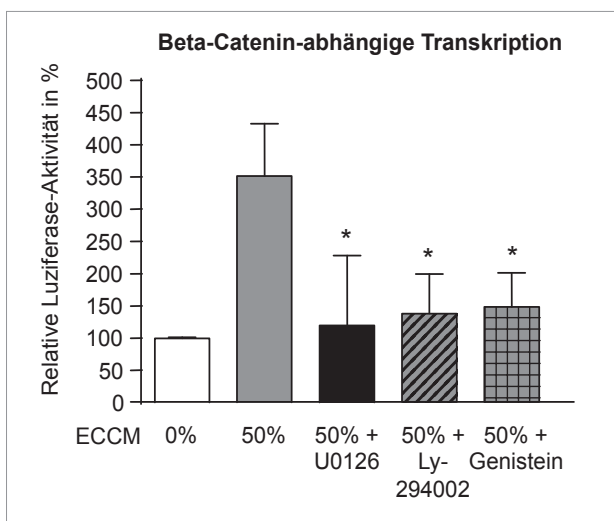


Abb. 3.3.2 Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität durch MEK-Inhibitor U0126, PI3-Kinase-Inhibitor Ly-294002 und Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Genistein. Transfektion der NCI-H295R-Zellen mit TOPFLASH und anschließende Stimulation für 24 Stunden mit 50 % ECCM, 50 % ECCM mit U0126 (25 µM), mit Ly-294002 (50 µM) bzw. mit Genistein (50 µM). Es zeigte sich eine signifikante Hemmung der relativen Luciferaseaktivität gegenüber der Stimulation durch 50 % ECCM, durch alle drei Inhibitoren. * : $p < 0,05$.

Die Inhibitoren wurden auch in einer Westernblot-Analyse, zum Nachweis einer Beeinflussung der Beta-Catenin-Aktivität auf Proteinebene, verwendet. Im Westernblot zeigte sich eine stärkere Proteinbande der Zellen nach ECCM-

Stimulation im Vergleich zum Basalmedium, sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion. Außerdem waren bei Koinkubation von 50 %-ECCM mit U0126 bzw. Ly-294002 eine Abnahme der Dichte der zytoplasmatischen und keine nukleären Beta-Catenin-Banden erkennbar (Abb.3.3.3). Diese Ergebnisse unterstützten die Transfektionsbefunde der Beta-Catenin-Aktivierung durch ECCM sowie der Hemmung dieser Stimulation durch Inhibitoren der MAP- und PI3-Kinase.

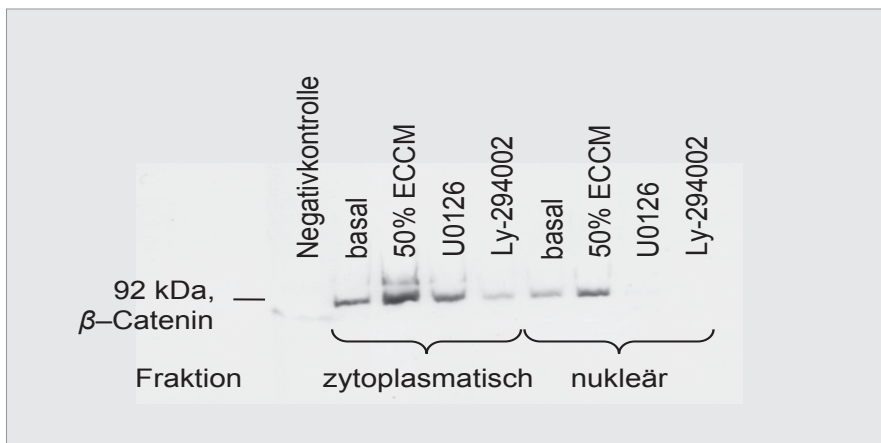


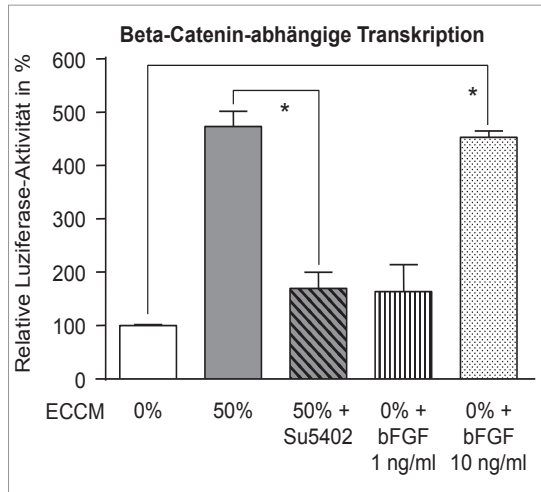
Abb. 3.3.3 Westernblotanalyse der zytoplasmatischen und nukleären Beta-Catenin-Fraktion bei 92 kDa aus NCI-H295R-Zellen. Die Zellen wurden vor der Analyse 24 Stunden mit Basalmedium, 50 %-ECCM, 50 %-ECCM mit MAPK-Inhibitor U0126 25 μ M und 50 %-ECCM mit PI3-Kinase-Inhibitor Ly-294002 50 μ M stimuliert. Die Proteinbanden nach ECCM-Stimulation besaßen eine höhere Dichte im Vergleich zum Basalmedium, sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. Es zeigten sich verminderte zytoplasmatische und keine nukleären Banden nach Inhibitor-Behandlung der Zellen.

3.4 Experimente zur Beteiligung des bFGF-Signalwegs an der Beta-Catenin-Aktivität

Zur Differenzierung der Rezeptortyrosinkinasen wurde die Beteiligung von bFGF untersucht. Nach Transfektion der Nebennierenrindenzellen wurden diese mit 50 % ECCM, 50 % ECCM mit dem bFGF-Inhibitor Su5402 (22 μ M) und in Kontrollmedium gelöstem bFGF in den Konzentrationen 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml stimuliert. Die photometrische Auswertung zeigte eine Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch bFGF 10 ng/ml auf über 450 %

im Vergleich zur Stimulation mit 50 % ECCM. Der stimulierende Effekt des ECCMs ließ sich durch den bFGF-Inhibitor um 60 % signifikant hemmen (Abb. 3.4.1A).

A



B

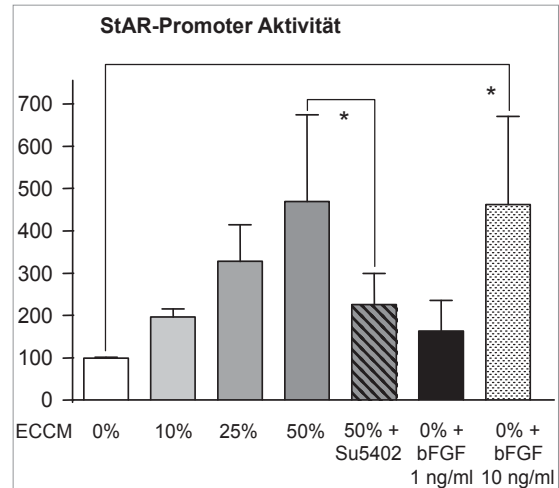


Abb. 3.4.1 **Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription und der StAR-Promoter-Aktivität durch bFGF und Hemmung durch bFGF-Inhibitor Su5402.** Transfektion der NCI-H295R-Zellen mit **A)** TOPFLASH und **B)** StAR-Plasmid und anschließende Stimulation der Zellen für 24 Stunden zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen **A)** der Beta-Catenin-Aktivität und dem bFGF-Signalweg und **B)** der Steroidogenese und dem bFGF-Signalweg. Stimulationsmedien enthielten **A)** 50 % ECCM oder **B)** 10 % ECCM, 25 % ECCM bzw. 50 % ECCM, außerdem 50 % ECCM mit bFGF-Inhibitor Su5402 (22 μ M), bFGF 1 ng/ml oder bFGF 10 ng/ml. Su5402 führte zu einer signifikanten Hemmung der relativen Luciferaseaktivität sowohl des TOPFLASH- als auch des StAR-Reporterplasmids. Zusätzlich stimulierte bFGF in einer Konzentration von 10 ng/ml in gleichem Maße die relative Luciferaseaktivität wie 50 % ECCM. Die Berechnung wurde aus den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten durch ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, * : $p < 0,05$.

Auch der Schlüsselschritt der Steroidogenese, die StAR-Transkription, wurde durch ECCM und bFGF beeinflusst. Transfektionsexperimente der NCI-H295R-Zelllinie mit einem StAR-Plasmid, das eine Luciferase-Sequenz beinhaltet, zeigten eine Steigerung der StAR-Promoter-Aktivität bei Stimulation der Zellen für 24 Stunden mit bFGF und ECCM mit und ohne Inhibitor. Bei 10 % ECCM kam es bereits zu einer Verdopplung und bei Stimulation mit 50 % ECCM zeigte sich eine Erhöhung der Promoteraktivität auf das 4-fache. Dieser Effekt konnte durch eine bFGF-Konzentration von 10 ng/ml simuliert werden. Die Stimulation der Promoteraktivität durch 50 % ECCM ließ sich ebenfalls signifikant durch

den bFGF-Inhibitor Su5402 (22 μ M) von über 450 % auf etwa 250 % hemmen (Abb. 3.4.1B).

Zur Quantifizierung der bFGF-Konzentration wurde das ECCM mittels ELISA untersucht. Es konnte ein Anstieg der bFGF-Konzentration in Abhängigkeit der Konzentration des ECCMs von 450 pg/ml bei 10 % bis hin zu einer Konzentration von über 1500 pg/ml bei 100 % festgestellt werden (Abb.3.4.2.A), so dass davon ausgegangen werden kann, dass bFGF durch HUVECs in das ECCM sezerniert wird.

A

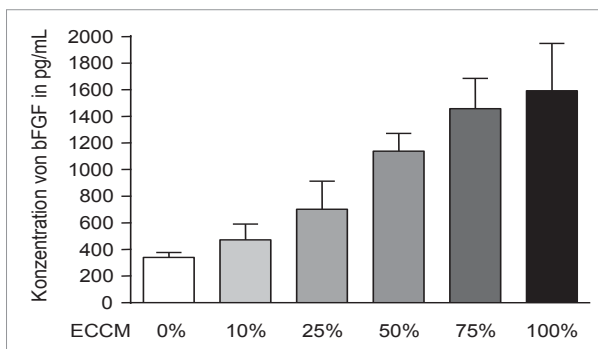


Abb. 3.4.2A bFGF Konzentration steigt in Abhängigkeit von der ECCM Konzentration. Die quantitative ELISA-Analysen der bFGF-Konzentrationen in 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % bzw. 100 % ECCM wurde in unabhängigen Experimenten durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei einer höheren Konzentration des ECCMs die Konzentration an bFGF anstieg. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus den Mittelwerten der Experimente berechnet.

B

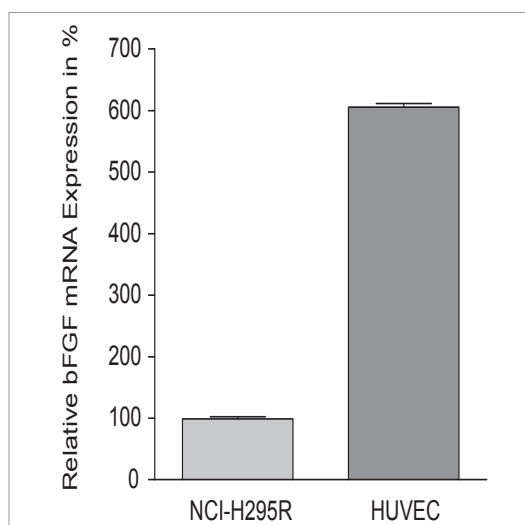


Abb. 3.4.2B RT-PCR-Analyse der bFGF-mRNA-Expression in HUVECs im Vergleich zu NCI-H295R-Zellen. Es zeigte sich eine 6-fach höhere bFGF-mRNA-Expression in HUVECs. Zur Berechnung der relativen Expression wurde der C_T (Cycle Threshold / Schwellenwert)-Wert der HUVEC- und der NCI-H295R-Zellen zueinander in Beziehung gesetzt.

Zur Analyse der bFGF-RNA-Expression in HUVECs wurden RT-PCR-Experimente mit bFGF-Primern durchgeführt. Zum Vergleich wurde die extrahierte RNA aus den HUVECs mit der aus den NCI-H295R-Zellen verglichen. Dabei zeigte sich eine 6-fach höhere bFGF-mRNA-Expression in HUVECS als in Nebennierenrindenzellen (Abb.3.4.3).

4 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der regulatorischen Wirkung von Endothelzell-konditioniertem Medium auf die Beta-Catenin-Aktivität in einem *in vitro*-Modell adrenokortikaler Zellen.

Die Nebennierenrinde des menschlichen Körpers wird mit 5 ml/min durchlutet (Vrezas *et al.* Adrenal Disease and Function, Adrenal Cortex, Development, Anatomy, Physiology Chapter 1 in Endotext.org) und beinahe jede Nebennierenrindenzelle ist mit einer Endothelzelle verbunden (Ehrhart-Bornstein *et al.* Endocr Rev 1998). Es sind bereits einige Effekte Endothelzell-sezernierter Faktoren auf die Nebenniere bekannt, wie die Stimulation der Synthese von Aldosteron bzw. Cortisol (Willenberg *et al.* Horm Metab Res 2008). Endothelzell-sezernierte Faktoren beeinflussen aber auch die Organogenese der Nebenniere, zum Beispiel durch Regulation von SF-1 und CITED2 (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2007; Haase *et al.* Cell Tissue Res 2009). Da eine veränderte Beta-Catenin-Aktivität auch zu einer Nebennierenaplasie im *in vivo*-Mausmodell führt (Kim *et al.* Development 2008) und Beta-Catenin darüberhinaus ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese der Nebenniere ist (Tissier *et al.* Cancer Res 2005; Berthon *et al.* Hum Mol Genet 2010; Tadjine *et al.* Clin Endocrinol 2008; Gaujoux *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2008; Ragazzon *et al.* Cancer Res 2010; Übersicht in Schinner *et al.* Eur J Endocrinol 2009 bzw. in Berthon *et al.* Mol Cell Endocrinol 2011), widmet sich diese Arbeit den Zusammenhängen und Signalwegen, die durch Endothelzell-sezernierte Faktoren die Regulation der Beta-Catenin-Aktivität in Nebennierenrindenzellen beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass von Endothelzellen sezernierte Faktoren zu einer Aktivierung von Beta-Catenin in humanen Nebennierenrindenzellen führen. Endothelzell-konditioniertes Medium regulierte die Beta-Catenin-abhängige Transkription wie folgt: ECCM steigerte konzentrationsabhängig die Beta-Catenin-abhängige Transkription. Zusätzlich ließ sich mittels Westernblot eine höhere Proteinkonzentration und eine vermehrte nukleäre Translokation an Beta-Catenin in den Nebennierenrindenzellen nachweisen, die mit ECCM stimuliert wurden. Bei der verwendeten Zelllinie, NCI-H295R, liegt zwar eine konstitutive Aktivierung des

Beta-Catenins vor (Doghman *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2008), was sich auch in unseren Experimenten bestätigte, dennoch führte die Inkubation von Nebennierenrindenzellen mit ECCM zu einer zusätzlichen signifikanten Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription auf über 700%. Außerdem bestätigte sich diese Stimulation auch in einem Modell immortalisierter Nebennierenrindenzellen ohne konstitutive Aktivierung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription.

Häufig sind Pathologien der Nebenniere, vor allem die Tumorgenese, mit einer Veränderung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs assoziiert, und das sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern (Tissier *et al.* Cancer Res 2005; Ragazzon *et al.* Cancer Res 2010; Übersicht Berthon *et al.* Mol Cell Endocrinol 2011; Durand *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2011; Leal *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2011). Die Aktivierung des Wnt/Beta-Catenin-Signalwegs besitzt beim Nebennierenrindenzellkarzinom sogar eine prognostische Aussagekraft (Gaujoux *et al.* Clin Cancer Res 2011).

In unseren Experimenten zeigte sich nun, dass die ECCM-Stimulation zwar zu einer Aktivierung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription führt, diese allerdings unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg verläuft. Weder sFRP-1, noch Dkk-1 waren in der Lage, die ECCM-abhängige Beta-Catenin-Aktivität zu hemmen.

Die Steroidogenese der Nebenniere lässt sich – wie oben bereits beschrieben – durch ECCM stimulieren. Studien zu den Signalwegen, die eine Stimulation der Aldosteronsekretion auslösen können, gaben vorläufige Hinweise auf einen cAMP-abhängigen, aber Proteinkinase A-unabhängigen Signalweg (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009).

Die Untersuchungen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Regulation der Beta-Catenin-Aktivität und den Proteinkinasen A, B und C und der Regulation ihrer Signalwege durch ECCM legen den Schluß nahe, daß mit Ausnahme einer minimalen Steigerung der CRE-Promoteraktivität, die Proteinkinasen A, B und C nicht wesentlich in den Prozeß involviert sind.

Die durch ECCM stimulierte CITED2-Transkription und Aldosteronsekretion wird über den MAP-Kinasen und den PI3-Kinase-Signalweg vermittelt (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol 2009; Haase *et al.* Cell Tissue Res 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls auf eine Vermittlung des ECCM-Effektes auf die Beta-Catenin-Aktivität durch den MAP-Kinase und PI3-Kinase-Signalweg hin. Ein hemmender Effekt sowohl des PI3-K- und des MAPK-Inhibitors konnte nicht nur auf DNA-, sondern auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Mittels Westernblotanalyse wurde gezeigt, dass zusätzlich zur verminderten Beta-Catenin-Aktivität im Zytoplasma die Translokation in den Nukleus durch Inhibitoren der MAP- und PI3-Kinasen gehemmt wurden. Der Zusammenhang zwischen dem MAP-Kinase-Signalweg MEK/ERK und Beta-Catenin zeigte sich auch in Experimenten mit bovinen retinalen Endothelzellen, bei denen es nach Einsatz eines MEK-Inhibitors zu einer verminderten Beta-Catenin-Aktivität kam (Yang *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2010). Interessanterweise zeigte auch der RTK-Inhibitor Genistein in Experimenten dieser Arbeit einen hemmenden Effekt auf die ECCM-Stimulation der Beta-Catenin-abhängigen Transkription.

Eine weitere RTK, deren Blockade zu einer Hemmung der Beta-Catenin-Aktivität führt, ist der FGFR1. Die Experimente mit dem bFGF-Inhibitor Su5402 am FGF-1-Rezeptor führten zu einer signifikanten Hemmung der transkriptionalen Aktivität von Beta-Catenin. Auch der stimulatorische Effekt von ECCM auf die Beta-Catenin-abhängige Transkription ließ sich durch humanes bFGF imitieren. Studien zeigten, dass es in humanen Endothelzellen zur Aktivierung von Beta-Catenin durch bFGF kommt (Holnthoner *et al.* J Biol Chem 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch bei adrenokortikalen Zellen aktiviert wird. Allerdings gibt es auch Studien an neuronalen Progenitorzellen, in denen es durch bFGF-Stimulation zu einer verminderten Beta-Catenin Aktivität kam (Sato *et al.* Neuropathology 2000).

Auch die Transkription des StAR-Gens, welches stellvertretend für die Aktivierung der Steroidogenese steht, wurde durch ECCM gesteigert und konnte durch Einsatz eines bFGF-Inhibitors gehemmt werden. Die Stimulation der StAR-Transkription durch ECCM war bereits bekannt (Ansurudeen *et al.* Mol Cell Endocrinol. 2007). Die aktuellen Experimente zeigten nun jedoch, dass sich die StAR-Aktivität auch direkt durch bFGF stimulieren und die durch ECCM verursachte Steigerung durch einen bFGF-Inhibitor hemmen lässt. Krug *et al.* konnten eine Adipozyten-abhängige Regulation von StAR durch den ERK1/2-

MAPK-Signalweg nachweisen (Krug *et al.* Int J Obes (Lond) 2007). Ob die durch ECCM stimulierte StAR-Transkription wie die Beta-Catenin-abhängige Transkription auch über den MAPK-Signalweg vermittelt wird, ist zwar anzunehmen, müsste aber durch weitere Experimente belegt werden.

Es ist durchaus bekannt, dass bovine und humane Endothelzellen bFGF synthetisieren (Vlodavsky *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; Hannan *et al.* Growth Factors 1988). Dies zeigte sich auch in den aktuellen ELISA-Analysen des ECCM, das nach 2-4 Tagen Inkubationszeit eine höhere Konzentration an bFGF aufwies als durch das Nährmedium zugeführt wurde. Zusätzlich konnte durch RT-PCR-Analysen gezeigt werden, daß Endothelzellen mRNA für bFGF exprimieren und zudem 6-fach mehr erhöhte bFGF mRNA generieren als NCI-H295R-Zellen.

Eine Aktivierung des MAP- und PI3-Kinase-Signalwegs durch bFGF führt zur Migration von Endometriumstromazellen (Gentilini *et al.* Mol Hum Reprod 2007), Proliferation von Bandscheibenzellen (Pratsinis *et al.* Eur Spine J 2007) und von Hühnerkeimzellen (Choi *et al.* PLoS One. 2010). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass sich die proliferative Funktion von bFGF auf Netzhautzellen durch Genistein und einen PI3-Kinase-Inhibitor hemmen lässt (Guilarducci-Ferraz *et al.* Neurochem Res 2008).

Interessanterweise konnte auch in bovinen adrenokortikalen Zellen eine Stimulation des MEK/ERK-Signalwegs mittels bFGF nachgewiesen werden (Chabre O *et al.* Endocrinology 1995). Dieser Zusammenhang spiegelt sich diesen Ergebnissen nach auch im humanen System wider.

Die Auswertung der Daten zeigt, dass bei der Regulation von Beta-Catenin in Nebennierenrindenzellen durch Endothelzelloktoren der basische Fibroblastenfaktor, bFGF, involviert ist, der durch Bindung an seinen Rezeptor in der Nebennierenrindenzelle über den MAPK- und PI3-Kinase-Signalweg zur zytoplasmatischen und nukleären Beta-Catenin-Akkumulation führt. Jedoch ist bFGF als einziger Faktor zur Erklärung der Beta-Catenin-Regulation in Nebennierenrindenzellen nicht ausreichend, da die Experimente zeigen, dass sich im verwendeten 50 % ECCM im Mittel 1,2 ng/ml bFGF nachweisen lassen. Die ausgeprägten Effekte der Stimulation mit 50 % ECCM lassen sich jedoch erst durch eine bFGF-Konzentration von 10 ng/ml vollständig simulieren. Dies betrifft sowohl die Experimente zur Beta-Catenin-abhängigen Transkription als

auch die Experimente zur StAR-Promoter Aktivität. Somit ist davon auszugehen, dass nicht nur die Bindung von bFGF den MAPK- und PI3-K-Signalweg aktiviert, sondern darüberhinaus noch weitere bisher unbekannte Faktoren existieren könnten, die eine Rolle in der Regulation der Beta-Catenin-Aktivität in den Nebennierenrindenzellen spielen (Abb 4.1).

Bezüglich einer Interaktion zwischen Beta-Catenin, bFGF und der Nebenniere ist es von Interesse, dass für Beta-Catenin eine Beteiligung bei der Nebennierenorganogenese angenommen wird (Übersicht Berthon *et al.* Mol Cell Endocrinol 2011; Kim *et al.* Development 2008) und auch vom bFGF eine Regulation der fetalen Nebennierenentwicklung (Mesiano *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1991; Mesiano *et al.* Steroids 1997) bzw. der Nebennierenrindenzellenregeneration bekannt ist (Chu *et al.* Tissue Eng Part A 2009).

Darüber hinaus ist es wichtig, auch die Nebennieren-Pathogenese mit Blick auf die bFGF-Sekretion von Endothelzellen und deren Auswirkungen auf die Beta-Catenin-Aktivität auszuwerten, da bFGF als bekannter Angio- und Tumorgenseaktivator (Montesano *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1986; Rodeck *et al.* Cancer Cells 1991; Czubayko *et al.* J Biol Chem 1994) womöglich auch die Entstehung von adrenalen Tumoren fördern könnte.

Somit könnten die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen Zweig der Signalwege in der Nebennierenrinde beleuchten und Anlass geben, die Zusammenhänge zwischen von Endothelzellen sezerniertem bFGF, Beta-Catenin und der Nebennierenrinde bezüglich ihrer embryonalen Entwicklung und Pathogenese genauer zu betrachten.

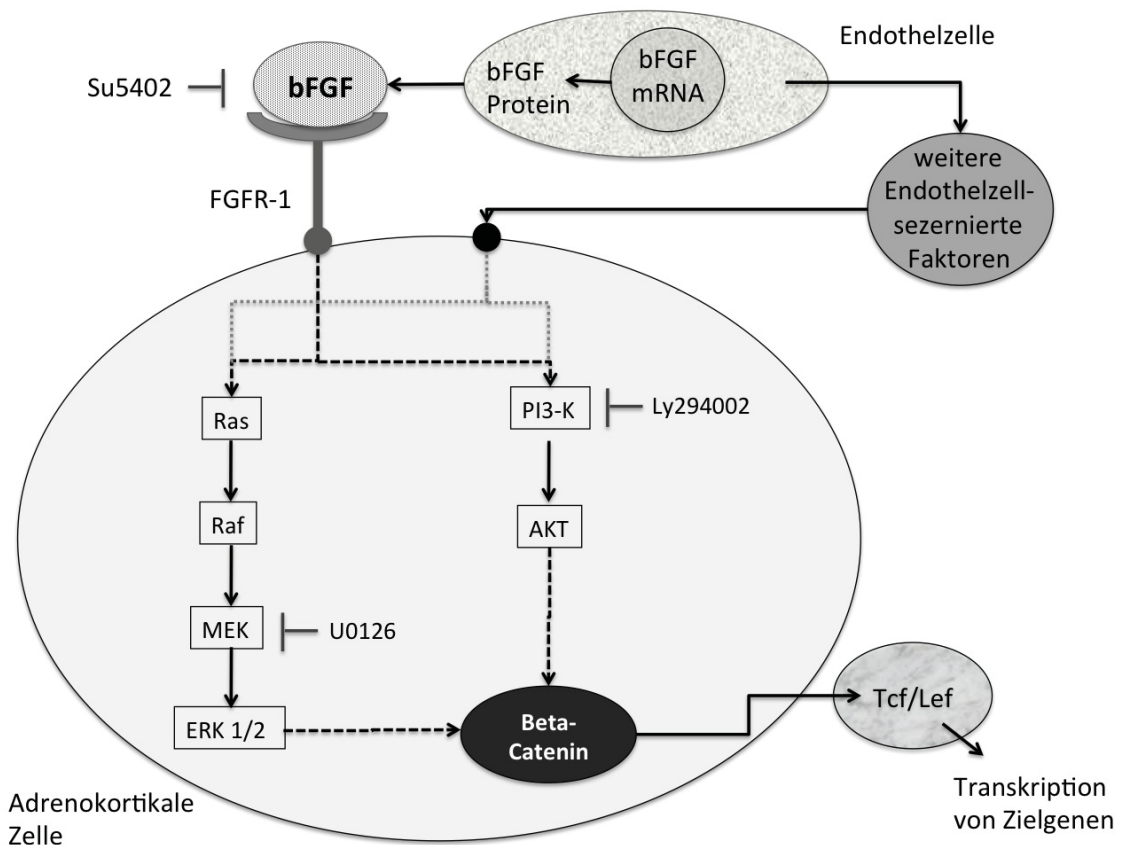


Abb. 4.1 Signalweg-Modell von der bFGF Bildung in der Endothelzelle einschließlich Bindung von bFGF an einer adrenokortikalen Zelle. In der Endothelzelle wird aus der bFGF-mRNA zunächst das bFGF-Protein hergestellt, welches dann freigesetzt wird. Nach der Bindung von bFGF am FGFR-1, welcher durch Su5402 gehemmt werden kann, kommt es zur Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs der MAPK. Hemmung von MEK 1/2 ist durch U0126 möglich. Außerdem kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase. Dieser Schritt ist durch den Inhibitor Ly294002 hemmbar. Nach Aktivierung der Signalkaskaden kommt es durch bisher unbekannte Mechanismen zur Akkumulation von Beta-Catenin sowohl im Zytoplasma als auch im Kern und anschließender Bindung an der Tcf/Lef-Bindungsstelle mit nachfolgender Transkription von Zielgenen.

5 Schlussfolgerung

Die Nebenniere gehört zu den am besten durchbluteten Organen. Dabei reguliert die Durchblutung der Nebenniere nicht nur die Nährstoffversorgung und die Distribution der Nebennierenrindenhormone, sondern die Endothelzellen sezernieren Faktoren, die die Funktion der Nebenniere ganz konkret kontrollieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Beta-Catenin-Aktivität wichtig ist für die Physiologie der Nebennierenrinde und durch Endothelzellofaktoren reguliert wird. Sowohl die Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295R als auch eine immortalisierte Nebennierenrindenzelllinie zeigten eine Aktivierung der Beta-Catenin-abhängigen Transkription nach ECCM-Stimulation. Diese Aktivierung bestätigte sich ebenfalls in Westernblotanalysen. Um die von Endothelzellen-sezernierten Faktoren und die Mechanismen der Beta-Catenin-Aktivierung genauer erfassen zu können, wurden verschiedene Signalwege untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder der klassische Wnt-Signalweg noch die Proteinkinasen A, B und C in den Prozeß der Beta-Catenin-Regulation relevant eingebunden sind.

Studien mit Inhibitoren des MAP- und PI3-Kinasen-Signalwegs dokumentierten hingegen auf mRNA- und auf Protein-Ebene ihre Beteiligung an der Regulation von Beta-Catenin. Schließlich konnte mit bFGF ein von Endothelzellen sezernierter Faktor gefunden werden, über den die Kontrolle der Beta-Catenin-abhängigen Transkription durch Endothelzellen erfolgt. Gelöstes bFGF war in der Lage, die Beta-Catenin-abhängige Transkription ebenso zu stimulieren wie ECCM. Darüber hinaus führte die Applikation eines bFGF-Inhibitors zu einer Hemmung der Stimulation durch ECCM. ELISA- und RT-PCR-Analysen bestätigten die Generation von bFGF-mRNA und die Sekretion von bFGF-Protein durch HUVEC-Zellen.

Als alleiniger Faktor reicht bFGF als Erklärung für die Regulation der Beta-Catenin-Aktivität durch Endothelzellen in Nebennierenrindenzellen jedoch nicht aus. Es ist davon auszugehen, dass ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren die Stimulation der Beta-Catenin-Aktivität reguliert und dabei unter anderem der bFGF-, MAPK- und PI3-K-Signalweg involviert ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in humanen Nebennierenrindenzellen die Aktivität von Beta-Catenin unter anderem *via* bFGF reguliert wird. Dieses bFGF wird durch Endothelzellen sezerniert und wirkt auf Nebennierenrindenzellen über seine Rezeptorbindung mit Aktivierung des MAP- und PI3-Kinase-Signalwegs.

Diese Ergebnisse klären einen Mechanismus auf, über den Endothelzellen direkt die Nebennierenrindenphysiologie kontrollieren und stellen eine direkte Verbindung zwischen bFGF und Beta-Catenin her, von denen beiden bekannt ist, daß sie die Nebennierenorganogenese entscheidend kontrollieren. Da bFGF auch als Tumorgeneseaktivator charakterisiert wurde, wäre es wichtig die Nebennieropathogenese in Zukunft auch in Hinblick auf die Aktivierung von Beta-Catenin durch bFGF zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R, 'beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway', *The EMBO Journal*, 16 (1997), 3797-3804
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I, 'Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway', *Genes & Development*, 16 (2002), 1066-1076
- Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Krug AW, Funk RH, Bornstein SR, 'Vascular-adrenal niche--endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II', *Hormone and Metabolic Research*, 38 (2006), 476-480
- Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS, 'Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266 (2007), 150-156
- Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, 'Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 300 (2009), 66-70
- Bamforth SD, Bragança J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S., 'Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfp2 co-activator', *Nature Genetics*, 29 (2001), 469-474
- Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jousineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P, 'Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development', *Human Molecular Genetics*, 19 (2010), 1561-1576
- Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P, 'Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development', *Molecular and Cellular Endocrinology* (2011)
- Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE, 'Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion', *Endocrinology*, 133 (1993), 1555-1561
- Botting R, Vane JR, 'Vasoactive mediators derived from the endothelium', *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux*, 82 Spec No 4 (1989), 11-14
- Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ, 'Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein', *Molecular Endocrinology*, 11 (1997), 138-147
- Chabre O, Cornillon F, Bottari SP, Chambaz EM, Vilgrain I, 'Hormonal regulation of mitogen-activated protein kinase activity in bovine adrenocortical cells: cross-talk between phosphoinositides, adenosine 3',5'-

- monophosphate, and tyrosine kinase receptor pathways', *Endocrinology*, 136 (1995), 956-964
- Chen M, Hornsby PJ, 'Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells', *Hormone and Metabolic Research*, 38 (2006), 549-555
- Choi JW, Kim S, Kim TM, Kim YM, Seo HW, Park TS, Jeong JW, Song G, Han JY, 'Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells', *PLoS One*, 5 (2010), e12968
- Chu Y, Ho WJ, Dunn JC, 'Basic fibroblast growth factor delivery enhances adrenal cortical cellular regeneration', *Tissue engineering. Part A*, 15 (2009), 2093-2101
- Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Polistena P, Svaldi M, Coser P, Bonomini S, Hojden M, Martella E, Chisesi T, Rizzoli V, Giuliani N, 'Do human myeloma cells directly produce basic FGF?', *Blood*, 102 (2003), 3071-3072; author reply 3072-3073
- Cross 2001, <http://tips.trends.com>
- Czubayko F, Smith RV, Chung HC, Wellstein A, 'Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors', *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994), 28243-28248
- Doghman M, Cazareth J, Lalli E, 'The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93 (2008), 3222-3225
- Durand J, Lampron A, Mazzuco TL, Chapman A, Bourdeau I, 'Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96 (2011), E1206-1211
- Eastman Q, Grosschedl R, 'Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals', *Current Opinion in Cell Biology*, 11 (1999), 233-240
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP, 'Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis', *Endocrine Reviews*, 19 (1998), 101-143
- Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libé R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J, 'Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93 (2008), 4135-4140
- Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libé R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F, 'β-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17 (2011), 328-336

- Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV, 'Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis', *Cancer Research*, 50 (1990), 5488-5496
- Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Viganò P, Di Blasio AM, 'PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors', *Molecular Human Reproduction*, 13 (2007), 317-322
- Glyn J, 'The discovery and early use of cortisone', *Journal of the Royal Society of Medicine*, 91 (1998), 513-517
- Guilarducci-Ferraz CV, da Silva GM, Torres PM, Dos Santos AA, de Araújo EG, 'The increase in retinal cells proliferation induced by FGF2 is mediated by tyrosine and PI3 kinases', *Neurochemical Research*, 33 (2008), 754-764
- Haase M, Ansurudeen I, Schinner S, Paramonova I, Schott M, Papewalis C, Bornstein SR, Scherbaum WA, Willenberg HS, 'Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression', *Cell and Tissue Research*, 336 (2009), 337-343
- Hannan RL, Kourembanas S, Flanders KC, Rogelj SJ, Roberts AB, Faller DV, Klagsbrun M, 'Endothelial Cells Synthesize Basic Fibroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor Beta', *Growth Factors*, 1 (1988), 7-17
- Heikkilä M, Peltoketo H, Leppäluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S, 'Wnt-4 Deficiency Alters Mouse Adrenal Cortex Function, Reducing Aldosterone Production', *Endocrinology*, 143 (2002), 4358 -4365
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A, 'Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination', *Molecular and Cellular Biology*, 25 (2005), 9063-9072
- Holnthoner W, Pillinger M, Groger M, Wolff K, Ashton AW, Albanese C, Neumeister P, Pestell RG, Petzelbauer P, 'Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002), 45847-45853
- Kendall EC, 'Cortisone', *Annals of Internal Medicine*, 33 (1950), 787-796
- Kifor I, Dzau VJ, 'Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins', *Circulation Research*, 60 (1987), 422-428
- Kikuchi A, 'Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway', *Cancer Science*, 94 (2003), 225-229
- Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, Hammer GD, 'Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex', *Development*, 135 (2008), 2593-2602
- Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG, 'Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development', *Genomics*, 23 (1994), 272-274

- Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, 'Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells', *International Journal of Obesity*, 31 (2007), 1605-1616
- Leal LF, Mermejo LM, Ramalho LZ, Martinelli CE Jr, Yunes JA, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Cardinalli IA, Brandalise SR, Moreira AC, Tone LG, Scrideli CA, Castro M, Antonini SR, 'Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96 (2011), 3106-3114
- Lilien J, Balsamo J, 'The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin', *Current Opinion in Cell Biology*, 17 (2005), 459-465
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X, 'Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism', *Cell*, 108 (2002), 837-847
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL, 'A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation', *Cell*, 77 (1994), 481-490
- Mesiano S, Mellon SH, Gospodarowicz D, Di Blasio AM, Jaffe RB, 'Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (1991), 5428-5432
- Mesiano S, Jaffe RB, 'Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex', *Steroids*, 62 (1997), 62-72
- Miller W, Strauss JF, 'Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69 (1999), 131-141
- Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis 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 E2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005), 6213-6218
- Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L, 'Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (1986), 7297-7301
- Nakamura S, Yamamura H, 'Yasutomi Nishizuka: father of protein kinase C', *Journal of Biochemistry*, 148 (2010), 125-130
- Oetjen E, Diedrich T, Eggert A, Eckert B, Knepel W, 'Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene', *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994), 27036-27044
- Ornitz DM, 'FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development', *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22 (2000), 108-112

- Ornitz DM, Itoh N, 'Fibroblast growth factors', *Genome Biology*, 2 (2001), REVIEWS3005
- 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', *Hormone and Metabolic Research*, 42 (2010), 840-845
- Parker KL, Schimmer BP, 'Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function', *Endocrine Reviews*, 18 (1997), 361-377
- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M, 'Structural basis for FGF receptor dimerization and activation', *Cell*, 98 (1999), 641-650
- Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M, 'Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557 (1989), 374-385; discussion 386-387
- Pratsinis H, Kletsas D, 'PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways', *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 16 (2007), 1858-1866
- Ragazzon B, Libé R, Gaujoux S, Assié G, Fratticci A, Launay P, Clouser E, Bertagna X, Tissier F, de Reyniès A, Bertherat J, 'Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers', *Cancer Research*, 70 (2010), 8276-8281
- Rainey WE, Bird IM, Sawetawan C, Hanley NA, McCarthy JL, McGee EA, Wester R, Mason JI, 'Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77 (1993), 731-737
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, 'Biochemie', Thieme Verlag (2006)
- Rodeck U, Becker D, Herlyn M, 'Basic fibroblast growth factor in human melanoma', *Cancer Cells*, 3 (1991), 308-311
- Rosolowsky LJ, Campbell WB, 'Endothelial cells stimulate aldosterone release from bovine adrenal zona glomerulosa cells', *The American Journal of Physiology*, 266 (1994), E107-117
- Rosolowsky LJ, Hanke CJ, Campbell WB, 'Adrenal capillary endothelial cells stimulate aldosterone release through a protein that is distinct from endothelin', *Endocrinology*, 140 (1999), 4411-4418
- Roux PP, Blenis J, 'ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions', *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68 (2004), 320-344
- Satoh J, Kuroda Y, 'Beta-catenin expression in human neural cell lines following exposure to cytokines and growth factors', *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 20 (2000), 113-123

- 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', *International Journal of Obesity*, 31 (2007), 864-870
- Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D, 'Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth', *Nature*, 325 (1987), 257-259
- Seidensticker MJ, Behrens J, 'Biochemical interactions in the wnt pathway', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1495 (2000), 168-182
- Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, von Euw J, Schindler O, Reichstein T, '[Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid]', *Experientia*, 10 (1954), 132-133
- Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T, 'Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes', *General Physiology and Biophysics*, 21 (2002), 231-255
- Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF, 'Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene', *Biochemistry*, 35 (1996), 9052-9059
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A, 'Cells in focus: endothelial cell', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34 (2002), 1508-1512
- Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I, 'Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas', *Clinical Endocrinology*, 68 (2008), 264-270
- Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Horvath A, Stratakis CA, Bourdeau I, 'Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD)', *Clinical Endocrinology*, 69 (2008), 367-373
- Thomas M, Suwa T, Yang L, Zhao L, Hawks CL, Hornsby PJ, 'Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells', *Neoplasia*, 4 (2002), 493-500
- Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ, 'Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature', *Microscopy Research and Technique*, 61 (2003), 247-251
- Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J, 'Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors', *Cancer Research*, 65 (2005), 7622-7627
- van Amerongen R, Mikels A, Nusse R, 'Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors', *Science Signaling*, 1 (2008), re9
- Vane JR, Botting RM, 'Formation by the endothelium of prostacyclin, nitric oxide and endothelin', *Journal of Lipid Mediators*, 6 (1993), 395-404

- Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M, 'Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1987), 2292-2296
- Vrezas *et al.* Adrenal Disease and Function, Adrenal Cortex, Development, Anatomy, Physiology Chapter 1 in Endotext.org
- 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', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 116 (2008), 70-74
- Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I, 'New mechanisms to control aldosterone synthesis', *Hormone and Metabolic Research*, 40 (2008), 435-441
- Wu CH, Chen YF, Wang JY, Hsieh MC, Yeh CS, Lian ST, Shin SJ, Lin SR, 'Mutant K-ras oncogene regulates steroidogenesis of normal human adrenocortical cells by the RAF-MEK-MAPK pathway', *British Journal of Cancer*, 87 (2002), 1000-1005
- Yang J, Duh EJ, Caldwell RB, Behzadian MA, 'Antipermeability function of PEDF involves blockade of the MAP kinase/GSK/beta-catenin signaling pathway and uPAR expression', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (2010), 3273-3280
- Zhang DX, Gauthier KM, Falck JR, Siddam A, Campbell WB, 'Steroid-producing cells regulate arterial tone of adrenal cortical arteries', *Endocrinology*, 148 (2007), 3569-3576

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. H. S. Willenberg für die Unterstützung, Motivation und Förderung bedanken.

Außerdem danke ich dem Team des endokrinologischen Labors vor allem Frau B. Muelders-Opgenoorth für die gute Zusammenarbeit und die mitreißende Begeisterung für die Arbeit im Labor.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch meiner Familie, Freunden und meinem Partner, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt, wieder aufgebaut und immer an mich geglaubt haben.

7.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist. Außerdem wurde diese Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt.

Carolin Schwafertz

Datum, Ort