

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

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

***Das Endothel sezerniert Interleukin-6 (IL-6)
und stimuliert die adrenale Interleukin-6 und Aldosteronsynthese
über einen Interleukin-6 unabhängigen Mechanismus***

Dissertation

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

vorgelegt von

Kathrin Schebesta

2015

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

Gez.Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Willenberg

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Scheller

Meinen Eltern, meinem Opa und Tasso

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Willenberg, H. S., I. Ansurudeen, K. Schebesta, M. Haase, B. Wess, S. Schinner, A. Raffel, M. Schott and W. A. Scherbaum (2008). "The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical cells." Exp Clin Endocrinol Diabetes **116 Suppl 1**: S70-4.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
1. Einleitung	9
1.1 Embryogenese und Anatomie der Nebenniere	9
1.2 Aufbau und Funktion der Nebenniere	10
1.2.1 Steroidbiosynthese und Regulation durch die Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse.....	11
1.2.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	12
1.2.3 Vaskularisation der Nebenniere	13
1.3 Endothelzellprodukte	14
1.3.1 Stickstoffmonoxid.....	14
1.3.2 Interleukin-6.....	14
1.3.3 Endothelin-1	16
1.3.4 Nicht näher bezeichnete Proteine.....	16
1.4 Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 NCI-H295R Zellen.....	18
2.1.2 HUVEC Zellen	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
<i>Kultivierung von NCI- H295R- Zellen</i>	19
<i>Kultivierung von HUVEC-Zellen</i>	20
<i>Herstellung von Endothel-Zell-konditioniertem Medium (ECCM)</i>	20
2.2.2 Immunzytologie.....	21
2.2.3 Transfektion und Reporterassay.....	21
<i>Transfektion</i>	21
2.2.4 Messung der Luciferase.....	22
2.2.5 Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA).....	24
2.2.6 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	25
2.2.7 RNA-Isolation.....	26
<i>Messung der RNA-Konzentration</i>	27
2.2.8 cDNA-Synthese	27
2.2.9 Primer-Synthese	28
2.2.10 T-Zell-Stimulationstest.....	30
3. Ergebnisse	33
3.1 Endothelzellen	33
3.2 Promoteraktivität	33
3.3 IL-6 Konzentrationen im Überstand	34
3.4 Cycloheximidversuch	36
3.5 NCI-H295R/HUVEC PCR.....	37
3.6 T-Zell-Stimulationstest und IL-6 ELISA.....	38
3.7 JAK2/STAT Inhibitor	40
4. Diskussion	42
Literaturverzeichnis	47

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Aufbau der Nebenniere	10
Abb. 1.2 Entstehungsweg der verschiedenen Steroide in der Nebenniere	12
Abb. 2.1 Schematisierter Blick auf eine 24-Well Platte	22
Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Transfektion	23
Abb. 2.3 Prinzip ELISA	25
Abb. 2.4 Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer	28
Abb. 2.5 Komponenten der Reaktionssätze in Menge und Endkonzentration	29
Abb. 2.6 T-Zellisolierung	31
Abb. 2.7 Pipettierschemata für die Stimulation von T-Zellen	32
Abb. 3.1 Immunzytochemie mit CD31-Antikörper	33
Abb. 3.2 Promoteraktivität von IL-6 (1µg)	34
Abb. 3.3 IL-6 Konz. im Überstand nach 24h ECCM auf NCI- H295R Zellen	35
Abb. 3.4 IL-6 im Überstand im Vergleich	36
Abb. 3.5 Cycloheximidversuch	37
Abb. 3.6 Semiquantitative PCR zum Vergleich von NCI-H295R Zellen und HUVEC auf IL-6	38
Abb. 3.7 HUVECs und T-Zellen mit unterschiedlichen Stimulantien im Vergleich	39
Abb. 3.8 Aldosteronsekretion	41

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokorticotrope Hormon
AT II	Angiotensin II
AT II R	Angiotensin II Rezeptor
CD 31	Cluster of differentiation 31
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
Ct-Methode	Cycle Treshold (Schwellenwert)
CYP11B2	Aldosteronsynthase
DAX-1	dosage-sensitive sex reversal on chromosome X (nuclear receptor protein)
DEPC-Wasser	Diethylprocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonucleic-acid
ECCM	Endothelzell konditioniertes Medium
ELISA	Enzyme Linked Immuno System Assay
ET-1	Endothelin-1
FAM	6- Carboxyfluorescein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
LS-Säulen	Magnetisierte Säulen (Größe: Large)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mRNA	Messenger Ribonucleic-acid
NCI-H295-R Zellen	Nebennierenrindenzellen der Zelllinie H295R
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered Saline
pRLTKp	Renilla Luziferase Reporter Vektor
RD1W	A buffered protein base with preservatives
RAAS	Renin-Angiotensin- Aldosteron-System
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SF-1	Steroidogene Factor-1
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Proteins
SYBR-Green	Asymmetrischer Cyaninfarbstoff zum Nachweis von DNA
TAMRA	6- Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Zusammenfassung

Unsere Arbeitsgruppe fand, dass die Aldosteronsekretion der Nebennierenrinde durch einen Endothelin-1 und Angiotensin II-unabhängigen Mechanismus durch die Endothelzellen reguliert wird. Da außerdem bekannt war, dass Interleukin-6 von Endothelzellen und Nebennierenzellen produziert wird, stellten wir uns die Frage, ob die Endothelzelleffaktoren auch die adrenale IL-6 Synthese beeinflussen und ob dieser Effekt quantitativ bedeutsam ist, bzw. ob er eine autokrine Stimulation auf die Steroidbiosynthese bewirkt. Weiterhin sollte geklärt werden, wie viel Interleukin-6 von Endothelzellen selbst und wie viel im Vergleich dazu von der Nebennierenrindenzelle sezerniert wird.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das Endothelzellmedium menschlicher Nabelschnurzellen zur Steigerung der Interleukin-6 Promoteraktivität in den Nebennierenzellen der Zelllinie NCI-H295R führte und die Interleukin-6-Sekretion im Kulturüberstand proportional zur Konzentration des Endothelzellmediums anstieg.

Hingegen zeigte sich durch die Blockade des Signaltransduktionsweges des Interleukin-6, dass Interleukin-6 die Aldosteronsynthese nicht beeinflusste und somit die IL-6 Synthese und die Steroidbiosynthese über zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert werden.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass T-Zellen und Endothelzellen mehr Interleukin-6 generieren als NCI-H295R Nebennierenzellen. Dabei fiel auf, dass mit Zytokinen stimulierte T-Zellen am meisten Interleukin-6 Protein sezernierten, dass jedoch die Endothelzellen insgesamt einen viel größeren Anteil an systemisch gemessenen Interleukin-6-Konzentrationen haben könnten, als bisher vermutet.

Unsere Ergebnisse führten zur Verwerfung der Hypothese, dass Endothelzellen über Interleukin-6 die Aldosteronsekretion wesentlich beeinflussen. Sie stützen aber die Annahme, dass Wechselwirkungen zwischen Endothel- und Nebennierenzellen nicht nur an der Entwicklung bestimmter Formen des Bluthochdrucks beteiligt sind, sondern auch bei der Regulation von Entzündungsantworten eine maßgebliche Rolle spielen.

1. Einleitung

1.1 Embryogenese und Anatomie der Nebenniere

Die Nebenniere besteht aus zwei embryologisch und funktionell unterschiedlichen Geweben – der Nebennierenrinde und dem darin eingeschlossenen Nebennierenmark. In der vierten Schwangerschaftswoche beginnt die Entwicklung der Nebenniere zunächst durch Zusammenlagerung von Zölomepithelzellen bzw. aus dem intermediären Mesoderm in der Urogenitalleiste. Daraus entwickelt sich ungefähr in der sechsten Woche unter dem Einfluss vieler verschiedener Faktoren wie SF-1 und DAX1 das adrenalcorticale Primodium (Keegan and Hammer 2002; Else and Hammer 2005). Nach der Trennung von steroidogenen Geschlechtszellen, aus denen später Hoden oder Eierstöcke entstehen, entwickelt sich die primitive Nebenniere mit zunächst zwei Zonen. Die adulte Zone besteht aus kleinen, eng aneinander liegenden Zellen, die die fetale Zone umgeben. Die fetale Zone besteht dagegen aus größeren Zellen, die sich ungeordnet im Inneren der fetalen Nebenniere befinden (Zubair et al. 2008).

In der neunten Schwangerschaftswoche entwickelt sich vermutlich die Nebennierenkapsel. Gleichzeitig wandern aus der Neurralleiste chromaffine Vorläuferzellen ein, die sich zunächst inselförmig gruppieren und aus denen später das Nebennierenmark entsteht (Mesiano and Jaffe 1997; Keegan and Hammer 2002). Nach der Geburt steigt die Zahl der adulten Zellen bis zur Pubertät, die der fetalen sinkt durch ihre verstärkte apoptotische Aktivität ab. Die restlichen Zellen der fetalen Zone verbleiben an der Grenze zwischen der Nebennierenrinde und dem Nebennierenmark, wohingegen sich die Zellen der adulten Zone weiter in die späteren zwei äußeren Zonen (*Zona glomerulosa* und *Zona fasciculata*) der Nebennierenrinde differenzieren (Zubair et al. 2008). Zwischen dem sechsten und achten Lebensjahr entwickelt sich die dritte und innerste Zone der Nebennierenrinde: die *Zona reticularis* (Keegan and Hammer 2002). Somit hat zur Erhaltung der Funktion und der Struktur der Nebenniere das Gleichgewicht zwischen Apoptose- und Proliferationsprozesse eine zentrale Bedeutung (Hornsby 1987).

1.2 Aufbau und Funktion der Nebenniere

Die drei zuvor genannten Zonen der adulten Nebenniere wurden erstmals 1866 von ARNOLD lichtmikroskopisch erkannt und von außen nach innen wie folgt benannt: *Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata* und *Zona reticularis* (Abb. 1.1 Aufbau der Nebenniere).

In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, in der Nebennierenrinde der Großteil der Steroidhormone im menschlichen Organismus produziert. Zu den drei Klassen gehören Mineralkortikoide (z.B. Aldosteron), die Glukokortikoide (z.B. Cortisol) und die androgenen C19-Vorläufersteroidhormone (z.B. Dehydroepiandrosteron) (Rainey et al. 1993; Rainey et al. 1994). Außerdem werden noch Gestagene und Vorstufen der Androgene und Östrogene synthetisiert. Seit der Mitte des 20. Jahrhunderts vermutet man, dass die mikroskopische Einteilung mit der funktionellen Gliederung übereinstimmt.

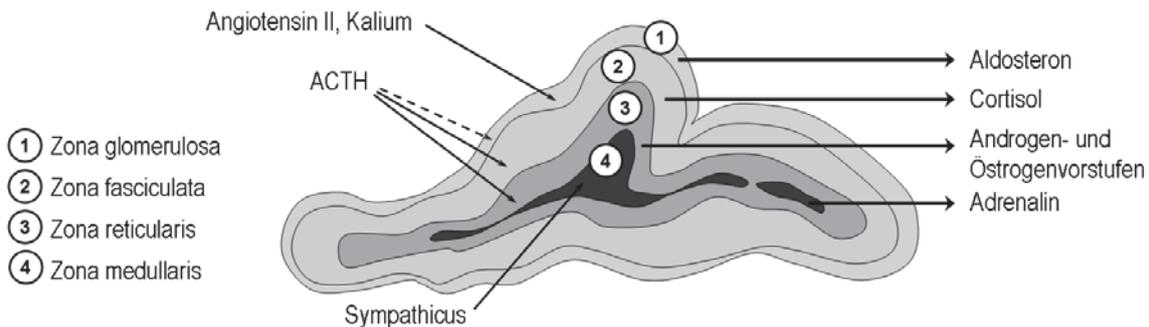


Abb. 1.1 Aufbau der Nebenniere

Die Nebennierenrinde besteht aus drei verschiedenen Zonen, die jeweils unterschiedliche Sekretionsprodukte hervorbringen: (1) *Zona glomerulosa* sezerniert unter anderem Aldosteron, (2) *Zona fasciculata* sezerniert unter anderem Cortisol und (3) *Zona reticularis* sezerniert unter anderem Androgene. Im Nebennierenmark (4) wird unter anderem Adrenalin produziert.

1.2.1 Steroidbiosynthese und Regulation durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die produzierten Hormone der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarks haben im menschlichen Organismus eine entscheidende Bedeutung. Sie spielen eine wichtige Rolle im Energiehaushalt, der Immunregulation, im Knochenstoffwechsel und bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes, inklusive der Kontrolle des arteriellen Blutdrucks (Willenberg et al. 2006).

Die Steroidhormonbiosynthese (Abb. 1.2) wird zum einen über die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrindenachse reguliert. Dabei wird das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) vom Hypothalamus aus dem Bereich der *Eminentia medialis* freigesetzt und stimuliert über das hypothalamisch-hypophysäre Portalsystem die Hypophyse, wodurch diese das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) freisetzt. Außerdem wird vermutet, dass CRH auch einen direkten Einfluss auf die adrenokortikale Steroidbiosynthese hat (Willenberg et al. 2000). Wie man in weiterführenden Studien gesehen hat, ließ sich diese Vermutung durch den Nachweis von CRH-Rezeptoren und ihre funktionelle Kopplung in der Nebennierenrinde bestätigen (Willenberg et al. 2005).

Die ACTH-Rezeptoren, die in der Nebennierenrinde in allen drei Zonen vorkommen, gehören zu den Melanocortin-Rezeptoren und führen über einen zyklischen AMP-Proteinkinase-A-Signaltransduktionsweg zur Regulation der Expression des Steroidogenic Factors (SF-1) und damit des Steroidogenic Acute Regulatory Proteins (StAR), welche letztendlich die Steroidbiosynthese regulieren (Clark et al. 1995). Mit Hilfe des StAR-Proteins, einem in den adrenokortikalen Zellen gebildeten 30 kDa großen Phosphoprotein, wird Cholesterol aus der äußeren Mitochondrienmembran durch das lipophile Milieu des Intermembranraums in die innere Mitochondrienmembran transportiert, wo sich das P450_{scc}-Enzym befindet (Stone and Hechter 1954; Stocco 2001). Die StAR-Expression wird durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor SF-1 vermittelt und leitet die Steroidbiosynthese ein (Abb. 1.2).

Die komplette Kaskade des CRH/ACTH-Systems unterliegt einem Feedback-Mechanismus durch Glukokortikoide, durch die die CRH Expression im Hypothalamus und die ACTH-Expression in der Hypophyse gehemmt und bei deren Abwesenheit sie vermehrt sezerniert werden.

Neben den Steroiden, die in den jeweiligen Nebennierenrindenzellen produziert werden, sezernieren die Nebennierenrindenzellen außerdem noch A kutephaseproteine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumor-Nekrosefaktor (TNF- α) (Bornstein et al. 1994; Gonzalez-Hernandez et al. 1994).

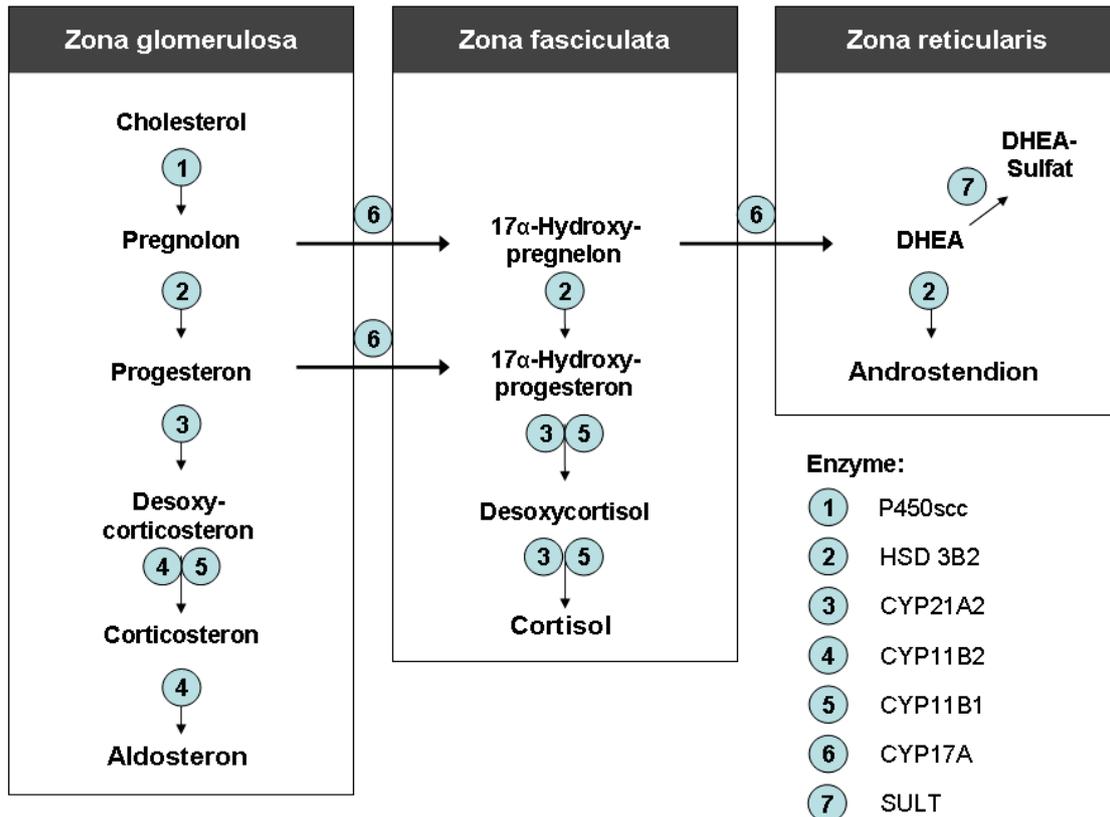


Abb. 1.2 Der Entstehungsweg der verschiedenen Steroide in der Nebenniere

Die Entstehungswege der humanen Nebennierensteroidbiosynthese nach (Rainey et al. 1994). P450scc: Cholesterin side chain cleavage; HSD3B2: 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, CYP21A2: 21-Hydroxylase; CYP11B2: Aldosteronsynthase; CYP11B1: 11 β -Hydroxylase; CYP17A: 17 α -Hydroxylase; SULT: Sulfontransferase.

1.2.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Aldosteron ist eines der wichtigsten Mineralkortikoide im menschlichen Organismus, das dazu beiträgt, den Salz-Wasser-Haushalt und damit auch den Blutdruck zu regulieren. Es wird vor allem in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde synthetisiert und durch mehrere Mechanismen reguliert. Neben ACTH und biogenen Aminen spielen monovalente Kationen,

sowie Angiotensin II (AT II) eine entscheidende Rolle (Foster et al. 1997; Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Lefebvre et al. 2001; Ehrhart-Bornstein et al. 2003; Willenberg et al. 2008).

Da AT II infolge einer Aktivierung von Renin synthetisiert wird, ist die Aldosteronsekretion infolge eines Absinkens des mittleren Blutdruckes besonders nennenswert.

AT II bindet in der *Zona glomerulosa* an den G-Protein-gekoppelten Angiotensin-Rezeptor vom Typ 1 (AT1R) (Whitebread et al. 1989; Balla et al. 1991), der über einen Anstieg des intrazellulären Calciums und der Aktivierung von Calmodulin dazu führt, dass Cholesterin mobilisiert und die Aldosteronsynthese gebildet wird. AT II ist allerdings nicht nur für die stimulierende Wirkung der Aldosteronsynthese (CYP11B2) bekannt, sondern induziert auch die Proliferation von *Zona glomerulosa* Zellen (Tanabe et al. 1998; Lumbers 1999). ACTH erhöht die Aldosteronsekretion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, hauptsächlich jedoch transient und damit bei akuten Prozessen. Des Weiteren spielt Kalium eine bedeutende Rolle bei der Aldosteronsynthese. Durch einen Kaliumverlust in der Zelle steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration. Dies wiederum führt zur Einleitung der CYP11B2-Expression (Aldosteronsynthese) und nachfolgend zur Aldosteronsynthese, wie auch z.B. in der adrenokortikalen NCI-H295R-Zelllinie (Bird et al. 1995; Denner et al. 1996; Rainey 1999). Außerdem fand man heraus, dass sich AT II und Kalium hierbei gegenseitig beeinflussen: durch die Bindung von AT II an seinen Rezeptor kommt es nachfolgend zur Hemmung von Kaliumkanälen und dadurch zur Membrandepolarisation (Choi et al.; Aptel et al. 1996).

Außer ACTH, AT II und Kalium üben des Weiteren noch parakrine Faktoren wie Katecholamine und Endothelzellfaktoren über parakrine Mechanismen eine stimulierende Wirkung auf die Aldosteronsynthese aus (Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Lefebvre et al. 2001; Willenberg et al. 2008).

1.2.3 Vaskularisation der Nebenniere

Obwohl die Nebenniere beim Erwachsenen mit ihrem Gewicht von ca. 0,02% des gesamten Körpergewichtes ein relativ kleines Organ im menschlichen Organismus ist, wird sie mit 0,14% des gesamten kardialen Blutflusses relativ stark durchblutet (Breslow 1992; Ehrhart-Bornstein et al. 1998). Die Nebenniere wird von kleinen Arteriolen, die aus der Aorta stammen, von der Nierenarterie und der *A. phrenicus inferior* versorgt. Dabei wird die Nebennierenrinde von dünnwandigen Sinusoiden und das Nebennierenmark direkt von Markarterien durchblutet (Ehrhart-Bornstein et al. 1998). Durch eine spezielle Anordnung der adrenokorti-

kalen Zellen kommt fast jede dieser Zellen mit den umliegenden Endothelzellen in Kontakt, so dass zwischen den Zellen ein reger Austausch stattfinden kann. So besteht einerseits die Möglichkeit der indirekten Sekretion der Steroidprodukte über die Endothelzellen in den systemischen Kreislauf, andererseits können die Endothelzellen mit ihren Sekretionsprodukten die Nebennierenzellen beeinflussen (Willenberg et al. 2006).

Zum Beispiel ist bekannt, dass die Endothelzellprodukte nicht nur auf die glatte Gefäßwandmuskulatur, sondern vermutlich über parakrine Effekte auch auf die Nebennierenzellen einwirken (Vinson et al. 1989; Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Hanke et al. 1998; Willenberg et al. 2008).

1.3 Endothelzellprodukte

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) gehört ebenfalls zu einem der wichtigsten Endothelzellfaktoren. NO hat mehrere Funktionen im Organismus; zum Beispiel ist es durch Dilatation der Gefäße maßgeblich an der Regulation der Blutversorgung des Organismus beteiligt. Im Rattenmodell fand man *in vitro*, dass ACTH über die Generation von NO zur Aktivierung der Cyclooxygenase und über die Sekretion von Prostaglandin-E₂ zur Sekretion von Kortikosteroiden führt, welche in Mikroorganellen gespeichert sind (Mohn et al. 2005).

1.3.2 Interleukin-6

Interleukin-6 gehört zur Gruppe der Zytokine. Es wird auf dem Chromosomenabschnitt 7p21 kodiert. Zunächst wird ein inaktives Propeptid mit 212 Aminosäuren transkribiert. Das fertige Interleukin-6 besteht aus 184 Aminosäuren. Seine im Blut zirkulierende aktive Form hat eine biologische Halbwertszeit von ca. vier Stunden und wird über Leber und Niere eliminiert.

Interleukin-6 spielt im Organismus in verschiedenen Bereichen eine wichtige Rolle. Es hat sowohl bei der Hämatopoese, als auch bei der Immunantwort und der Akute-Phase-Reaktion entscheidende Aufgaben. Vor allem in Bezug auf die Entzündungsreaktion ist es ein wichtiger Botenstoff. Dabei spielt es sowohl bei der Differenzierung, als auch bei der Stimulation der Immunzellen eine wichtige Rolle (Willenberg et al. 2002).

Außerdem ist Interleukin-6 inzwischen auch als Mediator des Immunsystems in der Wechselwirkung mit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse auf allen Ebenen bekannt (Spath-Schwalbe et al. 1994; Fischer 2006). Insbesondere spielt es bei der Inflammation eine große Rolle, indem es auf T-Lymphozyten chemotaktisch wirkt (Bacon et al. 1990).

Man fand IL-6 und IL-6-Rezeptoren (IL-6R) in allen Zonen der Nebennierenrinde (Path et al. 1997). Allerdings wird IL-6R vor allem in der *Zona reticularis* und dem Inneren der *Zona fasciculata* exprimiert. In der *Zona glomerulosa* und dem Nebennierenmark wiesen nur vereinzelte Zellen in der Immunhistochemie den Rezeptor auf. In der gleichen Arbeit fand man, dass IL-6 in der Lage ist, die Synthese aller Steroide, die in den unterschiedlichen Zonen gebildet werden, *in vitro* zu regulieren – je nachdem wie lange und mit welcher Dosis die Zellen stimuliert wurden (Mastorakos et al. 1993; Path et al. 1997).

Deshalb vermutet man, dass bei andauerndem Stress, wenn CRH und ACTH durch den Feedbackmechanismus von Cortisol wieder zurückgekoppelt werden, Interleukin-6 weiterhin in der Lage ist, die Steroidogenese direkt anzukurbeln. Somit spielt Interleukin-6 vermutlich auch eine entscheidende Rolle in Bezug auf chronischen Stress (Willenberg et al. 2002). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass Boten-RNA (mRNA) für IL-6 in den adrenokortikalen Zellen der *Zona reticularis* nachweisbar ist (Gonzalez-Hernandez et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Haftfestigkeit von Endothelzellen zu peripheren Blutlymphozyten durch IL-6 verstärkt wird, wie anhand von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) gezeigt werden konnte. Dies könnte eine Rolle bei der Lymphozytenattraktion bei Wunden haben (Watson et al. 1996).

Aufgrund vorheriger Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Endothelzell-konditioniertes Medium (ECCM) die Sensitivität von NCI-H295R Zellen gegenüber AT II erhöht und dass ECCM selbst eine direkte stimulierende Wirkung auf die Aldosteronsynthese der Nebennierenrindenzellen zusätzlich zu AT II und ACTH hat (Ansurudeen et al. 2006; Ansurudeen et al. 2007; Ansurudeen et al. 2009). In diesen Arbeiten wurde ebenfalls herausgestellt, dass die Aldosteronsekretion durch Stimulation mit ECCM nicht durch den Angiotensin-Rezeptor und auch nicht direkt über Endothelin-1 (ET-1), sondern eher über einen ET-1 unabhängigen Mechanismus vermittelt wird (Paramonova et al.; Ansurudeen et al. 2007).

1.3.3 Endothelin-1

Ein gut charakterisierter Faktor ist Endothelin-1. Dieses Peptid besteht aus 21 Aminosäuren und gehört als Hauptmitglied zur sogenannten Endothelinfamilie. Diese vasoaktiven Hormone werden hauptsächlich vom Endothel (Yanagisawa and Masaki 1989), aber auch von Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, ZNS-Neuronen, Kardiomyozyten und vom respiratorischen Epithel sezerniert (Luscher and Barton 2000; Kedzierski and Yanagisawa 2001). Außerdem wird diskutiert, ob Endothelin-1 eine stimulierende Wirkung auf die Cortisolausschüttung hat oder nicht.

Endothelin-1 entfaltet seine Wirkung über verschiedene Rezeptoren, die alle G-Proteingekoppelt sind. Über den Endothelin-Rezeptor Typ A, der vor allem in der glatten Muskelzelle lokalisiert ist, wird unter anderem die Vasokonstriktion in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße vermittelt. Auch in der Nebennierenrinde sind diese Rezeptoren vor allem in der *Zona glomerulosa* zu finden und führen möglicherweise zur Stimulation der Zellproliferation (Rossi et al. 1994; Mazzocchi et al. 1997).

Der Rezeptor Typ B (ETB) befindet sich vorwiegend auf Epithel-, Endothel- und glatten Muskelzellen. Über diesen Rezeptor wird hauptsächlich die steroidogene Wirkung von Endothelin-1 erklärt (Nussdorfer et al. 1997). Außerdem hat das Peptid über diesen Rezeptor eine vasodilatative und antiproliferative Wirkung (Yanagisawa et al. 1988).

Weiterhin kann Endothelin-1 mit Hilfe von Stimulation der Zytokinproduktion (IL-6, TNF- α) zur Chemotaxis von Leukozyten und Entzündungsreaktion beitragen (Luscher and Barton 2000).

1.3.4 Nicht näher bezeichnete Proteine

Es wurde noch ein weiteres Protein beschrieben, das an der Steroidbiosynthese beteiligt ist und von Endothelzellen produziert wird. Die Wirkung dieses 3000 Da großen Proteins scheint ausschließlich auf die Stimulation der Aldosteronsekretion beschränkt und über einen Proteinkinase-C-Signaltransduktionsweg vermittelt zu sein.

1.4 Ziel der Arbeit

Es wurde gezeigt, dass ECCM die adrenale Steroidbiosynthese stimuliert. Jedoch wurde dieser Effekt im Hinblick auf die adrenale Interleukin-6-Sekretion bisher nicht untersucht. Im Rahmen dieser Dissertation sollten deshalb folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Hat ECCM einen Effekt auf die adrenale IL-6 Synthese in der NCI-H295R-Zelllinie?
2. Produzieren NCI-H295R Zellen mehr Interleukin- 6 als HUVEC Zellen?
3. Ist die IL-6 Produktion in den NCI-H295R Zellen und in den HUVEC Zellen physiologisch relevant?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 NCI-H295R Zellen

Die Zelllinie NCI-H295R stammt ursprünglich von einem Nebennierenrindenzellkarzinom einer bei Entfernung des Tumors 48 Jahre alten Patientin von den Bahamas. Im weiteren Verlauf entwickelte die Patientin Leber- und Lungenmetastasen. Klinisch litt die Patientin im Zuge der Symptome des Steroidüberschusses unter Hyperaldosteronismus, Gewichtsverlust, Ödemen, Akne, Diarrhoen und Unregelmäßigkeiten der Menses. Die Zellen wurden 1990 in Kultur genommen (Gazdar et al. 1990). Durch Herausfiltern *adhärenter* Zellen und Wechsel in Kulturmedien entstand der hier verwendete Stamm NCI-H295R Zellen. Als Besonderheit wiesen diese Zellen genetische Aberrationen, einen hypertriploiden Chromosomensatz und auch *in vivo* Charakteristika maligner Zellen auf. Diese Zellen sind als *in vitro* Modell vor allen Dingen deswegen interessant, weil sie Eigenschaften von Zellen der *Zona glomerulosa*, *Zona reticularis* und *Zona fasciculata* vereinen. So können diese Zellen zum Beispiel durch ihr Enzymsystem bis zu 30 verschiedene Steroidhormone synthetisieren (Gazdar et al. 1990).

2.1.2 HUVEC Zellen

Die HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) wurden aus menschlichen Nabelschnurvenen isoliert und dann in Kultur genommen. Für unsere Zwecke haben wir die Zellen verschiedener Passagen aus verschiedenen Quellen benutzt (Ansurudeen et al. 2007) und außerdem auch kommerzielle von der Firma *Promo Cell*, Heidelberg, Germany erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung von NCI- H295R Zellen

Die NCI-H295R Zelllinie wurde in einem Medium bestehend aus serumfreien DMEM/F12 Medium und in den Versuchen 2.2.6 und 2.2.10 mit RPMI1640 + L- Glutamin Medium (beides Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit 2 % fetalem Kälberserum (Invitrogen), Estradiol 10 nM (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Hydrocortison 10 nM (Sigma-Aldrich), Apotransferrin 10 µg/ml (Sigma-Aldrich), Insulin 66 nM (Sigma-Aldrich), Natrium-Selenit 30 nM (Sigma-Aldrich), Penicillin 100 U/ml (Invitrogen) und Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid in einem Brutschrank kultiviert. Für die Kultivierung von ca. 5-15 Mio. Zellen in einer 250 ml Zellkulturflasche benötigte man 25 ml dieses Mediums.

Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in Abhängigkeit der Zelldichte (ca. 70 % Konfluenz) gesplittet und mit neuem Medium versorgt. Hierzu wurde unter einer laminar Air Flow zunächst das Medium steril abgesaugt. Danach wusch man die Zellen mit 10 ml PBS (Phosphate buffered Saline, Gibco/Invitrogen), um dann den Puffer wieder abzusaugen.

Als nächstes wurden drei ml Accutase hinzugefügt und die Flasche wurde bei 37°C für sechs Minuten im Brutschrank bebrütet. Dieses Accutase-Zellgemisch wurde nachfolgend mit sieben ml Medium vom Zellboden abgespült und in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, um es dann bei 1100 rpm für sechs Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde dann wieder abgesaugt, und das Pellet wurde mit der entsprechenden Menge Medium suspendiert, indem man die Pipette auf den Boden beim Aufnehmen und Ablassen der Suspension stellte. Dadurch wurden die Zellen vereinzelt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt. Die toten Zellen wurden mit Hilfe von Trypanblau (Sigma-Aldrich) optisch sichtbar gemacht. In Abhängigkeit vom Versuchsprotokoll wurden verschiedene Zellzahlen verwendet und in die entsprechenden Behälter überführt und kultiviert (s. Abb. 2.1).

Kultivierung von HUVEC Zellen

Die HUVEC-Zellen wurden in serumfreiem DMEM/F12 Medium, für die Versuche 2.2.10 und 3.4 auch in Endothelial Cell Basal Medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert, das vor Gebrauch mit einem Supplement Pack von Promocell versehen wurde. Nach Zugabe des Supplement Packs befanden sich im Endothelial Cell Basal Medium von Promocell außerdem ECGS/H (0,4%), Rinderserum (2%), Epidermaler Wachstumsfaktor (0,1 ng/ml) und Hydrocortison 1 µg/ml), (die Konzentrationen gelten jeweils für eine Endkonzentration von 500 ml Medium). Das Medium wurde spätestens alle drei Tage ausgetauscht. Wenn die Zellen in den 75 cm²-Kulturflaschen nahezu 100% konfluent waren, wurden sie in einem Verhältnis von 1:4 oder 1:8 passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, um gleich danach den Puffer wieder abzusaugen. Als Nächstes wurden drei ml Accutase hinzugefügt; die Flasche wurde für höchstens 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank bebrütet, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nachfolgend wurden die Zellen mit sieben ml Medium vom Boden abgelöst und in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Danach wurde das übrig gebliebene Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 oder 1:8 in 12 ml Medium in eine neue Kulturflasche überführt.

Herstellung von Endothel-Zell-konditioniertem Medium

Für das verwendete ECCM, insbesondere für die ersten Versuche, wurden oben genannte HUVEC-Zellen in serumfreiem DMEM/F12 Medium für 24 Stunden kultiviert. Für spätere Versuche wurden die Zellen auch in Endothelial Cell Basal Medium für 24 Stunden kultiviert. Das dabei entstandene Medium wurde alle zwei bis drei Tage abgenommen und erneuert. Das gewonnene Medium wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1400 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde es in eine sterile Spritze gefüllt und durch einen sterilen Filter in ein neues 15-ml-Falcon-Röhrchen gespritzt. Das Falcon wurde mit Datum, Passage, Konfluenzgrad und Inkubationszeit beschriftet und bei -20 °C eingefroren. Für Kontrollversuche wurde deshalb serumfreies DMEM/F12 verwendet.

2.2.2 Immunzytologie

Zunächst wurden die Endothelzellen mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers, der mit einer Verdünnung von 1 :50 gegen CD31 eingesetzt wurde, identifiziert (DAKO, Hamburg, Deutschland). Als nächstes wurde Interleukin-6 in einer Verdünnung von 1:100 mit einem polyklonalen Ziegen-Anti-Mensch-Antikörper detektiert (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Nachfolgend wurden die fixierten Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem primären Antikörper inkubiert (Merckofix, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Detektion der gebundenen Immunoglobuline wurde mit Hilfe der »linked-Streptavidin-Biotin-Technik«, wie in der Betriebsanleitung beschrieben, erreicht (DAKO). Um die Zellen sichtbar zu machen, wurden sie mit 0,01 % AEC und 0,0003 % H₂O₂ in 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) für 10 Minuten inkubiert. Die Waschschriffe wurden zwischen allen Inkubationsschritten wie folgt durchgeführt: Spülung mit Leitungswasser für 10 Sekunden, dann 10 Minuten in 0,5 M Tris-HCl-Puffer Ruhelagerung. Bevor die ersten Antikörper hinzugefügt wurden, wurde die Inkubation mit Peroxidase durchgeführt, der eine Waschprozedur und Preinkubation mit 2% normalem Schweineserum (DAKO) in 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) folgte. Am Ende wurden alle Schnitte für die Zählung mit Hematoxylin (Merck) angefärbt und auf dünnen Objektträgern, die mit Gelatin benetzt waren, fixiert. Für alle Stufen, auch für die Studien ohne Primär- oder Sekundärantikörper, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Dort konnte jedoch keine Anfärbung in den Kontrollen nachgewiesen werden. Die Färbungen wurden dreimal wiederholt.

2.2.3 Transfektion und Reporteragenassay

Transfektion

Das Plasmid-Konstrukt (IL-6 Promoter-Firefly-Luziferase) wurde – wie beschrieben – eingesetzt (Nagy et al. 2001). Das kommerziell zu erhaltende pRL-TK-Renilla Luziferase Plasmid stammt von der Firma Promega und wurde als Kontrolle kotransfiziert.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden zunächst ca. 100.000 NCI-H295R Zellen pro Well in einer 24-Well Platte (Nunc, Wiesbaden, Germany) für 24 Stunden bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Als nächstes wurden die Plasmide mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche, Mannheim, Germany) in die Zellen gebracht.

Um ein Verhältnis von 3 :1 von FuGENE zu DNA bei der Transfektion zu erzeugen, wurden nach der Inkubationszeit 1,5 µg FuGENE, 1 µg des IL-6 Promoter-Luciferase-Plasmids und 0,25 µg des pRL-TK-Kontrollplasmids pro Well verwendet und erneut für 24 Stunden mit zusätzlichen 2,4 ml serumfreiem Medium pro Well inkubiert. Das pRL-TK Plasmid diente als Kontrolle, welches den SV40-Promoter enthält und die Renilla-Luciferase exprimiert. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS Puffer gewaschen.

Nun wurde nach unten stehendem Schema mit ECCM-Medium oder serumfreien DMEM/F12 stimuliert. Mit Hilfe des Dual-Luziferase-Reporter-Assay-Systems (Promega, Mannheim, Deutschland) konnten nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit die Aktivität der Renilla und Firefly Luziferase gemessen werden. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

A (10% ECCM)	B (20% ECCM)
C (30% ECCM)	D (40% ECCM)
E (60% ECCM)	F (80% ECCM)
G (100% ECCM)	H (100% Kontroll-Med.)

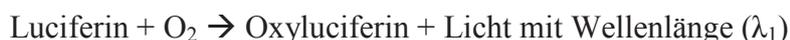
Abb. 2.1 Schematisierter Blick auf eine 24-Well Platte.

Aufteilung der verschiedenen Medienkonzentrationen in einer 24 Well-Platte. In drei Wells nebeneinander war jeweils die gleiche Konzentration von ECCM und DMEM/F12. Die Konzentration von ECCM wurde jeweils erhöht und die von DMEM/F12 entsprechend verringert. A: 10% ECCM; 90% DMEM/F12; B: 20% ECCM; 80% DMEM/F12; C: 30% ECCM; 70% DMEM/F12; D: 40% ECCM; 60% DMEM/F12; E: 60% ECCM; 40% DMEM/F12; F: 80% ECCM; 20% DMEM/F12; G: 100% ECCM; H: 100% DMEM/F12 (Referenz).

2.2.4 Luciferase Messung

Mit dem Dual-Luziferase-Reporter-Assay-System (Promega) besteht die Möglichkeit, mit einem Reagenzansatz die Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität zu messen. Bei Luciferasen handelt es sich um Enzyme, die durch eine Reaktion mit Sauerstoff Licht freisetzen, welches dann messbar wird.

Bei der Renilla-Luziferase sah die Reaktion wie folgt aus:



Die Firefly-Luziferase, ein Enzym, das im Organismus des Leuchtkäfers vorkommt, führte zu folgender Reaktion:



Falls der Promotor nach der Stimulation aktiviert wurde, wurden Renilla- und Firefly-Luziferase produziert, die dann gemessen werden konnten.

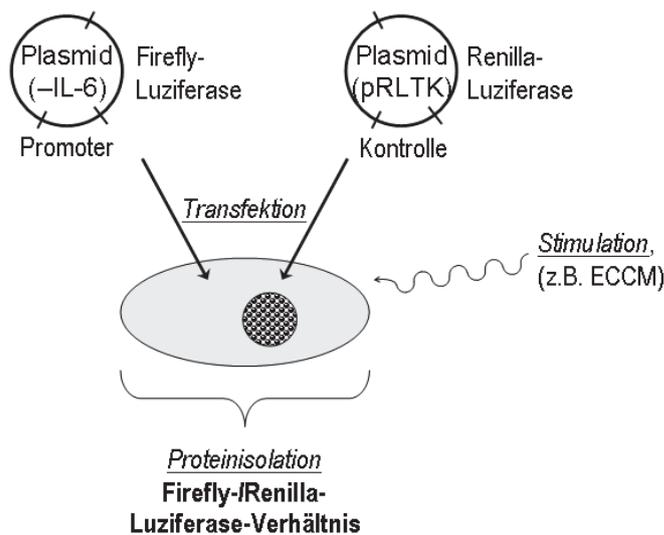


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Transfektion

Einbau der Plasmide (IL-6: Interleukin-6 Plasmid (Firefly-Luziferase); pRLTK-Plasmid: p Renilla Luziferase Reporter Vektor) in die Zelle und anschließende Stimulation, in diesem Fall mit ECCM, um am Ende die Proteinisolierung durch das Firefly-/Renilla-Luziferase-Verhältnis zu bestimmen.

Das Stimulationsmedium wurde nach dem Versuch abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen.

Als nächstes wurden 100 µl eines Lysepuffers (PLB) in die Wells pipettiert, um die Zellen aufzuschließen. Danach wurden die Zellen auf einer Schüttelplattform für 10 Minuten inkubiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen mit der Pipettenspitze abgekratzt und mit 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Für die Messung der Lumineszenz in einem Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) wurden nun fünf µl der jeweiligen Probe mit 25 µl LAR II Luziferase Assay Reagenz II versetzt und dann gemessen. Das Ergebnis war die Aktivität der Firefly-Luziferase. Durch weitere Zugabe von 25 µl einer Stopplösung (Stop and Glo Reagenz), in der auch das Substrat für die Renilla-Luziferase enthalten ist, wurde im Anschluss die Renilla-Luziferase Aktivität bestimmt. Zur Auswertung wurde der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luziferase ermittelt.

In unserem Versuch wurde eine transiente Transfektion mit einem Reporterplasmid, das die IL-6-Promoter-Region vor einer Firefly Luziferase beinhaltet, durchgeführt.

Nachdem die Transfektion durchgeführt wurde, wurden die NCI-Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20, 30, 40, 60, 80 und 100 %) ECCM für 48 Stunden kultiviert. Dieser Versuch wurde ebenfalls dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.5 Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Für die Durchführung des ELISAs wurde das Quantikine Human IL-6 Kit (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Beim ELISA Verfahren handelt es sich um eine Sandwich-Immunoassay-Technik, bei der mit Hilfe von Farbreaktionen quantitativ die Konzentration von Interleukin-6 nachgewiesen werden kann. Das Wort „Sandwich“ wird hier benutzt, da das zu untersuchende Antigen zwischen zwei Antikörpern gebunden wird.

Zur Vorbereitung wurde zunächst der Überstand von den Zellen abgenommen und in 1,5 ml große Eppendorf- Reaktionsgefäße gefüllt. Um 250 ml Waschpulver zu erhalten, wurden 10 ml Waschpufferkonzentratlösung in 250 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Der IL-6-Standard wurde mit 5 ml RD5T (11 ml eines proteinbasierten Puffers) Kalibratordiluent versetzt. Dies entsprach einer Ausgangskonzentration von 300 pg/ml. Um nun die entsprechenden Verdünnungen herzustellen, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, die nach sechs Verdünnungsschritten eine Endkonzentration von 3,12 pg/ml ergab.

Die verwendete 96-well Platte war mit einem monoklonalen Coating-Mäuse-Antikörper gegen IL-6 beschichtet, der sich dann bei Zugabe des Antigens mit diesem verband (Abb. 2.3)

Im nächsten Schritt wurden in jedes Well 100 µl Assay Diluent RD1W pipettiert. Zusätzlich wurden 100 µl des Standards, der Kontrolle oder der Probe hinzugefügt, je nachdem, wie die Versuchsreihe aufgebaut war. Das Ganze wurde anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach zweistündiger Inkubation mit dem Zellüberstand wurde ein weiterer Detektionsantikörper aufgetragen, der allerdings an einer anderen Stelle des Antigens bindet; so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex in der Art eines Sandwichs entstand (Abb. 2.3). Hierzu wurde jedes Well mit 400 µl Waschpuffer gefüllt und anschließend die Flüssigkeit wieder abgesaugt. Nach dem vierten Waschdurchgang wurde die Flüssigkeit ausgeschüttet und die Platte durch dreimaliges Ausklopfen auf einem Papiertuch gesäubert. Nun wurden 200 µl IL-6 Konjugat (ein Polyklonaler Antikörper gegen IL-6) hinzugefügt und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um danach den Waschvorgang, wie oben beschrieben, erneut durchzuführen.

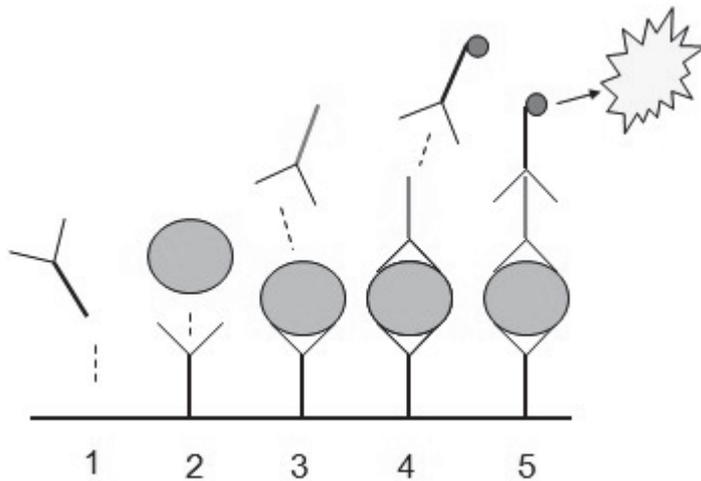


Abb. 2.3 Prinzip ELISA

Zunächst wird ein Beschichtungsantikörper auf die Platte aufgetragen (1), dann wird die Probe mit der unbekanntem Konzentration – für die Eichkurve eine definierte Menge – des Antigens hinzugefügt (2). Als nächstes wird ein Brückenantikörper hinzugefügt, der an einer anderen Stelle des Antigens bindet (3). Im letzten Schritt kommt ein Detektionsantikörper hinzu, an dem ein Enzym haftet (4), das einen Farbstoff zu einer photometrisch messbaren Reaktion konvertieren kann (5).

Um das Ganze als Farbreaktion sichtbar zu machen, wurde ein weiterer Antikörper (200 µl Substratlösung), der an den Detektionsantikörper bindet und ein Enzym beinhaltet, zur Anlagerung in jedes Well pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (Abb. 2.3). Zum Schluss wurden 50 µl Stopplösung pro Well hinzugefügt. Am Antigen wurde eine Farbreaktion hervorgerufen, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten gemessen werden konnte.

Die Intensität der Färbung war proportional der Konzentration des Antigens in der Probe. Anhand der Eichkurve konnten so die Konzentrationen des Antigens, die in der Probe enthalten war, gemessen werden. Interleukin-6-ELISA-Messungen wurden in mehreren Versuchen eingesetzt (Ergebnisse 3.1, 3.4, sowie 3.6) und jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Im Jahr 1985 wurde erstmals die Methode der PCR (Polymerase Chain Reaction) veröffentlicht (Saiki et al. 1985). Bei dieser Methode wird die zuvor erstellte DNA durch Zugabe von Reaktionskomponenten künstlich vervielfältigt.

Für die real time PCR wurden ca. 2.000.000 HUVEC- und NCI-H295R Zellen mit dem jeweiligen Medium (HUVECs mit ECC-Medium und NCI-H295R Zellen mit RPMI1640-Medium) über 24 Stunden stimuliert. Von diesen Zellen wurde dann mRNA hergestellt, mit Hilfe derer durch reverse Transkription cDNA (komplementäre DNA) erstellt wurde (Beschreibung siehe unten).

Die cDNA konnte für die SYBR-Green real time PCR verwendet werden, um damit das IL-6-Gen und das β -Aktin-Gen als House-keeping-Gen (Referenzgen) bei der jeweiligen Zellart zu vervielfältigen. Der hier verwendete fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green bindet ausschließlich die doppelsträngige DNA und kann so zur Quantifizierung des Gens verwendet werden.

2.2.7 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das RNase Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei diesem Kit kommt zur RNA-Isolation eine Membran auf Sizilibasis zum Einsatz, welche die RNA bindet. Die verwendeten Zellen wurden nach der Lösung vom Well (mit jeweils 100 μ l Accutase) für sechs Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und abermals zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet pro Well in 350 μ l RLT-Puffer (Kit) aufgenommen. Als nächstes wurden die 350 μ l RLT-Puffer auf einen Qiashreder (Qiagen) pipettiert, um das Lysat zu homogenisieren. Dazu musste der Shredder bei höchster Umdrehung (13.000 rpm) in einer Tischzentrifuge für zwei Minuten zentrifugiert werden.

Der Shredder wurde nun verworfen und das Lysat mit 350 μ l 80-prozentigem Alkohol vermischt, um die Bindungseigenschaften der RNA an die Membran zu verbessern. Danach wurde die gesamte Menge von 700 μ l auf eine RNase freie Mini-Säule (Qiagen) aufgetragen und bei 8000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Hierbei wurde die RNA auf die Säule gebunden und der Rest als Lysat verworfen. Im Folgenden wurde die Säule mit 700 μ l RW1-Puffer und danach mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen, indem nach der Zugabe erneut mit 8000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert wurde. Zuletzt wurde die Säule erneut mit 500 μ l RPE-Puffer bei 8000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert, um die Membran zu trocknen.

Anschließend wurde noch zweimal 30 μ l RNase freies Wasser auf die Säule gebracht, damit die RNA von der Säule gelöst und in einem 1,5 ml großen Eppendorf-Becher aufgefangen

werden konnte. Die entstandene RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt in DNA umgeschrieben.

Messung der RNA-Konzentration

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde ein Photometer verwendet. Mit ihm wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Mit Hilfe der folgenden Formel wurde dann die Konzentration berechnet:

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Multiplikationsfaktor (40 für RNA)}$.

Zunächst wurden die RNA-Proben 1:40 mit TE-Puffer verdünnt, damit die OD_{260} genau der RNA Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Für die Verdünnung und Messung wurden spezielle Küvetten aus Kunststoff (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Gleichzeitig wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, um die Reinheit der RNA zu überprüfen. Sofern der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen 1,8 und 2,0 lag, ließ dies darauf schließen, dass die hergestellte RNA besonders rein war.

2.2.8 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von cDNA durch reverse Transkription der vorliegenden DNA wurde das Ready-to-go T-primed First Strand Synthesis Kit (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) verwendet. In jedem Reaktionsbehälter befinden sich temperaturstabile cDNA Synthesereaktionskomponenten, die aus NotI-(dT) 18 Primer, Cloned FPLC pure M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, und Nukleotiden bestehen. Die Puffer- und dNTP-Eigenschaften des Reaktionsmixes sind 45 mM Tris (pH 8,3), 6 mM KCL, 15 mM DTT, 9 mM MgCl_2 , 0,08 mg/ml BSA, und jedes dNTP 1,8 mM.

Um ein Endvolumen von 33 μl cDNA zu erzeugen, soll die mRNA in reiner Konzentration von 250 ng/ μl vorliegen. Je nachdem, wie viel mRNA synthetisiert wurde, werden nun 1 bis 5 μl der mRNA verwendet und mit DEPC-Wasser auf 33 μl aufgefüllt.

Diese Lösung wird dann für fünf Minuten bei 65°C im T3-Thermocycler (Biometra) erhitzt. Danach wird dieselbe Lösung für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wird auch der Reaktionsmix vom First-Strand Kit bei 37°C für fünf Minuten erhitzt. Nachfolgend wird die RNA in den Reaktionsmix überführt und beides zusammen, ohne es gemischt zu haben, erneut bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. In diesem Schritt können sich die Primer an die RNA anlagern. Als nächstes werden das Reaktionsgemisch und RNA durch Vortexen gut

gemischt und dann zur reversen Transkription für weitere 60 Minuten im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37°C inkubiert.

Hierbei übersetzt die reverse Transkriptase, die unter natürlichen Bedingungen nur in Retroviren vorhanden ist, die mRNA in cDNA.

Die *in vitro* entstandene cDNA konnte nun entweder direkt für die PCR verwendet oder zunächst bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.9 Primer-Synthese

Die ersten Versuche wurden mit TaqMan-Primern durchgeführt, bei deren Sondenerstellung folgende Regeln zu beachten waren: wenig Nukleotidwiederholungen, Anteil der Guanin (G)- oder Cytosin (C)-Nukleotide nur zwischen 30 und 80%, höherer Cytosin- als Guaninanteil, keine Guanin-Nukleotide am 5'-Ende. Die Sonden werden abschließend mit einem Reporterfarbstoff, z. B. FAM, versehen. Die Primer wurden entsprechend der Sonde nach ähnlichen Kriterien ausgewählt: Sie sollten in unmittelbarer Nähe der Sonde binden und eine niedrigere Schmelztemperatur als die Sonde, also zwischen 58 und 65°C, haben.

Die Sequenzen sind in der folgenden Abbildung dargestellt und wurden bei der Firma Eurogentec S.A. (Eurogentec, Köln, Deutschland) synthetisiert und bestellt.

Name der Primer / Sonde	Nukleotidsequenz (5' nach 3')
IL-6 Sonde	TCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGT
IL-6 Primer forward	TCCAGGAGCCCAGCTATGAA
IL-6 Primer reverse	CCCAGGGAGAAGGCAACTG
β -Aktin forward	AGCCTCGCCTTTGCCGATCCG

Abb. 2.4 Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

Für die weiteren Versuche wurde aus Kostengründen mit SYBR Green gearbeitet. Hierfür wurde ein SYBR-GREEN-PCR-Kit eingesetzt. Bei dem verwendeten SYBR[®] GREEN PCR Kit (Qiagen) war ein SYBR Green PCR Master Mix enthalten. In diesem Mix waren der SYBR Green I Farbstoff, eine spezielle Polymerase, PCR-Puffer, dNTP Mix und MgCl₂

enthalten. Die Primer wurden zuvor mit DEPC-Wasser bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Weitere Komponenten der Reaktionsansätze sind in der folgenden Tabelle mit Mengen und Endkonzentrationen angegeben (s.u.).

Nach Vorbereitung eines Mastermix-Ansatzes für zehn Proben mit den Komponenten aus der Tabelle wurde die 96-well-Platte (Applied Biosystems, MicroAmp, Carlsbad, USA) pro Well mit einem Volumen von 22,5 µl versehen, zu denen im nächsten Schritt 2,5 µl cDNA hinzugefügt wurden.

Pro Zelllinie (HUVEC, NCI, und T-Zellen) wurde eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt. Um die Pipettiergenauigkeit zu kontrollieren, wurden zusätzlich zwei Wells pro Ansatz mit 2,5 µl Wasser gefüllt. In diesen Proben dürfte demnach kein Signal zu messen sein.

Nach Befüllen der Wells wurden sie mit einer Klarsichtfolie abgeklebt (Applied Biosystems, MicroAmp) und für ein paar Sekunden bei 1400 rpm abzentrifugiert.

Reagenzien	IL-6	β-Aktin	Endkonzentration
SYBR Green Mastermix	12,5 µl	12,5 µl	
Primer forward	1,0 µl	} 2,5 µl	300 mM
Primer reverse	1,0 µl		300 mM
cDNA	2,5 µl	2,5 µl	10 ng
Aqua dest.	8,0 µl	7,5 µl	

Abb. 2.5 Komponenten der Reaktionsätze in Menge und Endkonzentration

Die PCR wurde in 48 Zyklen mit den folgenden Schritten pro Zyklus in einem Step One Plus Real Time PCR System der Firma Applied Biosystems durchgeführt:

- 95° C: 10 Minuten Aktivierung der DNA- Polymerase
- 95° C: 20 Sekunden Denaturierung
- 60° C: 20 Sekunden Annealing (Primer Anlagerung)
- 60° C: 20 Minuten Extension (Kettenverlängerung)

Mit Hilfe der komparativen Ct-Methode wurde zusätzlich die relative mRNA-Expression berechnet. Jede Probe hat ihren eigenen Ct-Wert, der für jede Probe aus dem signifikanten Antigen des Amplifikationssignals über das Grundrauschen ermittelt wird. Er entspricht dem Schwellenwert (Threshold), der im linear ansteigenden Abschnitt inhalb-logarithmischer Darstellung sichtbar ist.

2.2.10 T-Zell-Stimulationstest

Für die T-Zell-Isolierung wurden zwei bis fünf CPT-Röhrchen (BD Vacutainer, New Jersey, USA) mit frischem Blut verwendet. Die Röhrchen wurden bei 1750 rpm bei 22°C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bestand die oberste Schicht aus Serum, das abgenommen und verworfen wurde. Die mittlere Schicht wurde weiter verwendet und zunächst mit PBS Puffer gewaschen und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Zu jedem Zellpellet wurden zwei ml Erythrozytenlysepuffer (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) hinzugefügt und für fünf Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS Puffer gewaschen und gezählt.

Für die T-Zell-Isolierung wurden CD3 Micro Beads (Miltenyi Biotec, Auburn, USA) verwendet. T-Zellen exprimieren den CD3-Rezeptor. An diesen Rezeptor binden Antikörper, welche auf der anderen Seite einen Magneten beinhalten. Wenn die Zellen nun über spezielle Säulen laufen, werden sie an einem Magneten festgehalten, um am Ende mit den Antikörpern aufgefangen zu werden, wenn man den Magneten entfernt.

Für den Versuch mussten die Zellen über die gesamte Zeit auf Eis gestellt und die verwendeten Säulen und Magnete vorgekühlt werden. Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation von dem Puffer befreit und das Zellpellet danach sofort in 80 µl MACS-Puffer (Miltenyi Biotec Stocklösung, Auburn, USA), 0,5 % BSA und 2 mM EDTA pro 10^7 Zellen aufgenommen.

Danach wurden 20 µl CD3 Micro Beads pro 10^7 Zellen hinzugefügt. Das Ganze wurde für 15 Minuten bei vier bis acht °C inkubiert. Um die Zellen nach der Inkubation zu waschen, wurden sie erneut mit ein bis zwei ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen versehen und erneut für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen diesmal in 500 µl MACS Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. Während der Zentrifugationszeit wurden die Säulen vorbereitet.

Hierzu wurden LS-Säulen (MidiMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, USA), die bei Zellzahlen ab 10^8 verwendet werden, im magnetischen Feld eingesetzt (MACS Separator). Zunächst wurden drei ml MACS Puffer darüber gespült, damit die Säulen sauber waren.

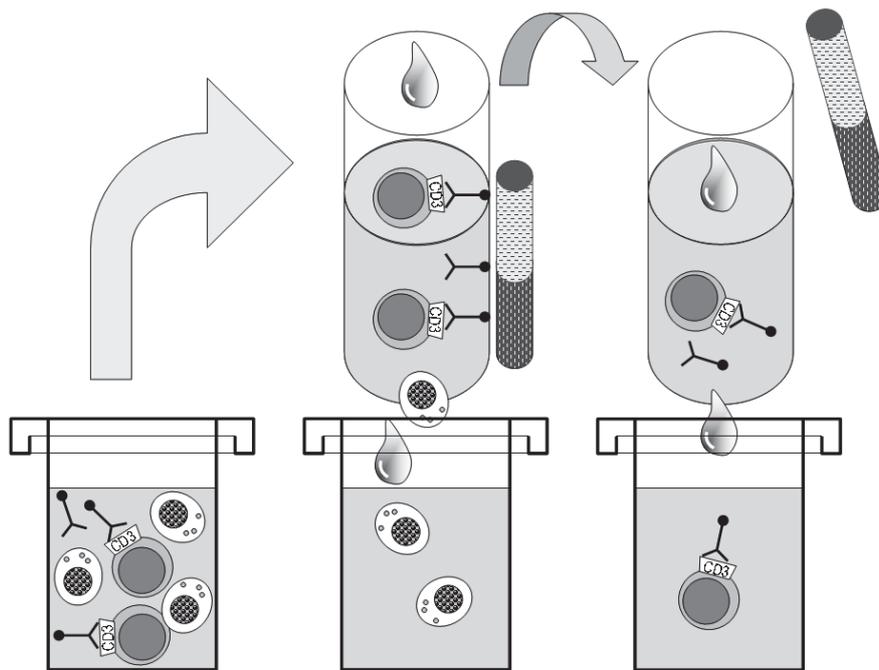
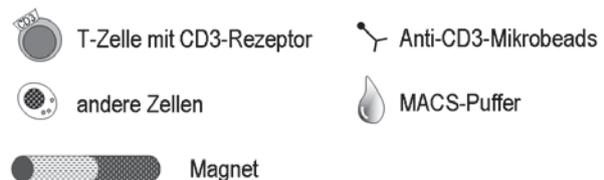


Abb. 2.6 T-Zellisolierung

Zunächst werden die T-Zellen mit einem magnetischen Anti-CD3-Antikörper markiert, um dann mit einem Magneten festgehalten zu werden, während die anderen Zellen mit MACS Puffer ausgewaschen werden. Danach werden die T-Zellen vom Magneten entfernt und in einem neuen Behälter aufgefangen. Mit weiterem MACS Puffer werden die Antikörper abgewaschen (Legende nebenstehend).



Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säulen gefüllt. Unter den Säulen standen 15 ml Falcon Gefäße, welche die Zellen, die nicht in der magnetischen Säule festgehalten wurden, auffangen sollten. Um alle anderen Zellen auszuwaschen, wurde die Säule nun dreimal mit je weils drei ml MACS Puffer gewaschen, sobald die Zellsuspension einmal komplett durchgelaufen war.

Als nächstes wurde die Säule von dem magnetischen Feld gelöst und über einem neuen 15 ml Falcon platziert. Es wurden fünf ml MACS Puffer auf die Säule gefüllt und mit Hilfe des

Stempels schnell über die Säule gedrückt, um mit dem Druck die T-Zellen von der Säule zu lösen.

Die aufgefangenen T-Zellen wurden erneut bei 1400 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und anschließend in 10 ml RPMI-Medium (+) aufgenommen. Dem Medium wurden zuvor noch IL-2 (Konzentration von 500 U/ μ l), IL-1 β (Konzentration von 1000 U/ μ l), Prostaglandin E2 und TNF- α (alle R&D Systems, Minneapolis, USA) für die Stimulation hinzugefügt nach dem entsprechenden Schema (s.Abb.2.7). Eine Probe, die nur mit IL-6 versetzt wurde, diente als Positivkontrolle.

Die Zellzahl betrug ca. 3.800.000 Zellen/well in 1,5 ml Medium in einer 24-well-Platte. Die Zellen wurden über 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen nach dem unten angegebenen Schema stimuliert. Die HUVECs und NCI-H295R Zellen wurden ohne Stimulation ebenfalls 24 Stunden in der 24-Well-Platte inkubiert.

Stimulationsansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
IL-6 (1ng/ml)	+	-	-	-	-	-	-	-
IL-2 (0,125 U/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
TNF- α (10 ng/ml)	-	-	+	-	+	-	+	-
TNF- α (20 ng/ml)	-	-	-	+	-	+	-	+
IL-1 β (25 ng/ml)	-	-	-	-	+	-	+	-
IL-1 β (50 ng/ml)	-	-	-	-	-	+	-	+
PGE ₂ (1 μ g/ml)	-	-	-	-	-	-	+	-
PGE ₂ (2 μ g/ml)	-	-	-	-	-	-	-	+

Abb. 2.7 Pipettierschemata für die Stimulation von T-Zellen

Je nach Ansatz kamen unterschiedliche Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen zur Anwendung.

Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und für den ELISA verwendet; aus den Zellen wurde mRNA hergestellt (s.o.). Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Endothelzellen

Auf der Abb. 3.1 erkennt man eine Endothelzelle, die mit einem Anti-CD31 Antikörper markiert wurde. Diese Endothelzellen konnten in einer Zellkultur aus präparierten normalen humanen Nebennieren detektiert werden.

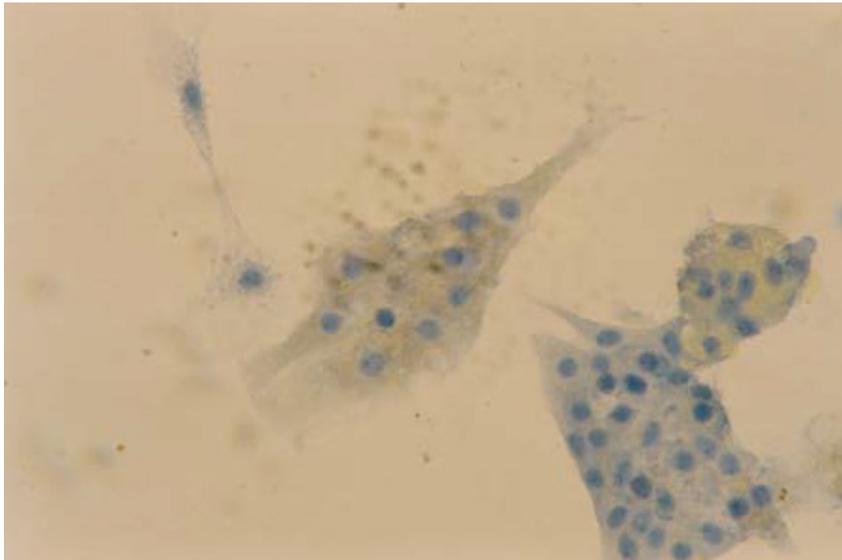


Abb.3.1 Immunzytochemie mit CD31-Antikörper

Immunocytochemie einer Endothelzelle in einer primären Nebennierenzellkultur nach sieben Tagen Inkubation mit einem Anti-CD31-Antikörper.

3.2 Promoteraktivität

Mit Hilfe dieser Methode sollte gemessen werden, ob die IL-6 Promoteraktivität in NCI-H295R Zellen nach Exposition gegenüber ECCM ansteigt. Hierzu wurde eine transiente Transfektion mit einem Reporterplasmid, das die IL-6-Promoter-Region vor einer Firefly Luciferase beinhaltet, durchgeführt.

Die Inkubation von NCI-H295R Zellen mit ECCM führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Promoteraktivität wie folgt: 10% ECCM bei 79,0 (SEM \pm 25,5)%, 73,0 (SEM \pm 5,7)%, 95 (SEM \pm 24,0)%, 139,5 (SEM \pm 47,4)%, 333,5 (SEM \pm 215,7)%, 334,5 (SEM \pm 137,9)% und 100% bei 410,5 (SEM \pm 200,1)%.

Ab einer ECCM Konzentration von 60% ist eine signifikante IL-6-Promoteraktivität erkennbar. Im Vergleich zur basalen Promoteraktivität ist sie bei 60 bis 100% ECCM zwei bis dreimal so hoch wie basal (Abb. 3.2).

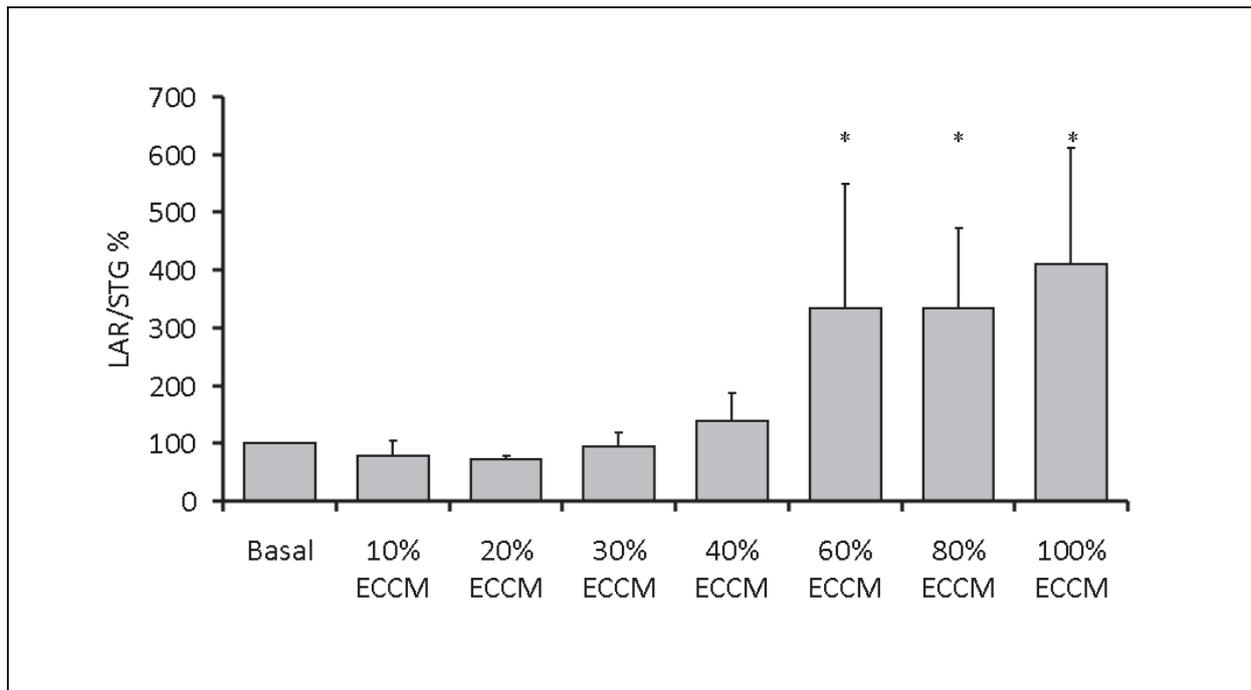


Abb. 3.2 Promoteraktivität von IL-6 (1µg)

Relative Promoteraktivität von IL-6 in transfizierten NCI-H259R Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von ECCM (n=3), (*: P < 0,05). In diesem Reporterassay erkennt man einen signifikanten Anstieg der IL-6-Promoteraktivität. Am stärksten ist die Promoteraktivität bei ECCM Konzentrationen von 60 bis 100% ECCM (Willenberg et al. 2008).

3.3 IL-6 Konzentrationen im Überstand

Nach 24-stündiger Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit ECCM in den Konzentrationen 20%, 40%, 60%, 80% und 100% in Kontrolle zu NCI-H295R-Zellen, die mit serumfreien DMEM/F12-Medium versetzt wurden, ergab sich ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration in den Zellüberständen, die mittels ELISA bestimmt wurde. (Abb. 3.3)

Schon bei 20%-igem ECCM Zusatz ließ sich eine Signifikanz erkennen. Die IL-6-Sekretion stieg auf 4,1 (SEM ± 0,7) pg/ml (Mittelwert ± SEM), bei 40% ECCM war sie schon doppelt so groß mit 8,4 (SEM ± 1,1) pg/ml und stieg dann weiter bei 60% auf 11,8 (SEM ± 0,3) pg/ml, bei 80% auf 14,1 (SEM ± 0,4) pg/ml, und bei 100% auf 18,0 (SEM ± 2,0) pg/ml.

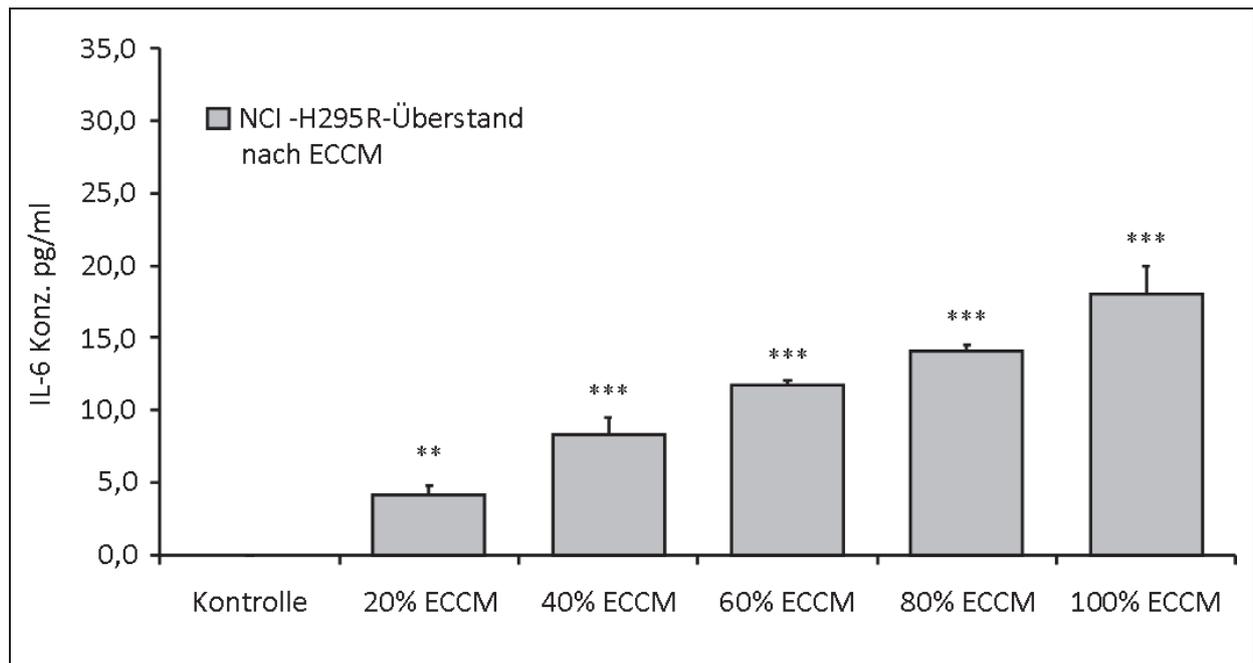


Abb. 3.3 IL-6 Konz. im Überstand nach 24h ECCM auf NCI-H295R Zellen

IL-6 Konzentration in pg/ml im Überstand von NCI-H295R Zellen nach Inkubation mit ECCM in verschiedenen Konzentrationen (n=3); (**: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$). Mit Hilfe des ELISAs wurde nachgewiesen, dass die IL-6-Konzentration entsprechend der ECCM Konzentration proportional ansteigt (Willenberg et al. 2008).

Zum Vergleich wurde die IL-6-Konzentration im ECCM in unterschiedlichen Konzentrationen mittels ELISA gemessen – ohne dass damit NCI-H295R Zellen behandelt wurden –, um die basale Sekretion des IL-6-Proteins von HUVECs festzustellen.

Hierbei fanden sich folgende Werte: Bei 20% ECCM lag die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand bei 5,3 (SEM \pm 0,4) pg/ml. Dieser Wert stieg bei 40%, 60%, 80% und 100% um jeweils ca. 5 pg/ml auf Werte von 11,2 (SEM \pm 0,8) pg/ml, 16,1 (SEM \pm 1,0) pg/ml, 21,9 (SEM \pm 2,7) pg/ml und 28,3 (SEM \pm 1,1) pg/ml an. Auch hier wird deutlich, dass es einen konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-6-Sekretion gibt (Abb. 3.4).

Insgesamt fällt auf, dass die IL-6 Konzentration im ECCM der HUVECs jeweils ca. 2 pg/ml höher ist, als im Überstand der NCI-H295R Zellen, die mit der gleichen Konzentration ECCM inkubiert wurden. Damit wurde mit Hilfe des ELISAS gezeigt, dass auch Endothelzellen IL-6 sezernieren.

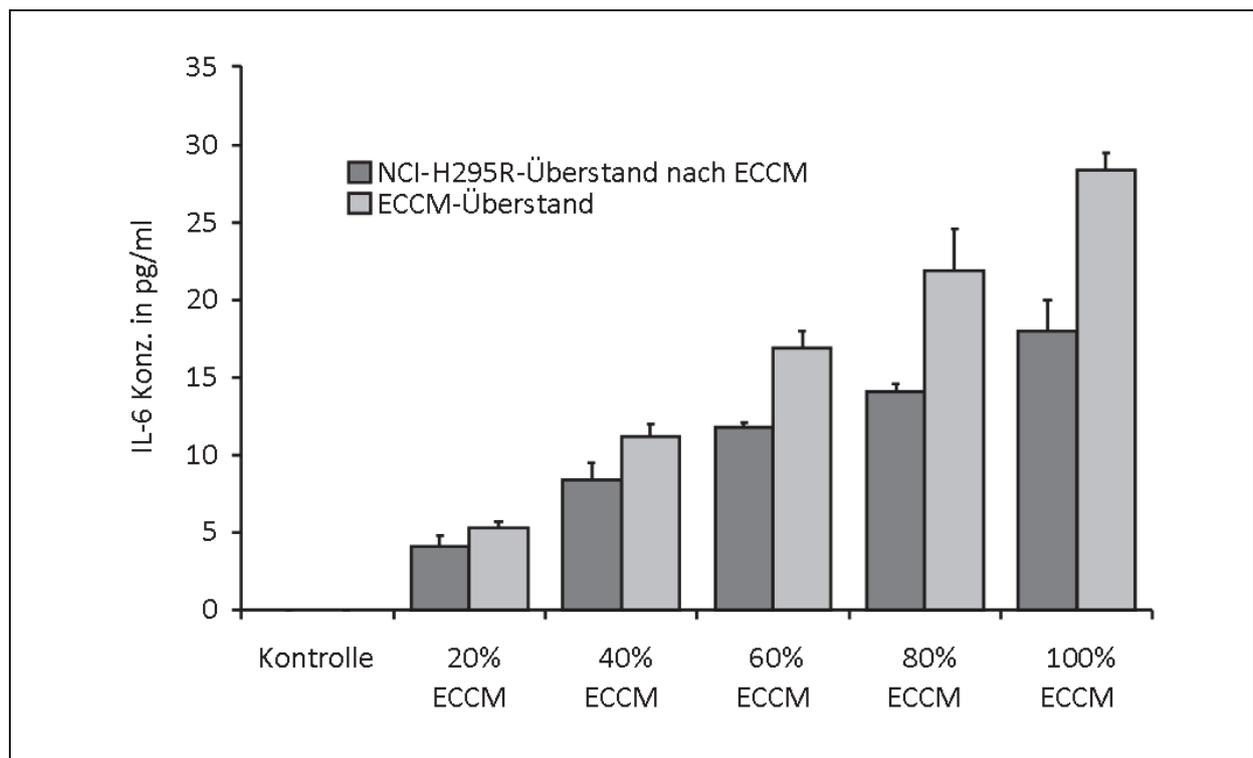


Abb. 3.4 IL-6 im Überstand im Vergleich

IL-6-Konzentration in pg/ml im Überstand von NCI-H295R Zellen und HUVEC Zellen im Vergleich nach 24stündiger Inkubation mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von ECCM basal, 20% ECCM, 40% ECCM, 60% ECCM, 80% ECCM und 100% ECCM (n=3). In beiden Zellkulturen steigt die IL-6 Konzentration proportional zur ECCM Konzentration an. Im Überstand der HUVEC ist die IL-6-Konzentration jeweils ca. 2 pg/ml höher als im Überstand der NCI-H295R Zellen. Damit wurde mit Hilfe des ELISAS gezeigt, dass auch Endothelzellen IL-6 sezernieren (Willenberg et al. 2008).

3.4 Cycloheximidversuch

Durch Cycloheximid wird die *de novo* Proteinbiosynthese gehemmt. Damit wollten wir überprüfen, wie viel IL-6 noch nach Zugabe von ECCM und Cycloheximid im Überstand von NCI-H295R Zellen vorhanden war. Als Kontrolle dienten NCI-H295R Zellen, die nicht mit ECCM inkubiert und auch nicht mit Cycloheximid behandelt wurden (0 µM).

Wir ermittelten nach Inkubation mit 50% und 100% ECCM und durch Zugabe zweier verschiedener Konzentrationen von Cycloheximid (100 und 200 µM) folgende Daten:

Die Konzentrationen an IL-6 im Überstand von NCI-H295R Zellen waren ungefähr vergleichbar, d.h. bei 50% ECCM mit 100 µM Cycloheximid eine IL-6 Konzentration von 105,8 (SEM ± 35,3) pg/ml und mit 200µM eine IL-6 Konzentration von 113,3 (SEM ± 20,7) pg/ml.

Für die Konzentration von 100% ECCM ergab sich ein Ergebnis von 202,9 (SEM ± 60,4) pg/ml bei Zugabe von 100 µM Konzentration Cycloheximid, bei Zugabe von 200 µM Cycloheximid ein Wert von 196,8 (SEM ± 17,2) pg/ml.

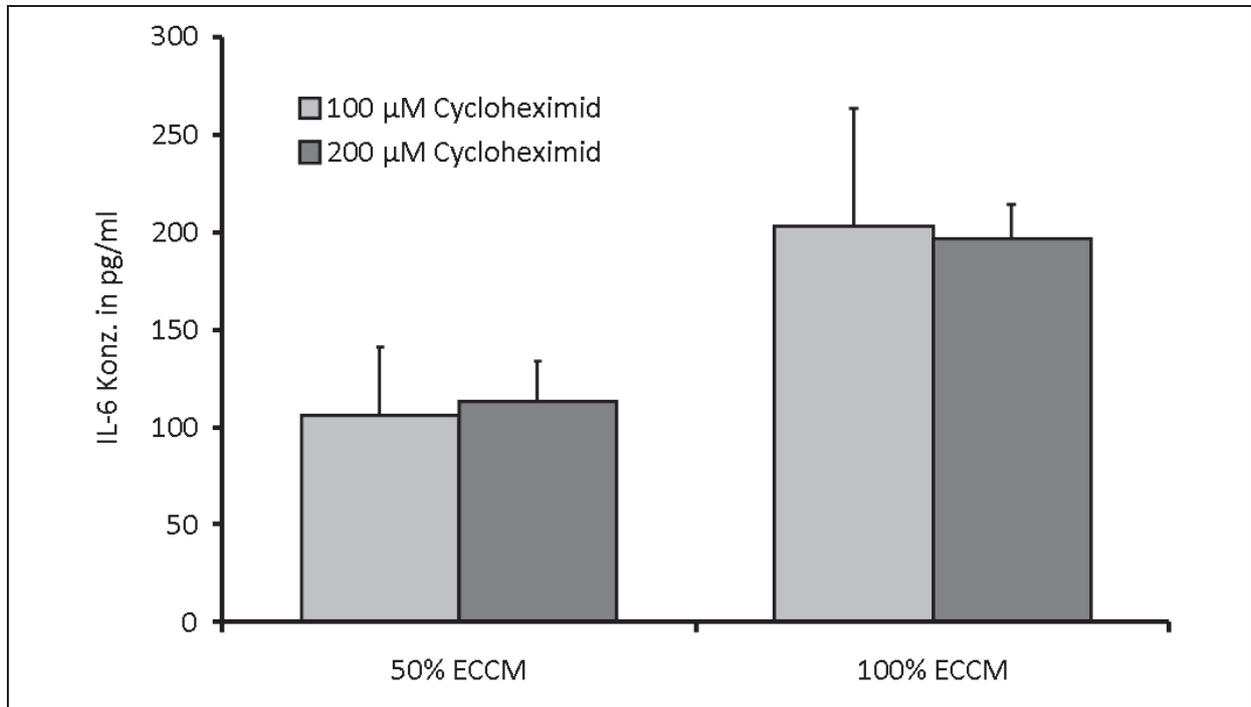


Abb. 3.5 Cycloheximidversuch

IL-6-Konzentration in pg/ml im Überstand von NCI-H295R Zellen, die mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Cycloheximid (100 µM und 200 µM) und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von ECCM (50 und 100%) über 24 Stunden inkubiert wurden (n=3). Als Vergleich wurden NCI-H295R Zellen mit RPMI-Medium und ohne Cycloheximid verwendet. Die Konzentrationen an IL-6 verändern sich innerhalb der unterschiedlichen Cycloheximid Konzentrationen nur minimal und innerhalb der unterschiedlichen ECCM-Konzentrationen genau um das Doppelte von 50 nach 100% ECCM. Die IL-6-Produktion der Nebennierenrinndenzellen wird demzufolge kaum durch das Cycloheximid beeinflusst.

3.5 NCI-H295R/HUVEC PCR

Um zu überprüfen, ob sich die Aktivierung des IL-6-Promoters in einer Generation von Messenger RNA niederschlägt, untersuchten wir die Expression von IL-6 Messenger RNA mittels PCR in beiden Zelllinien, denn die IL-6-Konzentration im Überstand kultivierter NCI-H295R-Zellen änderte sich nach Zugabe von ECCM zusammen mit Cycloheximid nicht.

Als Ergebnis wurde sichtbar, dass die relative IL-6-mRNA-Synthese in HUVECs um 20,3 (SEM ± 8) % höher ist, als in NCI-H295R Zellen, die als Referenz mit 1 betrachtet wurden.

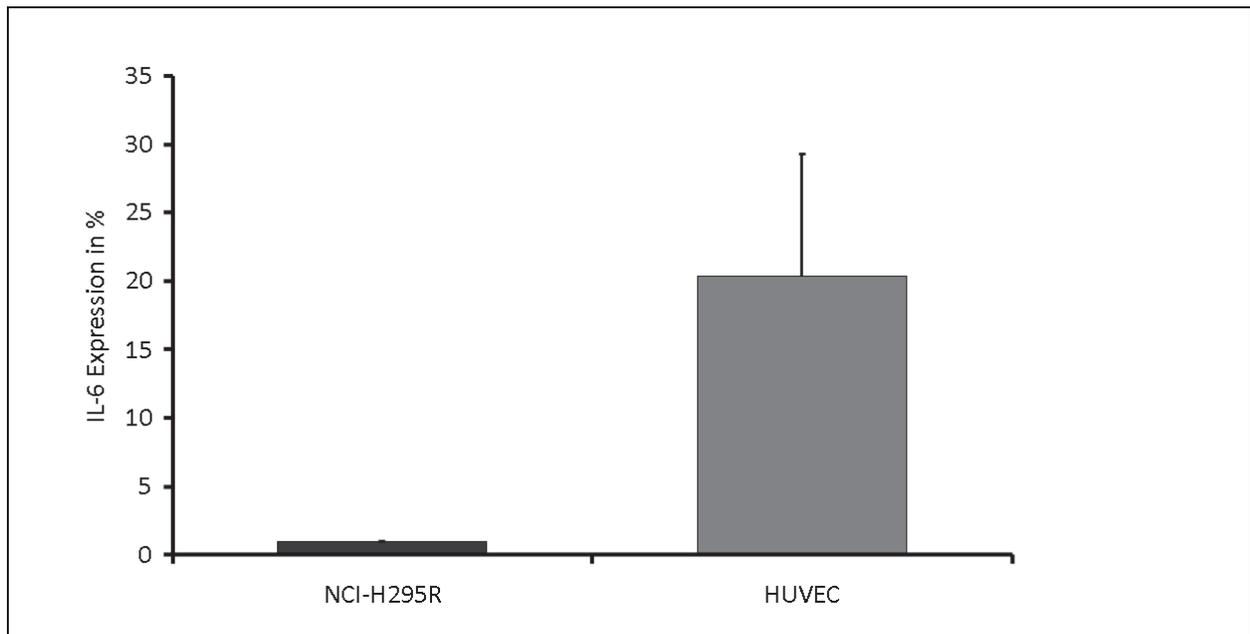


Abb. 3.6 Semiquantitative PCR zum Vergleich der IL-6 Expression durch NCI-H295R-Zellen und HUVECs

Relative IL-6 Expression von HUVECs im Vergleich zu NCI-H295R Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus n=3 Versuchen \pm Standardabweichung dargestellt. Endothelzellen zeigen eine ca. 21-fach höhere Expression.

3.6 T-Zell-Stimulationstest und IL-6 ELISA

Um die physiologische Relevanz der IL-6-Synthese durch HUVEC- und NCI-H295R Zellen abschätzen und die Quantität besser charakterisieren zu können, wurden die IL-6 Konzentrationen von HUVEC und von T-Zellen nach der Sekretion mittels ELISA verglichen. Hierzu haben wir T-Zellen aus menschlichem Blut freiwilliger Probanden isoliert und diese über 24 Stunden mit Faktoren stimuliert, die die IL-6-Produktion anregen sollten. Zu diesen Faktoren gehörten IL-2 (0,125 U/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (25 ng/ml) und PGE₂ (1 μ g/ml) in den jeweils angegebenen Konzentrationen. Als Positivkontrolle dient die einfache Zugabe von IL-6 (1 ng/ml) zu den T-Zellen in ihrem Medium (Pipettierschema s. Abb.3.7).

Durch die alleinige Zugabe von IL-2 wurden die T-Zellen nicht sehr stark stimuliert, IL-6 zu produzieren; im Überstand lag die IL-6-Konzentration bei 8,9 (SEM \pm 4,9) pg/ml. Wenn zusätzlich TNF- α hinzugefügt wurde, stieg die IL-6-Konzentration auf 140,4 (SEM \pm 6,8) pg/ml und bei der doppelten Konzentration von TNF- α auf 194,6 (SEM \pm 146,2) pg/ml.

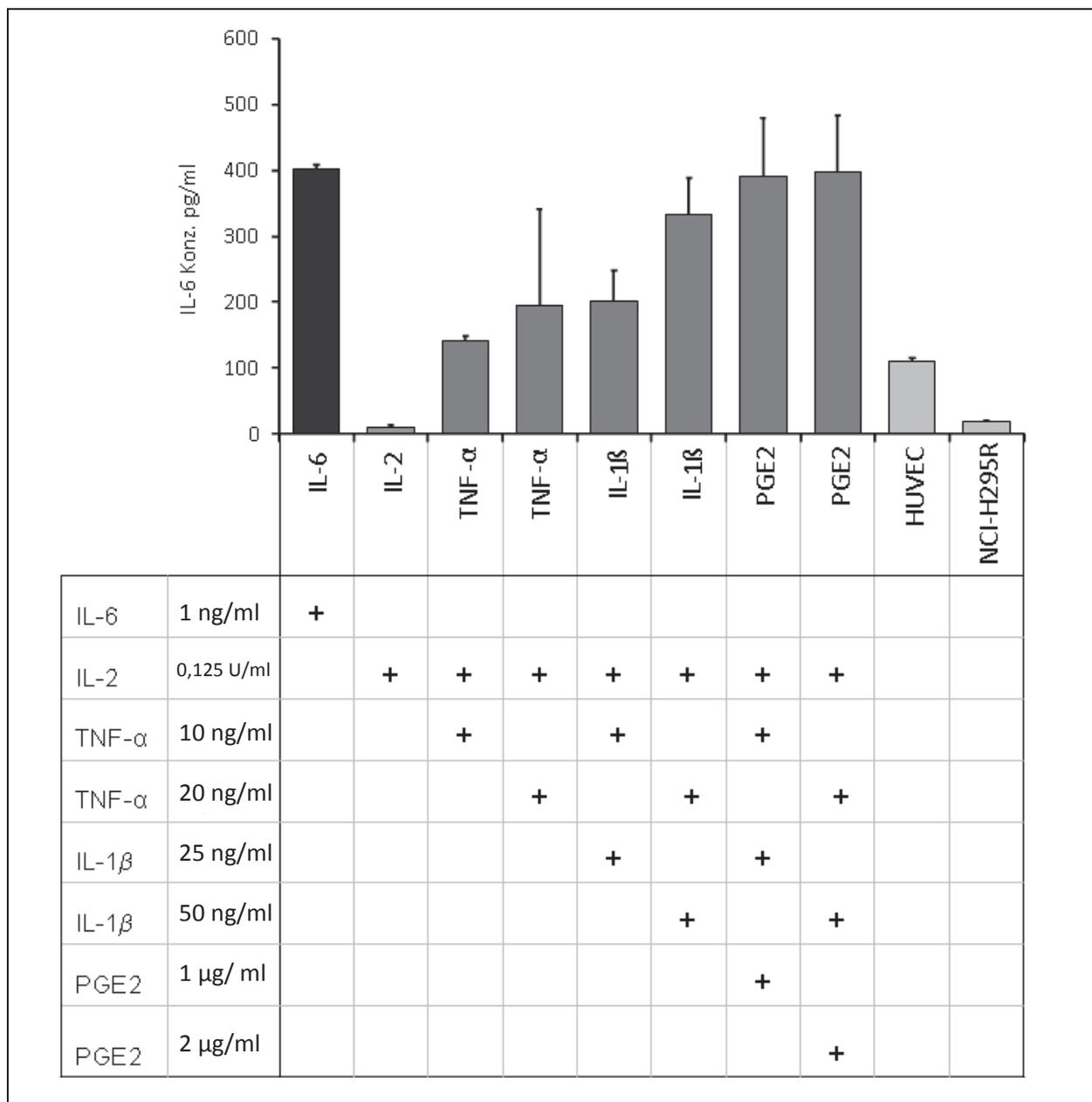


Abb. 3.7 HUVECs und T-Zellen mit unterschiedlichen Stimulantien im Vergleich

Messung der IL-6-Konzentration im Überstand von T-Zellen und Endothelzellen nach 24stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Stimulantien im Vergleich (n=3). Je mehr Stimulantien über 24 Stunden zu den T-Zellen hinzugefügt wurden, desto mehr IL-6 wurde sezerniert.

Am stärksten war die Ausschüttung bei Zugabe von IL-2 (1 ng/ml) + TNF- α (20 ng/ml) + IL-1 β (50 ng/ml) und PGE2 (2 μ g/ml) mit über 400 pg/ml. Im Vergleich dazu war die Ausschüttung von IL-6 bei den HUVECs ca. viermal geringer. Nach Stimulation mit 100% ECCM sezernierten hingegen die NCI-H295R Zellen im Vergleich sogar 20 Mal weniger IL-6 als die T-Zellen.

Bei der zusätzlichen Gabe von IL-1 β stieg die Konzentration auf 201,5 (SEM \pm 46,9)pg/ml und in doppelter Konzentration von TNF- α und IL-1 β auf 334,3 (SEM \pm 54,1) pg/ml. Zusätzlich gaben wir zu ein paar Wells noch Prostaglandin E2, was zur Folge hatte, dass die IL-6-Konzentration in der einfachen Konzentration der Faktoren auf 390,8 (SEM \pm 88,5) pg/ml und in der doppelten Konzentration auf 396,8 (SEM \pm 85,9) pg/ml stieg. Somit besteht der größte Stimulationseffekt bei allen vier Faktoren – der geringste bei IL-2 alleine sowie mit TNF- α .

Im Vergleich dazu liegt der Wert bei den HUVECs in normalem Endothelzellmedium bei 109,1 (SEM \pm 7,1) pg/ml. Damit ist die IL-6-Konzentration im Endothelzellmedium ca. zwei- bis viermal geringer als im Medium der maximal stimulierten T-Zellen, je nachdem, mit welchen Faktoren diese stimuliert wurden. Bei den NCI-H295R Zellen liegt der Wert bei 18,0 (SEM \pm 2,0) pg/ml, so dass hier im Vergleich zu den T- Zellen eine bis zu zwanzigfach im Vergleich zu den Endothelzellen eine fünffach geringere IL-6 Konzentration gemessen wurde.

3.7 JAK2/STAT Inhibitor

Um herauszufinden, ob auch die Aldosteronproduktion durch das Endothelzellmedium bzw. IL-6 beeinflusst wird, haben wir in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Ansurudeen-Rafi, Technische Universität Dresden NCI-H295R Zellen mit 100% ECCM stimuliert und einen Teil zusätzlich mit einem JAK2-Inhibitor (50 μ m; Calbiochemie Merck, Darmstadt) versetzt. Dieser Inhibitor verhindert den Signalweg, der durch IL-6 ausgelöst wird. Als Kontrolle diente serumfreies Medium auf NCI-H295R Zellen. Dieser Versuch wurde dreifach unabhängig voneinander durchgeführt.

In Abb. 3.8 erkennt man, dass sich die Aldosteronkonzentration zunächst durch die Stimulation mit 100% ECCM ca. um das Vierfache erhöht: Von basal 39 (SEM \pm 2) pmol/l auf 144 (SEM \pm 8 pmol/l) mit 100% ECCM. Fügt man nun zusätzlich den JAK2-Inhibitor hinzu, verändert sich die Aldosteronkonzentration kaum: auf 30 (SEM \pm 4) pmol/l im Basalüberstand zu 160 (SEM \pm 5) pmol/l mit 100% ECCM. Demzufolge besteht bei der Aldosteronproduktion wohl kein Einfluss durch IL-6.

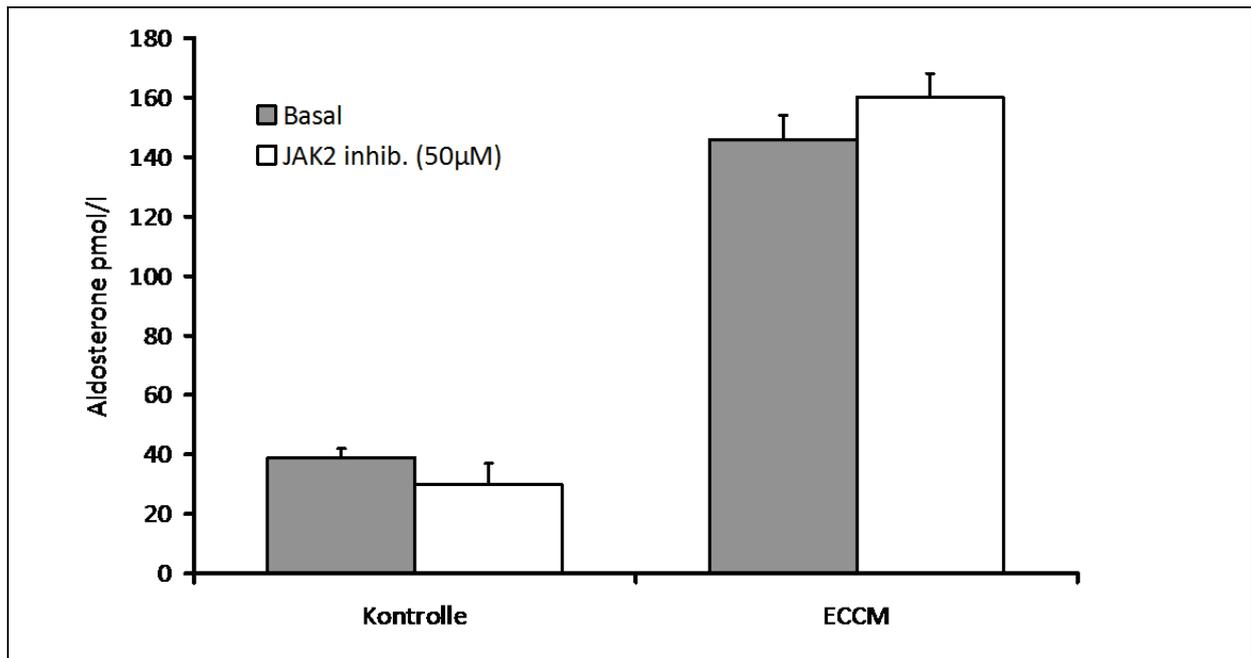


Abb. 3.8 Aldosteronsekretion

Die Abbildung zeigt die Aldosteronkonzentration im Überstand von NCI-H295R Zellen nach Inkubation mit 100% ECCM und als Kontrolle mit serumfreiem Medium über 24 Stunden (n=3). Zusätzlich wurde zu einem Teil der Zellen ein JAK2-Inhibitor (50 µM) hinzugefügt, der die IL-6-Produktion hemmt. Die Aldosteronkonzentration steigt unter ECCM-Inkubation auf das ca. Vierfache und wird auch durch den JAK2-Inhibitor kaum beeinflusst (Willenberg et al. 2008 in Zusammenarbeit mit I. Ansurudeen, TU Dresden).

4. Diskussion

Die Nebenniere produziert außer den Steroidhormonen auch Interleukin-6 (Gonzalez-Hernandez et al. 1994), und es wird vermutet, dass IL-6 die Steroidbiosynthese stimuliert (Päth et al. 1996; Willenberg et al. 2002).

In der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Endothel Faktoren sezerniert, die die Nebennierenrindenfunktion regulieren (Willenberg et al. 2008; Ansurudeen et al. 2009). Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob Endothelzellfaktoren auch die adrenale IL-6 Synthese beeinflussen, ob ein solcher Effekt die Steroidbiosynthese autokrin stimuliert und ob er quantitativ bedeutsam ist.

Durch histologische Untersuchungen konnte mit Hilfe eines monoklonalen CD31-Antikörpers gezeigt werden, dass Endothelzellen in der Nebennierenrinde in enger Beziehung zu den steroidogenen Zellen stehen (Haase et al. 2009). Dies bestätigt vorherige Ergebnisse von (Vinson et al. 1985; Thomas et al. 2003). Deshalb vermuteten wir aufgrund der großen Kontaktfläche zwischen Nebennierenrinden- und Gefäß-Endothelzellen nicht nur eine Wirkung auf die Steroidbiosynthese, sondern auch parakrine Wechselwirkungen zwischen Endothelzellfaktoren und Nebennierenrindenzellen.

Vorausgegangene Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Endothelzellen die Steroidbiosynthese und Aldosteronproduktion der Nebenniere stimulieren können (Ansurudeen et al. 2007; Ansurudeen et al. 2009), dass dieser Effekt jedoch nicht durch Endothelin-1 (Paramonova et al. 2010; Rosolowsky et al. 1999; Hinson et al. 2000), das 3000-Da-Protein (Rosolowsky et al. 1999) oder Prostaglandin E2 vermittelt wird. Wir wollten deshalb ebenfalls untersuchen, ob es sich bei dem Endothelzellfaktor um IL-6 handeln könnte.

Ein Ergebnis dieser Arbeit war zunächst, dass der IL-6-Promoter in Nebennierenrindenzellen durch Endothelzellfaktoren konzentrationsabhängig stimuliert wurde (Willenberg et al. 2008). Das stützte die Hypothese, dass ECCM neben der Steroidbiosynthese in Nebennierenrindenzellen auch die IL-6-Synthese reguliert. Diese Hypothese wurde durch unsere Beobachtung untermauert (Abb. 3.3), dass die Expression von IL-6 Protein im Überstand kultivierter Nebennierenrindenzellen ebenfalls in Abhängigkeit von der ECCM Konzentration zunahm (Willenberg et al. 2008).

Da bereits seit 1989 bekannt ist, dass Endothelzellen IL-6 produzieren (Podor et al. 1989; Nilsen et al. 1998), musste kontrolliert werden, ob die im Kulturüberstand der NCI-H295R gemessenen IL-6-Spiegel durch das ECCM hereingetragen wurden. Im ECCM fanden sich jedoch höhere Konzentrationen an IL-6 Protein im Vergleich zum Überstand der NCI-H295R Zellen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Frau Dipl.-Biol. I. Ansurudeen-Rafi (Technische Universität Dresden) wurde untersucht, ob die Hemmung der IL-6 Signalkaskade auf der Stufe von JAK2 die ECCM-induzierte Aldosteronsynthese inhibiert. Es zeigte sich, dass die Aldosteronsynthese der NCI-H295R Zellen durch die Inkubation mit ECCM zwar anstieg, sich die Konzentration durch zusätzliche Hemmung der IL-6-Signalkaskade aber nur minimal veränderte. Wir schlussfolgerten, dass die Steroidogenese in der Nebenniere unabhängig von der IL-6 Produktion der Nebennieren- und der Endothelzellen reguliert wird. Somit zeigte sich außerdem, dass die IL-6 Synthese und die Steroidgenese zwei unterschiedliche Mechanismen sind, die unabhängig voneinander durch die Endothelzellen stimuliert werden. Dies ist eine neue Erkenntnis, denn in früheren Experimenten mit Ratten wurde nachgewiesen, dass IL-6 durch Lipopolysaccharide (Schobitz et al. 1992), Corticotropin (ACTH) (Judd and MacLeod 1992) und Stress (Zhou et al. 1993) stimuliert wird (Willenberg et al. 2008).

Um zu ermitteln, wie groß der jeweilige Anteil von Endothelzellen und von NCI-H295R Zellen an der IL-6 Synthese ist, wurde mit Hilfe von Cycloheximid die IL-6 Proteinsynthese gehemmt. Es zeigte sich, dass in zwei verschiedenen Proben mit verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen jeweils ungefähr der gleiche Anteil an IL-6 vorhanden war. Dieser Anteil verdoppelte sich außerdem bei der doppelten Konzentration an ECCM. Dadurch wurde deutlich, dass die IL-6 Produktion der Nebennierenrindenzellen schon durch geringe Dosen von Cycloheximid gehemmt wurde (Abb. 3.5). Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Interleukinkonzentrationen zu vorangegangenen Versuchen lassen sich am ehesten durch die Verwendung von unterschiedlichen Präparationen und Passagen an HUVEC-Zellen erklären. Ein wichtiger Grund hierfür war außerdem, daß die Experimente zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt wurden, da die HUVEC Zellen nur wenigen Passagen unterzogen werden konnten. Eine weitere Schwachstelle sehen wir in der Herstellung des konditionierten Mediums, da jeder Kontakt des Mediums zu Zellen dazu führt, daß sowohl neue Faktoren hineingegeben als auch andere verbraucht bzw. abgebaut werden. Die Faktoren waren zum großen Teil unbekannt; selbst bei deren Bekanntheit wäre ein Ausgleich schwierig, da immer wieder Bestimmungen und Manipulationen stattfinden müßten. Ein weiteres Problem stellte die Tatsache dar, daß die verschiedenen Zellen unter verschiedenen Bedingungen gehalten wurden –

eben auch in unterschiedlichen Medien. Eine Änderung des Mediums zwecks Inkubation stellt eine Veränderung dar, ebenso wie der Entzug von Serum für Kontrollzwecke. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für spätere Versuche außerdem Endothelial Cell Basal Medium zur Herstellung von ECCM verwendet (3.5 und 3.6) und die NCI-H295R-Zellen wurden später mit RPMI1640 Medium inkubiert. Das Endothelial Cell Basal Medium wurde mit Serum versetzt. Dies könnte ebenfalls zu höheren IL-6 Werten beigetragen haben. Jedoch ist die Menge bei 2% Kälberserum bei ca. 0,02 pg/ml eher zu vernachlässigen. Von untergeordneter Bedeutung mag auch sein, dass zwei verschiedene Medien verwendet wurden, da in beiden Medien selbst kein IL-6 vorhanden war. Wir gehen nicht von einer zusätzlichen Stimulation durch Serum oder Medien aus, allerdings bleibt dies offen, da eine explizite Untersuchung dieser Umstände durch uns nicht erfolgte.

Um genau zu sehen, wie hoch der relative Anteil an der IL-6 Produktion von HUVEC- und NCI-H295R Zellen ist, wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR die relative IL-6 mRNA-Konzentration in beiden Zellreihen untersucht. Das Ergebnis zeigte im Schnitt eine 21-fach höhere Expression von IL-6 in den HUVECs im Vergleich zu den NCI-H295R Zellen (Abb. 3.6).

Dies ist ein neuer Befund, der die Vermutung, dass die Nebennierenrinde durch Ihre IL-6 Produktion maßgeblich an der Steroidogenese und Inflammation beteiligt ist, nicht bestätigt. Hingegen zeigte sich, dass die Endothelzellen einen viel größeren Anteil an der Inflammation haben könnten, als bisher vermutet.

Deshalb wurden außerdem HUVECs im Vergleich zu T-Zellen bezüglich Ihrer IL-6 Produktion untersucht. Man weiß, dass T-Zellen einen großen Anteil an der IL-6 Produktion und Entzündungsreaktion haben und unter dem Einfluss von IL-1 β und TNF- α , wie auch PGE₂ vermehrt IL-6 sezernieren (van Kooten et al. 1991). Im menschlichen Körper beträgt die Konzentration von IL-6 im Plasma bei Gesunden ca. 1 pg/ml. Davon ist der Anteil, der durch T-Zellen produziert wird, sehr groß. Wenn man Endothelzellen mit TNF- α und IL-1 β stimuliert, produzieren sie ebenfalls mehr IL-6 (Podor et al. 1989). In dem Experiment wurden die maximal stimulierte IL-6 Produktion in T-Zellen mit der IL-6 Produktion von HUVECs und ECCM-stimulierten NCI-H295R Zellen verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die höchste IL-6 Produktion in T-Zellen dann eintrat, wenn IL-1 β , IL-2, TNF- α und PGE₂ als Faktoren gleichzeitig zum Einsatz kamen (Abb. 3.7). Auch wenn die IL-6 Produktion der Endothelzellen im Vergleich zu der IL-6 Produktion von T-Zellen gering erscheint, so waren sie immerhin unstimuliert, so dass dieser Anteil bei der Inflammation eine nicht zu vernachlässigende

Rolle zu spielen scheint. Die Interleukin-6 Produktion in Nebennierenrindenzellen ist im Vergleich zu der Synthese in T-Zellen und Endothelzellen zu vernachlässigen. Allerdings ist der Synthesevergleich dieser Zellen *in vitro* nur eingeschränkt machbar, zumal es sich bei den NCI-H295R-Zellen um eine maligne Zelllinie handelt. Wie in dieser Arbeit durch verschiedene Versuche ermittelt wurde, steigt die IL-6-Konzentration mit der ECCM-Konzentration und ist somit proportional zur Anzahl an Endothelzellen. Eine Interpretation, die sich daraus ergibt, ist deshalb, dass die Endothelzellen damit insgesamt trotzdem einen Einfluss auf eine generalisierte Entzündungsreaktion haben könnten. Lipopolysaccharide und andere Entzündungsmediatoren können ebenfalls die Sekretion von IL-6 aus Endothelzellen *in vitro* beeinflussen (Muramami et al. 1993). Außerdem sind sowohl TNF- α als auch IL-6 an der vasokrinen Signalkaskade beteiligt (Yudkin 2007).

Aufgrund der engen Zellkontakte zwischen Endothelzellen und Nebennierenrindenzellen könnte demzufolge eine Endotheldysfunktion, wie sie z.B. durch eine Sepsis hervorgerufen werden kann, auch Auswirkungen auf die Funktion der Nebennierenrinde und ihre Hormonausschüttung haben.

Normalerweise führen Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF- α und IL-1 β zur Stimulation von ACTH und CRH, so dass Cortisol und andere adrenale Steroidhormone, wie z.B. Aldosteron ausgeschüttet werden.

Bei einer Sepsis gehören die Nebennieren zu den Organen, die oftmals von einer Nebenniereninsuffizienz betroffen sind. Somit könnten bei einer Dysfunktion die Endothelzellfaktoren, wie z.B. das IL-6 bei einer Sepsis als Vorhersagefaktoren dienen, um das Risiko für eine Nebenniereninsuffizienz für Patienten abzuschätzen (Chavakis et al.).

Bezüglich dieser Erkenntnisse gibt es aus unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bisher noch nicht veröffentlichte Daten über HUAEC (human umbilical artery endothelial cells) und die Regulation der Nebennierenrindenfunktion, die die oben diskutierten Ergebnisse untermauern und bestätigen.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Endothelzellmedium den IL-6 Promoter der Nebennierenrindenzellen aktiviert und Endothelzellfaktoren in der Lage sind, die adrenale IL-6 Synthese zu regulieren. Allerdings konnten wir ebenfalls zeigen, dass es sich bei IL-6 nicht um den gesuchten Faktor handelt, der die Steroidbiosynthese der Nebenniere steigert.

Außerdem fanden wir heraus, dass die Endothelzellen ein weitaus größerer Lieferant an IL-6 sind, als bisher vermutet und wahrscheinlich maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, insbesondere im Vergleich zu T-Zellen. Besonders durch den engen Kontakt des Endo-

thels zur Nebenniere könnten IL-6 bzw. andere, bisher noch nicht identifizierte Endothelzellfaktoren, eine Rolle bezüglich einer relativen Nebenniereninsuffizienz, die im Rahmen einer Sepsis entstehen kann, spielen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse stützen die Annahme, dass Wechselwirkungen zwischen Endothel- und Nebennierenzellen nicht nur an der Entwicklung bestimmter Formen des Bluthochdrucks beteiligt sein könnten, sondern auch bei der Regulation von Entzündungsantworten eine maßgebliche Rolle spielen.

Literaturverzeichnis

- Ansurudeen, I., S. Kopprasch, M. Ehrhart-Bornstein, S. R. Bornstein and H. S. Willenberg (2007). "Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells." Mol Cell Endocrinol **265-266**: 150-6.
- Ansurudeen, I., S. Kopprasch, M. Ehrhart-Bornstein, H. S. Willenberg, A. W. Krug, R. H. Funk and S. R. Bornstein (2006). "Vascular-adrenal niche--endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II." Horm Metab Res **38**(7): 476-80.
- Ansurudeen, I., H. S. Willenberg, S. Kopprasch, A. W. Krug, M. Ehrhart-Bornstein and S. R. Bornstein (2009). "Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways." Mol Cell Endocrinol **300**(1-2): 66-70.
- Aptel, H. B., E. I. Johnson, M. B. Vallotton, M. F. Rossier and A. M. Capponi (1996). "Demonstration of an angiotensin II-induced negative feedback effect on aldosterone synthesis in isolated rat adrenal zona glomerulosa cells." Mol Cell Endocrinol **119**(1): 105-11.
- Bacon, K., A. Gearing and R. Camp (1990). "Induction of in vitro human lymphocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and interleukin 6." Cytokine **2**(2): 100-5.
- Balla, T., A. J. Baukal, S. Eng and K. J. Catt (1991). "Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla." Mol Pharmacol **40**(3): 401-6.
- Bird, I. M., J. M. Mathis, J. I. Mason and W. E. Rainey (1995). "Ca(2+)-regulated expression of steroid hydroxylases in H 295R human adrenocortical cells." Endocrinology **136**(12): 5677-84.
- Bornstein, S. R., J. A. Gonzalez-Hernandez, M. Ehrhart-Bornstein, G. Adler and W. A. Scherbaum (1994). "Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions." J Clin Endocrinol Metab **78**(1): 225-32.
- Breslow, M. J. (1992). "Regulation of adrenal medullary and cortical blood flow." Am J Physiol **262**(5 Pt 2): H1317-30.
- Chavakis, T., W. Kanczkowski, H. S. Willenberg and S. R. Bornstein "Endothelial dysfunction: a critical determinant in inflammation-associated adrenal insufficiency?" Eur J Clin Invest **41**(8): 917-9.
- Choi, M., U. I. Scholl, P. Yue, P. Bjorklund, B. Zhao, C. Nelson-Williams, W. Ji, Y. Cho, A. Patel, C. J. Men, E. Lolis, M. V. Wisgerhof, D. S. Geller, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Akerstrom, W. Wang, T. Carling and R. P. Lifton "K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension." Science **331**(6018): 768-72.
- Clark, B. J., S. C. Soo, K. M. Caron, Y. Ikeda, K. L. Parker and D. M. Stocco (1995). "Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein." Mol Endocrinol **9**(10): 1346-55.
- Denner, K., W. E. Rainey, V. Pezzi, I. M. Bird, R. Bernhardt and J. M. Mathis (1996). "Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells." Mol Cell Endocrinol **121**(1): 87-91.
- Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum and G. P. Vinson (1998). "Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis." Endocr Rev **19**(2): 101-43.
- Ehrhart-Bornstein, M., V. Lamounier-Zepter, A. Schraven, J. Langenbach, H. S. Willenberg, A. Barthel, H. Hauner, S. M. McCann, W. A. Scherbaum and S. R. Bornstein (2003).

- "Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14211-6.
- Else, T. and G. D. Hammer (2005). "Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia." Trends Endocrinol Metab **16**(10): 458-68.
- Fischer, C. P. (2006). "Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?" Exerc Immunol Rev **12**: 6-33.
- Foster, R. H., C. H. MacFarlane and M. O. Bustamante (1997). "Recent progress in understanding aldosterone secretion." Gen Pharmacol **28**(5): 647-51.
- Gazdar, A. F., H. K. Oie, C. H. Shackleton, T. R. Chen, T. J. Triche, C. E. Myers, G. P. Chrousos, M. F. Brennan, C. A. Stein and R. V. La Rocca (1990). "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis." Cancer Res **50**(17): 5488-96.
- Gonzalez-Hernandez, J. A., S. R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein, E. Spath-Schwalbe, G. Jirikowski and W. A. Scherbaum (1994). "Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function." J Clin Endocrinol Metab **79**(5): 1492-7.
- Haase, M., I. Ansurudeen, S. Schinner, I. Paramonova, M. Schott, C. Papewalis, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum and H. S. Willenberg (2009). "Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression." Cell Tissue Res **336**(2): 337-43.
- Hanke, C. J., J. G. Drewett, C. R. Myers and W. B. Campbell (1998). "Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect." Endocrinology **139**(10): 4053-60.
- Hinson, J. P., S. Kapas and D. M. Smith (2000). "Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide." Endocr Rev **21**(2): 138-67.
- Hornsby, P. J. (1987). "Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex." J Steroid Biochem **27**(4-6): 1161-71.
- Judd, A. M. and R. M. MacLeod (1992). "Adrenocorticotropin increases interleukin-6 release from rat adrenal zona glomerulosa cells." Endocrinology **130**(3): 1245-54.
- Kedzierski, R. M. and M. Yanagisawa (2001). "Endothelin system: the double-edged sword in health and disease." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 851-76.
- Keegan, C. E. and G. D. Hammer (2002). "Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex." Trends Endocrinol Metab **13**(5): 200-8.
- Lefebvre, H., P. Compagnon, V. Contesse, C. Delarue, C. Thuillez, H. Vaudry and J. M. Kuhn (2001). "Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT." J Clin Endocrinol Metab **86**(10): 5001-7.
- Lumbers, E. R. (1999). "Angiotensin and aldosterone." Regul Pept **80**(3): 91-100.
- Luscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**(19): 2434-40.
- Mastorakos, G., G. P. Chrousos and J. S. Weber (1993). "Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans." J Clin Endocrinol Metab **77**(6): 1690-4.
- Mazzocchi, G., G. P. Rossi, P. Rebuffat, L. K. Malendowicz, A. Markowska and G. G. Nussdorfer (1997). "Endothelins stimulate deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C- and tyrosine kinase-dependent signaling pathways." Endocrinology **138**(6): 2333-7.
- Mesiano, S. and R. B. Jaffe (1997). "Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex." Endocr Rev **18**(3): 378-403.

- Mohn, C. E., J. Fernandez-Solari, A. De Laurentiis, J. P. Prestifilippo, C. de la Cal, R. Funk, S. R. Bornstein, S. M. McCann and V. Rettori (2005). "The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6213-8.
- Muramami, N., J. Fukata, T. Tsukada, H. Kobayashi, O. Ebisui, H. Segawa, S. Muro, H. Imura and K. Nakao (1993). "Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of interleukin-6 messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus, pituitary, adrenal gland, and spleen." Endocrinology **133**(6): 2574-8.
- Nagy, Z., J. Radeff and P. H. Stern (2001). "Stimulation of interleukin-6 promoter by parathyroid hormone, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta in UMR-106 osteoblastic cells is inhibited by protein kinase C antagonists." J Bone Miner Res **16**(7): 1220-7.
- Nilsen, E. M., F. E. Johansen, F. L. Jahnsen, K. E. Lundin, T. Scholz, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen (1998). "Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine." Gut **42**(5): 635-42.
- Nussdorfer, G. G., G. P. Rossi and A. S. Belloni (1997). "The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex." Int Rev Cytol **171**: 267-308.
- Paramonova, I., M. Haase, B. Mulders-Opgenoorth, I. Ansurudeen-Rafi, S. R. Bornstein, C. Papewalis, S. Schinner, M. Schott, W. A. Scherbaum and H. S. Willenberg "The effects of the endothelium on adrenal steroidogenesis and growth are mainly mediated by proteins other than endothelin-1." Horm Metab Res **42**(12): 840-5.
- Path, G., S. R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein and W. A. Scherbaum (1997). "Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis." J Clin Endocrinol Metab **82**(7): 2343-9.
- Path, G., S. R. Bornstein, E. Spath-Schwalbe and W. A. Scherbaum (1996). "Direct effects of interleukin-6 on human adrenal cells." Endocr Res **22**(4): 867-73.
- Podor, T. J., F. R. Jirik, D. J. Loskutoff, D. A. Carson and M. Lotz (1989). "Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6." Ann N Y Acad Sci **557**: 374-85; discussion 386-7.
- Rainey, W. E. (1999). "Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase." Mol Cell Endocrinol **151**(1-2): 151-60.
- Rainey, W. E., I. M. Bird and J. I. Mason (1994). "The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies." Mol Cell Endocrinol **100**(1-2): 45-50.
- Rainey, W. E., I. M. Bird, C. Sawetawan, N. A. Hanley, J. L. McCarthy, E. A. McGee, R. Wester and J. I. Mason (1993). "Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids." J Clin Endocrinol Metab **77**(3): 731-7.
- Rosolowsky, L. J., C. J. Hanke and W. B. Campbell (1999). "Adrenal capillary endothelial cells stimulate aldosterone release through a protein that is distinct from endothelin." Endocrinology **140**(10): 4411-8.
- Rossi, G., G. Albertin, A. Belloni, L. Zanin, M. A. Biasolo, T. Prayer-Galetti, M. Bader, G. G. Nussdorfer, G. Palu and A. C. Pessina (1994). "Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex." J Clin Invest **94**(3): 1226-34.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Schobitz, B., F. Holsboer, R. Kikkert, W. Sutanto and E. R. De Kloet (1992). "Peripheral and central regulation of IL-6 gene expression in endotoxin-treated rats." Endocr Regul **26**(3): 103-9.

- Spath-Schwalbe, E., J. Born, H. Schrezenmeier, S. R. Bornstein, P. Stromeyer, S. Drechsler, H. L. Fehm and F. Porzolt (1994). "Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 1212-4.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." Annu Rev Physiol **63**: 193-213.
- Stone, D. and O. Hechter (1954). "Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: the site of action of ACTH in corticosteroidogenesis." Arch Biochem **51**(2): 457-69.
- Tanabe, A., M. Naruse, K. Arai, K. Naruse, T. Yoshimoto, T. Seki, T. Imaki, M. Kobayashi, H. Miyazaki and H. Demura (1998). "Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells." J Endocrinol Invest **21**(10): 668-72.
- Thomas, M., M. Keramidas, E. Monchaux and J. J. Feige (2003). "Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature." Microsc Res Tech **61**(3): 247-51.
- van Kooten, C., I. Reusink, D. Pascual-Salcedo, R. van Oers and L. Aarden (1991). "Monokine production by human T cells; IL-1 alpha production restricted to memory T cells." J Immunol **146**(8): 2654-8.
- Vinson, G. P., S. M. Laird, B. J. Whitehouse and J. P. Hinson (1989). "Specific effects of agonists of the calcium messenger system on secretion of 'late-pathway' steroid products by intact tissue and dispersed cells of the rat adrenal zona glomerulosa." J Mol Endocrinol **2**(2): 157-65.
- Vinson, G. P., J. A. Pudney and B. J. Whitehouse (1985). "The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis." J Endocrinol **105**(2): 285-94.
- Watson, C., S. Whittaker, N. Smith, A. J. Vora, D. C. Dumonde and K. A. Brown (1996). "IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes." Clin Exp Immunol **105**(1): 112-9.
- Whitebread, S., M. Mele, B. Kamber and M. de Gasparo (1989). "Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes." Biochem Biophys Res Commun **163**(1): 284-91.
- Willenberg, H. S., I. Ansurudeen, K. Schebesta, M. Haase, B. Wess, S. Schinner, A. Raffel, M. Schott and W. A. Scherbaum (2008). "The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical cells." Exp Clin Endocrinol Diabetes **116 Suppl 1**: S70-4.
- Willenberg, H. S., S. R. Bornstein, N. Hiroi, G. Path, P. E. Goretzki, W. A. Scherbaum and G. P. Chrousos (2000). "Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function." Mol Psychiatry **5**(2): 137-41.
- Willenberg, H. S., M. Haase, C. Papewalis, M. Schott, W. A. Scherbaum and S. R. Bornstein (2005). "Corticotropin-releasing hormone receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells." Neuroendocrinology **82**(5-6): 274-81.
- Willenberg, H. S., G. Path, T. A. Vogeli, W. A. Scherbaum and S. R. Bornstein (2002). "Role of interleukin-6 in stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation." Ann N Y Acad Sci **966**: 304-14.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-5.
- Yanagisawa, M. and T. Masaki (1989). "Molecular biology and biochemistry of the endothelins." Trends Pharmacol Sci **10**(9): 374-8.
- Yudkin, J. S. (2007). "Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome." Horm Metab Res **39**(10): 707-9.

- Zhou, D., A. W. Kusnecov, M. R. Shurin, M. DePaoli and B. S. Rabin (1993). "Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Endocrinology **133**(6): 2523-30.
- Zubair, M., K. L. Parker and K. Morohashi (2008). "Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing." Mol Cell Biol **28**(23): 7030-40.

Danksagung:

Ganz großer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. med. Holger S. Willenberg, der mich die gesamte Zeit unterstützt, betreut und beraten und mich mit stetiger Hilfe gefördert hat.

PD Dr. med. Holger S. Willenberg und Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum danke ich für die Anvertraung des Themas sowie die fortwährende Unterstützung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich auch herzlich beim gesamten Forschungsteam des endokrinologischen Forschungslabors bedanken; im Besonderen gilt hier mein herzlicher Dank für die Unterstützung und fachliche Hilfe bei meiner Arbeit Annette Tries und Birgit Mülders-Opgenoorth, Claudia Papewalis und Magret Ehlers.

Ich danke Claas Schmidt für die kleinen Feinheiten und Ilka Kräft für den freundschaftlichen Beistand.

Für die stetige Unterstützung und den stetigen Glauben an mich durch ihre Liebe danke ich meinen Eltern Dorothe und Norbert Schebesta, meiner Schwester Ulrike Schebesta und meinem Lebenspartner Tasso Diedrich.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01.06.2012, Kathrin Schebesta