

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Funktionsbereich Endokrinologie

Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Die Expression von Komponenten des Hedgehog-Signalwegs in
humanen normalem und tumorösem Nebennierengewebe sowie
ihre Regulation *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pascal Werminghaus

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Willenberg

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Wesselborg

Meiner Ehefrau Maika und meinen Eltern in Dankbarkeit

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Rolle des *Hedgehog* (Hh)-Signalwegs in der menschlichen Nebenniere. Aktuell wird der mögliche Einfluss von *Sonic Hedgehog* (Shh) auf die Entwicklung der Nebenniere bei Mäusen und die Bedeutung des Signalwegs für die Regulation von Wachstum der Nebennierenrinde diskutiert. Wenig ist über die Bedeutung von SHH für die menschliche Nebenniere und einen möglichen Einfluss auf die adrenale Tumorgenese bekannt. Daher untersuchten wir die Expression ausgewählter Komponenten des Hh-Signalwegs in der menschlichen Nebenniere an adultem tumorösen und nicht-tumorösen Gewebe sowie in adrenalen Zellkulturlinien. Mit Immunhistochemie wiesen wir *GLI family zinc finger 1* (*GLI1*) in humanen Nebennierenrinden (NHA) nach, was gleichbedeutend mit dem Nachweis eines aktiven Hh-Signalwegs im adulten adrenalen Gewebe ist. Mit semiquantitativer Polymerasekettenreaktion erfassten wir Expressionsunterschiede von *SHH*-, *Smoothed* (*SMO*)-, *Patched1* (*PTCH1*)- und *GLI1*-mRNA in NHAs im Vergleich zu adrenokortikalen Karzinomen (ACCs), Cortisol-produzierenden (CPAs) und hormoninaktiven Adenomen (NPAs). Auffällig war die stark erhöhte Expression aller untersuchten Komponenten in den NPAs im Vergleich zu der Expression in NHAs als Hinweis auf eine mögliche Rolle bei der Pathogenese dieser Tumorentität. Funktionelle *in vitro* Daten konnten wir in der humanen Nebennierenrindenkarzinomzelllinie NCI-H295R und in einer immortalisierten adulten humanen Nebennierenrindenzelllinie (ihNHAc) gewinnen. Ein Antagonismus des Hh-Signalwegs durch Behandlung der NCI-H295R Zellen mit Cyclopamin führte zu einer Inhibition der adrenalen Proliferationsrate der Zellen sowie zu einer verringerten Aldosteron- und Dehydroepiandrosteron-Sekretion der Zellen. Die Hemmung des adrenalen Zellwachstums durch Cyclopamin bestätigten wir in der ihNHAc. Stimulation der NCI-H295R Zellen mit Forskolin führte zu einer Inhibition der Expression von *GLI1* und *SMO*. Somit konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass der Hh-Signalweg in der menschlichen adulten Nebenniere aktiv ist, durch Forskolin in seiner Aktivität beeinflusst werden kann und ein Antagonismus der Signalkaskade die Proliferation und Hormonproduktion adrenaler Zelllinien inhibiert.

Abkürzungsverzeichnis

3β-HSD	<i>3β-hydroxysteroid-dehydrogenase</i>	CYP11B2	<i>cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2</i>
ACC	Nebennierenrindenskarzinom	DAX1/Dax1	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
ACE	<i>Angiotensin I converting enzyme</i>	DHEA	Dehydroepiandrosteron
ACTH	<i>Corticotropin</i>	DHH/Dhh	<i>Desert hedgehog</i>
AGT1R	<i>Angiotensin II receptor, type 1</i>	DIK1	<i>Delta-like 1 homolog (Drosophila) protein</i>
APA	Aldosteronproduzierendes Adenom	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
bFGF	<i>Fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	ERK	<i>Extracellular regulated MAP kinase</i>
cAMP	<i>3'-5'-cyclic adenosine monophosphate</i>	FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1</i>	Foxd2	<i>Forkhead box protein D2</i>
Cited2	<i>Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2</i>	Gli-Proteine	<i>GLI family of zinc finger transcription factors</i>
CPA	Cortisol-produzierendes Adenom	GLI1/Gli1	<i>GLI family zinc finger 1</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>	GLI2/Gli2	<i>GLI family zinc finger 2</i>
CRH-R	<i>Corticotropin-releasing hormone receptor</i>	GLI3/Gli3	<i>GLI family zinc finger 3</i>
CRH-R1	<i>Corticotropin-releasing hormone receptor 1</i>	Hh	<i>Hedgehog</i>
		HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
		ihNHAc	immortalisierte humane Nebennierenrindenzelllinie
		IHH/Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
		IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
		IL	Interleukin

LC/NE-System	<i>Locus-coeruleus-norepinephrin-System</i>	PTCH2/Ptch2	<i>Patched2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
MC2-Rezeptor	<i>Melanocortin 2 receptor</i>	Sall1	<i>Sal-like 1 (Drosophila) protein</i>
Mek	<i>MAP kinase-ERK kinase</i>	SAG	<i>Smoothened Agonist</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	SF-1	<i>Steroidogenic factor 1</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>	SHH/Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
NPA	<i>hormoninaktives Adenom</i>	SMO/Smo	<i>Smoothened</i>
NHA	<i>Normale humane Nebenniere</i>	StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
Pbx1	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>	SuFu	<i>Suppressor of Fused</i>
PC1	<i>Prohormone convertase 1</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
PC2	<i>Prohormone convertase 2</i>	Wt1	<i>Wilms tumor protein</i>
PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>	WNT/Wnt	<i>Wnt signaling pathway</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>	WNT4	<i>WNT protein 4</i>
POMC	<i>Proopiomelanocortin</i>	zF	<i>Zona fasciculata</i>
PTCH1/Ptch1	<i>Patched1</i>	zG	<i>Zona glomerulosa</i>
		zR	<i>Zona reticularis</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Entwicklung, Wachstum und Regulation der Nebenniere.....	1
1.1.1	Die Entwicklung der Nebenniere.....	1
1.1.2	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse.....	4
1.1.3	Renin-Angiotensin-Aldosteron System.....	7
1.1.4	Kortikochromaffine Interaktionen und neurale Regulationsmechanismen.....	9
1.2	Der Hh-Signalweg.....	10
2.	Ziele der Arbeit.....	12
3.	<i>Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line,</i> Werminghaus, P; Haase, M; Hornsby, PJ; Schinner, S; Schott, M; Malendowicz, LK; Lammers, BJ; Goretzki, PE; Müller-Mattheis, V; Giessing, M; Willenberg, HS; <i>The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Volume 139, Pages 7-15, (2014)</i>	13
4.	Diskussion.....	23
4.1	Nachweis des Hh-Signalwegs in der adulten humanen Nebenniere.....	24
4.2	Der Hh-Signalweg in Nebennierenrindentumoren.....	25
4.3	Einflüsse des Hh-Signalwegs auf das Verhalten humaner adrenocorticaler Zellkulturlinien <i>in vitro</i>	29
4.4	Mögliche Interaktionen mit anderen Einflussfaktoren.....	33
5.	Schlussfolgerung.....	35
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	36

1. Einleitung

1.1 Entwicklung, Wachstum und Regulation der Nebenniere

Die Nebenniere ist ein humorales Effektororgan des Stresssystems (Selye, 1950). Sie besteht aus zwei anatomischen und physiologischen Kompartimenten, der Nebennierenrinde und dem Nebennierenmark. Die hier gebildeten Substanzen, Glukokortikoide, Mineralokortikoide und Androgenvorstufen wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion auf der einen und die Katecholamine auf der anderen Seite, helfen dem Organismus bei der Adaptation. Die Regulation der Nebenniere ist bestimmt durch die Interaktion verschiedener Systeme. In einem komplexen Zusammenspiel regulieren *das Corticotropin-releasing hormone (CRH)/Corticotropin (ACTH) -System*, das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS), neuronale Innervation, das Immunsystem, vaskulär sezernierte Faktoren und lokale Wachstumsfaktoren das Wachstum der Nebennierenzellen und die Steroidbiosynthese.

1.1.1 Die Entwicklung der Nebenniere

Die fetale Nebenniere entwickelt sich ab der vierten Embryonalwoche und unterscheidet sich vom adulten Organ durch das Fehlen des zonalen Aufbaus von *Zona glomerulosa (zG)*, *Zona fasciculata (zF)*, *Zona reticularis (zR)* und Nebennierenmark. Sie besteht zunächst aus zwei Zonen mesodermaler Abstammung: der definitiven und der fetalen Zone (Mesiano, Jaffe, 1997). Erst später, etwa bis zur 9. Woche sind Zellen der Neuralleiste in die fetale Nebenniere eingewandert und bilden erste Nester aus Katecholamin-produzierenden Vorläuferzellen des späteren Nebennierenmarks (Molenaar u. a., 1990). Eine die Nebenniere umgebende Kapsel aus Bindegewebe entsteht in der 9. Woche (Hammer u. a., 2005).

Die Entwicklung des Organs ist ein Komplex aus Migration, Hyperplasie, Hypertrophie und Apoptose. Die dabei bedeutsamen, beeinflussenden Faktoren sind

auch an der Regulation der Steroidbiosynthese beteiligt. Daneben sind Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle sowie Regulatoren von Zellzyklus und Angiogenese von Bedeutung (Kempná, Flück, 2008). Primärer Regulator von Wachstum und Funktion der fetalen Nebenniere ist ACTH unter dem Einfluss von CRH aus der fetalen Hypophyse und der maternalen Plazenta (Mesiano, Jaffe, 1997), (Hammer u. a., 2005), (Yates u. a., 2013). Der Ursprung der embryonalen Nebenniere liegt in der gemeinsamen Anlage mit den Gonaden, die sich aus einer Kondensation von Zölomepithelzellen entwickelt. Diese gemeinsame Anlage befindet sich im medialen Teil der Urogenitalleiste zwischen Aorta und Mesenterialwurzel. In den adrenogonadalen Zölomepithelzellen ist *Steroidogenic factor 1* (SF-1) nachweisbar und diese lassen sich so zu den umgebenden Zellen abgrenzen (Hatano u. a., 1996). An der Regulation der Entstehung dieser ersten adrenogonadalen Anlage sind eine Vielzahl parakriner Faktoren wie *Wilms tumor protein* (WT1), *WNT protein 4* (WNT4), *Forkhead box protein D2* (Foxd2), *Pre-B-cell leukemia transcription factor 1* (PBX1), *Sal-like 1 (Drosophila) protein* (SALL1), *GLI family zinc finger 3* (GLI3), SF-1 und *Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1* (DAX1) beteiligt. GLI3 ist Bestandteil der Hh-Signalkaskade, sodass der Hh-Signalweg bereits an den ersten Schritten der Nebennierenentwicklung beteiligt ist (Else, Hammer, 2005).

Im weiteren Verlauf kommt es zur unterschiedlichen Migration der Zellen, sodass die zur Zölomhöhle orientierten Zellen zur gonadalen Anlage, die zur dorsalen Aorta orientierten Zellen zur adrenalen Anlage differenzieren (Hammer u. a., 2005). Herauszustellen bei der Regulation dieser Vorgänge ist dabei die Rolle von *Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2* (CITED2), denn im Gegensatz zu SF-1 und DAX1, die sowohl die adrenale als auch gonadale Differenzierung beeinflussen, wobei SF-1 die Transkription von *Dax1* reguliert (Kawabe u. a., 1999), führt eine Störung der CITED2-Transkription zur Nebennierenaplasie ohne Beeinträchtigung der Gonadenentwicklung (Bamforth u. a., 2001).

In der adrenalen Anlage findet eine erste Zonierung der fetalen Nebenniere in eine fetale und definitive Zone statt. Morphologisch dominiert die fetale Zone, eine im Inneren der fetalen Nebenniere gelegene Zone großer, in Clustern angeordneter Zellen. Sie wird umgeben von der definitiven Zone, einem schmalen Zellsaum ohne nennenswerte hormonelle Aktivität bis in die späte Gestation hinein. Während die peripheren Zellen eher klein und blastenartig sind, stark proliferieren und als adrenokortikale Vorläuferzellen angesehen werden, zeigen die Vorläuferzellen der fetalen Zone durch größeren Aufbau und die Expression von 17α -Hydroxylase bereits morphologische und funktionelle Hinweise auf ihre steroidogene Potenz (Erhart-Bornstein u.a., 1997). Tatsächlich werden in diesem Stadium hauptsächlich adrenale Androgenvorläufer gebildet, die der maternalen Plazenta als Substrat für die Estradiolbiosynthese dienen. In der Spätphase der Gestation exprimieren die Zellen auch 3β -hydroxysteroiddehydrogenase (3β -HSD), was sie zur *de novo* Produktion von Glukokortikoiden befähigt, die als Reifungsstimulus für die fetalen Organe große Bedeutung für eine erfolgreiche Endphase der Schwangerschaft haben. Doch bereits in der Frühphase der Embryonalentwicklung zwischen der 7. und 12. embryonalen Woche kommt es zur kurzfristigen Expression der 3β -HSD zum Schutz vor Virilisierung in einer Phase, die kritisch für die sexuelle Differenzierung des Embryos ist. Unter dem Einfluss der Glukokortikoide differenzieren in diesem Zeitraum die aus der Neuralleiste eingewanderten Zellen zu chromaffinen, katecholaminproduzierenden Vorläuferzellen des Nebennierenmarks (Mesiano, Jaffe, 1997), (Coulter, 2004).

Nach der Geburt atrophiert die fetale Zone und es kommt zur Zonierung der bekannten adulten Form der Nebenniere. Zum genauen Ablauf der adrenalen Zonierung bestehen unterschiedliche Hypothesen und unsere Kenntnisse werden weiterhin durch neue Studiendaten aus *in vitro*- oder Mausmodellexperimenten erweitert (Yates u. a., 2013). Interessanterweise konnten Zubair *et al.* spezifische Vorläuferzellen für Zellen der adulten Zonen in einem sehr frühen Stadium der Nebennierenentwicklung, noch vor Ausbildung der fetalen und definitiven Zone,

nachweisen (Zubair u. a., 2008). Die Literaturrecherche und Studien unserer Arbeitsgruppe führten zu einer interessanten Hypothese. Bereits die fetale Nebenniere ist stark vaskularisiert, und durch den zentripetalen Blutfluss durch die Nebenniere wird aufgrund der externen Stimulation von Corticotropin und Angiotensin ein Glukokortikoidgradient aufgebaut, der das intrazelluläre Milieu und die Aktivität der Hormone der Steroidbiosynthese der Nebennierenzellen so beeinflusst, dass die Nebennierenrindenzellen entlang dieses Gradienten verschiedene Funktionszustände einnehmen, die letztendlich zur Differenzierung und Ausbildung der typischen Zonierung der Nebennierenrinde führen (Hornsby, 1987), (Dringenberg u. a., 2012). Diese Hypothese erweitert daher bestehende Modelle über eine subkapsuläre Stammzellzone, von der sowohl die Zonierung als auch im adulten Organ eine konstante Zellerneuerung ausgeht. Pluripotente Stammzellen migrieren zentripetal in die Nebennierenrinde zu den verschiedenen Zonen, wobei die Zellen eher, wie oben beschrieben, unterschiedliche Funktionszustände annehmen, als, wie zuvor angenommen, aufgrund externer, für die jeweilige Zone spezifischer Signale zur typischen Nebennierenrindenzelle von zG, zF oder zR differenzieren (Vinson, 2003), (Kim, Hammer, 2007).

1.1.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse

Einer der wichtigsten regulatorischen Stimuli für die Funktion der Nebennierenrinde ist ACTH, das in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert wird. Obwohl funktionelle Zusammenhänge zwischen ACTH und der Nebenniere bereits in den 1950er Jahren bekannt waren, führte erst die Entdeckung von CRH, das unter anderem im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus gebildet wird und die ACTH-Freisetzung kontrolliert, Anfang der 1980er Jahre durch Vale *et al.* zur Vervollständigung des Modells der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (Conn, Fajans, 1952), (Vale u. a., 1981). CRH wird pulsatil aus dem Hypothalamus freigesetzt und stimuliert synergistisch mit Arginin-Vasopressin die Abspaltung von ACTH aus Proopiomelanocortin. Ausgehend vom CRH-Rezeptor Typ 1 vermittelt CRH seine Wirkung über die Aktivierung der Adenylatcyclase und Erhöhung von

intrazellulärem *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate* (cAMP). Es kommt zur Aktivierung der Prohormon-Konvertasen *Prohormone convertase 1* (PC1) und *Prohormone convertase 2* (PC2) und damit zur Spaltung von Proopiomelanocortin in pro- γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon, ACTH und β -lipotropes Hormon, die jeweils weiter gespalten werden können. Das genaue quantitative Verhältnis der verschiedenen Spaltprodukte von *Proopiomelanocortin* (POMC), den *POMC-related peptides*, ist vom Verhältnis von PC1 zu PC2 in den CRH-Zielzellen abhängig (Benjannet u. a., 1991), (Day u. a., 1992). Bindet ACTH am hochspezifischen G-Protein-gekoppelten, 7fach transmembranösen *Melanocortin 2 receptor* (MC2-Rezeptor) in der Nebennierenrindenzelle, wird die stimulierende Untereinheit des G-Proteins freigesetzt und die Adenylatcyclase aktiviert. Konsekutiv steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel und die cAMP-abhängige *Protein kinase A* (PKA) wird aktiviert (Sala u. a., 1979), (Sewer, Waterman, 2003). Über die Phosphorylierung der Zielproteine kommt es zur weiteren Signaltransduktion und letztendlich zur Modulation der Nebennierenfunktion. So werden über SF-1 vermittelt die Schlüsselenzyme für die Steroidbiosynthese aktiviert und die Steroidbiosynthese der Zielzelle wird gesteigert (Stocco u. a., 2005). Darüber hinaus werden aber auch Wachstum und Proliferation der Nebennierenrinde über eine ACTH-abhängige Aktivierung von *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) reguliert (Robinson-White u. a., 2006), (Winnay, Hammer, 2006). Eine Aktivierung der Nebennierenrindenzellen durch ACTH führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung der *MAP kinase-ERK kinase* (Mek) und der MAPK *Extracellular regulated MAP kinase* (ERK)1/2, vermutlich unabhängig von PKA (Le, Schimmer, 2001), (Janes u. a., 2008). ERK1/2 kontrollieren die Aktivität von mehr als hundert Substraten wie z.B. Transkriptionsfaktoren und anderen signalübertragenden Proteinen, sodass in der Nebennierenrinde sowohl die Steroidbiosynthese als auch das Zellwachstum beeinflusst werden (Yoon u. a., 2006), (Wu u. a., 2002). Neben ACTH können weitere, von der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HHN)-Achse weitgehend unabhängige Liganden wie zum Beispiel *Vascular endothelial growth factor* (VEGF),

Epidermal growth factor (EGF), *Insulin-like growth factor (IGF)* und *Fibroblast growth factor 2 (basic) (bFGF)*, die MAPK regulieren (Hoeflich, Bielohuby, 2009). Abweichende Muster innerhalb der beschriebenen Signalkaskaden können mit Störungen in der Hormonproduktion und mit adrenalem Tumorwachstum einhergehen, wie von Haase et Willenberg zusammengefasst (Haase, Willenberg, 2009).

Die Regulation der HHN-Achse ist ein Zusammenspiel verschiedener Systeme; das endokrine System, das Nervensystem und das Immunsystem wirken in komplexer Interaktion. Als Reaktion auf chronischen Stress findet man vermehrte Expression des *Corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH-R1)* in den corticotrophen Zellen der Hypophyse, also eine erhöhte Sensibilität auf den Stimulus CRH (Luo u. a., 1994). Der *Locus coeruleus* und andere noradrenerge Zellpopulationen in Hirnstamm und Brücke bilden das *Locus-coeruleus-norepinephrin-System (LC/NE-System)* und sezernieren Epinephrin, das neurovegetative Funktionen hemmt und den *Hippocampus*, die *Amygdala*, das *Striatum* und auch die HHN-Achse beeinflusst. Als morphologisches Korrelat für diese enge Verzahnung ist die Expression von *Corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R)* in den Zellen des *Locus coeruleus* und α 1-Rezeptoren für Adrenalin im *Nucleus paraventricularis* anzusehen, über die eine gegenseitige Stimulation stattfindet. Vermittelt und moduliert wird die Stressantwort im ZNS vom mesolimbischen System, *Amygdala* und *Hippocampus*, LC/NE-System und CRH/ACTH-System (Chrousos, 1998). Darüber hinaus beeinflusst das Immunsystem die HHN-Achse. Die meisten Kenntnisse haben wir über den Einfluss von Tumornekrosefaktor- α , Interleukin (IL)-1 und IL-6, die jeweils die HHN-Achse stimulieren. IL-6, dessen Produktion von den anderen beiden genannten Zytokinen, aber auch von Katecholaminen gefördert, von Glukokortikoiden hingegen gehemmt wird, hat auf die ACTH-Produktion dabei einen größeren Effekt als hohe Dosen CRH, vermutlich über zusätzliche Aktivierung von Arginin-Vasopressin (Chrousos, 1995).

Glukokortikoide üben auf die HHN-Achse ein überwiegend negatives Feedback aus. So wird der Organismus vor den antireproduktiven, immunsuppressiven und katabolen Effekten der Glukokortikoide geschützt. In weiten Teilen des ZNS befinden sich intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren. Dabei bindet Kortisol im ZNS sowohl an den Glukokortikoidrezeptor Typ I (Mineralokortikoidrezeptor) als auch an den Glukokortikoidrezeptor Typ II (Glukokortikoidrezeptor). Je nach Lokalisation der Rezeptoren kommt es zu positivem oder negativem Feedback auf die HHN-Achse, deren Aktivität somit durch Kortisol moduliert wird. Während der nächtlichen Ruhephase der HHN-Achse aktiviert der niedrige Kortisolspiegel vor allem hoch affine Mineralokortikoidrezeptoren und erhält so eine niedrige Basalaktivität. In den Phasen hoher CRH-Sekretion des circadianen Rhythmus oder in Stresssituationen begrenzen die hohen Dosen an Kortisol die CRH-Sekretion über die Glukokortikoidrezeptoren in Hypothalamus und Hypophyse (Reul, de Kloet, 1985), (Spencer u. a., 1998), (Tsigos, Chrousos, 2002).

Neben der „klassischen“ HHN-Achse wird auch ein intraadrenaler, von hypophysärem ACTH unabhängiger Effekt von CRH auf die adrenale Steroidbiosynthese beschrieben. Voraussetzung ist die Expression der CRH-Rs auf adrenocorticalen Zellen (Willenberg u. a., 2005). Sowohl in kultivierten fetalen Nebennierenzellen als auch in adulten Nebennierenzellkulturmodellen stimuliert CRH die Steroidbiosynthese über Aktivierung des CRH-R Typ 1 (Sirianni u. a., 2005), (Willenberg u. a., 2000).

1.1.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Die besondere Bedeutung des RAAS für die Blutdruck- und Mineralokortikoidregulation wurde von Franz Gross erkannt (Gross, 1958). Auf einen Volumen-, Druck- oder Natriumverlust im juxtaglomerulären Apparat der Niere wird reaktiv Renin sezerniert, das als Protease wirkt und aus dem in der Leber produzierten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I abspaltet. Das *Angiotensin I converting enzyme* (ACE) katalysiert die Umwandlung in das Oktapeptid Angiotensin II, das auf die Erfolgsorgane des RAAS wirkt. Klinisch kommt

es über einen Anstieg des Salzgehalts des Blutes zu Durst, zur ADH-vermittelten Wasserrückresorption und damit zur Erhöhung des Blutvolumens (Peach, 1977). Ein Erfolgsorgan für Angiotensin II ist die Nebennierenrinde, in der es die Aldosteronproduktion stimuliert. Angiotensin II-Rezeptoren finden sich prinzipiell in allen Zonen der Nebennierenrinde, lassen sich aber außerhalb der zG erst durch hohe Dosen Angiotensin II aktivieren. Der *Angiotensin II receptor, type 1* (AGT1R) der zG hingegen ist hochspezifisch für Angiotensin II (Douglas u. a., 1984), (Balla u. a., 1991). Die Aktivierung des AGT1R führt einerseits zu einer Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität, verbunden mit einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels, andererseits zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels über die Aktivierung von Dihydropyridin-sensitiven, spannungsabhängigen Kalziumkanälen sowie über die Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Inositoltriphosphatbildung und Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Die hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration inhibiert die ansässigen Subtypen 5 und 6 der Adenylatcyclase in der zG-Zelle, während Proteinkinase C und *calmodulin kinase* und letztendlich die Enzyme der Steroidbiosynthese, insbesondere *cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2* (CYP11B2), die Aldosteronsynthese, aktiviert werden (Ohnishi u. a., 1992), (Dringenberg u. a., 2012).

Während die gesteigerte Aldosteronbiosynthese eher als akute Reaktion der zG auf Angiotensin II angesehen werden kann, hat eine salzarme Ernährung, die zur langandauernden Freisetzung von Angiotensin II führt, einen proliferativen Effekt auf diese Zone (Aguilera, Catt, 1983).

Analog zum intraadrenalen CRH/ACTH-System konnten Studien die Existenz eines intraadrenalen RAAS belegen. Sowohl auf messenger ribonucleic acid- (mRNA) als auch auf Protein-Ebene wurden intraadrenales Prorenin, Angiotensinogen und ACE sowie die aktiven Komponenten des Systems, Renin und Angiotensin II, nachgewiesen (Ehrhart-Bornstein u. a., 1998).

1.1.4 Kortikochromaffine Interaktionen und neurale Regulationsmechanismen

Lange Zeit wurden Nebennierenrinde und -mark völlig unabhängig voneinander betrachtet. Bereits auf morphologischer Ebene zeigt sich aber eine mögliche funktionelle Verknüpfung, da sowohl chromaffine Zellen in der kortikalen Zone als auch kortikale Zellen im Nebennierenmark gehäuft in der Nähe medullärer Gefäße gefunden wurden. Die adrenomedullären sekretorischen Produkte Adrenalin und Noradrenalin stimulieren die Steroidbiosynthese von Nebennierenrindenzellen *in vivo* und *in vitro* über α -Rezeptoren. Außerdem haben die darüber hinaus von den chromaffinen Zellen sezernierten Neuropeptide regulatorische Einflüsse auf die Nebennierenrinde (Ehrhart-Bornstein u.a. 1998), (Schinner, Bornstein, 2005). *In vitro* Untersuchungen mit Kokulturen von adrenokortikalen und chromaffinen Zellen zeigten einen parakrin-stimulierenden Effekt von chromaffinen Zellen auf die kortikale Steroidbiosynthese (Haidan u. a., 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten die Verbindung von Nebennierenrindenzellen mit *gap-junctions* aufzeigen, die interzellulären Austausch von hydrophilen Molekülen ermöglichen und so die Weiterleitung parakriner Effekte ermöglichen (Davis u. a., 2002). In direktem Kontakt zu hormonproduzierenden Zellen der Rinde stehen vesikelgefüllte Nervenendigungen der den Kortex zur Medulla durchziehenden Nerven, sodass eine nervale Innervation des Kortex nahe liegt (Dorovini-Zis, Zis, 1991). Baro- und Chemorezeptoren in der Nebennierenrinde werden von Nervenfasern versorgt, die teilweise aus Nervenzellen der adrenalen Medulla stammen, teilweise aber von außerhalb gelegenen Ganglien entlang der versorgenden Gefäße in den adrenalen Cortex gelangen (Nijima, Winter, 1968), (Hinson, 1990). Die Funktionen dieser Innervation sind vielfältig, unter anderem scheint adrenales Wachstum neural reguliert zu werden, da es bei einseitiger Adrenalektomie kompensatorisch zu neural vermittelter Hypertrophie der kontralateralen Nebenniere kommt (Dallman u. a., 1977), (Holzwarth u. a., 1987).

1.2 Der Hh-Signalweg

Das Hh-Gen wurde erstmals 1980 von der Arbeitsgruppe um Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus bei Mutationsanalysen an *Drosophila* zur Identifikation von Genen mit Beteiligung an der Segment-Polarisation beschrieben (Nüsslein-Volhard, Wieschaus, 1980). Im Verlauf wurden zunächst in Mäusen die drei *Drosophila* Hh-Homologe für Säugetiere, Shh, *Desert hedgehog* (Dhh) und *Indian hedgehog* (Ihh), entdeckt und erstmals eine entscheidende Rolle für Shh in der Entwicklung des ZNS postuliert (Echelard u. a., 1993). Mittlerweile konnte diesen Hh-Homologen eine essentielle Bedeutung in der embryonalen Entwicklung zugeschrieben werden, wobei der Hh-Signalweg nicht nur die Zelldifferenzierung, das –wachstum und die Gewebeentwicklung in der Embryologie reguliert, sondern auch im adulten Organismus für die Kontrolle von Homöostase und Stammzellaktivität von Belang ist (Ingham, McMahon, 2001).

Die Kaskade zur Signaltransduktion wird durch Bindung der Hh-Proteine an den 12-fach transmembranösen Rezeptor Ptch1 bzw. *Patched2* (Ptch2) der entsprechenden Zielzellen induziert. Es kommt zu einer Internalisierung der Rezeptoren (Carpenter u. a., 1998). Daraufhin wird ein zweiter Rezeptor, der 7-fach transmembranöse Rezeptor Smo, an seinem intrazellulären carboxyterminalen Anteil phosphoryliert und aus intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran des primären Ziliums der Zielzelle eingebaut und damit reaktiviert. Die genauen Mechanismen, wie die Ptch-Rezeptoren und Smo interagieren, sind noch nicht vollständig geklärt. Ein direkter, physischer Kontakt gilt aber als unwahrscheinlich (Chen, 2004), (Huangfu, Anderson, 2006). Die eigentliche Signaltransduktion des Hh-Signalwegs wird durch die Familie der *GLI family of zinc finger transcription factors* (Gli-Proteine) vermittelt. Im inaktivierten Zustand der Hh-Signalweg-Zielzelle werden die Gli-Proteine durch PKA und durch *Suppressor of Fused* (SuFu) inhibiert (Wang u. a., 2000), (Kogerman u. a., 1999). Erst nach erfolgter Aktivierung von Smo wird die durch PKA und SuFu vermittelte Inhibition gestoppt und die Gli-Proteine werden aktiviert. Am Ende der

Kaskade induziert Gli1 schließlich im Zellkern die Translation der Hh-Signalweg-Zielgene (Ingham, McMahon, 2001).

Ein gestörter Ablauf innerhalb der komplexen Signalkaskade kann zu einer übermäßigen Aktivierung oder Inhibition des Hh-Signalwegs führen. Entsprechend der physiologischen Rolle der Hh-Proteine kann es zu Fehlbildungen in der Entwicklung, im adulten Gewebe aber auch zur Tumorentstehung kommen (Ingham, McMahon, 2001). So zeichnet eine inaktivierende Mutation im Rezeptor *PTCH* im Menschen für das Gorlin-Goltz-Syndrom verantwortlich, charakterisiert durch das gehäufte Auftreten von Basalzellkarzinomen, Rhabdomyosarkomen und Medulloblastomen (Gorlin, 2004), (Hahn u. a., 1996). Ein erster Hinweis auf eine mögliche Rolle des Hh-Signalwegs in der Nebenniere waren Kenntnisse über eine Mutation von *GLI3* im Pallister-Hall Syndrom, bei dem klinisch unter anderem eine Hypoplasie der Nebenniere beobachtet werden kann (Kang u. a., 1997). Ein weiterer Ausgangspunkt unserer Arbeit, den Hh-Signalweg in der humanen Nebenniere zu untersuchen, waren Veröffentlichungen, die den Einfluss des Hh-Signalwegs auf die Tumorgenese der Hypophyse und die ACTH-Produktion der Hypophyse sowie auf die Entwicklung der Leydig-Zellen und der Steroidbiosynthese in den Gonaden beschrieben (Vila u. a., 2004), (Vila u. a., 2005), (Yao u. a., 2002), (Clark u. a., 2000). Im Laufe unserer Experimente wurden zudem erste Erkenntnisse zur Rolle von *Shh* in der Entwicklung der Nebenniere der Maus veröffentlicht, die uns in unseren Bemühungen bestärkt haben (King u. a., 2009), (Ching, Vilain, 2009).

2. Ziele der Arbeit

In den letzten Jahren wurde die Rolle des Hh-Signalwegs bei der Entwicklung der Nebenniere der Maus nähergehend untersucht (Laufer u.a., 2012). Bisher war wenig über die Rolle beim Menschen und adultem adrenalen Gewebe bekannt. Darüber hinaus wurden Studien zur Rolle des Hh-Signalwegs bei der Steroidbiosynthese in den Gonaden sowie zur Regulation der ACTH-Sekretion und Tumorentstehung in der Hypophyse publiziert (Clark u.a., 2000), (Vila u.a., 2004), (Vila u.a., 2005). Unsere Hypothese war daher, dass der Hh-Signalweg neben seiner Rolle bei der Nebennierenentwicklung auch in physiologische und pathophysiologische Prozesse der adulten, humanen Nebenniere involviert ist. Es war unser Ziel, die Expression wichtiger Komponenten der Hh-Signalkaskade in adulten humanen Nebennieren zu untersuchen. Falls Komponenten des Signalwegs in den Nebennierenrindenzellen vorhanden sind, wollten wir untersuchen, ob Störungen des Hh-Signalwegs - wie in anderen Organen auch - für die adrenale Tumorgenese bedeutsam sind. Wir verfolgten deshalb die Hypothese, dass Expressionsunterschiede der Hh-Signalkaskade im Vergleich zwischen adrenalen Tumoren und Normalgewebe vorliegen.

Um von Expressionsunterschieden auf mögliche funktionelle Störungen zurückschließen zu können, wollten wir den regulatorischen Einfluss des Hh-Signalwegs auf die Funktion und das Wachstum humaner adrenaler Zellen in einem *in vitro*-System studieren. In Fokus nahmen wir dabei die Interaktion mit dem cAMP/PKA-Signalweg, der einerseits die Funktion des Hh-Signalwegs in anderen Geweben inhibiert, gleichzeitig aber auch entscheidend für die Regulation der Nebennierenrindenfunktion ist.

3. *Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line*, Werminghaus, P., Haase, M., Hornsby, P.J., Schinner, S., Schott, M., Malendowicz, L.K., Lammers, B.J., Goretzki, P.E., Müller-Mattheis, V., Giessing, M., Willenberg, H.S., *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 139, Pages 7-15 (2014).

4. Diskussion

Der Hh-Signalweg ist in die embryonale Entwicklung verschiedener Organe zentral eingebunden. Im adulten Gewebe kontrolliert er das Verhalten und die Homöostase der entsprechenden Stammzellen (Ingham, McMahon, 2001). Für die regelrechte Entwicklung der Gonaden und für die Regulierung der gonadalen Steroidbiosynthese ist Dhh entscheidend. Männliche Mäuse, bei denen das *Dhh*-Gen ausgeschaltet wurde, entwickeln eine fehlerhafte Spermatogenese und zeigen morphologisch abweichende Varianten der Leydigzellen mit einer reduzierten Expression von Sf-1 (Yao u. a., 2002), (Clark u. a., 2000). Seit einigen Jahren beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Beteiligung des Hh-Signalwegs an der Nebennierenentwicklung und konzentrieren sich dabei auf die Rolle von Shh an der Entwicklung der Nebenniere in Mäusen und Ratten (King u. a., 2009), (Ching, Vilain, 2009), (Huang u. a., 2010).

So konnten die Bestandteile der Hh-Signalkaskade Shh, Gli1, *GLI family zinc finger 2* (Gli2) und Gli3 in der Nebennierenrinde während des gesamten Entwicklungszeitraumes nachgewiesen werden. Wird Shh inaktiviert, so lassen sich eine Hypoplasie und darüber hinaus auch eine Aufhebung der regelhaften Morphologie des Kortex beobachten (Laufer u. a., 2012). Shh scheint daher bedeutsam für das Größenwachstum der Nebennierenrinde zu sein, eine Beteiligung an der Differenzierung in die bekannten Zonen des adulten Organs wird diskutiert, wobei hier vermutlich andere Mechanismen im Vordergrund stehen (Guasti u. a., 2013b), (Yates u. a., 2013), (Dringenberg u. a., 2012).

Für uns stellte sich die Frage, ob ähnlich wie bei anderen, für die adrenale Embryogenese bedeutenden Wachstumsfaktoren, auch der Hh-Signalweg an der Physiologie, dem Wachstum und damit gegebenenfalls auch an der Tumorgenese der adulten humanen Nebenniere beteiligt ist (Haase u. a., 2007).

4.1 Nachweis des Hh-Signalwegs in der adulten humanen Nebenniere

Gli1 ist sowohl der primäre Transkriptionsfaktor als auch ein Zielgen der Hh-Signalkaskade, sodass der Nachweis bedeutet, dass die Signalkaskade unterhalb des Rezeptors Smo auch tatsächlich aktiv ist (Ingham, McMahon, 2001), (Vokes u. a., 2007). In unserer Arbeit konnten wir mit GLI1-Antikörpern die adulten humanen Nebennieren anfärben. Besonders auffällig war die Färbung subkapsulär in der zG und in der zR; die zF war aber ebenfalls positiv für GLI1, sodass wir postulieren, dass der Hh-Signalweg im gesamten humanen adulten adrenalen Kortex aktiv ist. Unsere Ergebnisse wurden von einer unabhängigen Arbeitsgruppe um Gomes *et al.* bestätigt (Gomes u.a., 2014). Passend zu diesen Daten detektierten Huang *et al.* in Mäusen die Expression von Gli1, Ptch1 und Shh im adrenalen Kortex von adulten Mäusen, wobei Gli1 und Ptch1 kapsulär, Shh hingegen subkapsulär nachgewiesen werden konnten (Huang u. a., 2010). Interessanterweise wird Shh dabei von relativ undifferenzierten steroidogenen Zellen exprimiert; diese Beobachtung veranlasste die Arbeitsgruppe um King und Laufer dazu, ein Modell der Nebennierenentwicklung aufzustellen, das genauer auf die Bedeutung des Hh-Signalwegs eingeht. Während die Entwicklung des adrenalen Primordiums weitestgehend Hh-unabhängig reguliert wird, ist Shh entscheidend an Reifung und Erhaltung der adrenalen Kapsel verantwortlich (Laufer u. a., 2012). Der Nachweis und die Lokalisationsbestimmung von SHH-Protein in der Nebennierenrinde mit Immunhistochemie, die diese These stützen könnten, gestalteten sich in unserer Studie als Herausforderung. Die von uns untersuchten Nebennieren ließen sich nicht eindeutig mit einem SHH-Antikörper anfärben. Die kommerziell erhältlichen Antikörper wurden primär für Western-Blot Untersuchungen entwickelt, sodass eine Garantie für Funktionalität in immunhistochemischen Verfahren nicht gegeben war. Aufgrund der limitierten Gewebemenge, die uns für unsere Studie zur Verfügung stand, entschieden wir uns dennoch gegen eine Western-Blot Analyse und für die morphologische Untersuchung von adrenalen Schnitten mit Immunhistochemie, sodass wir die bereits beschriebenen morphologischen Unterschiede für die GLI1-Expression

aufdecken konnten. Dem SHH-Protein aufgrund des fehlenden Nachweises auf Proteinebene in unserer Studie die Bedeutung für die Regulation adrenaler Funktionen abzusprechen, ist jedoch unzulässig, da wir *SHH* auf mRNA-Ebene und des Weiteren *GLI1*, *SMO* und *PTCH1* in allen untersuchten Nebennieren nachweisen konnten und mit diesen Ergebnissen mit den Daten anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen. So konnten die Bestandteile der Hh-Signalkaskade teilweise auf mRNA-, teilweise auf Proteinebene nachgewiesen werden (King u. a., 2008), (Ching, Vilain, 2009), (Huang u. a., 2010), (Laufer u. a., 2012) (Gomes u.a., 2014).

4.2 Der Hh-Signalweg in Nebennierenrindentumoren

Störungen innerhalb der Hh-Signalkaskade, die mit einer nicht-physiologischen Aktivität des Signalweges einhergehen, führen zu krankhaften Zuständen des Organismus. Besonders die Entstehung maligner Erkrankungen scheint begünstigt. Im Gorlin-Goltz-Syndrom, das mit dem generalisierten Auftreten multipler Basalzellkarzinome, mit Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen einhergeht, konnte eine den Rezeptor *Patched* inaktivierende Mutation nachgewiesen werden, die auf diese Art den Hh-Signalweg bei den Betroffenen unkontrolliert aktiviert (Gorlin, 2004), (Hahn u. a., 1996). Andere klinische Beispiele tumoröser Erkrankungen, in deren Pathophysiologie die Hh-Signalkaskade eingebunden ist, sind das kleinzellige Lungenkarzinom, Karzinome der Speiseröhre, des Magens, des Gallengangsystems und des Pankreas (Berman u. a., 2003), (Watkins u. a., 2003).

Besonders interessante Einblicke in mögliche pathophysiologische Mechanismen des Hh-Signalwegs in der Nebenniere bieten die Studien von Vila *et al.* in der Hypophyse, dem der Nebenniere funktionell nahestehenden Organ. Obwohl SHH wichtig für eine normale Entstehung der Hypophyse ist, und neben SHH auch PTCH und GLI1 in corticotrophen Zellen nachweisbar sind, exprimieren ACTH-sezernierende Hypophysenadenome kein SHH (Treier u. a., 2001), (Vila u. a., 2005). Dennoch scheint SHH in die hypophysäre Hormonsekretion eingebunden zu sein, da SHH sowohl die Expression des CRH-R1 als auch die ACTH-Sekretion über eine GLI-abhängige Aktivierung von POMC steigert (Vila u. a., 2004), (Vila u. a., 2005).

Aufgrund dieser Vorüberlegungen stellten wir uns also die Frage einer möglichen Beteiligung des Hh-Signalwegs an der Tumorgenese der humanen Nebenniere und untersuchten daher Nebennierenkarzinome und Nebennierenrindenadenome, sowohl hormonproduzierende als auch hormoninaktive Tumoren auf die Expression der wichtigsten Hh-Signalweg-Komponenten. Obwohl wir GLI1 in der normalen Nebenniere immunhistochemisch nachweisen konnten, waren die von uns untersuchten adrenalen Tumoren weder positiv für GLI1 noch für SHH. Gomes *et al.* hingegen konnten in der Mehrzahl, aber nicht in allen untersuchten Tumorproben GLI1 immunhistochemisch anfärben, SHH hingegen nur in wenigen Tumoren (Gomes u.a., 2014). Passend dazu konnten wir auf mRNA-Ebene *GLI1*, *SHH*, *SMO* und *PTCH1* nicht nur im humanen adrenalen Normalgewebe, sondern auch in allen untersuchten Tumoren nachweisen. Darüber hinaus wurden in der semiquantitativen *Real time polymerase chain reaction* (PCR) teilweise erhebliche quantitative Unterschiede im Expressionsmuster in den einzelnen Gewebearten auffällig.

Sowohl bei hormonaktiven Adenomen als auch bei Nebennierenrindenkarzinomen zeigte sich eine zwei- bzw. sechsfache Erhöhung der *SHH*-mRNA-Expression im Vergleich zur Expression in der normalen Nebenniere. Diese Ergebnisse gingen jedoch einher mit relativ geringen Unterschieden für die Expression von *GLI1*-, *SMO*- und *PTCH1*-mRNA, passend zu Daten aus der Arbeitsgruppe von Gary Hammer, die bei Genexpressionsanalysen adrenocorticale Tumoren mit normalen Nebennieren prüfte und keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von SHH und GLI1 im Vergleich von Nebennierenrindenkarzinomen, Nebennierenadenomen und normalen Nebennieren feststellen konnte (Giordano, 2010). Die Daten zur Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs in Nebennierenrindentumoren sind in der Literatur jedoch bislang äußerst heterogen. So konnten Gomes *et al.* innerhalb der untersuchten Population adrenocorticaler Tumoren Expressionssteigerungen für *PTCH1*-, *SMO*-, *GLI3*- und *SUFU*-mRNA in ACC im Vergleich zu normalen adulten Nebennieren messen, nicht aber für *Shh*-mRNA. In

den von ihnen untersuchten Nebennierenadenomen fanden sie hingegen keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede. In Tumorgewebe von pädiatrischen Patienten zeigte sich eine verminderte Expression für *SHH*-, *GLI1*-, *PTCH1*-, *SMO*- und *GLI3*-mRNA im Vergleich zu normalen pädiatrischen Nebennieren. Boulkroun *et al.* verglichen die Expression von SHH in normalen menschlichen Nebennieren mit der in Aldosteron-sezernierenden Nebennierenadenomen. Während sie im Kontrollgewebe nur eine schwache SHH-Expression einiger Zellen ausschließlich subkapsulär in der Nebennierenrinde nachwies, war SHH in allen untersuchten Tumoren schwach exprimiert, davon bei etwa 29% homogen im gesamten Knoten, bei der Mehrheit der Tumoren aber heterogen im Tumorgewebe (Boulkroun u. a., 2011). In Zusammenschau dieser Daten kann die exakte Rolle des Hh-Signalwegs in der Tumorgenese hormonproduzierender adrenocorticaler Tumoren weiterhin nicht vollständig geklärt werden. Immerhin weisen sowohl unsere Ergebnisse als auch die aufgeführten Studien auf eine mögliche Beteiligung von SHH bei diesen Neoplasien hin, wohingegen sich jedoch bislang keine Hinweise auf eine führende Rolle in der Entstehung und der Wachstumsregulation dieser Tumorentitäten ergeben. Interessante Ergebnisse brachten unsere weiteren Experimente zur Expression der Hh-Signalweg-Moleküle *SHH*, *GLI1*, *SMO* und *PTCH* in hormoninaktiven Adenomen - auch im Hinblick auf die eben diskutierten Ergebnisse unserer Studien in ACC und hormonproduzierenden Adenomen. Es zeigte sich neben einer signifikant erhöhten Expression von *SHH* auch eine erhöhte Expression der weiteren Komponenten *GLI1*, *SMO* und *PTCH1* für die hormoninaktiven Adenome. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des Hh-Signalwegs an der Pathophysiologie dieser Tumorentität. Die Studien der Arbeitsgruppe um Ed Laufer und Peter King geben Erklärungsansätze über die möglichen funktionellen Zusammenhänge zwischen Hh-Signalweg und der Tumorgenese in Nebennierenrindentumoren (King u. a., 2009). So ist eine exzessive Stimulation von SHH-exprimierenden Zellen bzw. eine Expansion dieser Zellart denkbar. Nicht-hormonaktive Zellen, die sensibel für SHH sind, könnten übermäßig

aktiviert werden, sodass es über die weitere Kaskade mit konsekutiver Aktivierung von SMO und GLI1 innerhalb dieser zweiten Zellart zur Proliferation und Tumorentstehung kommt. Alternativ könnte auch eine autonome, SHH-unabhängige Aktivierung des Hh-Signalwegs in den nicht-steroidogenen Zellen die ausgeprägt erhöhte Expression von *GLI1* in dieser Tumorentität erklären. Passenderweise beschreiben King *et al.* in ihren Arbeiten eine *Gli1+/SF-1-* Zellpopulation in den untersuchten Nebennieren von Mäusen, die durch *SF-1+/Shh+* Zellen aktiviert werden (King u. a., 2009). Unsere oben diskutierten Ergebnisse zur Expressionssteigerung von *SHH*-mRNA in ACC und hormonproduzierenden Adenomen ohne einhergehende Steigerung der Expression der weiteren Hh-Signalweg-Bestandteile untermauern diese Theorie, da hormonaktive Tumoren vermutlich vermehrt aus der *Sf+/Shh+* Zellpopulation bestehen und die *Gli1+/SF-1-* Zellen supprimiert sein könnten. Außerdem ist bei dieser Tumorentität eine erhöhte Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs zu vermuten, der wiederum inhibierenden Einfluss auf die Hh-Signalkaskade ausübt (Sheng u. a., 2006). Um dies auch in Nebennierenrindenzellen bestätigt zu wissen, kultivierten wir *NCI-H295R*-Zellen mit Forskolin und konnten die Expression von *SMO*- und *GLI1*-mRNA auf diese Art hemmen. Es ist daher zu vermuten, dass in ACC und hormonproduzierenden Adenomen der Hh-Signalweg über den cAMP/PKA-Signalweg negativ reguliert wird, wohingegen in den NPA der Hh-Signalweg aktiv bleibt.

Die Studien von Boulkroun *et al.* zeigen eine signifikante Expressionssteigerung des Hh-Signalwegs im peritumoralen Gewebe der untersuchten Adenome und der angrenzenden zG-Zellen der von einem Aldosteron-produzierenden Adenom (APA) befallenen Nebennieren im Vergleich zum Haupttumorgewebe oder zu normalen Nebennieren. Diese Beobachtungen ließen die Autoren schlussfolgern, dass eine übermäßige Aktivierung des Hh-Signalwegs im adulten Gewebe zu einer Reaktivierung fetaler Wachstumsmuster und damit zu unkontrolliertem adrenalen Wachstum führt (Boulkroun u. a., 2011). Auch wir und andere (Gomes u.a., 2014) haben bei unserer immunhistochemischen Analyse eine erhöhte Expression von

GLI1 in den subkapsulären Gebieten der zG im Vergleich zur etwas schwächeren Färbung der zF gefunden. Da wir nur sehr wenig Gewebe der hormoninaktiven Tumoren zur Verfügung hatten, mussten wir uns auf die deskriptiven Studien zur mRNA-Expression konzentrieren und konnten das Gewebe nicht immunhistochemisch untersuchen. Unsere Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf die Daten der Gruppe um King und Laufer in Mäusen, die Daten von Gomes *et al.* in ACC und Nebennierenrindenadenomen und die äußerst heterogenen Daten von Boulkroun *et al.* in APA sind jedoch vielversprechend, lassen eine entscheidende Rolle des Hh-Signalwegs bei dieser Tumorentität vermuten und sollten daher in größeren Studien zu NPA vertieft werden.

4.3 Einflüsse des Hh-Signalwegs auf das Verhalten humaner adrenocorticaler Zellkulturlinien *in vitro*

Wir konnten zeigen, dass ein gezielter Antagonismus mit Cyclopamin des Hh-Signalwegs in verschiedenen adrenocorticalen Zellkulturmodellen mit einer gehemmten Zellproliferation und Steroidbiosynthese einhergeht. Wir untersuchten dabei zwei etablierte Zellkulturlinien: Die NCI-H295R-Zelllinie adrenocorticaler Karzinomzellen sowie eine in Zusammenarbeit mit Prof. Hornsby etablierte immortalisierte, primäre humane Nebennierenrindenzelllinie. Unsere Versuche, den Hh-Signalweg exogen über die Stimulation der Nebennierenrindenzellen mit SHH und *Smoothened Agonist* (SAG) zu aktivieren, zeigten jedoch keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Proliferation und die Steroidbiosynthese. Der von uns beobachtete inhibierende Einfluss von Cyclopamin verblieb dabei ohne statistisch signifikante Veränderung der Expression von *Steroidogenic acute regulatory protein* (*StAR*)-, *MAPK*- und *SF-1*-mRNA oder der Aktivität des *StAR*-Promoters. Interessanterweise zeigte sich aber zumindest eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung der Expression von *StAR* und *SF-1*-mRNA nach Stimulation der NCI-H295R-Zelllinie mit SAG und SHH.

Um die Ergebnisse von Agonismus und Antagonismus durch SHH, SAG und Cyclopamin auf die Nebennierenrindenzellen zu diskutieren, sind tiefergehende Kenntnisse über die Signaltransduktion der Hh-Signalkaskade essentiell. Zunächst soll hier die zentrale Rolle von SMO, des zweiten Rezeptors innerhalb der Signalkaskade, diskutiert werden. Die Aktivität des Hh-Signalweges ist mit der Lokalisation von Smo im Primärzilium, einem mikrotubulären, hauchdünnen Zellfortsatz, den die meisten Zellen von Säugetieren tragen und der in Proteintransportmechanismen involviert ist, verknüpft (García-García u. a., 2005), (Rohatgi u. a., 2007). Der in unseren Studien benutzte Hh-Agonist SAG bindet direkt an SMO, sorgt für dessen Kumulation im Primärzilium und steigert so die Aktivität der Hh-Signalkaskade (Chen u. a., 2002b). Der spezifische Antagonismus von Cyclopamin, einem Steroidalkaloid, ist auf die direkte Bindung an Smo und eine so verursachte und die weiteren Funktionen inhibierende Veränderung der Proteinstruktur von Smo zurückzuführen (Chen u. a., 2002a). Die Proteinkinase A wiederum aktiviert Smo über Phosphorylierung und führt so zu einer vermehrten Aktivierung der Hh-Signalkaskade (Jia u. a., 2004). Die Proteinkinase A ist aber auch entscheidend an der Aktivierung der Steroidbiosynthese in adrenocorticalen Zellen beteiligt (Sewer, Waterman, 2003). Möglicherweise greift Cyclopamin in unseren Experimenten durch die Konformationsänderung von SMO so gravierend in die Homöostase der Nebennierenrindenzelle ein und verändert die Verfügbarkeit der PKA, sodass die PKA-assoziierte Aktivierung der Zellproliferation und der Steroidbiosynthese nachhaltig gestört wird.

Bemerkenswert ist, dass der cAMP/PKA-Signalweg trotz der aktivierenden PKA-assoziierten Phosphorylierung von Smo prinzipiell ein starker Antagonist der Hh-Signalkaskade ist (Epstein u. a., 1996), (Hammerschmidt u. a., 1996), (Noveen u. a., 1996). Die PKA reguliert direkt die Lokalisation und Aktivität des Transkriptionsfaktors Gli1 (Sheng u. a., 2006). Dieser Mechanismus könnte erklären, warum unsere Experimente mit den Agonisten SAG und SHH keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Proliferation und Steroidbioynthese in den

adrenocorticalen Zellkulturmodellen hatten: besonders in der Nebennierenkarzinomzelllinie, aber auch in der immortalisierten, primären humanen Nebennierenrindenzelllinie könnte aufgrund der hohen intrinsischen Aktivität des cAMP/PKA-Signalwegs in Nebennierenrindenzellen *GLI1* nicht ausreichend exogen aktiviert werden, um die hemmenden Effekte von cAMP und PKA zu kompensieren. Unsere Daten zeigen, dass Forskolin die Expression von *SMO* und *GLI1*-mRNA in Nebennierenrindenzellen hemmt. Damit konnten wir belegen, dass dieser Effekt des cAMP/PKA-Signalwegs prinzipiell auch in Nebennierenrindenzellen existiert.

Unsere Studien offenbaren einen eindeutig hemmenden Effekt von Cyclopamin auf die Proliferation und die Steroidbiosynthese in den untersuchten Nebennierenrindenzelllinien. Obwohl Cyclopamin als spezifischer Inhibitor des Hh-Signalweges über die oben beschriebenen Effekte auf den Rezeptor Smo etabliert ist (Jia u. a., 2004) und auf ähnliche Weise wie bei uns in Studien anderer Arbeitsgruppen genutzt wurde (Taipale u. a., 2000), (Alinger u. a., 2009), (Mazumdar u. a., 2011), (Mozet u. a., 2013), sind unspezifische Effekte von Cyclopamin nicht vollständig auszuschließen, da wir die Ergebnisse nicht über eventuelle Aktivitätsänderungen des *GLI1*-Promotors nach Cyclopamin-Stimulation der Zelllinien oder über Tomatidin, einem strukturell verwandten Steroidalkaloid ohne Effekt auf die Hh-Signalkaskade, kontrolliert haben. Unabhängig von unseren Ergebnissen konnten auch *Gomes et al.* mit Cyclopamin in bereits relativ geringen Dosen die Zelllebensfähigkeit der NCI-H295R Zelllinie nach 96 Stunden Inkubationszeit inhibieren (Gomes u.a., 2014). Diese Studie stützt unsere eigenen Befunde und lässt unspezifische Effekte von Cyclopamin unwahrscheinlich erscheinen.

Klinisch ist die Spezifität von Cyclopamin als Hh-Antagonist ebenfalls weithin akzeptiert, sind doch modifizierte Analoga von Cyclopamin als spezifische selektive Therapeutika gegen Hh-induzierte Tumoren bereits zugelassen oder wurden in

aktuellen Studien auf klinische Wirksamkeit geprüft (Fan u. a., 2011), (Jimeno u. a., 2013), (Poggi, Kolesar, 2013).

In unseren Experimenten haben wir die in der Literatur etablierten und von den Herstellern empfohlenen Dosen für SAG und SHH genutzt, um die Nebennierenrindenzellen zu stimulieren. Einige Studien weisen darauf hin, dass nicht die absolute Konzentration von Hh-Protein, sondern vielmehr kleine Konzentrationsveränderungen im für die Zielzelle spezifischen Gradienten von Hh-Protein die Funktion des Hh-Signalwegs verändern (Charron u. a., 2003), (Martinelli, Fan, 2007), (Ahn, Joyner, 2004). Wir haben deshalb die Konzentration der Stimulantien SAG und SHH-Protein variiert, ohne durchgreifende Unterschiede in der Proliferation der Nebennierenrindenzellen messen zu können.

Bei dem von uns genutzten, kommerziell erhältlichen SHH-Protein handelt es sich nicht um das komplette Protein, sondern um das N-terminale Peptid, der eigentlichen Signaleinheit des Hh-Proteins. *In vivo* wird das sezernierte Shh-Protein mehrfach kovalent modifiziert, um nicht nur die Zellen, die die sezernierende Zelle direkt umgeben, sondern auch weiter entfernte Zellen zu erreichen und zu stimulieren (Gallet u. a., 2006), (Mann, Beachy, 2004). Für diese Fernwirkungen benötigen die Hh-Proteine *in vivo* Lipoproteinpartikel (Eaton, 2008). Möglicherweise reicht die Signaleinheit von SHH allein nicht aus, um die Nebennierenrindenzellen *in vitro* zu stimulieren, da mögliche Co-Faktoren nicht an der Signaleinheit binden können und essentielle Bindungsproteine oder Co-Rezeptoren fehlen. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass *Delta-like 1 homolog (Drosophila) protein* (Dlk1) über β -Integrin- und ERK1/2-assoziierte Wege die Gli1-Transkription aktiviert, was als weiterer Hinweis für die komplexen Regulationsmechanismen des Hh-Signalweges in der Nebennierenzelle zu werten ist (Guasti u. a., 2013b).

Zusammenfassend konnten wir mit unseren Studien zeigen, dass ein selektiver Antagonismus der Hh-Signalkaskade sowohl die Proliferation als auch die Steroidbiosynthese der untersuchten Nebennierenrindenzelllinien *in vitro* inhibiert. In der Diskussion dieses Abschnitts haben wir mögliche Erklärungsansätze dargelegt,

warum in unseren Studien keine statistisch signifikanten Ergebnisse durch die Stimulation mit Hh-Agonisten gemessen werden konnten.

4.4 Mögliche Interaktionen mit anderen Einflussfaktoren

Abschließend sollen in diesem Abschnitt über diese Arbeit hinausgehende mögliche Mechanismen, die für die Rolle des Hh-Signalwegs in der Nebennierenrinde relevant sein können, diskutiert werden.

Unsere Arbeitsgruppe hat weitreichende Daten zum Einfluss des *Wnt signaling pathway* (Wnt)-Signalwegs auf die Steroidbiosynthese publiziert (Schinner u. a., 2009). Der Hh-Signalweg-Rezeptor Smo gehört zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren und ist eng verwandt mit den *Frizzled* Rezeptoren des Wnt-Signalwegs (Ingham, McMahon, 2001). Darüber hinaus wurden in verschiedenen Organsystemen für die Pathogenese der Organe Überschneidungen von Wnt- und Hh-Signalweg gefunden, wobei die genauen Mechanismen weiterhin Gegenstand aktueller Studien sind (Kim u. a., 2010), (Ulloa u. a., 2007), (Iwakura u. a., 2013). So konnten Gomes *et al.* kürzlich zeigen, dass die Hemmung der Hh-Signalkaskade mit Cyclopamin in NCI-H295R-Zellen mit einer Inhibition der *catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (CTNNB1)-mRNA* Expression einhergeht (Gomes u.a., 2014). Insbesondere für die Nebennierenentwicklung werden Interaktionen zwischen diesen beiden Signalkaskaden vermutet. Aus nicht-steroidogenen Zellen unmittelbar subkapsulär in der fetalen Nebenniere sekretiertes Shh ist entscheidend für die reguläre Größenentwicklung der adrenalen Kapsel, der vermuteten Stammzellzone der Nebennierenrinde (Huang u. a., 2012). Die von Shh aktivierten Zellen der Kapsel migrieren in die Nebennierenrinde, wo sie ihre Sensibilität für Shh verlieren und zu steroidogenen Zellen differenzieren (Laufer u. a., 2012). Dlk1 und *Fibroblast growth factor* (FGF)-Rezeptoren scheinen an der Regulation dieser Mechanismen entscheidend beteiligt, aber auch eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs wird diskutiert (Guasti u. a., 2013a), (Yates u. a., 2013).

Ein anderer, für die Nebenniere potentiell relevanter Aspekt lässt sich aus den Studien zur Rolle von Shh in der Hypophyse ableiten. In der Hypophyse kommt es zu

einer GLI1-abhängigen CRH-R Typ1-Expression, einer erhöhten GLI1-Transkription nach CRH-Stimulation sowie zu einer Steigerung der ACTH-Produktion, wenn SHH additiv zu CRH hinzugegeben wird (Vila u. a., 2004). In Kenntnis der aus unserer Arbeitsgruppe beschriebenen intraadrenalen Expression der CRH-Rezeptoren und einer möglichen intraadrenalen CRH-ACTH-Achse ist eine Beteiligung der Hh-Signalkaskade an diesen Mechanismen denkbar (Seres u. a., 2004), (Willenberg u. a., 2005).

5. Schlussfolgerung

Mit unseren Studien zum Hh-Signalweg in der humanen Nebenniere konnten wir nachweisen, dass die Komponenten des Hh-Signalwegs in der menschlichen Nebenniere und in Nebennierenrindentumoren exprimiert werden und dass der Hh-Signalweg aktiv ist.

Wir fanden Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Tumorentitäten untereinander und im Vergleich zum Normalgewebe und konnten den inhibierenden Einfluss des cAMP/PKA-Signalwegs auf die Aktivität des Hh-Signalwegs in adrenocorticalen Zellkulturzellen belegen, sodass wir auch in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur erläuternde Hypothesen für die beobachteten Expressionsunterschiede formulieren konnten, die eine Rolle des Hh-Signalwegs in der Tumorgenese der NPA nahelegen und die in Zukunft in weiteren Studien überprüft werden sollten.

Des Weiteren konnten unsere *in vitro*-Studien einen inhibierenden Einfluss des Hh-Signalweg-Antagonisten Cyclopamin auf die Proliferation und die Steroidbiosynthese verschiedener adrenocorticaler Zellkulturmodelle nachweisen.

Zusammenfassend vermag diese Arbeit nicht endgültig die Rolle des Hh-Signalwegs in der Nebenniere aufzuklären; die anfangs formulierten Ziele wurden jedoch erfüllt. Unsere Studien ergeben Hinweise, dass die Hh-Signalkaskade nicht nur in der Embryonalzeit für die Nebenniere von Bedeutung ist, sondern sowohl in physiologische als auch pathophysiologische Prozesse des adulten Organs eingebunden ist und somit, gerade auch in Kenntnis der klinischen Anwendung von selektiven Hh-Signalweg-Antagonisten in anderen Tumorentitäten, eine Weiterführung spezifischer Studien lohnend erscheint.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aguilera, G; Catt, KJ (1983): „*Regulation of aldosterone secretion during altered sodium intake.*“. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 19 (1B), S. 525–530
- Ahn, S; Joyner, AL (2004): „*Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning.*“. In: *Cell*. 118 (4), S. 505–516
- Alinger, B; Kiesslich, T; Datz, C; Aberger, F; Strasser, F; Berr, F; Dietze, O; Kaserer, K; Hauser-Kronberger, C (2009): „*Hedgehog signaling is involved in differentiation of normal colonic tissue rather than in tumor proliferation.*“. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 454 (4), S. 369–379
- Balla, T; Baukal, AJ; Eng, S; Catt, KJ (1991): „*Angiotensin-II Receptor Subtypes and Biological Responses in the Adrenal-Cortex and Medulla.*“. In: *Molecular Pharmacology*. 40 (3), S. 401–406
- Bamforth, SD; Bragança, J; Eloranta, JJ; Murdoch, JN; Marques, FI; Kranc, KR; Farza, H; Henderson, DJ; Hurst, HC; Bhattacharya, S; (2001): „*Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator.*“. In: *Nature Genetics*. 29 (4), S. 469–474
- Benjannet, S; Rondeau, N; Day, R; Chrétien, M; Seidah, NG (1991): „*PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues.*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (9), S. 3564–3568
- Berman, DM; Karhadkar, SS; Maitra, A; Montes De Oca, R; Gerstenblith, MR; Briggs, K; Parker, AR; Shimada, Y; Eshleman, JR; Watkins, DN; Beachy, PA; (2003): „*Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours.*“. *Nature*. 425(6960), S. 846-851
- Boulikroun, S; Samson-Couterie, B; Golib-Dzib, JF; Amar, L; Plouin, PF; Sibony, M; Lefebvre, H; Louiset, E; Jeunemaitre, X; Meatchi, T; Benecke, A; Lalli, E; Zennaro, MC (2011): „*Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers.*“. In: *Endocrinology*. 152 (12), S. 4753–4763
- Carpenter, D; Stone, DM; Brush, J; Ryan, A; Armanini, M; Frantz, G; Rosenthal, A; de Sauvage, FJ (1998): „*Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family.*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (23), S. 13630–13634
- Charron, F; Stein, E; Jeong, J; McMahon, AP; Tessier-Lavigne, M (2003): „*The morphogen Sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with*

- Netrin-1 in midline axon guidance.*“. In: *Cell*. 113 (1), S. 11–23
- Chen, JK; Taipale, J; Cooper, MK; Beachy, PA. **(2002a)**: „*Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened.*“. In: *Genes & Development*. 16 (21), S. 2743–2748
- Chen, JK; Taipale, J; Young, KE; Maiti, T; Beachy, PA **(2002b)**: „*Small molecule modulation of Smoothened activity.*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (22), S. 14071–14076
- Chen, MH **(2004)**: „*Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates.*“. In: *Genes & Development*. 18 (6), S. 641–659
- Ching, S; Vilain, E **(2009)**: „*Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia.*“. In: *Genesis*. 47 (9), S. 628–637
- Chrousos, GP **(1995)**: „*The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.*“. In: *New England Journal of Medicine*. 332 (20), S. 1351–1362
- Chrousos, GP **(1998)**: „*Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response - The 1997 Hans Selye Memorial Lecture.*“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851, S. 311–335
- Clark, AM; Garland, KK; Russell, LD **(2000)**: „*Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules.*“. In: *Biology of Reproduction*. 63 (6), S. 1825–1838
- Conn, JW; Fajans, SS **(1952)**: „*The pituitary-adrenal system.*“. In: *Annual review of physiology*. 14 (1), S. 453–480
- Coulter, CL **(2004)**: „*Functional biology of the primate fetal adrenal gland: advances in technology provide new insight.*“. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 31 (8), S. 475–484
- Dallman, MF; Engeland, WC; McBride, MH **(1977)**: „*The neural regulation of compensatory adrenal growth.*“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 297, S. 373–392
- Davis, KT; Prentice, N; Gay, VL; Murray, SA **(2002)**: „*Gap junction proteins and cell-cell communication in the three functional zones of the adrenal gland*“. In: *The Journal of endocrinology*. 173 (1), S. 13–21
- Day, R; Schafer, MK; Watson, SJ; Chrétien, M; Seidah, NG **(1992)**: „*Distribution and*

- regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary.*“. In: *Molecular endocrinology*. 6 (3), S. 485–497
- Dorovini-Zis, K; Zis, AP (1991): „*Innervation of the zona fasciculata of the adult human adrenal cortex: a light and electron microscopic study.*“. In: *Journal of Neural Transmission General Section*. 84 (1-2), S. 75–84
- Douglas, JG; Brown, GP; White, C (1984): „*Angiotensin II receptors of human and primate adrenal fasciculata and glomerulosa: correlations of binding and steroidogenesis.*“. In: *Metabolism: clinical and experimental*. 33 (8), S. 685–688
- Dringenberg, T; Schwitalla, M; Haase, M; Scherbaum, WA; Willenberg, HS (2012): „*Control of CYP11B2/CYP11B1 expression ratio and consequences for the zonation of the adrenal cortex.*“. In: *Hormone and Metabolic Research*. 45 (02), S. 81–85
- Eaton, S (2008): „*Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway.*“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9 (6), S. 437-445
- Echelard, Y; Epstein, DJ; St-Jacques, B; Shen, L; Mohler, J; McMahon, JA; McMahon, AP (1993): „*Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.*“. In: *Cell*. 75 (7), S. 1417–1430
- Ehrhart-Bornstein, M; Breidert, M; Guadanucci, P; Wozniak, W; Bocian-Sobkowska, J; Malendowicz, LK; Bornstein, SR (1997): „*17 alpha-Hydroxylase and chromogranin A in 6th week human fetal adrenals.*“. In: *Hormone and Metabolic Research*. 29 (1), S. 30-32
- Ehrhart-Bornstein, M; Hinson, JP; Bornstein, SR; Scherbaum, WA; Vinson, GP (1998): „*Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis.*“. In: *Endocrine Reviews*. 19 (2), S. 101–143
- Else, T; Hammer, GD (2005): „*Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia.*“. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 16 (10), S. 458–468
- Epstein, DJ; Marti, E; Scott, MP; McMahon, AP (1996): „*Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway.*“. In: *Development*. 122 (9), S. 2885–2894
- Fan, Q; Gu, D; He, M; Liu, H; Sheng, T; Xie, G; Li, CX; Zhang, X; Wainwright, B; Garrossian, A; Garrossian, M; Gardner, D; Xie, J (2011): „*Tumor shrinkage by cyclopamine tartrate through inhibiting hedgehog signaling.*“. In: *Chinese journal of cancer*. 30 (7), S. 472–481
- Gallet, A; Ruel, L; Staccini-Lavenant, L; Thérond, PP (2006): „*Cholesterol modification*

is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in Drosophila epithelia.“ . In: *Development*. 133 (3), S. 407–418

García-García, MJ; Eggenschwiler, JT; Caspary, T; Alcorn, HL; Wyler, MR; Huangfu, D; Rakehan, AS; Lee, JD; Feinberg, EH; Timmer, JR; Anderson, KV (2005): „*Analysis of mouse embryonic patterning and morphogenesis by forward genetics.*“ . In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (17), S. 5913–5919

Giordano, TJ (2010): „*Classification of adrenal cortical tumors: promise of the „molecular“ approach.*“ . In: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 24 (6), S. 887–892

Gomes, DC; Leal, LF; Mermejo, LM; Scrideli, CA; Martinelli, CE Jr; Fragoso, MC; Latronico, AC; Tone, LG; Tucci, S; Yunes, JA; Cardinalli, IA; Mastellaro, MJ; Brandalise, SR; Ramalho, F; Moreira, AC; Ramalho, LN; de Castro, M; Antonini, SR (2014): „*Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors.*“ . In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 99 (7), S. 1209–1216

Gorlin, RJ (2004): „*Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome.*“ . In: *Genetics in Medicine*. 6 (6), S. 530–539

Gross, F (1958): „*Renin und Hypertensin, physiologische oder pathologische Wirkstoffe.*“ . In: *Klinische Wochenschrift*. 36 (15), S. 693–706

Guasti, L; Candy Sze, WC; McKay, T; Grose, R; King, PJ (2013a): „*FGF signalling through Fgfr2 isoform IIIb regulates adrenal cortex development.*“ . In: *Molecular and cellular endocrinology*. 371 (1-2), S. 182–188

Guasti, L; Cavlan, D; Cogger, K; Banu, Z; Shakur, A; Latif, S; King, PJ (2013b): „*Dlk1 up-regulates Gli1 expression in male rat adrenal capsule cells through the activation of $\beta 1$ integrin and ERK1/2.*“ . In: *Endocrinology*. 154 (12), S. 4675–4684

Haase, M; Willenberg, HS (2009): „*Adrenal cortical tumors and multiple endocrine neoplasia-related syndromes.*“ . In: *Minerva endocrinologica*. 34 (2), S. 123–135

Haase, M; Schott, M; Bornstein, SR; Malendowicz, LK; Scherbaum, WA; Willenberg, HS (2007): „*CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor.*“ . In: *The Journal of endocrinology*. 192 (2), S. 459–465

Hahn, H; Wicking, C; Zaphiropoulous, PG; Gailani, MR; Shanley, S; Chidambaram, A; Vorechovsky, I; Holmberg, E; Uden, AB; Gillies, S; Negus, K; Smyth, I; Pressman, C; Leffell, DJ; Gerrard, B; Goldstein, AM; Dean, M; Toftgard, R; Chenevix-Trench, G; Wainwright, B; Bale, AE (1996): „*Mutations of the human homolog of*

- Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome.*“. In: *Cell*. 85 (6), S. 841–851
- Haidan, A; Bornstein, SR; Glasow, A; Uhlmann, K; Lübke, C; Ehrhart-Bornstein, M (1998): „*Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells.*“. In: *Endocrinology*. 139 (2), S. 772–780
- Hammer, GD; Parker, KL; Schimmer, BP (2005): „*Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development.*“. In: *Endocrinology*. 146 (3), S. 1018–1024
- Hammerschmidt, M; Bitgood, MJ; McMahon, AP (1996): „*Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo.*“. In: *Genes & Development*. 10 (6), S. 647–658
- Hatano, O; Takakusu, A; Nomura, M; Morohashi, K (1996): „*Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1.*“. In: *Genes to Cells*. 1 (7), S. 663–671
- Hinson, JP (1990): „*Paracrine Control of Adrenocortical Function - a New Role for the Medulla?*“. In: *The Journal of endocrinology*. 124 (1), S. 7–9
- Hoeflich, A; Bielohuby, M (2009): „*Mechanisms of adrenal gland growth: signal integration by extracellular signal regulated kinases1/2.*“. In: *Journal of Molecular Endocrinology*. 42 (3), S. 191–203
- Holzwarth, MA; Cunningham, LA; Kleitman, N (1987): „*The Role of Adrenal Nerves in the Regulation of Adrenocortical Functions.*“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 512, S. 449–464
- Hornsby, PJ (1987): „*Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex*“. In: *Journal of Steroid Biochemistry*. 27 (4-6), S. 1161-1171
- Huang, CC; Liu, C; Yao, HH (2012): „*Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice.*“. In: *Molecular and cellular endocrinology*. 361 (1-2), S. 165–171
- Huang, CC; Miyagawa, Si; Matsumaru, D; Parker, KL; Yao, HH; (2010): „*Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog.*“. In: *Endocrinology*. 151 (3), S. 1119–1128
- Huangfu, D; Anderson, KV (2006): „*Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates.*“. In: *Development*. 133 (1), S. 3–14

- Ingham, PW; McMahon, AP (2001): „Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles.“. In: *Genes & Development*. 15 (23), S. 3059–3087
- Iwakura, T; Inui, A; Reddi, AH (2013): „Stimulation of Superficial Zone Protein Accumulation by Hedgehog and Wnt Signaling in Surface Zone Bovine Articular Chondrocytes.“. In: *Arthritis and Rheumatism*. 65 (2), S. 408–417
- Janes, ME; Chu, KM; Clark, AJ; King, PJ. (2008): „Mechanisms of adrenocorticotropin-induced activation of extracellularly regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in the human H295R adrenal cell line.“. In: *Endocrinology*. 149(4), S. 1898-1905
- Jia, J; Tong, C; Wang, B; Luo, L; Jiang, J (2004): „Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I.“. In: *Nature*. 432 (7020), S. 1045–1050
- Jimeno, A; Weiss, GJ; Miller, WH Jr; Gettinger, S; Eigl, BJ; Chang, AL; Dunbar, J; Devens, SM; Faia, K; Skliris, G; Kutok, J; Lewis, KD; Tibes, R; Sharfman, WH; Ross, RW; Rudin, CM (2013): „Phase I study of the Hedgehog pathway inhibitor IPI-926 in adult patients with solid tumors.“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19 (10), S. 2766–2774
- Kang, S; Graham, JM; Olney, AH; Biesecker, LG (1997): „GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome.“. In: *Nature Genetics*. 15 (3), S. 266–268
- Kawabe, K; Shikayama, T; Tsuboi, H; Oka, S; Oba, K; Yanase, T; Nawata, H; Morohashi, K (1999): „Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1.“. In: *Molecular endocrinology*. 13 (8), S. 1267–1284
- Kempná, P; Flück, CE (2008): „Adrenal gland development and defects.“. In: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 22 (1), S. 77–93
- Kim, AC; Hammer, GD (2007): „Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances.“. In: *Molecular and cellular endocrinology*. 265-266, S. 10–16
- Kim, JH; Shin, HS; Lee, SH; Lee, I; Lee, YS; Park, JC; Kim, YJ; Chung, JB; Lee, YC (2010): „Contrasting activity of Hedgehog and Wnt pathways according to gastric cancer cell differentiation: Relevance of crosstalk mechanisms.“. In: *Cancer Science*. 101 (2), S. 328–335
- King, PJ; Guasti, L; Laufer, E (2008): „Hedgehog signalling in endocrine development and disease.“. In: *Journal of Endocrinology*. 198 (3), S. 439–450
- King, P; Paul, A; Laufer, E (2009): „Shh signaling regulates adrenocortical

- development and identifies progenitors of steroidogenic lineages.*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (50), S. 21185–21190
- Kogerman, P; Grimm, T; Kogerman, L; Krause, D; Undén, AB; Sandstedt, B; Toftgård, R; Zaphiropoulos, PG. (1999): „*Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1.*“. In: *Nature cell biology*. 1 (5), S. 312–319
- Laufer, E; Kesper, D; Vortkamp, A; King, P (2012): „*Sonic hedgehog signaling during adrenal development.*“. In: *Molecular and cellular endocrinology*. 351 (1), S. 19–27
- Le, T; Schimmer, BP (2001): „*The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells.*“. In: *Endocrinology*. 142 (10), S. 4282-4287
- Luo, X; Kiss, A; Makara, G; Lolait, SJ; Aguilera, G (1994): „*Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat.*“. In: *Journal of neuroendocrinology*. 6 (6), S. 689–696
- Mann, RK; Beachy, PA (2004): „*Novel lipid modifications of secreted protein signals.*“. In: *Annual review of biochemistry*. 73, S. 891–923
- Martinelli, DC; Fan, CM (2007): „*Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling.*“. In: *Genes & Development*. 21 (10), S. 1231–1243
- Mazumdar, T; DeVecchio, J; Shi, T; Jones, J; Agyeman, A; Houghton, JA (2011): „*Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells.*“. In: *Cancer Research*. 71 (3), S. 1092–1102
- Mesiano, S; Jaffe, RB (1997): „*Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex.*“. In: *Endocrine Reviews*. 18 (3), S. 378–403
- Molenaar, WM; Lee, VM; Trojanowski, JQ (1990): „*Early fetal acquisition of the chromaffin and neuronal immunophenotype by human adrenal medullary cells. An immunohistological study using monoclonal antibodies to chromogranin A, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, and neuronal cytoskeletal proteins.*“. In: *Experimental neurology*. 108 (1), S. 1–9
- Mozet, C; Stoehr, M; Dimitrova, K; Dietz, A; Wichmann, G (2013): „*Hedgehog targeting by cyclopamine suppresses head and neck squamous cell carcinoma and enhances chemotherapeutic effects.*“. In: *Anticancer Research*. 33 (6), S. 2415–2424
- Nijijima, A; Winter, DL (1968): „*Baroreceptors in the adrenal gland.*“. In: *Science*. 159 (3813), S. 434–435

- Noveen, A; Jiang, TX; Chuong, CM (1996): „cAMP, an activator of protein kinase A, suppresses the expression of sonic hedgehog.“. In: *Biochemical and biophysical research communications*. 219 (1), S. 180–185
- Nüsslein-Volhard, C; Wieschaus, E (1980): „Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*.“. In: *Nature*. 287(5785), S.795-801
- Ohnishi, J; Ishido, M; Shibata, T; Inagami, T; Murakami, K; Miyazaki, H; (1992): „The rat angiotensin II AT1A receptor couples with three different signal transduction pathways.“. In: *Biochemical and biophysical research communications*. 186 (2), S. 1094–1101
- Peach, MJ (1977): „Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action.“. In: *Physiological reviews*. 57 (2), S. 313–370
- Poggi, L; Kolesar, JM (2013): „Vismodegib for the treatment of basal cell skin cancer.“. In: *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 70 (12), S. 1033–1038
- Reul, JM; de Kloet, ER (1985): „Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.“. In: *Endocrinology*. 117 (6), S. 2505–2511
- Robinson-White, A; Meoli, E; Stergiopoulos, S; Horvath, A; Boikos, S; Bossis, I; Stratakis, CA. (2006): „PRKAR1A Mutations and protein kinase A interactions with other signaling pathways in the adrenal cortex.“. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 91 (6), S. 2380–2388
- Rohatgi, R; Milenkovic, L; Scott, MP (2007): „Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium.“. In: *Science*. 317 (5836), S. 372–376
- Sala, GB; Hayashi, K; Catt, KJ; Dufau, ML. (1979): „Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis.“. In: *The Journal of biological chemistry*. 254 (10), S. 3861–3865
- Schinner, S; Bornstein, SR (2005): „Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland.“. In: *Endocrine Pathology*. 16 (2), S. 91–98
- Schinner, S; Willenberg, HS; Schott, M; Scherbaum, WA. (2009): „Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease.“. In: *European Journal of Endocrinology*. 160 (5), S. 731–737
- Selye, H (1950): „Stress and the General Adaptation Syndrome.“. In: *British Medical Journal*. 1 (4667), S. 1383–1392.

- Seres, J; Bornstein, SR; Seres, P; Willenberg, HS; Schulte, KM; Scherbaum, WA; Ehrhart-Bornstein, M (2004): „Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue.“. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 89 (2), S. 965–970
- Sewer, MB; Waterman, MR (2003): „ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex.“. In: *Microscopy Research and Technique*. 61 (3), S. 300–307
- Sheng, T; Chi, S; Zhang, X; Xie, J. (2006): „Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal.“. In: *The Journal of biological chemistry*. 281 (1), S. 9–12
- Sirianni, R; Mayhew, BA; Carr, BR; Parker, CR Jr; Rainey, WE (2005): „Corticotropin-releasing hormone (CRH) and urocortin act through type 1 CRH receptors to stimulate dehydroepiandrosterone sulfate production in human fetal adrenal cells.“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90 (9), S. 5393-5400
- Spencer, RL; Kim, PJ; Kalman, BA; Cole, MA (1998): „Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity.“. In: *Endocrinology*. 139 (6), S. 2718–2726
- Stocco, DM; Wang, X; Jo, Y; Manna, PR (2005): „Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought.“. In: *Molecular endocrinology* 19 (11), S. 2647–2659
- Taipale, J; Chen, JK; Cooper, MK; Wang, B; Mann, RK; Milenkovic, L; Scott, MP; Beachy, PA (2000): „Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine.“. In: *Nature*. 406 (6799), S. 1005–1009
- Treier, M; O'Connell, S; Gleiberman, A; Price, J; Szeto, DP; Burgess, R; Chuang, PT; McMahan, AP; Rosenfeld, MG (2001): „Hedgehog signaling is required for pituitary gland development.“. In: *Development*. 128 (3), S. 377–386
- Tsigos, C; Chrousos, GP (2002): „Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.“. In: *Journal of psychosomatic research*. 53 (4), S. 865–871
- Ulloa, F; Itasaki, N; Briscoe, J (2007): „Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling.“. In: *Current biology*. 17 (6), S. 545-550
- Vale, W; Spiess, J; Rivier, C; Rivier, J (1981): „Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin.“. In: *Science*. 213 (4514), S. 1394–1397

- Vila, G; Papazoglou, M; Stalla, J; Theodoropoulou, M; Stalla, GK; Holsboer, F; Paez-Pereda, M (2004): „*Sonic hedgehog regulates CRH signal transduction in the adult pituitary.*“. In: *The FASEB Journal*. 19 (2), S. 281–283
- Vila, G; Theodoropoulou, M; Stalla, J; Tonn, JC; Losa, M; Renner, U; Stalla, GK; Paez-Pereda, M (2005): „*Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation.*“. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 90 (12), S. 6687–6694
- Vinson, GP (2003): „*Adrenocortical zonation and ACTH.*“. In: *Microscopy Research and Technique*. 61 (3), S. 227–239
- Vokes, SA; Ji, H; McCuine, S; Tenzen, T; Giles, S; Zhong, S; Longabaugh, WJ; Davidson, EH; Wong, WH; McMahon, AP (2007): „*Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning.*“. In: *Development*. 134 (10), S. 1977–1989
- Wang, B; Fallon, JF; Beachy, PA (2000): „*Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb.*“. In: *Cell*. 100 (4), S. 423–434
- Watkins, DN; Berman, DM; Burkholder, SG; Wang, B; Beachy, PA; Baylin, SB (2003): „*Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer.*“. *Nature*. 422 (6929), S. 313-317
- Willenberg, HS; Bornstein, SR; Hiroi, N; Pärth, G; Goretzki, PE; Scherbaum, WA; Chrousos, GP (2000): „*Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function.*“. In: *Molecular Psychiatry*. 5 (2), S. 137–141
- Willenberg, HS; Haase, M; Papewalis, C; Schott, M; Scherbaum, WA; Bornstein, SR (2005): „*Corticotropin-releasing hormone receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells.*“. In: *Neuroendocrinology*. 82 (5-6), S. 274–281
- Winnay, JN; Hammer, GD (2006): „*Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation.*“. In: *Molecular endocrinology*. 20 (1), S. 147–166
- Wu, CH; Chen, YF; Wang, JY; Hsieh, MC; Yeh, CS; Lian, ST; Shin, SJ; Lin, SR (2002): „*Mutant K-ras oncogene regulates steroidogenesis of normal human adrenocortical cells by the RAF-MEK-MAPK pathway.*“. In: *British journal of cancer*. 87 (9), S. 1000–1005
- Yao, HH; Whoriskey, W; Capel, B (2002): „*Desert Hedgehog/Patched 1 signaling*

specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis.“. In: *Genes & Development*. 16 (11), S. 1433–1440

Yates, R; Katugampola, H; Cavlan, D; Cogger, K; Meimaridou, E; Hughes, C; Metherell, L; Guasti, L; King, P (2013): „*Adrenocortical development, maintenance, and disease.*“. In: *Current topics in developmental biology*. 106, S. 239-312

Yoon, S; Seger, R (2006): „*The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.*“. In: *Growth Factors*. 24 (1), S. 21–44

Zubair, M; Parker, KL; Morohashi, K (2008): „*Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing.*“. In: *Molecular and Cellular Biology*. 28 (23), S. 7030–7040

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. H.S. Willenberg, der mich bei dieser Arbeit betreut und mich so nicht nur in meiner wissenschaftlichen Ausbildung gefordert und gefördert, sondern darüber hinaus in besonderem Maße in meiner Entwicklung geprägt hat und zu einem Vorbild geworden ist. Er zeigte mir, wie spannend und faszinierend die Nebenniere ist. Seine Kreativität und Begeisterung waren Ansporn und Inspiration für die Umsetzung dieses gemeinsamen Projektes, aber auch für meinen weiteren beruflichen Werdegang in einem anderen Fachgebiet.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Schott bedanke ich mich für das Überlassen des Themas und die Unterstützung bei der Umsetzung. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen beteiligten Mitarbeitern des endokrinologischen Forschungslabors. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. S. Schinner, Dr. M. Haase, B. Mülders-Opgenoorth und A. Tries für ihre Hilfe, Anregungen und Kritik.

Ferner danke ich meiner Familie. Ich danke meinen Schwiegereltern, Ines und Ulrich Frommelt für ihre Hilfe. Insbesondere danke ich meinen lieben Eltern, Sylwia und Friedrich Werminghaus für ihre fortwährende Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich und in mein Handeln.

Ohne die Unterstützung meiner wunderbaren Ehefrau Maika Werminghaus hätte ich diese Arbeit nicht anfertigen können. Ich danke ihr daher für ihren Rückhalt und ihr Verständnis für die Zeit und Energie, die für diese Arbeit notwendig waren.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Gutachtern.

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.

(Pascal Werminghaus)