

**Charakterisierung neuer
Regulationsmechanismen in der Nebenniere
durch Somatostatin und Ghrelin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität-Duisburg-Essen

vorgelegt von

Bianca Ueberberg

aus Gelsenkirchen

Oktober 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Klinik für Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. med. S. Petersenn

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. D. Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGEN.....	6
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	Die Nebenniere und ihre Tumoren.....	9
2.2	Somatostatin und seine Rezeptoren.....	11
2.2.1	Das Hormon Somatostatin.....	11
2.2.2	Die Familie der Somatostatin-Rezeptoren.....	12
2.3	Ghrelin und sein Rezeptor.....	14
2.3.1	Das Hormon Ghrelin.....	14
2.3.2	Der Ghrelin-Rezeptor.....	16
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1	Material.....	20
3.1.1	Antibiotika.....	20
3.1.2	Antikörper.....	20
3.1.3	Chemikalien.....	20
3.1.4	Enzyme.....	21
3.1.5	Hormone/Peptide.....	22
3.1.6	Kits.....	22
3.1.7	Medien, Puffer, Lösungen.....	23
3.1.8	Nukleinsäuren.....	24
3.1.8.1	<i>Größenstandards</i>	24
3.1.8.2	<i>Plasmide</i>	24
3.1.8.3	<i>Primer und Sonden</i>	25
3.1.8.4	<i>RNA</i>	26
3.1.9	Bakterienstämme.....	26
3.1.10	Zelllinien.....	27
3.1.11	Geräte.....	28
3.1.12	Computer Software.....	29
3.1.13	Sonstige Materialien.....	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Gewebe / Gewebeschnitte.....	30
3.2.2	RNA-Methoden.....	31
3.2.2.1	<i>Isolierung von RNA aus humanen Nebennierentumoren und nicht-tumorösem Nebennierengewebe</i>	31
3.2.2.2	<i>Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen aus der Kultur</i>	31
3.2.2.3	<i>Enzymatischer DNA-Verdau</i>	31
3.2.2.4	<i>Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)</i>	32
3.2.2.5	<i>RealTime RT-PCR</i>	32
3.2.3	Bakterienkultur.....	33
3.2.4	DNA-Methoden.....	34
3.2.4.1	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	34
3.2.4.2	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten</i>	34
3.2.4.3	<i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten</i>	34
3.2.4.4	<i>Transformation</i>	34
3.2.4.5	<i>Enzymatische Reaktionen</i>	35
3.2.4.6	<i>DNA-Sequenzierung</i>	35
3.2.4.7	<i>Markierung von DNA-Sonden und Detektion der markierten DNA-Fragmente</i>	35

3.2.4.8	<i>Southern-Blot Analyse und Hybridisierung DIG-markierter Sonden</i>	35
3.2.5	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	36
3.2.5.1	<i>Kultur eukaryontischer Zellen</i>	36
3.2.5.2	<i>Herstellung einer Primärkultur</i>	36
3.2.5.3	<i>Versuchsaufbau zur Testung eines Hormoneinflusses auf Primärkulturzellen</i>	37
3.2.5.4	<i>Färbung der Zellen für die Durchflußzytometrie und Durchführung der FACS-Analyse</i> 37	
3.2.5.5	<i>Bestimmung der Hormonkonzentration im Zellkulturmedium</i>	38
3.2.5.6	<i>Promotoranalyse – Transiente Transfektionen mit anschließendem Reporter-Gen- Assay</i> 38	
3.2.6	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten.....	39
3.2.7	Statistische Auswertung.....	40

4 ERGEBNISSE.....42

4.1 Expression, Regulation und vermittelte Effekte von Somatostatin und den Somatostatin-Rezeptorsubtypen.....42

4.1.1	Expression der Somatostatin-Rezeptorsubtypen <i>sst1-5</i> in der gesunden Nebenniere und verschiedenen Nebennierenadenomen.....	42
4.1.2	Effekte von Somatostatin und seinen Analoga in Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien.....	48
4.1.2.1	<i>Quantitative Analyse der Somatostatin-Rezeptor-Expression in Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierenadenome</i>	49
4.1.2.2	<i>Hormonelle Kontrolle der Rezeptorexpression in Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien</i>	53
4.1.2.3	<i>Effekte auf die Hormonsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien</i>	57
4.1.2.3.1	Basale Hormonsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierentumoren.....	57
4.1.2.3.2	Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion primärer Nebennierenzellen.....	58
4.1.2.3.3	Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Gewebe Aldosteron-produzierender Adenome.....	58
4.1.2.3.4	Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Gewebe Cortisol-produzierender Adenome.....	59
4.1.2.3.5	Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Phäochromozytomgewebe.....	60
4.1.2.4	<i>Effekte von Somatostatin und der Analoga Octreotid und SOM230 auf den Zellzyklus von Primärkulturzellen aus gesundem Nebennierengewebe und Gewebe von Nebennierenadenomen unterschiedlicher Ätiologien</i>	60
4.1.2.4.1	Vergleichende Zellzyklusanalyse von Primärkulturzellen aus Geweben gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierentumoren.....	61
4.1.2.4.2	Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Nebennierenprimärkulturzellen.....	62
4.1.2.4.3	Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Primärkulturzellen aus Aldosteron-produzierenden Adenomgewebe.....	63
4.1.2.4.4	Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Cortisol-produzierenden Adenoms.....	64
4.1.3	Analyse der transkriptionellen Promotoraktivität der Somatostatin-Rezeptorsubtypgene (<i>sst1-5</i>) in Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen.....	65
4.1.3.1	<i>Lokalisation transkriptionell-aktiver Promotorelemente in NCI-H295-Zellen</i>	66
4.1.3.2	<i>Lokalisation transkriptionell-aktiver Promotorelemente in Y1-Zellen</i>	69

4.2 Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a.....79

4.2.1	Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a in der Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren im Vergleich zu anderen humanen Geweben.....	79
4.2.1.2	<i>Ghrelin mRNA Expression in verschiedenen Nebennierentumoren</i>	81
4.2.1.3	<i>GHS-R1a mRNA Expression in verschiedenen humanen Geweben</i>	82
4.2.1.4	<i>GHS-R1a mRNA Expression in Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien</i>	83
4.2.2	Immunhistochemische Analyse der Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a in humanen Geweben, einschließlich der Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien.....	84

4.2.2.1	<i>Expression des Ghrelin-Proteins</i>	84
5	DISKUSSION	91
5.1	Expression der Somatostatin-Rezeptorsubtypen sst1-5 in der Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren	91
5.2	Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf die Somatostatin-Rezeptor-Expression in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien.....	93
5.3	Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf die Hormonsekretion in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien.....	96
5.4	Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf den Zellzyklus in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien	99
5.5	Charakterisierung transkriptionell-aktiver Gensequenzen der fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen in Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen.....	101
5.6	Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a in der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	107
7	REFERENZEN	109
8	LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	118
9	LEBENS LAUF	121
10	ERKLÄRUNGEN	122

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropin
A. dest	destilliertes Wasser
ANG	Angiotensin II
APA	Aldosteron-produzierendes Adenom
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
β-2-MG	beta-2-Mikroglobulin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cp	Kopien/μg RNA
CPA	Cortisol-produzierendes Adenom
cpw	Kopien/250000 Zellen
CT	Computertomographie
Ct	„threshold cycle“
Dex	Dexamethason
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	copy-DNA
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	engl.: fluorescence-activated cell sorter
FGF	engl.: Fibroblast Growth Factor

FKS	fötales Kälberserum
FL2-A	Peak-Fläche (Durchflußzytometrie)
FL2-W	Peak-Weite (Durchflußzytometrie)
g	Gramm
× g	Fallbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GH	engl.: Growth Hormone
GHS	engl.: Growth Hormone secretagogues
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HS	engl.: Horse serum, Pferdeserum
Hybrid-Temp.	Hybridisierungstemperatur
I	Iod
IGF	engl.: Insulin Growth Factor
K	Kalium
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni Nährmedium
l	Liter
M	Molar
mM	10 ⁻³ Molar
max.	maximal
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Na	Natrium

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nM	10 ⁻⁹ Molar
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Oct	Octreotid (Somatostatin-Analog)
OD	optische Dichte
PBS	engl.: Phosphate buffered saline, Phosphate-gepufferte Salinelösung
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PHEO	Phäochromozytom
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minutes“)
RT	Raumtemperatur (~ 22 – 25 °C)
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion
sec	Sekunde
SOM	SOM230 (Somatostatin-Analog)
SRIF	Somatostatin
SSC	„Standard saline citrate“
sst	Somatostatin-Rezeptorsubtyp
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TRH	engl.: Thyroid Releasing Hormone
Tris	Tris(hydroxymethylaminomethan)
U	engl.: unit, enzymatische Einheit
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen

2 Einleitung

2.1 Die Nebenniere und ihre Tumoren

Die Nebenniere gehört als Syntheseort des Glukokortikoids Cortisol, welches für die Bewältigung von Stresssituationen wichtige metabolische Wirkung hat, zu den wichtigsten endokrinen Organen des menschlichen Körpers.

Die Nebenniere ist ein paarig angelegtes retroperitoneal auf bzw. medial des oberen Nierenpols liegendes Organ. Sie ist von einer fibrösen Kapsel umgeben und aus Zonen unterschiedlicher Herkunft (Nebennierenrinde - mesodermal; Nebennierenmark - ektodermal) und Funktion aufgebaut. Während der embryonalen Entwicklung entsteht als erstes die sogenannte fetale Zone aus Mesothelzellen. Hier werden zunächst die Nebennierenandrogene Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfat DHEAS synthetisiert. Dieser Anteil bildet sich postnatal innerhalb der ersten 4 Lebensmonate zurück. Aus der adulten Zone der fetalen Nebennierenrinde, die aus Mesenchymzellen entsteht, entwickelt sich die Zona fasciculata. Außen, an der Bowmannschen Kapsel, haften die Zellen der Zona glomerulosa an. Die Zona reticulata bildet sich frühestens im 3. Lebensjahr. Das Nebennierenmark wird aus von extern einwandernden Zellen des Neuralrohres gebildet. Seine Zellen sind modifizierte Ganglienzellen und bleiben in engem Kontakt mit den Fasern des sympathischen Nervensystems.

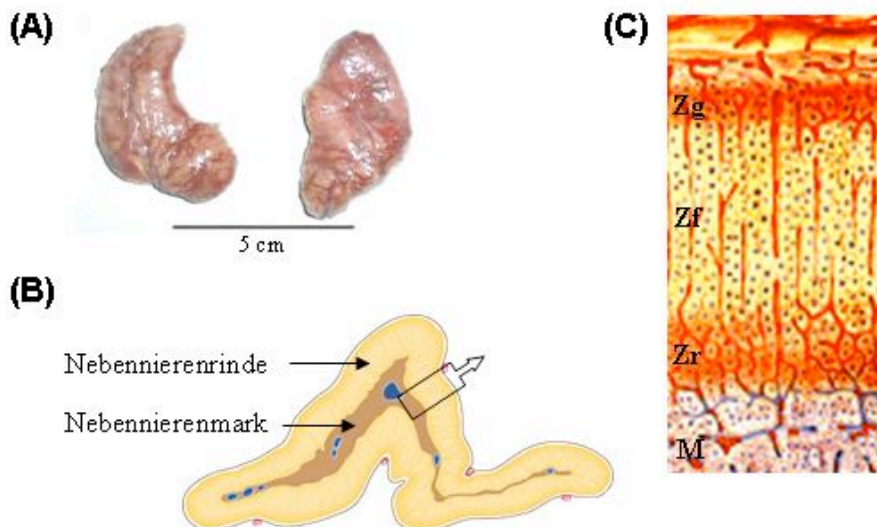


Abb. 1: Die Nebenniere. A: Übersicht; B: Querschnitt; C: Querschnitt der Nebennierenschichtung im Detail (ZG: Zona glomerulosa; Zf: Zona fasciculata; Zr: Zona reticularis; M: Mark).

Die Nebennierenrinde ist Syntheseort verschiedener Steroidhormone. In der äußeren Zone, der Zona glomerulosa, erfolgt vor allem die Produktion von Aldosteron. Es wird durch das nur in dieser Schicht vorkommende Enzym Aldosteronsynthase synthetisiert. Aldosteron beeinflusst durch den Effekt auf den transepithelialen Ionentransport in der Niere die Elektrolyte Natrium, Kalium und den Säure-Basen-Haushalt. Es ist damit der Hauptfaktor in der physiologischen Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens. In der Zona fasciculata, welche den größten Teil der Nebennierenrinde ausmacht, wird das Glukokortikoid Cortisol im glatten Endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien der Zellen gebildet. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Eiweiß und Fett, und wird in erhöhtem Maße bei Stress ausgeschüttet. In der innersten Rindenschicht, der Zona reticularis, erfolgt die Produktion von Androgenen, insbesondere die von Dehydroepiandrosteron (DHEA). Die Regulation der Hormonproduktion in der Nebennierenrinde wird grundsätzlich durch 2 Mechanismen reguliert. Adrenocorticotropin (ACTH) reguliert die Synthese der Hormone in der inneren Zone, also in der Zona fasciculata und der Zona reticularis. Die Hormonproduktion in der äußeren Zone der Nebennierenrinde, der Zona glomerulosa, wird durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), Na^+ -/ K^+ -Plasmaspiegel und ACTH reguliert. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks produzieren Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin). Diese werden in Granula gespeichert, wodurch eine rasche Freisetzung ermöglicht wird. Das Nebennierenmark wird durch präganglionäre Fasern des sympathischen Nervensystems innerviert. Die Regulation der Katecholaminsekretion erfolgt vorwiegend über Aktivierung des sympathischen Nervensystems im Rahmen von Stressreaktionen, wie körperliche Aktivität, Hypoglykämie, Orthostase. Die Sekretion wird dabei durch den Neurotransmitter Acetylcholin stimuliert.

Durch die zunehmende Verbreitung hochauflösender bildgebender Verfahren wie der Sonographie, Computertomographie (CT) oder der Magnetresonanztomographie (MRT) werden vermehrt Raumforderungen der Nebenniere diagnostiziert. Unterschieden werden Tumoren der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarks. Des Weiteren kann zwischen hormonaktiven und hormoninaktiven Tumoren klassifiziert werden. In die Gruppe der hormonaktiven Nebennierenrindenadenome gehören die Cortisol-produzierenden und die Aldosteron-produzierenden Adenome, welche in der Zona glomerulosa bzw. in der Zona fasciculata ihren Ursprung haben. Phäochromozytome

sind Katecholamin-produzierende Tumoren und entstammen den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Obwohl die Mehrzahl der Nebennierentumoren benigne ist, gibt es keine zuverlässigen klinischen oder biochemischen Marker, um sie von malignen Neoplasmen der Nebenniere zu unterscheiden (1, 2). Nach Lokalisation einer Raumforderung der Nebenniere sind daher aufwendige biochemische und radiologische Verlaufsuntersuchungen über viele Jahre notwendig. Im Folgenden werden zwei Hormone und ihre Rezeptoren vorgestellt, deren Bedeutung für die Regulation der Nebenniere und mögliche pathophysiologische Zusammenhänge zur Entstehung von Nebennierentumoren im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

2.2 *Somatostatin und seine Rezeptoren*

2.2.1 Das Hormon Somatostatin

Somatostatin (SRIF) wurde erstmals 1973 im Hypothalamus als Tetradecapeptid, welches die Freisetzung des Wachstumshormons (Growth Hormon, GH) inhibiert, entdeckt (3).

Das SRIF kodierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 3. Durch enzymatische Prozesse wird das Vorläufermolekül Preprosomatostatin in das Prosomatostatin umgewandelt (4). Aus diesem 92 Aminosäuren großen Protein werden wiederum die beiden bioaktiven Formen des Somatostatins, das SRIF-14 und das SRIF-28, gewebespezifisch prozessiert. Beide Formen bezeichnen in ihrem Namen die Anzahl der Aminosäuren, aus denen sie aufgebaut sind.

In zahlreichen Studien zeigte sich, dass SRIF ein im menschlichen Körper weit verbreitetes Hormon ist. Es wird in endokrinen Organen wie der Hypophyse, Schilddrüse, Nebenniere und dem Pankreas, im Gastrointestinaltrakt, in der Niere und der Plazenta produziert (5). Viele Tumorzellen ebenso wie inflammatorische Zellen und Immunzellen synthetisieren ebenfalls SRIF (6).

Die unterschiedlichen Wirkungen von SRIF lassen sich mit dem inhibitorischen Effekt auf zwei zelluläre Schlüsselprozesse, der Sekretion und der Zellproliferation, zusammenfassen. So agiert SRIF im Gehirn als Neurotransmitter und inhibiert u. a. die Freisetzung von GH, Dopamin, Norepinephrin. Im gastrointestinalen Trakt wird die Sekretion von annähernd jedem dort vorkommenden Hormon gehemmt. SRIF hemmt u. a. die Zellproliferation von Lymphozyten und inflammatorischen Zellen (7, 8).

Die Sekretion von SRIF kann durch eine Vielzahl von Substanzen wie Ionen, Nährstoffe, Neuropeptide, Neurotransmitter, klassische Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine beeinflusst werden (5, 9, 10). Einige dieser Agenzien wirken auf verschiedene SRIF-produzierende Zellen, während andere gewebespezifisch wirken. Eine Membrandepolarisierung führt beispielsweise zur Sekretion von SRIF aus Neuronen und aus SRIF-produzierenden Zellen der Peripherie. Nährstoffe hingegen üben einen gewebespezifischen Effekt auf die Freisetzung aus den δ -Inselzellen aus (5). Hormone wie GH und solche aus der Schilddrüse erhöhen die SRIF-Sekretion des Hypothalamus, während Glukokortikoide einen Dosis-abhängigen Effekt ausüben, der bei geringen Konzentrationen stimulierend und bei hohen Konzentrationen inhibierend ist.

Klinische Anwendung finden synthetische SRIF-Analoga, welche sich von den natürlichen Formen durch eine längere Halbwertszeit unterscheiden. Eingesetzt werden diese Substanzen u. a. bei der Lokalisierung und Behandlung von gastrointestinalen, neuroendokrinen Tumoren und bei der Therapie von Gigantismus und Akromegalie (5, 11).

2.2.2 Die Familie der Somatostatin-Rezeptoren

Die unterschiedlichen Effekte von SRIF werden durch Bindung des Hormons an spezifische Membranrezeptoren vermittelt. Diese bilden eine eigene Gruppe in der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren nächster Verwandte der Opioidrezeptor ist. Es konnten 5 humane Somatostatin-Rezeptorsubtypen (*sst1-sst5*) (12-20) identifiziert werden, deren kodierende Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die Rezeptorproteine haben eine Größe von 356 bis 391 Aminosäuren und weisen die größte Sequenzhomologie in den für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typischen 7 transmembranen α -Helices auf (55 - 70% Übereinstimmung). Deutliche Unterschiede in der Sequenz finden sich in den Amino- und Carboxy-terminalen Abschnitten (4, 21). Charakteristisches Merkmal für die Familie der *ssts* ist der stark konservierte Sequenzabschnitt YANSCANPI/VLY in der siebten transmembranen Helix (22). Alle 5 Subtypen verfügen über bis zu 4 Aspartat-abhängige Glykosilierungsstellen im N-terminalen Bereich und über bis zu 8 Konsensussequenzen zur Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C in der cytoplasmatischen C-terminalen Region sowie im 2. und 3. intrazellulären Abschnitt. Mit Ausnahme von *sst3*

weisen alle *ssts* in der C-terminalen Region ein Sequenzmotiv (Leucin-Cystein-Leucin) auf, an dem durch Palmitoylierung eine Verankerung an die Membran erfolgen kann.

	<i>sst1</i>	<i>sst2</i>	<i>sst3</i>	<i>sst4</i>	<i>sst5</i>
Chromosomale Lokalisation	14q13	17q24	22q13.1	20p11.3	16p13.3
Aminosäuren	391	369	418	388	363
Molekulargewicht (kDa)	53-72	71-95	65-85	45	52-66
mRNA (kb)	4.8	8.5 (?)	5.0	4.0	4.0
Homologie %					
<i>sst1</i>	100	43.8	40.6	54.8	43.3
<i>sst2</i>		100	44.1	41.1	48.5
<i>sst3</i>			100	38.6	52.1
<i>sst4</i>				100	46.3
<i>sst5</i>					100

Tab. 1: Charakteristika der humanen Somatostatinrezeptoren (5)

Die Bindung von SRIF-14 erfolgt mit nahezu gleicher Affinität an allen 5 Subtypen, während SRIF-28 zwar auch an alle 5 *ssts* bindet, allerdings eine höhere Affinität zu *sst5* besitzt. Im Hinblick auf den klinischen Einsatz wurden SRIF-Analoga wie Octreotid (23) und Lanreotid (24) entwickelt, die im Gegensatz zum natürlichen SRIF vor einer raschen Degradierung geschützt sind. Begründet auf das Bindungsverhalten dieser beiden Analoga kann man die 5 Subtypen in 2 Untergruppen trennen, die eine bestehend aus *sst2*, *sst3*, und *sst5* mit hohen Affinitäten zu den genannten Analoga, und eine zweite aus *sst1* und *sst4* mit nur sehr geringer Affinität. Zurzeit in der klinischen Prüfung ist das Analog SOM230, welches an 4 der 5 *ssts* (*sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst5*) mit hoher Affinität bindet und einen inhibierenden Langzeiteffekt auf die Freisetzung von GH und IGF-1 hat (25).

Die *ssts* induzieren eine zelluläre Antwort nach Bindung des Liganden durch G-Protein-vermittelte Modulation verschiedener Signalketten. Die wichtigsten intrazellulären Signalmoleküle sind dabei cAMP, Calcium und Proteinphosphatasen. Alle 5 Subtypen sind funktionell an die Hemmung der Adenylzyklase mittels Pertussitoxin-sensitiver G-Proteine gekoppelt, wodurch eine Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels hervorgerufen wird (26). Der antiproliferative Effekt von SRIF wird vermutlich durch eine Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalkette vermittelt. Bei allen 5 Rezeptoren konnte die Modulation der MAPK-Aktivität nachgewiesen werden. *Sst2* (27), *sst3* (28) und *sst5* (29) zeigten einen inhibierenden Effekt auf die MAPK-Aktivität, während *sst1* und *sst4* aktivierend wirkten (30, 31). Durch

Aktivierung von *sst1*, *sst2*, *sst4*, und *sst5* konnte eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase beobachtet werden (32). *Sst3* hat als einziger die Wirkung eines Zytotoxins und ist so beteiligt an der Induktion der Apoptose (33).

	<i>sst1</i>	<i>sst2</i>	<i>sst3</i>	<i>sst4</i>	<i>sst5</i>
Adenylatzyklaseaktivität	↑	↑	↑	↑	↑
Tyrosinphosphataseaktivität	↓	↓	↓	↓	↓
MAP-Kinaseaktivität		↓	↓↑	↑	↓
Kaliumkanäle		↑	↑	↑	↑
Kalziumkanäle	↓	↓			
Natrium-Protonen-Austauscher	↑				
Phospholipase C-IP₃-Aktivität		↑			↑↓
Phospholipase A2-Aktivität				↑	

Tab. 2: Kopplung der *ssts* an intrazelluläre Signaltransduktionswege (5)

Die Expression der *ssts* konnte in zahlreichen human Geweben wie Hypophyse (34), Magen (34), Inselzellen des Pankreas (35) und der Niere (36) demonstriert werden. Auch in der Nebenniere war die Expression von Somatostatin-Rezeptorsubtypen nachweisbar (37-39), wobei die Expression von *sst2* und *sst4* dominierte (37). In anderen Studien konnte die auf mRNA-Ebene gezeigte *sst*-Expression mittels Autoradiographie bestätigt und eine gleichmäßig verteilte Bindung von [¹²⁵I]Tyr⁰-D-Trp⁸-SRIF gezeigt werden, welche im Nebennierenmark verglichen mit der Nebennierenrinde intensiver war.

2.3 Ghrelin und sein Rezeptor

2.3.1 Das Hormon Ghrelin

Ghrelin besteht aus 28 Aminosäuren und wurde erstmals 1999 im Magen entdeckt (40). Unter Einfluss einer noch unbekanntes Akytransferase wird eine Hydroxylgruppe des Serin an der Position 3 des Ghrelin-Moleküls oktanoyliert. Diese posttranslationale Modifikation von Ghrelin ist essentiell für die Bindung und Aktivierung des bisher

bekanntem Rezeptor. Ghrelin kommt in verschiedenen natürlichen Varianten im Organismus vor. Diese basieren auf der Akylierung der Serin-3 Position und beinhalten die nicht-akylierte, oktanoylierte (C8:0), dekanoylierte (C10:0) und eine mögliche dezenoylierte (C11:1) Form des Ghrelins. Obwohl die Hauptaktivität vom oktanoylierten Ghrelin ausgeht, ist die Mehrzahl des im Blut zirkulierenden Ghrelins nicht akyliert (~ 80-90%).

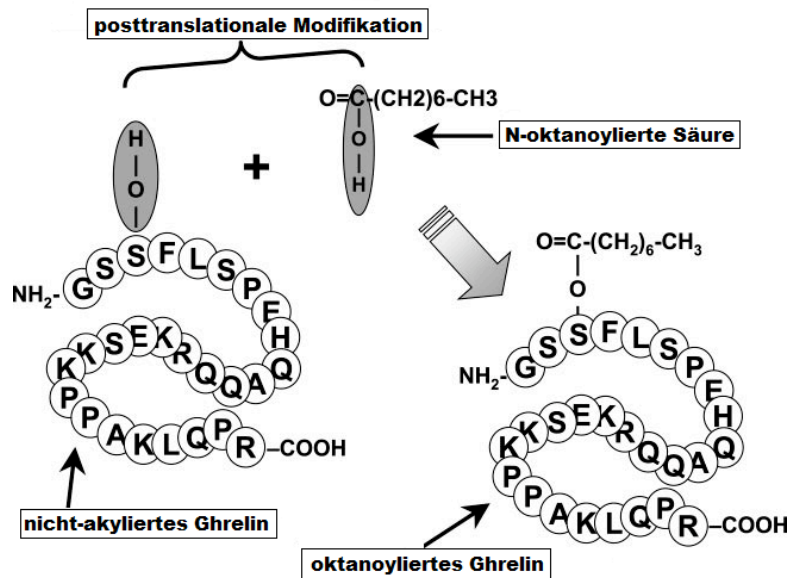


Abb. 2: Posttranslationale Modifikation des Ghrelin-Moleküls (41)

In Einklang mit der fehlenden Bindung dieser inaktiven Form des Ghrelins findet sich keine Regulation der endokrinen Achsen. Nicht-akyliertes Ghrelin zeigt dennoch kardiovaskuläre und antiproliferative Effekte, welche vermutlich durch noch unbekannte Rezeptorsubtypen vermittelt werden (40, 42, 43). Ein anderer endogener Ligand des Ghrelin-Rezeptors ist das Des-Gln14-Ghrelin. Dieses Peptid resultiert aus alternativem Splicing des Ghrelin-Gens und unterscheidet sich vom Ghrelin nur durch das Fehlen eines Glutamins. Es unterliegt dem gleichen Akylierungsprozess und scheint die gleichen hormonellen Effekte zu besitzen wie Ghrelin selbst.

Ghrelin ist ein endogenes Analog synthetisch hergestellter Peptide, welche die Ausschüttung von GH stimulieren. Diese Gruppe von Peptiden wurde als „Growth Hormone secretagogues“ (GHS) bezeichnet (44). Synthetische GHS sind u. a. das Hexapeptid GHRP 6 und das MK-0677, für die aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung auf die GH-Freisetzung ein Einsatz bei der Therapie von Wachstumshormonmangel

diskutiert wird (45). Neben der GH-freisetzenden Wirkung erhöht Ghrelin auch signifikant die Sekretion von Prolactin, ACTH, Cortisol und Aldosteron (46-48). Dennoch scheint die größte physiologische Bedeutung von Ghrelin im Energiehaushalt zu liegen. Es ist an der Regulation von Appetit, dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel, der Herzfunktion, der Gonaden-Achse, exokriner Funktionen und der Zellproliferation beteiligt (49-55). Die vielseitige Wirkung von Ghrelin weist auf eine weite Verbreitung im menschlichen Körper hin. So konnte in zahlreichen Studien die Expression dieses Peptids in endokrinen Organen (56-58), reproduktiven Organen (54, 59, 60), dem gastrointestinalen Trakt (43, 56), in der Lunge (61), Niere (62), Plazenta (63), dem Gehirn (64) und in Lymphozyten (65) nachgewiesen werden. Die größten Ghrelin-mRNA Mengen wurden allerdings in Magen, Hypophyse und Hypothalamus beschrieben (56, 66). Die Produktion von Ghrelin wurde nicht nur in Normalgeweben sondern auch in neoplastischen Geweben des Magens, Darms und der Schilddrüse (67-69) beobachtet.

2.3.2 Der Ghrelin-Rezeptor

Ghrelin bindet als spezifischer endogener Ligand an den G-Protein-gekoppelten GHS-Rezeptor (GHS-R). Das den Rezeptor kodierende Gen ist auf Chromosom 3q26.2 lokalisiert. Durch alternatives Prozessieren der pre-mRNA entstehen 2 Typen von GHS-R cDNAs, welche als Typ 1a und Typ 1b bezeichnet werden (45, 66, 70). Ihre Sequenzen weisen keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Rezeptoren auf. Die größten Übereinstimmungen bestehen mit dem TRH-Rezeptor (56%) und dem Neurotensin-Rezeptor (59%) (71). Die cDNA Typ 1a kodiert den GHS-R1a, bestehend aus 366 Aminosäuren, 7 transmembranen Regionen und einer Molekülmasse von 41 kDa. GHS-R1b wird von der cDNA Typ 1b kodiert und ist 289 Aminosäuren groß mit 5 transmembranen Regionen (66), wobei die ersten 265 Aminosäuren identisch zum Subtyp 1a sind.

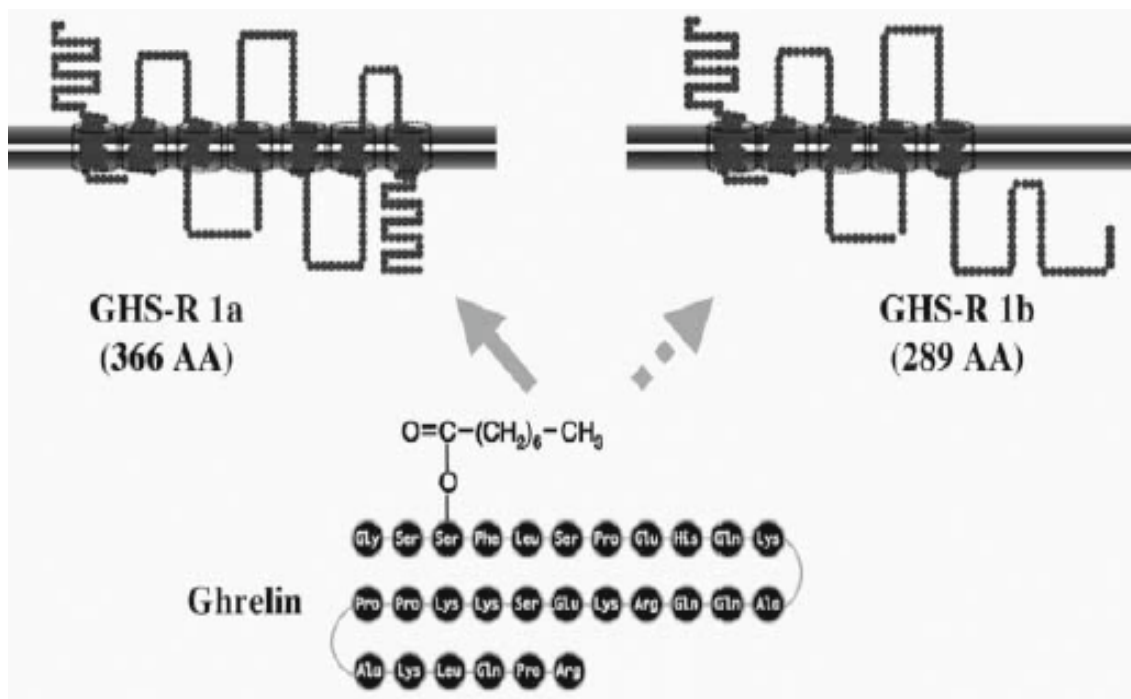


Abb. 3: Struktur des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GHS-R Typ 1a und 1b, und seines endogenen Liganden Ghrelin (71)

Es wird vermutet, dass nur die ersten 4 Aminosäuren (Gly-Ser-Ser(n-octanoyl)-Phe) des Ghrelins für die Rezeptoraktivierung verantwortlich sind (72, 73). Die Bindung von Ghrelin und synthetischen GHS an GHS-R1a führt zur Aktivierung der Phospholipase C Signalkette. Dabei wird vermehrt Inositoltriphosphat gebildet und die Proteinkinase C aktiviert. Es kommt zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Nach Tyrosinphosphorylierung durch die aktivierte Phospholipase werden Kaliumkanäle inhibiert. Der auf die Membranpolarisation folgende Eintritt von Ca^{2+} führt u. a. zur Stimulation der GH-Sekretion (45, 74). GHS-R1b bindet keine bekannten GHS und reagiert auch nicht auf diese (66). Seine funktionelle Rolle muss noch geklärt werden. Die stärkste Expression von GHS-R1a wurde in der Hypophyse, dem Hypothalamus und Hippocampus beobachtet (75). Aber auch in Geweben wie der humanen Nebenniere konnte die GHS-R1a mRNA nachgewiesen werden (56, 68, 76). Die Funktion ist hier allerdings noch nicht geklärt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Charakterisierung neuer Regulationsmechanismen in der Nebenniere durch Somatostatin und Ghrelin.

Die Nebenniere gehört durch die Produktion des wichtigen Glukokortikoids Cortisol (Stresshormon), aber auch durch die Synthese des Mineralokortikoids Aldosteron und der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, zu den wichtigsten endokrinen Organen des menschlichen Körpers.

In einigen Arbeiten wurde die Expression der Somatostatin-Rezeptoren sowie von Ghrelin und seinem Rezeptor in der Nebenniere bereits beschrieben. Zur Expression in Nebennierentumoren, sowie zu physiologischen Effekten von Somatostatin und Ghrelin liegen jedoch nur wenige bzw. keine Daten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Somatostatin und Ghrelin für die Regulation in der Nebenniere untersucht und mögliche pathophysiologische Zusammenhänge zur Entstehung von Nebennierentumoren geklärt werden.

Die Expression der fünf Somatostatin-Rezeptoren sollte zunächst in der normalen Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren mittels RT-PCR und anschließender Verifizierung durch die Southern Blot-Analyse untersucht werden. In anschließenden Experimenten mit Primärkulturen aus normalem Nebennierengewebe sowie aus Gewebe verschiedener Nebennierenadenome sollte der physiologische Effekt von Somatostatin und den Somatostatin-Analoga, Octreotid und SOM230, charakterisiert werden. Die Wirkung auf die Hormonsekretion der Primärkulturzellen, die Proliferation dieser Zellen und mögliche quantitativen Veränderungen der Somatostatin-Rezeptor-Expression sollten dazu analysiert werden. Dabei sollten Verfahren wie Radioimmuno-Assay, FACS-Analyse sowie die RealTime RT-PCR zum Einsatz kommen. Des Weiteren sollte in Transfektionsexperimenten die transkriptionelle Kontrolle der kodierenden *sst*-Gene in verschiedenen Nebennierenzelllinien geprüft werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte die Expression von Ghrelin und dem Ghrelin-Rezeptor in der normalen Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren im Vergleich zu unterschiedlichen humanen Normalgeweben untersucht werden. Eine Quantifizierung der Expression von Ghrelin und dem Ghrelin-Rezeptor sollte auf RNA-

Ebene mittels RealTime RT-PCR erfolgen. Auf Proteinebene sollten die gezeigten Ergebnisse anschließend in der Immunhistochemie verifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Antibiotika

Amphotericin B	MP Biomedicals
Ampicillin	ICN Biomedicals
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Gentamicin Sulfat	MP Biomedicals
Kanamycin	Roth
Penicillin/Streptomycin	MP Biomedicals

3.1.2 Antikörper

GHS-R (F16)	Santa Cruz
Kaninchen Anti-Ghrelin (human) Serum	Phoenix
Pharmaceuticals	

3.1.3 Chemikalien

Agar	Applichem
Agarose	ICN Biomedicals
Aquatex	Merck
Albumin Bovine Fraction	Roth
Betain (5M)	Sigma-Aldrich
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
5-BROMO-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid	ICN Biomedicals
Bromphenolblau	Roth
Borsäure	Roth
ChemMate Antibody Diluent	DakoCytomation
ChemMate Hematoxylin	DakoCytomation
ChemMate Target Retrieval Solution, pH 6,0 (hitzeinduzierte Epitopdemaskierung)	DakoCytomation

CLONfectin	BD Biosciences
Desoxynucleotide Mix (100 mM, 25 mM each dNTP)	Stratagene
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%)	Riedel-de-Haen
Ethanol, absolute	Riedel-de-Haen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FuGENE6 Transfection Reagent	Roche Applied
Science	
Glycerol	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranose (IPTG)	ICN Biomedicals
Isopropanol	Merck
LB Broth Base	Invitrogen
L-Glutamin	Biochrom
Maleinsäure	Merck
Mineralöl	Applied Biosystems
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Percoll	Amersham
Biosciences	
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	SERVA
Electrophoresis	
Roti-Histokitt II	Roth
Sodium Dodecyl Sulfate	ICN Biomedicals
Transferrin	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Xylencyanol	Roth
Xylol Isomerengemisch	Riedel-de-Haen

3.1.4 Enzyme

Kollagenase II	Sigma-Aldrich
DNase I, RNasefrei	Sigma-Aldrich,

	Roche	Applied
Science		
Restriktionsendonukleasen (10U/μl)	Invitrogen	
RNase A	Sigma-Aldrich	
3.1.5 <u>Hormone/Peptide</u>		
Angiotensin II, Acetat, human	Sigma-Aldrich	
Dexamethason	Sigma-Aldrich	
Ghrelin, human	Phoenix	
Pharmaceuticals		
GHS-R (F-16) Blocking Peptide	Santa Cruz	
Fibroblast Growth Factor Basic, human, recombinant	Sigma-Aldrich	
Insulin Sodium Salz, human	Sigma-Aldrich	
Sandostatin	Novartis Pharma	
Somatostatin, synthetisch	Sigma-Aldrich	
SOM230-AC	Novartis Pharma	
Synacthen	Novartis Pharma	
3.1.6 <u>Kits</u>		
Alkaline Phosphatase/RED ChemMate Detection Kit	DakoCytomation	
ControlKit GAPDH	Applied Biosystems	
DIG DNA Labeling Kit	Roche Sciences	
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Sciences	
DNase Set, RNase-frei	QIAGEN	
GeneAmp RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems	
Luciferase Reporter Gene Assay	Roche Sciences	
LSAB+ System-AP Detection Kit	DakoCytomation	
Plasma-Normetanephrin RIA	DLD Diagnostika	
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	
Plasmid Maxiprep Kit	QIAGEN	
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	

RNeasy Micro Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System	Invitrogen
TA Cloning Kit	Invitrogen
TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit	Applied Biosystems

3.1.7 Medien, Puffer, Lösungen

DIG Easy Hyb	Roche Sciences
D-MEM Medium (+ 4500 mg/ml Glukose, + L-Glutamin, + Pyruvat)	GIBCO
Fötiales Kälberserum (FKS)	GIBCO
F12-K Medium	GIBCO
Gelladepuffer	50% Glycerol, 1mM EDTA, pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
Isoton II	Beckman Coulter
M-199 Medium	GIBCO
PBS Puffer 1x	GIBCO
PBS/EDTA	5 mM EDTA in 1x
PBS	
Pferdeserum (HS)	GIBCO
RNAlater RNA Stabilization Solution	Ambion
RPMI 1640 Medium (+ L-Glutamin)	GIBCO
SSC Puffer (20 x)	Invitrogen
TBS	DakoCytomation
TBE-Puffer	890 mM Tris, 890 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH8,0
Trypsin-EDTA Lösung	MP Biomedicals

3.1.8 Nukleinsäuren

3.1.8.1 *Größenstandards*

100 bp DNA-Leiter	GIBCO
1 kb DNA-Leiter	GIBCO

3.1.8.2 *Plasmide*

pCR2.1 Vektor	Invitrogen
pGL2-Basic Vektor	Promega
pGL2-Control Vektor	Promega
pGL3-Basic Vektor	Promega
pGL3-Control Vektor	Promega

Reportergenkonstrukte:

Die 5'-Enden der Promotorfragmente von

- *sst1* waren -2834 bis -342 lokalisiert, während die identischen 3'-Enden bei -110 lagen (relativ zum ATG-Startcodon)
- *sst2* waren -1100 bis -163 lokalisiert, während die identischen 3'-Enden bei -30 lagen (relativ zum ATG-Startcodon)
- *sst3* waren -2536 bis -182 lokalisiert, während die identischen 3'-Enden bei -29 lagen (relativ zum ATG-Startcodon)
- *sst4* waren -984 bis -209 lokalisiert, während die identischen 3'-Enden bei -25 lagen (relativ zum ATG-Startcodon)
- *sst5* waren -1741 bis -101 lokalisiert, während die identischen 3'-Enden bei -33 lagen (relativ zum ATG-Startcodon).

Die Bezeichnung der Reportergenkonstrukte enthält des variable 5'-Ende des Promotorfragments, Abkürzung des Rezeptors und des Reportergens.

Reprotergenkonstrukt	Promotorfragment insertiert in	Reprotergenkonstrukt	Promotorfragment insertiert in
-342hsst1/luc	pGL2-Basic	-1033hsst3/luc	pGL3-Basic
-467hsst1/luc	pGL2-Basic	-1444hsst3/luc	pGL3-Basic
-656hsst1/luc	pGL2-Basic	-1896hsst3/luc	pGL3-Basic
-1151hsst1/luc	pGL2-Basic	-2536hsst3/luc	pGL3-Basic
-1495hsst1/luc	pGL2-Basic	-209hsst4/luc	pGL2-Basic
-1813hsst1/luc	pGL2-Basic	-266hsst4/luc	pGL2-Basic
-2834hsst1/luc	pGL2-Basic	-363hsst4/luc	pGL2-Basic
-163hsst2/luc	pGL2-Basic	-459hsst4/luc	pGL2-Basic
-252hsst2/luc	pGL2-Basic	-984hsst4/luc	pGL2-Basic
-325hsst2/luc	pGL2-Basic	-101hsst5/luc	pGL3-Basic
-465hsst2/luc	pGL2-Basic	-317hsst5/luc	pGL3-Basic
-707hsst2/luc	pGL2-Basic	-991hsst5/luc	pGL3-Basic
-905hsst2/luc	pGL2-Basic	-1256hsst5/luc	pGL3-Basic
-993hsst2/luc	pGL2-Basic	-1740hsst5/luc	pGL3-Basic
-1100hsst2/luc	pGL2-Basic		
-182hsst3/luc	pGL3-Basic		
-334hsst3/luc	pGL3-Basic		
-559hsst3/luc	pGL3-Basic		
-756hsst3/luc	pGL3-Basic		

3.1.8.3 Primer und Sonden

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer und Sonden wurden von MWG Biotech bezogen.

Primer	5'.....3'	Position	Hybrid.- Temp.	Produktlänge	Genbank-Nr.
<i>sst1</i>	CCTGGGCGTGTGGGTGCTATC	534	65°C	824 bp	BC035618
	CGCGCCTTCTTGGGTTCCTC	1337			
<i>sst2</i>	TCGGCCAAGTGGAGGAGAC	448	58°C	723 bp	AF184174
	TAGGGAGCCCATTGCCAGTAGACA	1147			
<i>sst3</i>	GTCAACGTGGTGTGCCCACTG	835	61°C	231 bp	M96738
	CTCAGTCTTCTCCGGGGGCC	1027			
<i>sst4</i>	TGGTCGGCAGTCTTCGTGGTCTAC	619	64°C	516 bp	D16826
	CTTGCGGCCGGGTTCTGGT	1116			
<i>sst5</i>	GCGCCGCCCGGTGTGG	450	65°C	694 bp	AY081193
	ACCTCCGACTCCTGGGGGTGACAC	1123			
<i>β-2-MG</i>	ACCCCACTGAAAAAGATGA	331	55°C	113 bp	M17987
	ATCTTCAAACCTCCATGATG	444			
TaqMan-					
<i>sst1</i>	TTACGCCACCGCGCTC	1333	61°C	70 bp	BC035618
	GCCGGACTCCAGGTTCTCA	1384			
<i>sst2</i>	CGTTTCTTCGTCTCCATGG	828	61°C	73 bp	AF184174
	GAGGACCACCACAAAGTCAAACA	900			
<i>sst3</i>	CAACCCATCCTTTATGGCTT	924	61°C	71 bp	M96738
	AGGGCCGCAGCAGGAC	994			

<i>sst4</i>	CGCTCGGAGAAGAAAATCACC	754	61°C	71 bp	D16826
	AAAGGCATCCAGCAGAGCAC	824			
<i>sst5</i>	ACAACCTCCGCCAGAGCTTC	926	61°C	76 bp	AY081193
	TCCGTGGCGTCAGCGT	1001			
<i>Ghrelin</i>	AGCAGGCTGGCTCCGC	192	61°C	68 bp	AB029434
	ACCGGACTTCCAGTTCATCCT	259			
<i>GHSR1a</i>	CTGTCGTGGGTGCCTCG	740	61°C	67 bp	U60173
	ACCACTACAGCCAGCATTTTCA	806			
Sonde-					
<i>sst1</i>	CCGTGCCTACAGTGTGGAAGACTTCCAA	1354	61°C		BC035618
<i>sst2</i>	CATCAGCCCCACCCAGCCCC	849	61°C		AF184174
<i>sst3</i>	CGCTTCAAGCAGGGCTTCCGC	955	61°C		M96738
<i>sst4</i>	TGGTGCTGATGGTCGTGTCGTCTT	779	61°C		D16826
<i>sst5</i>	TGTGCCTCCGCAAGGGCTCTG	956	61°C		AY081193
<i>Ghrelin</i>	CGGAAGATGGAGGTCAAGCAGAAGGG	209	61°C		AB029434
<i>GHSR1a</i>	TCAGGGACCAGAACCACAAGCAAACC	758	61°C		U60173

3.1.8.4 RNA

Magen Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Nebennieren Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Gehirn Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Leber Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Hypophysen Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Brustdrüsen Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Ovar Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Pankreas Gesamt-RNA, human	BD Biosciences
Human Total RNA Master Panel II	BD Biosciences

3.1.9 Bakterienstämme

E. coli DH5 α

Genotyp: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ* ⁻

Verwendung: Wirtstamm für Plasmide bei Klonierungsexperimenten

Bezugsquelle: Invitrogen

E. coli TOP10

Genotyp: F' *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1 deoR*
araD139 $\Delta(ara-leu)7697$ *galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

Verwendung: Wirtstamm für Plasmide bei Klonierungsexperimenten

Bezugsquelle: Invitrogen

3.1.10 Zelllinien

COS-7

Organismus/Gewebe: Affe / Niere

Kulturmedium: D-MEM Medium, 10% FKS, 0,5% Penicillin-
Streptomycin, 1% L-Glutamin

Bezugsquelle: AG Gellersen, IHF, Hamburg

Verwendung: Transfektionsexperimente zur Promotoranalyse

GH4

Organismus/Gewebe: Ratte / Hypophyse (Tumor)

Kulturmedium: D-MEM Medium, 10% FKS, 0,5% Penicillin-
Streptomycin, 1% L-Glutamin

Bezugsquelle: AG Melmed, Cedars-Sinai Research Institute, LA,
USA

Verwendung: Transfektionsexperimente zur Promotoranalyse

NCI-H295

Organismus/Gewebe: Mensch / Nebennierenrinde (Karzinom)

Kulturmedium: RPMI 1640 Medium, 2% FKS, 0,005 mg/ml
Insulin, 0,01 mg/ml Transferrin, 10 mM HEPES,
30 nM Natriumselenit, 10 nM Hydrocortison, 10
nM beta-Estradiol, 0,5% Penicillin-Streptomycin

Bezugsquelle: AG Auernhammer, Universitätsklinik München,
München

Verwendung: Transfektionsexperimente zur Promotoranalyse

PC-12

Organismus/Gewebe: Ratte / Nebennierenmark
(Phäochromozytom)

Kulturmedium: F12-K Medium, 2,5% FKS, 15% HS, 0,5%
Penicillin-Streptomycin

Bezugsquelle: ATCC

Verwendung: Transfektionsexperimente zur Promotoranalyse

Y1

Organismus / Gewebe: Maus / Nebennierenrinde

Kulturmedium: F12-K Medium, 2,5% FKS, 15% HS, 0,5%
Penicillin-Streptomycin

Bezugsquelle: AG Auernhammer, Universitätsklinik München,
München

Verwendung: Transfektionsexperimente zur Promotoranalyse

3.1.11 Geräte

Bio Flow BSB 3A	GELAIRE Flow Laboratories
Brutschrank KB 53	Binder
Cell Counter Z2 Coulter	Beckman Coulter
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Gelkammer	MWG Biotech
Hybridisierungsöfen Mini10	HYBAID
Mikroskop Olympus CK40	Olympus
MultiCrystal Counter LB2104	Berthold
Netzgerät Power Pac 3000	Bio-Rad
Omni Gene PCR Cycler	HYBAID
Photometer GeneQuantII	Pharmacia Biotech
7300 Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems
Rotamax120	Heidolph
Orbital Shaker	Labotect
Sirius Luminometer	Berthold Decetion Systems
Thermomixer 5436	Eppendorf
Transilluminator TI3	Biometra
UV-Gel-Kamera	Stratagene
Vortex REAX 2000	Heidolph
Schüttelwasserbad	Köttermann
IR1500 Automatic CO ₂ Incubator	GELAIRE Flow Laboratories
Zentrifugen:	
- Beckman J2-HC	Beckman Coulter
- Varifuge K	Heraeus
- Centrifuge 5417R	Eppendorf

3.1.12 Computer Software

- (1) Lasergene DNASTAR v6.0 DNASTAR Inc.,Madison, WI
Sequenzanalyse, Primerdesign
- (2) Primer Express Software v2.0, Applied Biosystems
Primer/Sonden Design für die RealTime RT-PCR
- (3) Sequence Detection Software, Applied Biosystems
Software des 7300 RealTime PCR Systems (Applied Biosystems) zur
Datenaufnahme und -analyse
- (4) CellQuest Pro Software, Becton Dickenson
Software des FACSCalibur (Becton Dickenson) zur Datenaufnahme und -analyse
- (5) ModFit LT, Verity software House, Inc.
Analyse von Daten der Durchflußzytometrie
- (6) Graph Pad Prism Version 4.03
Statistische Datenauswertung

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Bilder wurden elektronisch in das Dokument eingebunden.

Die Digitalisierung der Originalgele und Southern Blot Membranen erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage. Im Verlauf der Datenerfassung und Verarbeitung kam es zu keinen inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen.

3.1.13 Sonstige Materialien

Accuvetten	Beckman Coulter
BioMax XAR Film	KODAK
Einmalskalpelle	FEATHER
3MM-Filterpapier	Whatman
QIAshredder	QIAGEN
Nylonmembranen, positiv geladen	Roche Applied Science
Petrischalen	Greiner
Polystyren Reagenzgläser	Becton Dickenson
Reaktionsgefäße/Zentrifugenröhrchen	Greiner
Serologische Pipetten	Greiner
Cell Dissociation Sieves- Tissue Grinder Kit	Sigma-Aldrich

Zellkulturflaschen	Greiner, Sarstedt
Zellkulturplatten:	
– 6-Schalen-Platte	Corning
– 24-Schalen-Platte	Corning
Zellschaber	Sarstedt

3.2 *Methoden*

3.2.1 Gewebe / Gewebeschnitte

Patienten, deren Tumorgewebe im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, gaben eine von der Ethikkommission genehmigte Einverständniserklärung ab.

Die Nebennierenadenome wurden mittels retroperitoneoskopischer Adrenalektomie entfernt und das Tumorgewebe makroskopisch vom umgebenden Gewebe durch den Operateur getrennt. Für eine spätere RNA-Isolation folgte das Schockgefrieren des Gewebes in Flüssigstickstoff oder das Überführen in RNAlater RNA Stabilization Solution (Ambion). Die Proben lagerten dann bei -80°C. Gewebe, welches zur Herstellung einer Primärkultur verwendet werden sollte, verblieb bis zur Bearbeitung in eiskaltem PBS-Puffer mit Gentamicin (52 µg/ml) und Amphotericin B (0,5 µg/ml).

Die funktionale Klassifikation der Nebennierentumoren erfolgte aufgrund klinischer Daten und Hormonbefunde. Phäochromozytome (PHEO) waren dabei charakterisiert durch erhöhte Katecholamin- bzw. Metanephrinspiegel im Urin. Bezeichnende Merkmale für Cortisol-produzierende Adenome (CPA) waren erhöhte Cortisolspiegel im 24h-Urin und eine fehlende Cortisol-suppression im Dexamethason-Hemmtest. Die Einstufung in die Klasse der Aldosteron-produzierenden Adenome (APA) erfolgte bei einem erhöhten Aldosteron-Renin-Quotienten. Nebennierenadenome wurden mittels Magnetresonanztomographie lokalisiert.

Das in dieser Arbeit für die Herstellung von Primärkulturen verwendete normale Nebennierengewebe wurde bei diagnostiziertem Morbus Cushing mit bilateraler Hyperplasie operativ entfernt. Die verwendeten normalen Nebennierengewebe, welche nicht für Primärkulturen eingesetzt wurden, stammten aus verschiedenen Autopsien.

3.2.2 RNA-Methoden

3.2.2.1 *Isolierung von RNA aus humanen Nebennierentumoren und nicht-tumorösem Nebennierengewebe*

Die Isolation von RNA aus Geweben erfolgte mittels des RNeasy Mini Kits von QIAGEN. Dreißig mg Gewebe wurden zunächst in einem Mörser auf Eis zerkleinert, in 600 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) aufgenommen und auf eine QIAshredder Säule gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit (14000 rpm) wurde die QIAshredder Säule verworfen und das Gewebelysate zentrifugiert für weitere 3 min bei 14000 rpm. Die folgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und die RNA schließlich in 30 µl RNase-freies A. dest eluiert. Durch photometrische Messung konnte die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA bei einer OD von 260 nm bestimmt werden. Zur Überprüfung der Intaktheit der RNA wurde 1 µg RNA mit A. dest auf ein Endvolumen von 18 µl gebracht, 15 min bei 65°C denaturiert und zusammen mit 2 µl RNA-Ladepuffer auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Probe sollten 2 distinkte Banden (28S-RNA und 18S-RNA) erkennbar sein. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

3.2.2.2 *Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen aus der Kultur*

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Primärkulturzellen wurde das RNeasy Micro Kit (QIAGEN) verwendet. Dazu wurden die Zellen nach Trypsin/EDTA Behandlung aus den Schalen abgenommen, pelletiert und die Zellpellets dann in 350 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) unter 1-minütigem Vortexen lysiert. Nach Mischen des Lysats mit 1 Vol. EtOH (70%) kam es auf eine RNeasy MinElute Spin Säule. Die folgenden Schritte der Isolation erfolgten nach Herstellervorgaben. In diesem Protokoll wurde der enzymatische Verdau von DNA bereits während der Isolation auf der Säule durchgeführt.

3.2.2.3 *Enzymatischer DNA-Verdau*

RNA-Proben wurden einem enzymatischen Verdau von DNA unter Verwendung von RNase-freier DNase I (Roche Applied Science) oder schon während der Isolation

mittels dem DNase Set, RNase-frei (QIAGEN) nach Angaben der Hersteller unterzogen.

3.2.2.4 *Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)*

Gesamt-RNA (500 ng) wurde mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Zur reversen Transkription wurden Oligo d(T)₁₆-Primer verwendet. Dabei kam das Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers mit den folgenden Modifikationen zum Einsatz: zur Amplifikation der *sst3*- und *sst4*-Fragmente wurden 5% DMSO eingesetzt, 0,3 µM jedes Ghrelin-Primers und 0,9 µM jedes GHS-R1a-Primers bei der entsprechenden Genamplifikation, während die Amplifikation des beta-2-Mikroglobulin Gens (β-2-MG) mit 0,4 µM jedes Primers und 0,125 mM jedes dNTPs erfolgte. Das PCR-Programm beinhaltete 1 min bei 95°C, gefolgt von 1 min bei der spezifischen Primerhybridisierungstemperatur (siehe 3.1.8.3) und abschließend 1 min bei 72°C für 40 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert.

3.2.2.5 *RealTime RT-PCR*

Die bei der RealTime RT-PCR eingesetzten Primer und Sonden wurden mit der Primer Express Software (Applied Biosystems) basierend auf in der Genbank veröffentlichten Sequenzen so gewählt, dass sie Intron-Exon überspannend lagen (siehe 3.1.8.3). Die Sonden der Testgene trugen an ihrem 5'-Ende den fluoreszierenden Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA). Die Amplifikation der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente der Qualitätskontrolle der zu untersuchenden RNA-Proben. Proben, bei denen die Amplifikation von GAPDH nicht oder nur schlecht möglich war, wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen. Das zur GAPDH-Amplifikation eingesetzte Kontrollkit (Applied Biosystems) enthielt eine an ihrem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff VIC tragende Sonde, wodurch die Amplifikation von Test- und Kontrollgen in einem Reaktionsansatz durchführbar war.

Bei der Untersuchung von Ghrelin und seinem Rezeptor in Nebennierentumoren und verschiedenen Normalgeweben kam das TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems) nach Herstellervorgaben zum Einsatz. In Abänderung wurden 500 ng der isolierten RNA bzw. 100 ng der kommerziellen RNA aus dem Total RNA Master Panel II (BD Biosciences), und 100 nM der Ghrelin- bzw. GHS-R1a-Sonden verwandt. Zur Optimierung der Effizienz der Amplifikation wurden verschiedene Primerkonzentrationen getestet, wobei die Effizienz unter Verwendung von 0,3 μ M jedes Ghrelin- und 0,9 μ M jedes GHS-R1a-Primers am höchsten war. Alle klinischen Proben wurden in Triplikaten getestet. Als Kontaminationskontrolle enthielt jeder Durchgang einen Ansatz ohne RNA.

Zur Untersuchung der Expression von *ssts* in verschiedenen Primärkulturzellen kam das SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers zum Einsatz. Bei den hierbei durchgeführten RealTime RT-PCRs wurden pro Reaktion 2 μ l der aus den Primärkulturzellen isolierten RNA eingesetzt. Die RealTime RT-PCRs wurden am 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Mengen der Testgen-mRNA wurden mittels der amplifizierten GAPDH mRNA Mengen normalisiert. Verdünnungsreihen mit Plasmiden, welche das zu amplifizierende RT-PCR-Produkt enthielten, dienten der Definition der Kopienzahl pro μ g Gesamt-RNA bzw. pro Gesamt-RNA aus 250000 Zellen. Die Standardkurven wurden durch logarithmisches Auftragen der berechneten Plasmidkopienzahl gegen den Ct-Wert (Threshold Cycle) erstellt. Mit Hilfe der erstellten Standardkurven und der oberen Grenze der PCR-Zyklen ließen sich die Detektionslimits berechnen. Gewebe mit RNA-Mengen unterhalb des Detektionslimits wurden als negativ für die Expression des jeweils untersuchten Gens definiert. Die durchgeführten RealTime RT-PCRs zeigten eine Interprobenvarianz von 16,1% und eine Intraprobenvarianz von 12,9%.

3.2.3 Bakterienkultur

Plasmide wurden in geeigneten *E. coli*-Stämmen vermehrt. Die dazu eingesetzten *E. coli* DH5 α und *E. coli* TOP10 Zellen wuchsen auf LB (Luria-Bertani)-Agarplatten, welche 100 μ g/ml des Antibiotikums enthielten, gegen welches das jeweilige transformierte Plasmid eine Resistenz vermittelte.

3.2.4 DNA-Methoden

3.2.4.1 *Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien*

Die plasmidtragenden Bakterien wurden vor der Isolation in LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte anschließend je nach Größe der Schüttelkultur mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (2 ml Schüttelkultur) und dem „Plasmid Maxiprep Kit“ (100 ml Schüttelkultur) nach Angaben des Herstellers (QIAGEN).

3.2.4.2 *Isolierung von DNA-Fragmenten*

DNA-Fragmente, die bei der Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) aus den Agarosegelen (Agarose in TBE-Puffer) extrahiert. Dabei wurde zunächst die entsprechende Bande unter UV-Licht lokalisiert und mittels eines Skalpell aus geschnitten. Die sich anschließenden Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

3.2.4.3 *Aufreinigung von DNA-Fragmenten*

PCR-Produkte, welche für Klonierungen weiterverwendet wurden oder der Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden dienen, wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) aufgereinigt. Bei diesem Verfahren konnten die PCR-Produkte von den verwendeten Primern, Nukleotiden, Polymerase und Salzen getrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.4.4 *Transformation*

Die Transformation unter Verwendung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5 α und *E. coli* TOP10 Zellen erfolgte nach Vorgaben des jeweiligen Herstellers, wobei für die Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen das TA Cloning Kit (Invitrogen) eingesetzt wurde.

3.2.4.5 *Enzymatische Reaktionen*

Restriktionen, Verdau von DNA sowie Ligationen erfolgten nach Angaben der Hersteller der verwendeten Enzyme. Nach Restriktion wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet.

3.2.4.6 *DNA-Sequenzierung*

Zur Überprüfung von PCR-Produkten oder Plasmidpräparationen wurde die DNA in einer Sequenzierungsreaktion von einem Sequenzierservice analysiert. Die Auswertung der Sequenz erfolgte anschließend mit der Lasergene Computer Software DNASTAR.

3.2.4.7 *Markierung von DNA-Sonden und Detektion der markierten DNA-Fragmente*

DNA-Fragmente wurden mittels des „DIG DNA Labeling Kits“ (Roche Applied Science) nicht-radioaktiv mit Digoxigenin [DIG-11-dUTP] markiert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Als Ausgangsmaterial dienten säulenaufgereinigte bzw. aus einem Agarosegel extrahierte DNA-Fragmente (siehe 3.2.4.2 bzw. 3.2.4.3).

3.2.4.8 *Southern-Blot Analyse und Hybridisierung DIG-markierter Sonden*

Für die Southern-Blot Analyse werden DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wird anschließend auf einen Filter transferiert, fixiert und hybridisiert. Zur Denaturierung der im Gel aufgetrennten PCR-Produkte wurde das Agarosegel 30 min in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH inkubiert und anschließend bei 2 x 15 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl (pH 7,0)/1 mM EDTA (pH 8,0) neutralisiert. Das Transferieren der DNA auf eine positivgeladene Nylonmembran erfolgte durch Kapillartransfer. Die kovalente Bindung und damit die Fixierung der DNA an die Membran wurde durch Inkubation für 5 min auf einem UV-Transilluminator induziert. Prähybridisierung und Hybridisierung der DIG-markierten Sonden erfolgte in DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung (Roche Applied Science) nach dem Protokoll des Herstellers. Die optimale Hybridisierungstemperatur betrug 54°C bei einer Inkubationszeit von mindestens 6 h. Die DIG-markierten Sonden konnten mit

Hilfe eines Antikörpers, der gegen das Digoxigenin gerichtet und mit dem Enzym Alkalische-Phosphatase konjugiert war, detektiert werden. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. Dazu wurde das „DIG Luminescent Detection Kit“ (Roche Applied Science) eingesetzt. Alle hierzu notwendigen Rahmenbedingungen und erforderlichen experimentellen Arbeiten wurden gemäß den Angaben des Herstellers eingestellt und durchgeführt. Die Signale der DIG-markierten DNA-Fragmente wurden nach Einschweißen der Membran in Plastikfolie mit einem Röntgenfilm (BIOMax XAR Film, KODAK) detektiert.

3.2.5 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

3.2.5.1 *Kultur eukaryontischer Zellen*

Die verwendeten Zelllinien wurden in dem für die jeweilige Zelllinie optimalen Kulturmedium in einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid (CO₂) bei 37°C herangezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellkulturen wurden passagiert, bevor sie die vollständige Konfluenz erreicht hatten. Zur Passage wurde bei GH4- und COS-7-Zellen PBS/EDTA-Puffer und bei NCI-H295-, PC-12-, und Y1-Zellen Trypsin/EDTA-Lösung verwendet.

3.2.5.2 *Herstellung einer Primärkultur*

Das Nebennierengewebe wurde in einem 50ml-Falcon mit 45 ml eiskaltem PBS, welches Gentamicin (52 µg/ml) und Amphotericin B (0,5 µg/ml) enthielt, gewaschen und anschließend in einer 10cm-Gewebeschale mit einem Skalpell zerkleinert. Bei dem darauf folgenden enzymatischen Verdau inkubierte das zerkleinerte Gewebe in 30 ml PBS mit 1 mg/ml Kollagenase II und 100 µg/ml DNase I 3 h bei 37°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Die entstandene Suspension wurde unter Zugabe von 300 ml vorgewärmtem M-199-Komplettmedium, welches Gentamicin (52 µg/ml), Amphotericin B (0,5 µg/ml), L-Glutamin (290 ng/ml), FKS (15%) und HS (7,5%) enthielt, durch einen 100 µm-maschigen Filter filtriert und 7 min bei 250xg zentrifugiert. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte anschließend in 20 ml vorgewärmter (37°C) frisch angesetzter Percoll-Lösung einer Dichte von 1,07 g/ml. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 650xg befanden sich die Nebennierenzellen

in der obersten Schicht des Gradienten. Diese Schicht wurde mit einer sterilen 10ml-serologischen Pipette abgenommen, mit M-199-Komplettmedium auf 50 ml aufgefüllt, und 5 min bei 400xg zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren des Pellets in M-199-Komplettmedium erfolgte die Zellzählung. Pro Schale einer 24-Schalen-Platte wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in M-199-Komplettmedium ausgesät.

3.2.5.3 Versuchsaufbau zur Testung eines Hormoneinflusses auf Primärkulturzellen

24 h nach Aussaat der Primärkulturzellen wurde das M-199-Komplettmedium durch Serum-definiertes M-199-Medium, welches Gentamicin (52 µg/ml), Amphotericin B (0,5 µg/ml), L-Glutamin (290 ng/ml), Insulin (1 µg/ml) und FGF (100 ng/ml) enthielt, ersetzt. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte nach weiteren 24 h. Die Zellen wurden nach 24-, 48- bzw. 72-stündiger Hormoninkubation und zuvor durchgeführter Mediumabnahme zur Hormonkonzentrationsbestimmung mittels Trypsin/EDTA-Behandlung aus den Schalen abgenommen. Für eine spätere RNA-Isolation erfolgte das Einfrieren der Zellpellets bei -80°C bzw. für die Durchflußzytometrie eine Weiterverarbeitung der Zellen. Die in den Experimenten untersuchten Bedingungen wurden jeweils in Triplikaten angesetzt.

3.2.5.4 Färbung der Zellen für die Durchflußzytometrie und Durchführung der FACS-Analyse

Bei der Durchflußzytometrie werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, wodurch das Licht gestreut wird, und damit die Größe und Granularität, bzw. bei fluoreszenzmarkierten Zellen Licht emittiert wird, und so die Fluoreszenzdichte jeder einzelnen Zelle registriert werden kann. In den hier durchgeführten Experimenten zur Zellzyklusanalyse wurde die DNA der Zellen durch Einlagerung des Farbstoffs Propidiumiodid markiert. Bei der Messung/Datenaufnahme mit dem CellQuestPro Programm wurde im FL2-W gegen FL2-A-Dotplot eine Region bei Kanal 200 gesetzt und damit Einzelzellen in der G1-Phase definiert. FL2-W bezeichnet dabei die Peak-Breite und FL2-A die Peak-Fläche, welche proportional dem DNA-Gehalt der Zelle ist. Im FL2-A-Histogramm wurden dann die einzelnen Zellzyklus-Phasen angezeigt. Die Datenanalyse erfolgte anschließend mit dem ModFit LT Programm.

Zellen, welche bei der FACS-Analyse verwendet werden sollten, wurden nach Ablösen aus den Schalen mittels Trypsin/EDTA Behandlung zunächst in 1 ml eiskaltem 70%igem EtOH fixiert und damit die Zellmembran für den Farbstoff permeabel gemacht. Nach anschließender Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min (4°C) erfolgte die Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI). Dazu wurde das Zellpellet in 500 µl PBS mit 62 µg/ml RNase A und 40 µg/ml PI resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad konnten die Zellen zur durchflußzytometrischen Messung am FACSCalibur (Becton Dickinson) eingesetzt werden.

3.2.5.5 Bestimmung der Hormonkonzentration im Zellkulturmedium

Die Bestimmung der Cortisol- und Aldosteronkonzentration im Kulturmedium erfolgte mittels Chemilumineszenz im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen.

Metanephrine wurden im Medium unter Verwendung des Plasma Nor- / Metanephrin – RIA von DLD gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.5.6 Promotoranalyse – Transiente Transfektionen mit anschließendem Reporteragen- Assay

Zur Analyse von Promotoraktivitäten wurden Reporteragenkonstrukte transient in eukaryontische Zellen eingebracht (Transfektion). Die verwendeten Reporteragenkonstrukte waren Luziferase-Expressionsvektoren (pGL2basic, pGL3basic), welche 5' der Sequenz für das Enzym Luziferase funktionelle Promotorfragmente enthielten. Die transfizierten Plasmide wurden vorübergehend Teil der Gesamt-DNA der Zelle, so dass bei Aktivität der Promotorfragmente die Expression des Enzyms Luziferase erfolgte. Nach anschließender Zelllyse konnte durch Zugabe des Substrats Luziferin die Luziferaseaktivität im Reporteragen-Assay bestimmt werden. Dabei wurde das bei der Oxidation von Luziferin emittierte Licht einer Wellenlänge von 560 nm als Maß der Luziferaseaktivität und damit der Promotoraktivität gemessen.

Transiente Transfektion

Für Transfektionsexperimente wurden bei FuGENE6 (Roche Applied Science)-vermittelter Transfektion 3×10^5 Zellen und bei CLONfectin (BD Biosciences)-vermittelter Transfektion 5×10^5 Zellen in jede Schale einer 6-Schalen-Platte in einem Endvolumen von 2 ml Medium ausgesät. Bei Verwendung von PC-12-Zellen war es

notwendig, vor dem Aussäen die Schalen mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) zu beschichten. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Vierundzwanzig Stunden nach Aussaat der Zellen erfolgte die transiente Transfektion, wobei unter Verwendung des Transfektionsreagenzes FuGENE6 2 µg Reportergenkonstrukt mit 6 µl FuGENE6 pro Ansatz, und unter Verwendung von CLONfectin 3 µg DNA mit 5 µl CLONfectin je Ansatz eingesetzt wurden. In beiden Fällen erfolgte die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde der Reportergen-Assay durchgeführt.

Reportergen-Assay

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte mit dem Luciferase Reporter Gene Assay der Firma Roche Applied Science. Zunächst wurde das Kulturmedium aus den Schalen abgesaugt und die Zellen nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer (1x) pro Schale 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bzw. Zelltrümmer mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgekratzt und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch 10-sekündige Zentrifugation trennten sich die Zelltrümmer vom Zellextrakt. Nach Versetzen von 20 µl Überstand mit 100 µl Luziferasereagenz erfolgte die Detektion der Lumineszenz der Probe über eine Messzeit von 3 sec in einem Sirius Luminometer.

3.2.6 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Die in paraffineingebetteten Gewebeschnitte entparaffinierten durch wiederholte Inkubation für 15 min in Xylol. Daraufhin durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe (je 5 min 100%, 90%, 70% EtOH) und wurden anschließend 5 min in A. dest gespült. Das Blocken der endogenen Phosphatase erfolgte mittels 0,5 M HCl (5 min). Säurereste wurden durch Waschen der Schnitte in A. dest (5 min) entfernt. Bei Verwendung der Gewebeschnitte für den immunhistochemischen Nachweis von Ghrelin inkubierten sie für eine zusätzliche Epitopdemaskierung in Target-Retrieval-Lösung, pH6,0 (DakoCytomation), für 20 min im 98°C Wasserbad. Es folgte das Abkühlen der Schnitte in der Lösung für 20 min bei RT und erneutes Waschen in A. dest (5 min). Nach 5-minütiger Inkubation der Gewebeschnitte mit 100 µl Antibody Diluent (DakoCytomation) in einer feuchten Kammer erfolgte die Bindung des primären Antikörpers während 1-stündiger Inkubation bei RT ebenfalls in einer feuchten Kammer. Als primäre Antikörper kamen ein polyklonaler Kaninchen anti-

Ghrelin Antikörper (Phoenix Pharmaceuticals, 1:4000) und ein polyklonaler Ziegenantikörper (Santa Cruz, 1:250), der gegen den C-Terminus des GHS-Rezeptors Typ 1a gerichtet war, zum Einsatz. Die Primärantikörper-Arbeitslösungen wurden vor der Verwendung in Antibody Diluent angesetzt. Im Folgenden wurden für die Detektion von Ghrelin das Alkaline Phosphatase/RED ChemMate Detection Kit (DakoCytomation) und für die Detektion des Rezeptors das LSAB+ System-AP Detection Kit (DakoCytomation) verwendet. Auf ein 3maliges Waschen für 5 min in TBS folgte die Inkubation mit 100 µl Sekundärantikörper (bei Ghrelin-Detektion: 15 min bei RT in feuchter Kammer; bei GHS-R1a-Detektion: 30min). Die Gewebeschnitte inkubierten dann nach erneutem 3maligen Waschen für 5 min in TBS mit 100 µl alkalischer Phosphatase (bei Ghrelin-Detektion: 15 min bei RT in feuchter Kammer; bei GHS-R1a-Detektion: 30min). Bevor die frisch angesetzte Substrat-Chromogen-Lösung (enthält Levamisol) auf die Schnitte pipettiert wurde, erfolgte wie zuvor das Waschen mit TBS. Bei der Detektion von Ghrelin verblieb die Lösung 15 min auf den Gewebeschnitten und wurde dann in 2 x 5 min TBS abgewaschen. Die Inkubationszeit der Chromogen-Lösung betrug bei der Rezeptordetektion 10 min und wurde durch 2maliges Waschen für 5 min in A. dest beendet. Die Gegenfärbung mit 200 µl Hämatoxylin (Hämatoxylin/A. dest 1:1 für 1 min) wurde bei der Ghrelin-Rezeptor-Färbung gefolgt vom Spülen mit A. dest und dem Eindeckeln mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex, Merck). Bei der Ghrelin-Färbung durchliefen die Gewebeschnitte nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin und dem Spülen mit A. dest eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 70%, 90%, 100% EtOH) und 2 Xylobäder (je 5 min), und wurden dann in einem auf organische Lösungsmittel basierendem Eindeckmedium (Roti-Histokitt II, Roth) eingedeckelt. In Kontrollexperimenten erfolgte die Färbung als Kontrolle für unspezifische Bindungen ohne Primärantikörper und als Kontrolle für die Spezifität des Primärantikörpers nach Präinkubation des Primärantikörpers mit dem spezifischen die Bindung blockierenden Peptid.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, bei dem die Nullhypothese, dass p Populationen sich nicht unterscheiden, geprüft wird, gefolgt vom Dunn's Vergleichstest. Als signifikant wurden Unterschiede definiert, welche P-Werte <0,05 aufwiesen. Signifikante Varianzen beim Vergleich der prozentualen

Veränderungen zur Basis 100 wurden mittels Wilcoxon-Test ermittelt. Die nicht-parametrische Korrelationsanalyse nach Spearman wurde zur Ermittlung von Korrelationen verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression, Regulation und vermittelte Effekte von Somatostatin und den Somatostatin-Rezeptorsubtypen

4.1.1 Expression der Somatostatin-Rezeptorsubtypen *sst1-5* in der gesunden Nebenniere und verschiedenen Nebennierenadenomen

Mittels RT-PCR wurde die Expression der 5 Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in verschiedenen Nebennierentumoren und der normalen Nebenniere untersucht. Dabei kamen für den jeweiligen Subtyp spezifische Primer zum Einsatz.

Zur Kontrolle der Qualität der isolierten RNA und zum Ausschluss einer Kontamination durch DNA erfolgte zunächst die Amplifikation des beta-2-Mikroglobulin Gens. Die reverse Transkription wurde bei der Kontaminationskontrolle ohne Zugabe der reversen Transkriptase durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde genomische Lymphozyten-DNA verwendet. Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis der RT-PCR bei Verwendung isolierter Tumor-RNA-Proben.

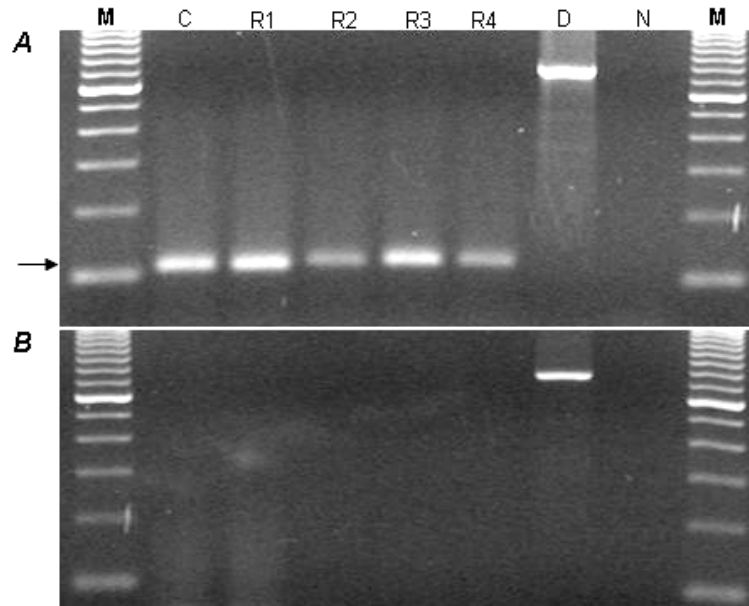


Abb. 4 RT-PCR Ergebnis nach beta-2-Mikroglobulin Amplifikation bei 4 Tumor-RNAs unter Verwendung *beta-2-Mikroglobulin*-spezifischer Primer. PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung identifiziert. Die RT-PCR wurde mit (*Abschnitt A*) und ohne (*Abschnitt B*) reverse Transkriptase durchgeführt. RNA eines Pools von gesunden Nebennieren (BD Biosciences) wurde als Positivkontrolle für die Amplifikation an intakter und nicht kontaminierter RNA verwendet (C). Genomische Lymphozyten-DNA diente als Positivkontrolle (D) für die Amplifikation an genomischer DNA mit einem erwarteten Amplikon von 720 bp. In der Negativkontrolle wurde die RNA durch A. dest ersetzt (N). R1-R4: RNA von 4 Nebennierentumoren. M: 100 bp DNA-Leiter. Der Pfeil markiert das spezifische Amplikon (113 bp) bei Verwendung von intakter RNA.

Durch Darstellung des erwarteten PCR-Produkts von 113 bp wurde für alle verwendeten RNAs eine ausreichende Qualität nachgewiesen. In der RT-PCR ohne reverse Transkriptase wurde für alle verwendeten RNAs bei Abwesenheit eines Amplikons eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen.

Für die Untersuchung der *sst*-Expression wurde Gesamt-RNA von 10 Phäochromozytomen (PHEO), 9 Cortisol-produzierenden Adenomen (CPA), 11 Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA) und 8 hormoninaktiven Nebennierenadenomen (NFA) genutzt (Tab. 3).

Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)	Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)
P1	46	w	PHEO	2	A1	49	w	APA	2,5
P2	58	m	PHEO	3,5	A2	64	w	APA	3
P3	35	w	PHEO	4	A3	28	w	APA	1,5
P4	24	w	PHEO	3	A4	46	m	APA	2,5
P5	32	w	PHEO	2	A5	33	w	APA	3
P6	63	m	PHEO	9	A6	29	m	APA	2
P7	42	w	PHEO	3	A7	56	m	APA	3
P8	26	w	PHEO	4	A8	45	m	APA	1,5
P9	52	w	PHEO	2,5	A9	43	w	APA	2,5
P10	17	m	PHEO	3,5	A10	36	w	APA	2,5
C1	30	w	CPA	1,8	A11	19	m	APA	3
C2	54	w	CPA	4	N1	31	w	NFA	2,5
C3	31	w	CPA	2	N2	48	m	NFA	2
C4	69	w	CPA	4	N3	62	w	NFA	2,5
C5	59	w	CPA	n.v.	N4	66	w	NFA	6
C6	56	w	CPA	3,2	N5	66	w	NFA	1
C7	49	w	CPA	4,8	N6	35	w	NFA	6,5
C8	33	w	CPA	3	N7	57	m	NFA	3,5
C9	31	w	CPA	2	N8	35	m	NFA	2,5

Tab. 3: Klinische Daten zu Patienten, deren Tumormaterial untersucht wurde; *Nr.*: Probennummer; *Gr.*: Tumorgroße; *m*: männlich; *w*: weiblich; *PHEO*: Phäochromozytom; *CPA*: Cortisol-produzierendes Adenom; *APA*: Aldosteron-produzierendes Adenom; *NFA*: hormoninaktives Nebennierenadenom; *n.v.*: nicht vorhanden.

In der gesunden Nebenniere konnte die Expression aller 5 *ssTs* nachgewiesen werden (Abb. 5). Die cDNA-Fragmente wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung (*Ausschnitt I*) und Southern Blot Analyse (*Ausschnitt II*) identifiziert, wobei die verwendeten Positivkontrollen die korrekte Amplikongröße zeigten und die Amplikonsequenz nach Sequenzanalyse mit den veröffentlichten *sst*-Sequenzen übereinstimmte.

Das Ergebnis der *sst*-Expressionsanalyse bei Phäochromozytomen ist in Abbildung 5 dargestellt. Spezifische Produkte der korrekten Größe konnten zum Nachweis der *sst1*, *sst2*, *sst4*, und *sst5*-Expression bereits mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht

werden. Die Expression von *sst3* war bei den Phäochromozytomen ebenso wie bei den anderen untersuchten Nebennierentumoren erst mittels der sensitiveren Southern Blot-Analyse nachweisbar.

In der Mehrzahl der untersuchten Phäochromozytome konnte die Expression von *sst1-3* nachgewiesen werden (Tab. 4A). So wurde *sst1* in 90%, *sst2* in 70% und *sst3* in 80% der Tumoren exprimiert. Nur in 20% dieses Tumortyps war *sst4* nachweisbar, während die Expression von *sst5* in allen Tumoren fehlte. Betrachtet man das Tumor-umgebende Gewebe, war die Expression der jeweiligen Rezeptoren mit der im Tumor vergleichbar (Tab. 4B).

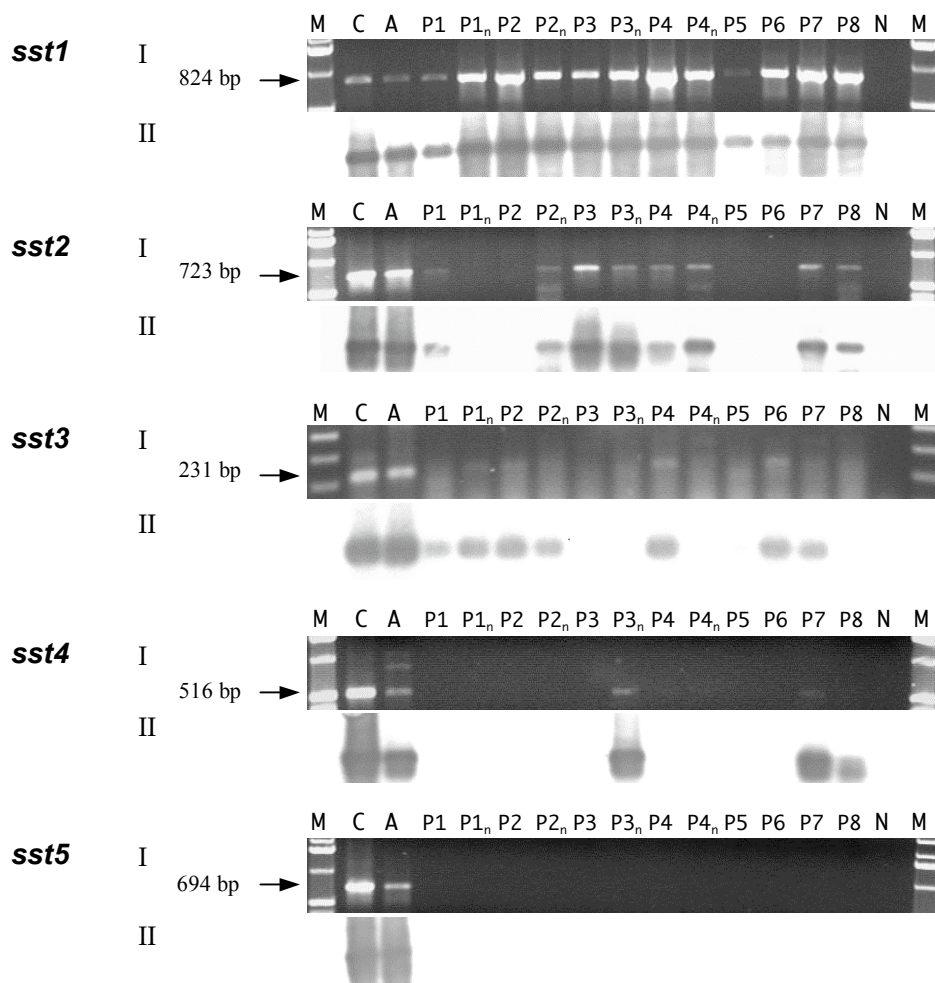


Abb.5 RT-PCR Analyse von 8 der insgesamt 10 untersuchten Phäochromozytome unter Verwendung *sst*-spezifischer Primer. PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung (*Ausschnitt I*) und Southern Blot-Analyse durch Verwendung *sst*-spezifischer Digoxigenin-markierter Sonden (*Ausschnitt II*) identifiziert. RNA eines Hypophysenadenoms wurde als Positivkontrolle (C) der Amplifikation von *sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst5*, und RNA von gesundem Lungengewebe für die von *sst4* eingesetzt. In der Negativkontrolle wurde die RNA durch A. dest ersetzt (N). RNA eines Pools von gesunden Nebennieren (A), RNA von Phäochromozytomen (P1-P8) und Tumor-umgebendem Gewebe (P1_n-P4_n). M: 1 kb DNA-Leiter für *sst1*, *sst2*, *sst4*, *sst5* und 100 bp DNA-Leiter für *sst3*. Die Pfeile markieren die spezifischen PCR-Produkte.

In den untersuchten Cortisol-produzierenden Adenomen war die Expression von *sst2* und *sst3* mit jeweils 78% vorherrschend (Abb. 6; Tab. 4A). Die Rezeptorsubtypen *sst1* (22%) und *sst4* (33%) wurden in einer geringeren Anzahl dieser Tumoren nachgewiesen. Bei der Analyse der Expression von *sst5* waren trotz sehr stringenter Bedingungen in der PCR verschiedene weitere Banden nach der Southern Blot-Analyse erkennbar. Gewertet wurden nur die Amplifikate der korrekten Größe mit Nachweis von *sst5* in 56% dieses Tumortyps. In den Tumor-umgebenden Geweben war die Expression von *sst1-4* in über 80% vergleichbar mit der im Tumor (Tab. 4B). Die Expression von *sst5* korrelierte hingegen nur in 33%.

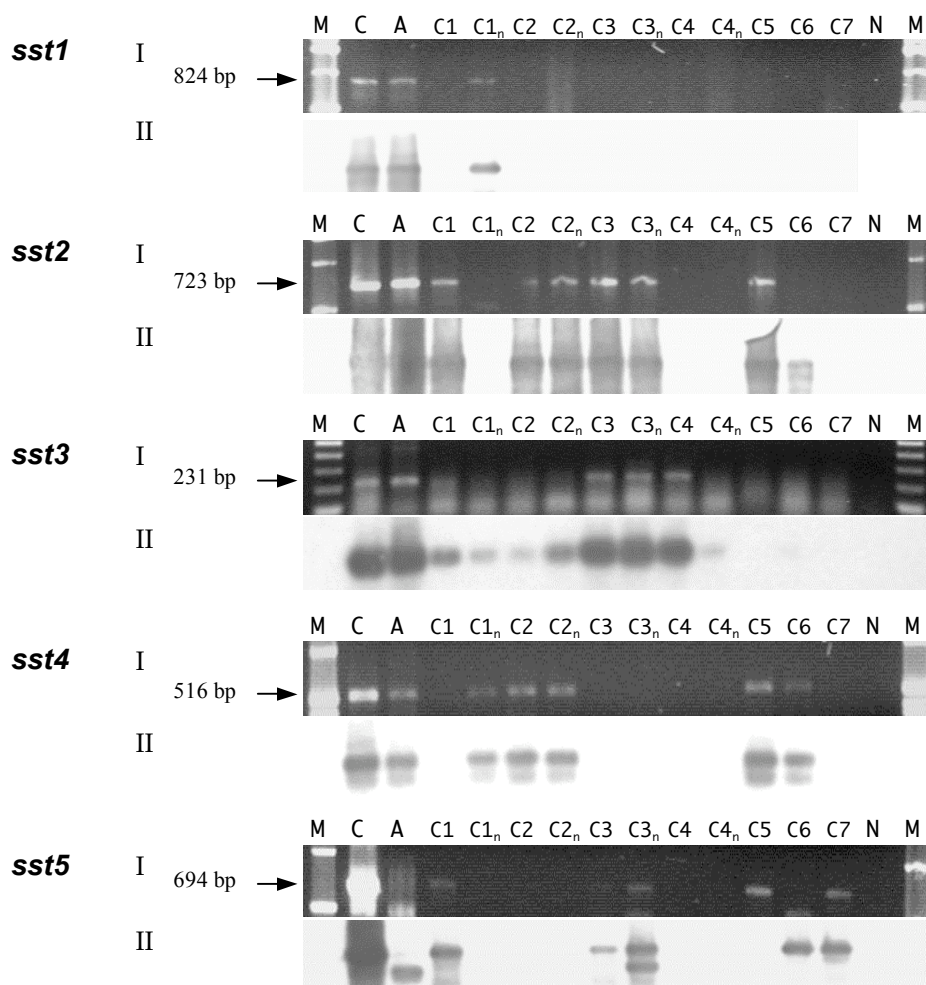


Abb. 6 RT-PCR Analyse von 7 der insgesamt 9 untersuchten Cortisol-produzierenden Adenome unter Verwendung *sst*-spezifischer Primer. PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung (*Ausschnitt I*) und Southern Blot-Analyse durch Verwendung *sst*-spezifischer Digoxigenin-markierter Sonden (*Ausschnitt II*) identifiziert. RNA eines Hypophysenadenoms wurde als Positivkontrolle (C) der Amplifikation von *sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst5*, und RNA von gesundem Lungengewebe für die von *sst4* eingesetzt. In der Negativkontrolle wurde die RNA durch A. dest ersetzt (N). RNA eines Pools von gesunden Nebennieren (A), RNA von Cortisol-produzierenden Adenomen (C1-C7) und Tumor-umgebendem Gewebe (C1n-C4n). M: 1 kb DNA-Leiter für *sst1*, *sst2*, *sst4*, *sst5* und 100 bp DNA-Leiter für *sst3*. Die Pfeile markieren die spezifischen PCR-Produkte.

Die Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen war in den Aldosteron-produzierenden Adenomen relativ gleichmäßig verteilt und variierte zwischen 45% - 65% (Abb. 7; Tab. 4A). Das den Tumor-umgebende Gewebe wies teilweise deutliche Unterschiede in der Expression der *ssts* auf und korrespondierte nur in 22% - 67% mit der entsprechenden im jeweiligen Tumor nachgewiesenen Expression (Tab. 4B).

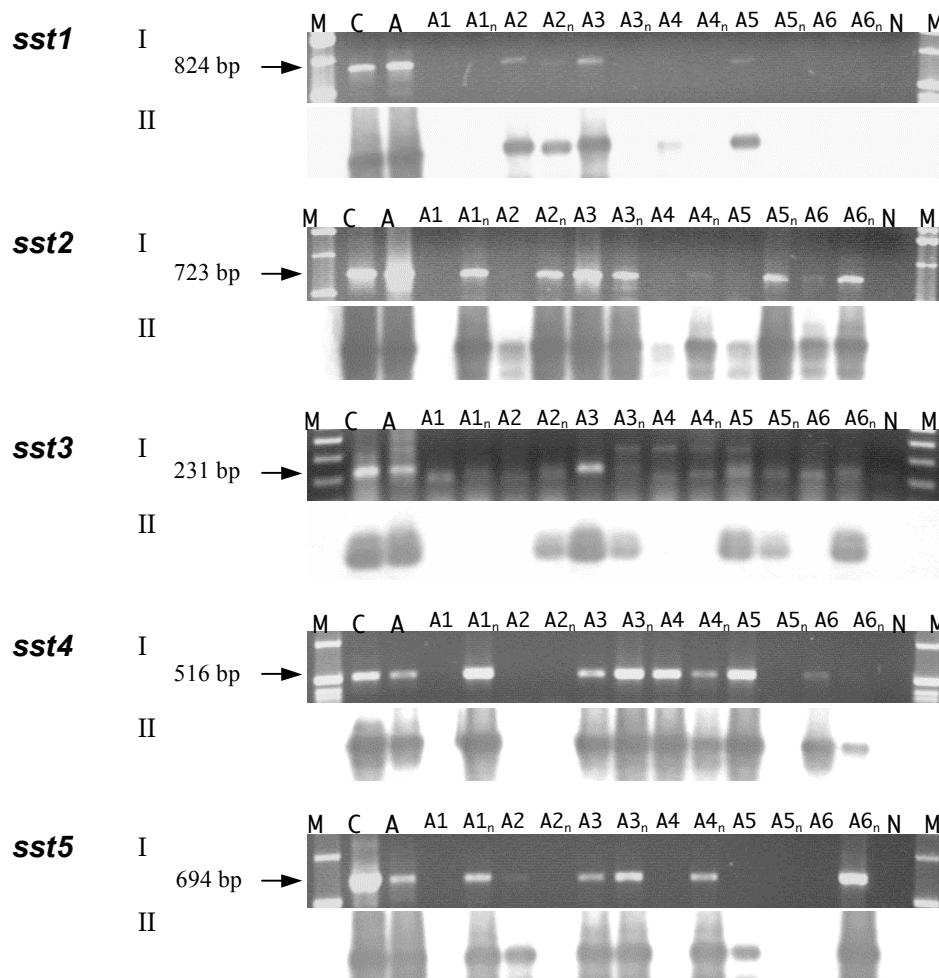


Abb. 7 RT-PCR Analyse von 6 der insgesamt 11 untersuchten Aldosteron-produzierenden Adenome unter Verwendung *sst*-spezifischer Primer. PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung (Ausschnitt I) und Southern Blot-Analyse durch Verwendung *sst*-spezifischer Digoxigenin-markierter Sonden (Ausschnitt II) identifiziert. RNA eines Hypophysenadenoms wurde als Positivkontrolle (C) der Amplifikation von *sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst5*, und RNA von gesundem Lungengewebe für die von *sst4* eingesetzt. In der Negativkontrolle wurde die RNA durch A. dest ersetzt (N). RNA eines Pools von gesunden Nebennieren (A), RNA von Aldosteron-produzierenden Adenomen (A1-A6) und Tumor-umgebendem Gewebe (A1_n-A6_n). M: 1 kb DNA-Leiter für *sst1*, *sst2*, *sst4*, *sst5* und 100 bp DNA-Leiter für *sst3*. Die Pfeile markieren die spezifischen PCR-Produkte.

In der Mehrzahl der hormoninaktiven Nebennierenadenome wurden mit jeweils 75% *sst2* und *sst3* exprimiert (Abb. 8; Tab. 4A). Die Rezeptorsubtypen *sst1* und *sst5* konnten mit 25% bzw. 13% in nur einer geringen Zahl der untersuchten Adenome dieses Typs

nachgewiesen werden. *Sst4* wurde in keinem dieser Tumoren exprimiert. Während die Expression von *sst1* sowie *sst3-5* im Tumor-umgebenden Gewebe in mehr als 50% der im Tumor gleich, korrelierte die Expression von *sst2* nur in 35% mit derjenigen im Tumor (Tab. 4B).

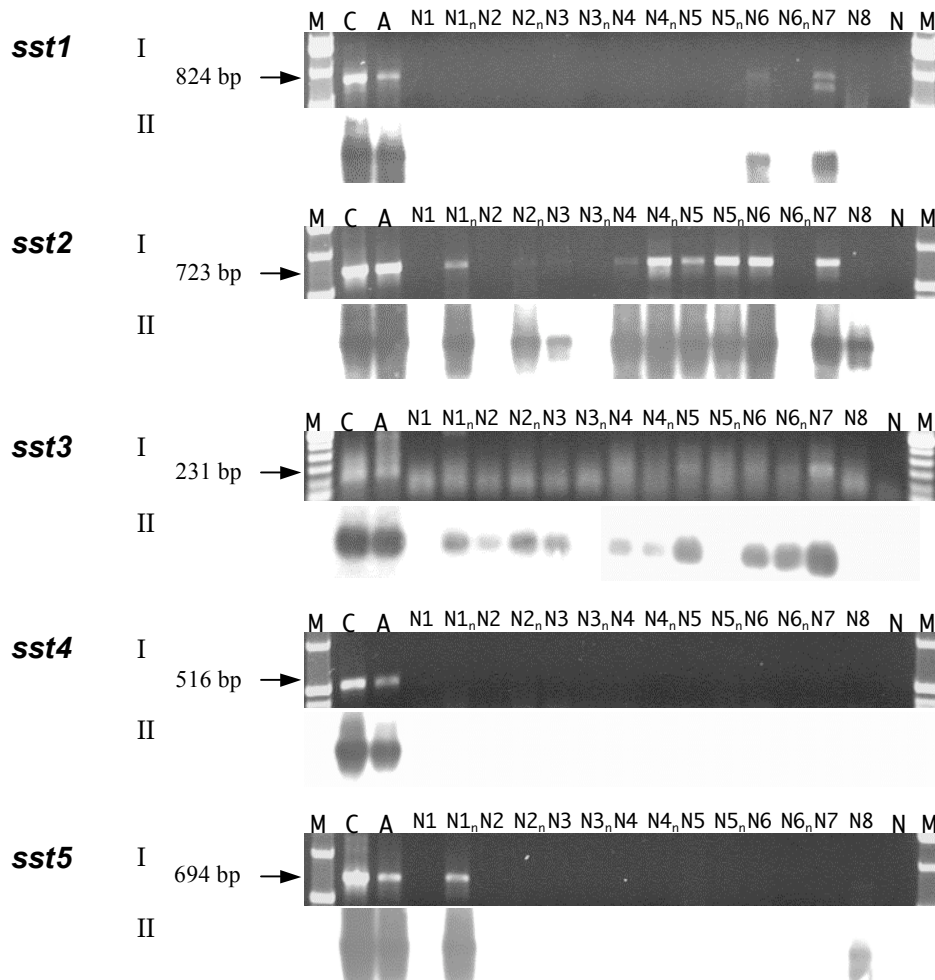


Abb. 8 RT-PCR Analyse von 8 hormoninaktiven Adenomen unter Verwendung *sst*-spezifischer Primer. PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromid-Färbung (*Ausschnitt I*) und Southern Blot-Analyse durch Verwendung *sst*-spezifischer Digoxigenin-markierter Sonden (*Ausschnitt II*) identifiziert. RNA eines Hypophysenadenoms wurde als Positivkontrolle (*C*) der Amplifikation von *sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst5*, und RNA von gesundem Lungengewebe für die von *sst4* eingesetzt. In der Negativkontrolle wurde die RNA durch *A*. dest ersetzt (*N*). RNA eines Pools von gesunden Nebennieren (*A*), RNA von Aldosteron-produzierenden Adenomen (*N1-N8*) und Tumor-umgebendem Gewebe (*N1n-N6n*). *M*: 1 kb DNA-Leiter für *sst1*, *sst2*, *sst4*, *sst5* und 100 bp DNA-Leiter für *sst3*. Die *Pfeile* markieren die spezifischen PCR-Produkte.

(A)		PHEO	CPA	APA	NFA	NAG	(B)		PHEO	CPA	APA	NFA	Ges.

<i>sst1</i>	90%	22%	55%	25%	+	<i>sst1</i>	100%	83%	44%	83%	74%
<i>sst2</i>	70%	78%	64%	75%	+	<i>sst2</i>	67%	83%	67%	33%	63%
<i>sst3</i>	80%	78%	55%	75%	+	<i>sst3</i>	83%	100%	67%	50%	74%
<i>sst4</i>	20%	33%	55%	0%	+	<i>sst4</i>	67%	83%	56%	100%	74%
<i>sst5</i>	0%	56%	45%	13%	+	<i>sst5</i>	100%	33%	22%	83%	56%
						Ges.	83%	77%	51%	70%	

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der *sst*-Expressionsanalyse mittels RT-PCR. *Teil A:* Prozentsatz der Expression des jeweiligen *ssts* in den verschiedenen Nebennierentumoren; + : Expression in der gesunden Nebenniere (NAG). *Teil B:* Prozentsatz der Übereinstimmung zwischen der *sst*-Expression in den jeweiligen Nebennierentumoren und dem entsprechenden Tumor-umgebenden Gewebe. Tumor-umgebendes Gewebe war nicht in allen Fällen vorhanden; Ges.: Gesamt.

4.1.2 Effekte von Somatostatin und seinen Analoga in Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Gewebe von 3 gesunden Nebennieren, 7 Aldosteron-produzierenden Adenomen, 8 Cortisol-produzierenden Adenomen, 8 Phäochromozytomen und 6 hormoninaktiven Nebennierenadenomen konnte zur Erstellung von Primärkulturen gewonnen werden. Untersucht wurden die Effekte von Somatostatin (SRIF) und der Analoga Octreotid (Oct) und SOM230 (SOM) auf die Hormonsekretion, die Somatostatin-Rezeptorsubtyp (*sst*)-Expression und den Zellzyklus der Primärkulturzellen. Zur Kontrolle der Modifizierbarkeit der Hormonsekretion durch Hormongabe wurden die Hormone ACTH, Angiotensin II (ANG) und Dexamethason (Dex) eingesetzt. Die Testhormone wurden, sofern nicht anderes angegeben, in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt.

Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)	Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)
P1	34	m	PHEO	4	C1	53	m	CPA	3
P2	34	w	PHEO	4	C2	69	w	CPA	3,8
P3	63	w	PHEO	2	C3	52	w	CPA	3
P4	35	m	PHEO	3,5	C4	57	w	CPA	n.v.
P5	14	w	PHEO	3,5	C5	37	w	CPA	2,8
P6	46	w	PHEO	4	C6	75	w	CPA	5,6
P7	8	m	PHEO	n.v.	C7	51	w	CPA	4,5
P8	31	m	PHEO	n.v.	C8	47	w	CPA	6,5
A1	49	w	APA	1,5	I1	68	m	NFA	4,5
A2	58	m	APA	2,5	I2	63	m	NFA	3,2
A3	51	m	APA	1,6	I3	60	w	NFA	n.v.
A4	72	m	APA	0,9	I4	65	m	NFA	n.v.
A5	44	m	APA	2,2	I5	74	w	NFA	3,4
A6	77	m	APA	3,3	I6	41	w	NFA	6,5
A7	73	w	APA	2,6	N1	66	w	NN	-
					N2	74	w	NN	-
					N3	66	m	NN	-

Tab. 5: Klinische Daten zu Patienten, deren Tumormaterial untersucht wurde; *Nr.*: Probennummer; *Gr.*: Tumorgroße; *m*: männlich; *w*: weiblich; *PHEO*: Phäochromozytom; *CPA*: Cortisol-produzierendes Adenom; *APA*: Aldosteron-produzierendes Adenom; *NFA*: hormoninaktives Nebennierenadenom; *NN*: gesunde Nebenniere; *n.v.*: nicht vorhanden.

4.1.2.1 *Quantitative Analyse der Somatostatin-Rezeptor-Expression in Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierenadenome*

Aufgrund der Seltenheit von Nebennierentumoren ist die Verfügbarkeit von Operationsmaterial beschränkt. Zudem ist aufgrund der meist geringen Tumorgroße die für die Primärkulturerstellung verwendbare Gewebemenge gering. Für diese spezielle Fragestellung war eine Untersuchung von 2 gesunden Nebennieren, 2 Aldosteron-produzierenden Adenomen, 1 Cortisol-produzierendem Adenom, 5 Phäochromozytomen und einem hormoninaktiven Nebennierenadenom möglich.

Der Nachweis adhärenter, gleichmäßig verteilter Zellen in der Primärkultur war Voraussetzung für den Beginn der Untersuchung. Die Zellen wurden zunächst definierten Untersuchungsbedingungen mit Inkubation der zu untersuchenden Testsubstanzen über einen definierten Zeitraum von 48 h ausgesetzt. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert und die *sst*-Expression unter Verwendung spezifischer Primer mittels RealTime RT-PCR untersucht. Durch Vergleich mit einer Standardkurve war die Berechnung der Kopienzahl pro μg RNA möglich (Abb. 9). Als unterste Detektionsgrenzen in diesem Testsystem wurden bestimmt: 12 Moleküle/ μg

Gesamt-RNA von *sst1*, 32 Moleküle/ μg Gesamt-RNA von *sst2*, 1 Molekül/ μg Gesamt-RNA von *sst3*, 5 Moleküle/ μg Gesamt-RNA von *sst4*, und 18 Moleküle/ μg Gesamt-RNA von *sst5*.

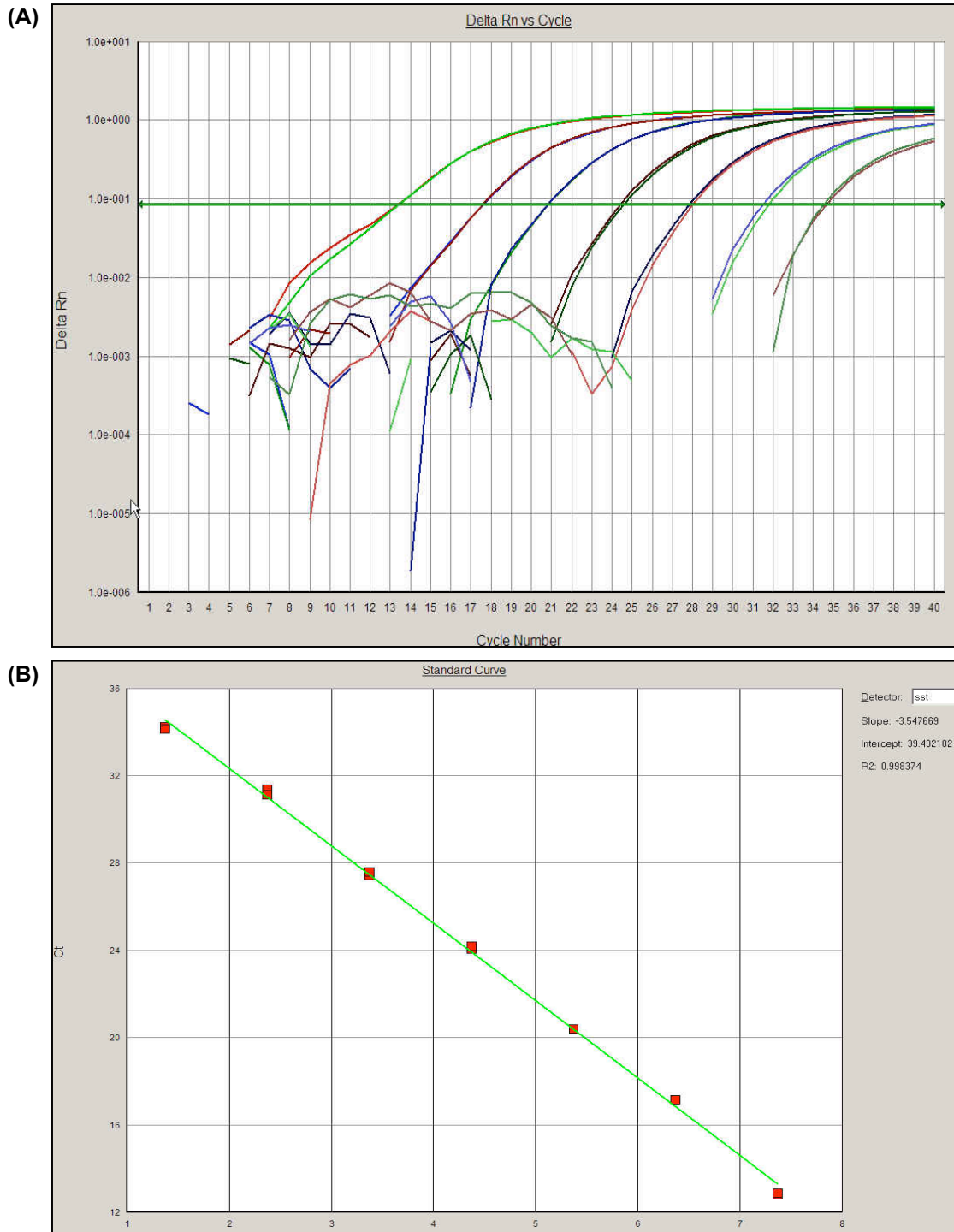


Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse einer RealTime RT-PCR mit Amplifikation des Zielgens innerhalb einer Verdünnungsreihe. Jede Verdünnungsstufe wurde in Duplikaten angesetzt. (A) Im „Amplification Plot“ wurde die Amplifikation des Targets als Anzahl der Zyklen gegen die Fluoreszenz (Delta Rn) aufgetragen. (B) Aus den Standardproben mit definierter Kopienzahl wird eine Standardkurve berechnet, bei der der 10er-Logarithmus der Kopienzahl gegen die Anzahl der Zyklen (Ct-Threshold Cycle) aufgetragen wird.

In der Mehrzahl der untersuchten Primärkulturen war die Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen nachweisbar. Ausnahmen waren die fehlende Expression von *sst5* in einem Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenom und einem Phäochromozytom, sowie die fehlende Expression von *sst4* und *sst5* beim hormoninaktiven Nebennierenadenom.

In Primärkulturzellen aus gesundem Nebennierengewebe fanden sich 2000 Kopien pro 250000 Zellen (cpw) von *sst1*, 1000 cpw *sst2*, 5 cpw *sst3*, 2000 cpw *sst4* und 700 cpw für *sst5* (Abb. 10). Für *sst1* war im Vergleich in hormoninaktiven Nebennierenadenomen eine höhere Expression und in Phäochromozytomen eine niedrigere Expression zu beobachten, ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz erreichten. Ein signifikanter Unterschied ergab sich einzig bei dem Vergleich der *sst1*-Expression in Phäochromozytomen und hormoninaktiven Nebennierenadenomen ($P < 0,05$). Für *sst2* fanden sich bei dem Vergleich der gesunden Nebenniere und den verschiedenen Nebennierentumoren keine signifikanten Unterschiede, bei im Median deutlich niedrigerer *sst2*-Expression in Cortisol-produzierenden und hormoninaktiven Nebennierenadenomen, sowie deutlich höheren Medianen in Phäochromozytomen. Eine signifikant höhere *sst2*-Expression fand sich in Phäochromozytomen im Vergleich zu hormoninaktiven Adenomen ($P < 0,01$). Die detektierten *sst3*-mRNA Mengen waren im Median in der gesunden Nebenniere und den verschiedenen Nebennierentumoren vergleichbar. Bemerkenswert waren starke Unterschiede in der Expression innerhalb der Gruppe der Phäochromozytome. Die *sst4*-Expression in Primärkulturzellen aus gesundem Nebennierengewebe war im Median höher als in Primärkulturzellen der verschiedenen Nebennierentumoren. Entsprechend der statistischen Analyse war einzig der Unterschied im Vergleich zum hormoninaktiven Nebennierenadenom als signifikant zu werten. Des Weiteren war eine signifikant höhere *sst4*-Expression in Phäochromozytomen im Vergleich zu Aldosteron-produzierenden ($P < 0,05$) und hormoninaktiven Nebennierenadenomen ($P < 0,01$) nachweisbar. Die Analyse der detektierten *sst5*-mRNA-Mengen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den in der gesunden Nebenniere nachgewiesenen Mengen und denen der verschiedenen Nebennierentumoren. Signifikant höher war die *sst5*-Expression in Cortisol-produzierenden Adenomen im Vergleich zu hormoninaktiven Nebennierenadenomen. Bezogen auf den Tumortyp fällt somit in Cortisol-sezernierenden Nebennierenrindenadenomen eine hohe Expression von *sst5*, in Phäochromozytomen eine hohe Expression von *sst2*, und in hormoninaktiven Nebennierentumoren eine hohe

Expression von *sst1* auf. Nebennierentumore aller Ätiologien zeigten eine niedrige Expression von *sst4*.

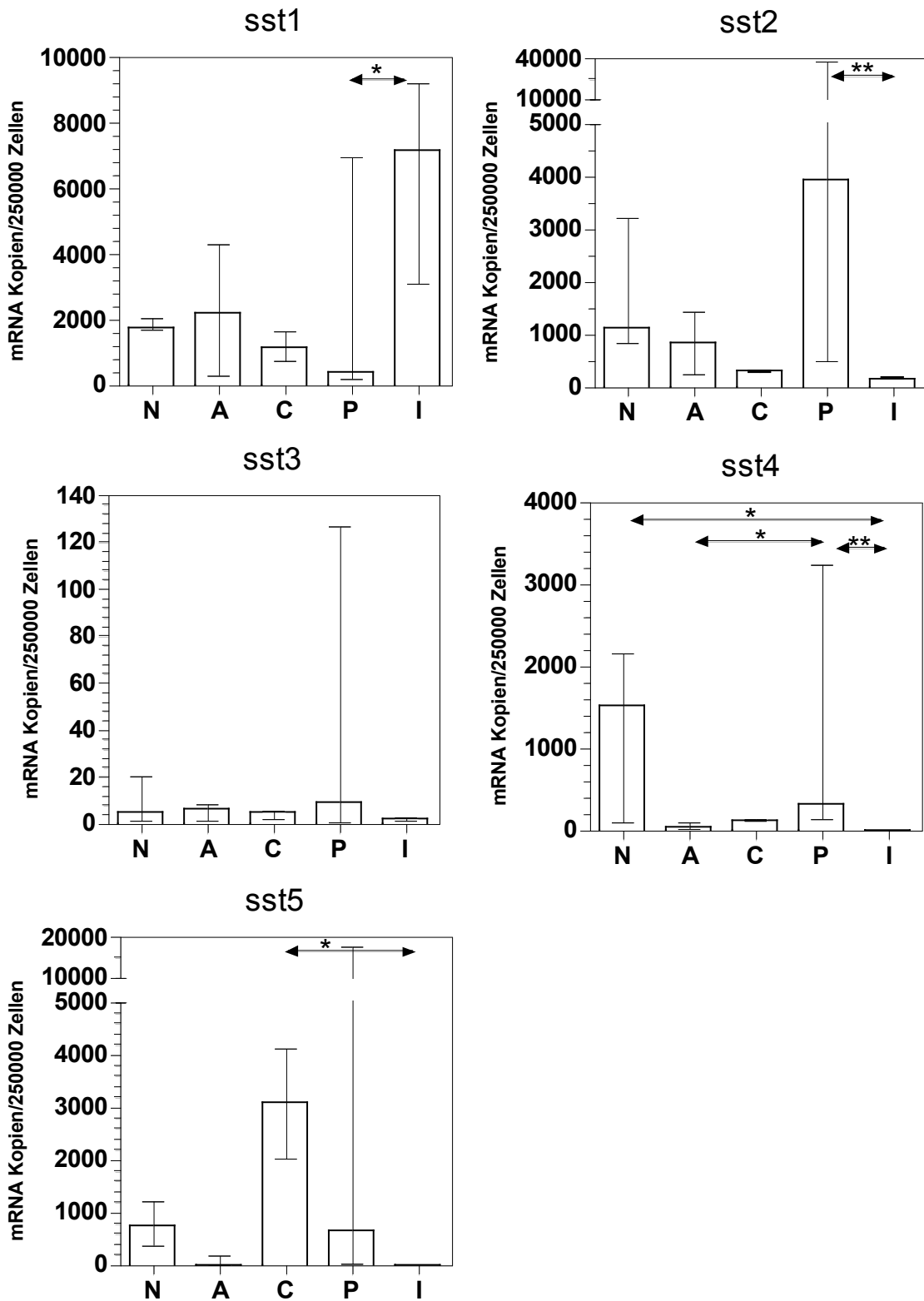


Abb. 10: *Sst*-Expression in Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierentumoren unter basalen Bedingungen. Dargestellt ist die mediane Kopienzahl der untersuchten *ssts*; N: gesunden Nebennieren; A: Aldosteron-produzierende Adenome; C: Cortisol-produzierende Adenome; P: Phäochromozytome; I: hormoninaktive Adenome; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4.1.2.2 Hormonelle Kontrolle der Rezeptorexpression in Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Im Folgenden werden die Effekte der Testhormone auf die mRNA-Expression der verschiedenen Somatostatin-Rezeptorsubtypen betrachtet.

ACTH führte zu einer statistisch signifikanten Hemmung der *sst2*-Expression ($P < 0,05$) (Abb. 11). Für *sst1* und *sst5* war eine Hemmung, wenn auch nicht von signifikantem Ausmaß, zu beobachten, während die Expression von *sst3* und *sst4* stimuliert wurde.

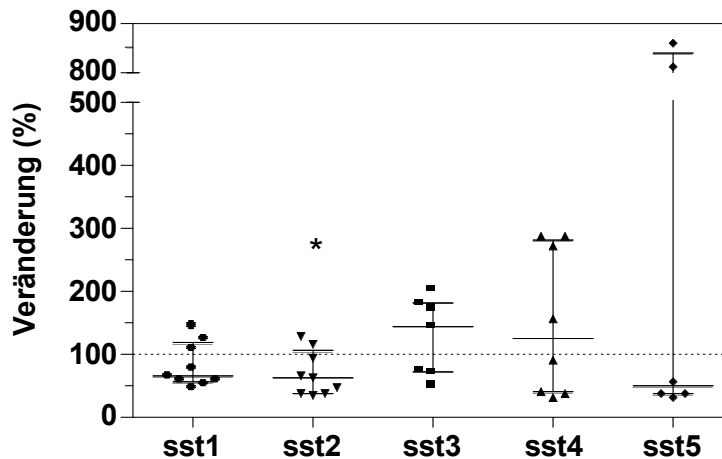


Abb. 11: Effekte von ACTH auf die *sst*-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von ACTH vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen; *: $P < 0,05$.

Die Gabe von Angiotensin II (ANG) führte zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression der fünf *ss*ts in den Primärkulturzellen (Abb. 12).

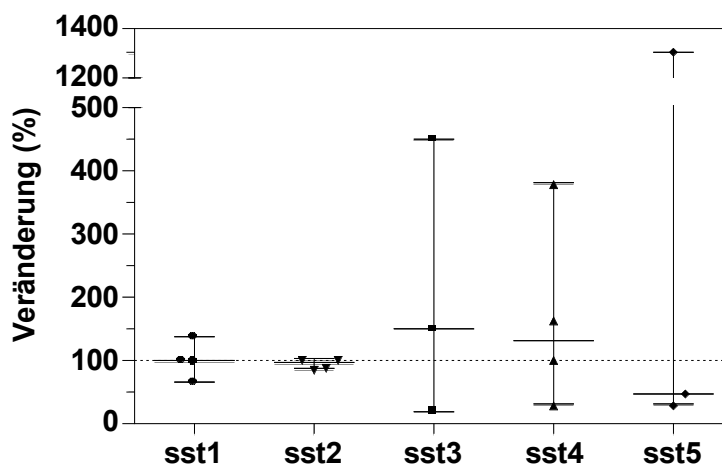


Abb. 12: Effekte von Angiotensin II (ANG) auf die *sst*-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von ANG vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen.

Dexamethason (Dex) bewirkte eine statistisch signifikante Stimulation der *sst1*- und *sst2*-Expression ($P < 0,05$) (Abb. 13), sowie eine Hemmung der *sst4*- und *sst5*-

Expression. Für *sst3* waren sehr unterschiedliche Effekte von Hemmung in einem Tumor bis Stimulation in drei Tumoren zu beobachten.

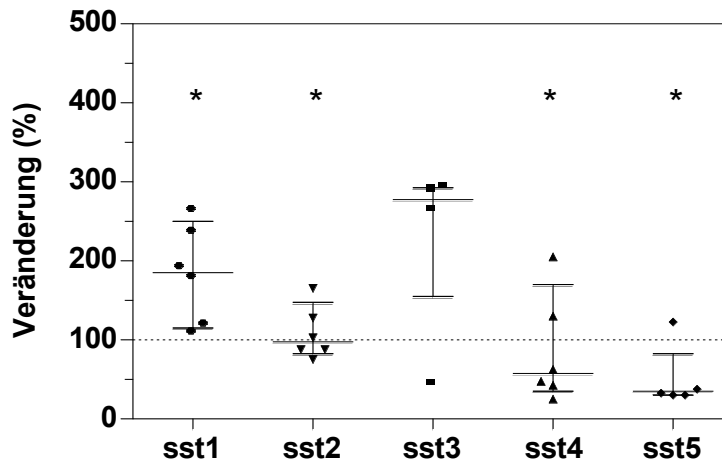


Abb. 13: Effekte von Dexamethason (Dex) auf die sst-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von Dex vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen; *: $P < 0,05$.

Somatostatin (SRIF) zeigte keine signifikanten Effekte auf die Expression der fünf *ssts* (Abb. 14). Auch ergab sich kein relevanter Zusammenhang zwischen basaler Expression und der durch Somatostatin verursachten Veränderung in der Korrelationsanalyse.

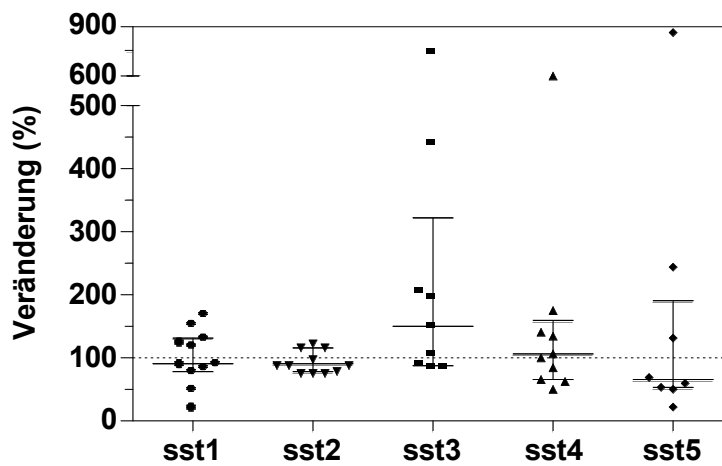


Abb. 14: Effekte von Somatostatin (SRIF) auf die sst-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von SRIF vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen.

Das Somatostatin-Analog Octreotid (Oct) mit vorwiegender Bindung an *sst2* und geringerer Bindung an *sst3* und *sst5* bewirkte eine signifikante Stimulation ($P < 0,05$) der *sst3*-mRNA Expression in den untersuchten Primärkulturen (Abb. 15). In der Mehrzahl der unterschiedlichen Kulturen war eine Abnahme der Expression von *sst4* und *sst5* zu

beobachten. Die durchgeführte Korrelationsanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der basalen *sst5*-Expression und dem durch Octreotid vermittelten Effekt auf die *sst4*-Expression ($r = -0,85$, $P < 0,001$) (Abb. 16). Octreotid zeigte bei höherer basaler *sst5*-mRNA Kopienzahl eine vermehrte Hemmung der *sst4*-mRNA-Expression.

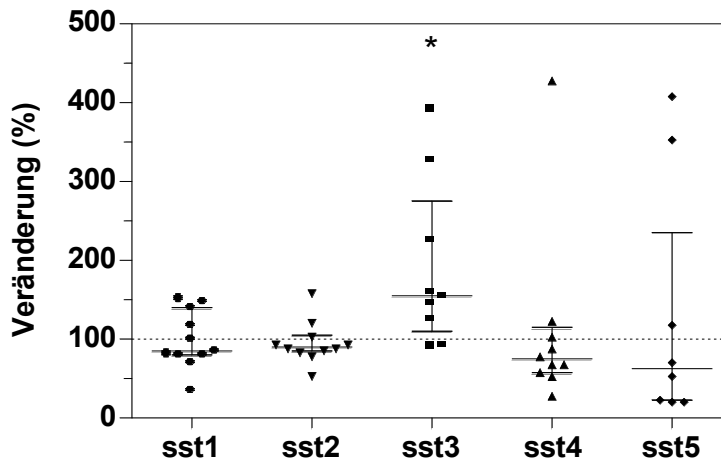


Abb. 15: Effekte von Octreotid (Oct) auf die *sst*-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von Oct vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen. *: $P < 0,05$

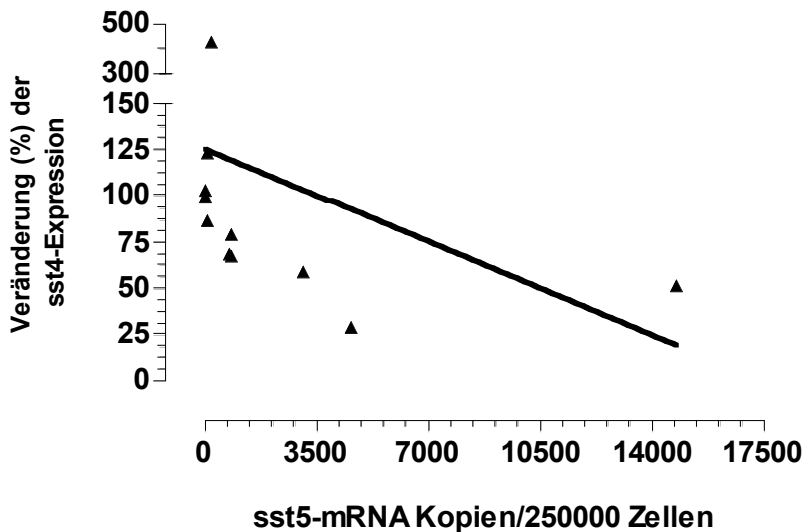


Abb. 16: Korrelation der basalen *sst5*-Expression zum Oct-vermittelten Effekt auf die *sst4*-Expression. Aufgetragen ist die unter basalen Bedingungen exprimierte *sst5*-mRNA Kopienzahl gegen die durch Oct vermittelte Veränderung der *sst4*-mRNA Expression. Die Gerade stellt die Regressionsgerade dar.

Für das Somatostatin-Analog SOM230 (SOM) wurde eine signifikante Hemmung ($P < 0,05$) der Expression von *sst1* nachgewiesen (Abb. 17). In der Mehrzahl der Tumoren wurde zudem die Expression von *sst2* und *sst4* gehemmt. Entsprechend der Korrelationsanalyse nahm die Hemmung der *sst1*-Expression mit zunehmender basaler

sst1-mRNA Kopienzahl ($r = -0,712$, $P < 0,05$; Abb. 18A) und zunehmender basaler *sst3*-mRNA Kopienzahl ($r = -0,65$, $P < 0,05$, Abb. 18B) zu. Mit zunehmender basaler *sst1*-mRNA Kopienzahl nahm zudem die Hemmung der *sst2*-Expression ($r = -0,86$, $P < 0,005$; Abb. 18C) zu.

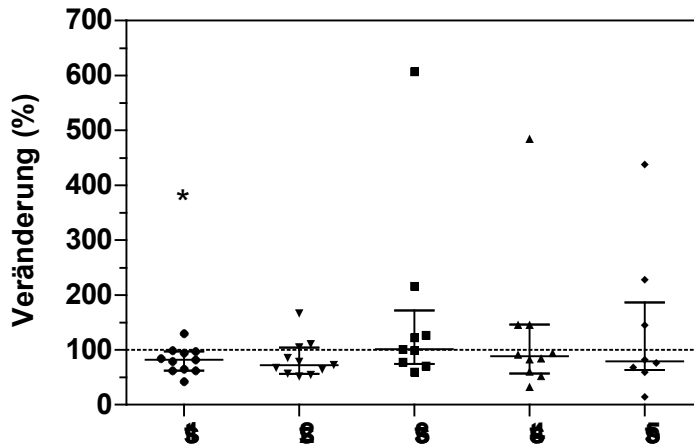


Abb. 17: Effekte von SOM230 (SOM) auf die *sst*-Expression in Primärkulturzellen. Dargestellt ist der von SOM vermittelte Effekt (als Veränderung in %) auf die fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen.

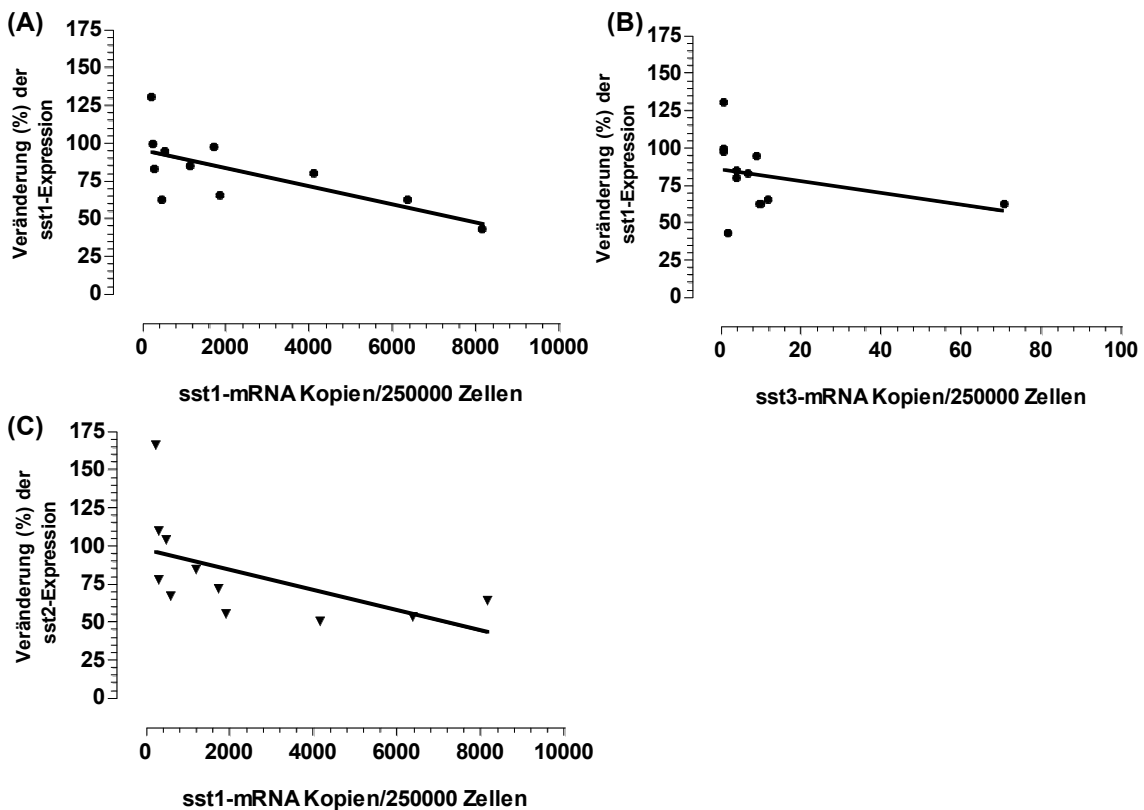


Abb. 18: Korrelation der basalen *sst1*- und *sst3*-Expression zum SOM230-vermittelten Effekt auf die *sst1*- bzw. *sst2*-Expression. Aufgetragen ist die unter basalen Bedingungen exprimierte *sst1*-mRNA Kopienzahl gegen die SOM230-vermittelte Veränderung der *sst1*-mRNA Expression (A), die unter basalen Bedingungen exprimierte *sst3*-mRNA Kopienzahl gegen die SOM230-vermittelte Veränderung der *sst1*-mRNA Expression (B), sowie die unter basalen Bedingungen exprimierte *sst1*-mRNA Kopienzahl gegen die SOM230-vermittelte Veränderung der *sst2*-mRNA Expression (C) in den verschiedenen Primärkulturen. Die Gerade stellt die jeweilige Regressionsgerade dar.

4.1.2.3 Effekte auf die Hormonsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

4.1.2.3.1 Basale Hormonsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierentumoren

Im Kulturmedium der Primärkulturen aus gesunden Nebennierengeweben erfolgte die Messung von Aldosteron (A), Cortisol (C) und Nor- (NMN)/Metanephrin (MN) (Abb. 19). Während in allen Primärkulturen des gesunden Nebennierengewebes die Sekretion von Aldosteron und Cortisol messbar war, konnte die Sekretion von Nor-/Metanephrin nur in 33% dieser Kulturen nachgewiesen werden. Bei den Aldosteron-produzierenden Adenomen war in 68% der erstellten Primärkulturen die Aldosteronsekretion im Kulturmedium messbar (Abb. 19). Die in diesen Kulturen detektierten Aldosteronmengen waren größer als die in den Primärkulturen der gesunden Nebennieren gemessenen Mengen. Bei Primärkulturen aus Cortisol-produzierenden Adenomen konnte im Kulturmedium sezerniertes Cortisol nur in 15% dieser Kulturen nachgewiesen werden (Abb. 19). Die detektierten Mengen waren hier mit den in den Primärkulturen gesunden Nebennierengewebes gemessenen Cortisolmengen vergleichbar. In 86% der Primärkulturen aus Gewebe von Phäochromozytomen war eine Normetanephrinsekretion und in 80% eine Metanephrinsekretion ins Kulturmedium nachweisbar (Abb. 19). Während die sezernierte Normetanephrinmenge der Primärkulturzellen dieser Tumorentität größer war als die der gesunden Nebennieren-Primärkulturzellen, war die produzierte Metanephrinmenge deutlich niedriger.

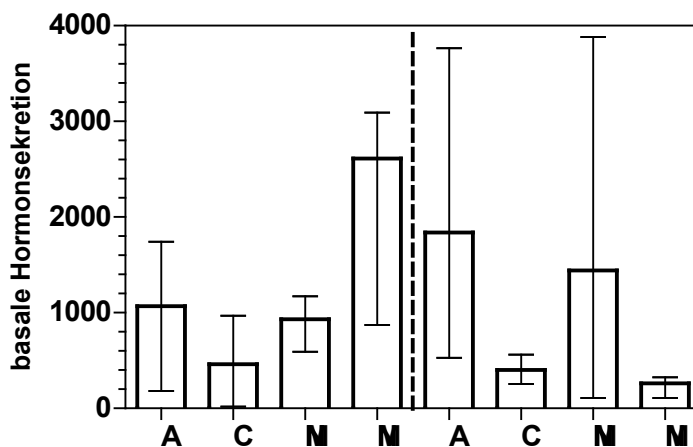


Abb. 19: Basale Hormonsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren mit Messung aller Hormone (links) und aus Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologie (rechts) mit Messung nur der tumorspezifischen Hormone. A: Aldosteron (ng/250000 Zellen); C: Cortisol (nmol/250000 Zellen); NMN: Normetanephrin (pg/250000 Zellen); MN: Metanephrin (pg/250000 Zellen).

4.1.2.3.2 Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion primärer Nebennierenzellen

Die Aldosteronsekretion der Primärkulturzellen aus gesundem Nebennierengewebe war sowohl durch Angiotensin II ($P < 0,05$) als auch durch ACTH ($P < 0,05$) signifikant stimulierbar (Abb. 20A). Dexamethason hatte ebenso wie Somatostatin und die Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 keinen Effekt. Auch die Cortisolsekretion war durch das Testhormon ACTH signifikant zu stimulieren ($P < 0,05$) (Abb. 20B). Hingegen hatte Dexamethason einen hemmenden Effekt ($P < 0,05$). Somatostatin, Octreotid und SOM230 zeigten auch hier keinen Effekt. Keines der Testhormone führte zu einer signifikanten Veränderung der Nor-/Metanephrinsekretion von Primärkulturzellen gesunder Nebennieren (Abb. 20C, D).

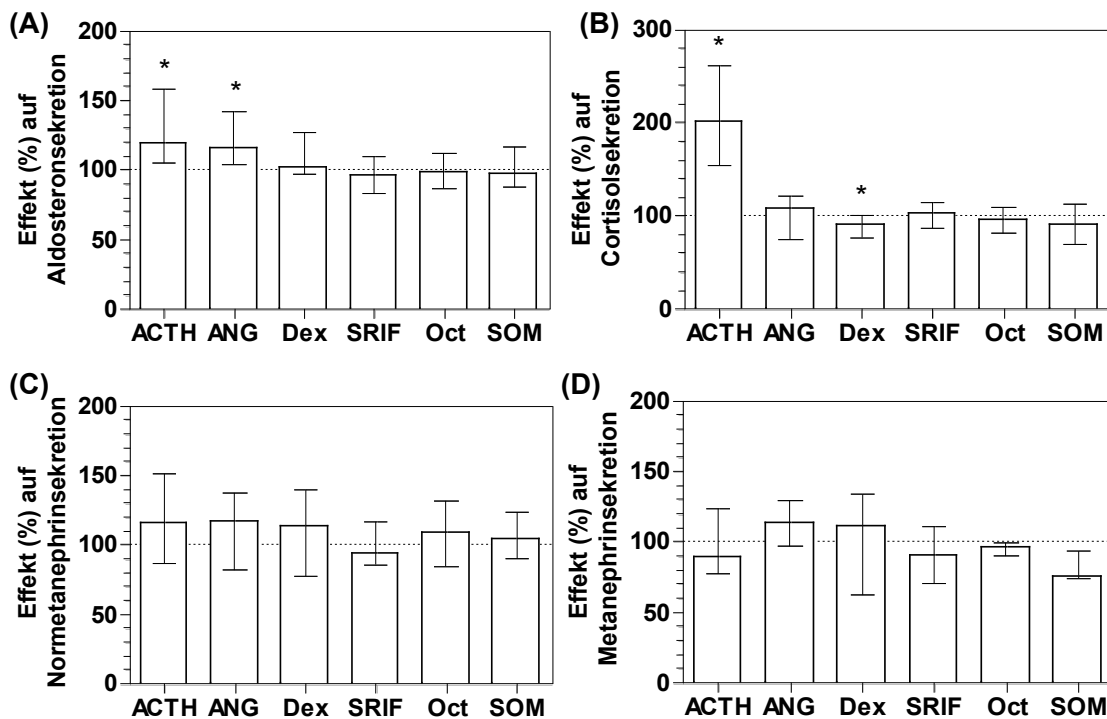


Abb. 20: Effekte der Testhormone auf die Hormonsekretion von Nebennierenprimärkulturzellen. Dargestellt ist der durch das jeweilige Testhormon hervorgerufene Effekt (%) auf die Hormonkonzentrationen (Aldosteron (A), Cortisol (B), Nor- (C) und Metanephrin (D)); *: $P < 0,05$.

4.1.2.3.3 Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Gewebe Aldosteron-produzierender Adenome

Die Aldosteronsekretion von Primärkulturzellen aus Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenomen war durch ACTH ($P < 0,05$) und Angiotensin II ($P < 0,05$) signifikant stimulierbar (Abb. 21). Während Somatostatin selber keinen Effekt zeigte, war eine stimulierende Wirkung der Somatostatin-Analoga Octreotid ($P < 0,05$) und SOM230 ($P < 0,05$) auf die Aldosteronsekretion dieser Primärkulturzellen nachweisbar.

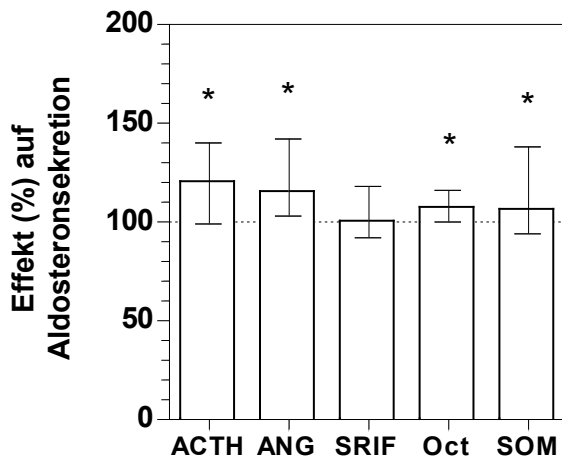


Abb. 21: Effekte der Testhormone auf die Aldosteronsekretion von Primärkulturzellen aus Aldosteron-produzierenden Adenomen. Dargestellt ist der durch das jeweilige Testhormon hervorgerufene Effekt (%) auf die Aldosteronkonzentration; *: $P < 0,05$.

4.1.2.3.4 Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Gewebe Cortisol-produzierender Adenome

In der Mehrzahl (75%) der Primärkulturen Cortisol-produzierender Nebennierenadenome konnte im Kulturmedium kein Cortisol nachgewiesen werden, bei lichtmikroskopisch nachweisbaren adherenten, vitalen Einzelzellen (Abb. 22A). Für die 25% der Adenome mit endokriner Aktivität wurde die Cortisolsekretion durch ACTH signifikant erhöht ($P < 0,05$) (Abb. 22B). Somatostatin führte ebenso wie Octreotid und SOM230 zu keiner Veränderung der Hormonsekretion dieser Primärkulturzellen.

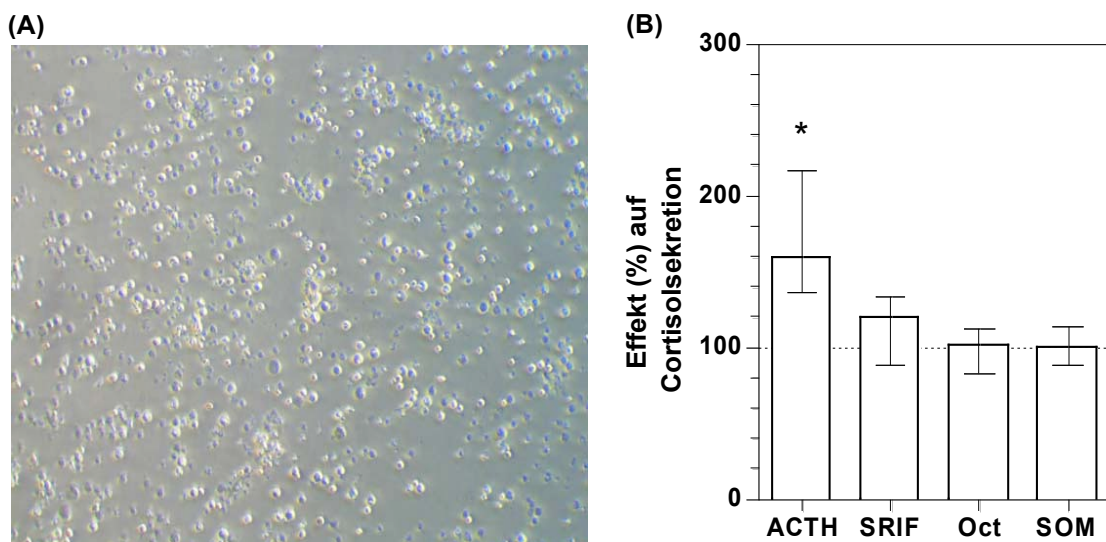


Abb. 22: Primärkulturen aus Cortisol-produzierenden Adenomen (A) und die Effekte der Testhormone auf die Cortisolsekretion dieser Zellen (B). Abschnitt (A): Das lichtmikroskopische Bild zeigt adherente Einzelzellen einer Primärkultur erstellt aus Gewebe eines Cortisol-produzierenden Nebennierenadenoms nach 24-stündiger Testhormoninkubation (100x vergrößert). Abschnitt (B): Dargestellt ist der durch das jeweilige Testhormon hervorgerufene Effekt (%) auf die Cortisolkonzentration; *: $P < 0,05$.

4.1.2.3.5 Hormonelle Kontrolle der Hormonsekretion von Primärkulturzellen aus Phäochromozytomgewebe

Während die Normetanephrinsekretion der Primärkulturzellen aus Phäochromozytomen durch keines der Testhormone beeinflusst wurde (Abb.23A), war eine signifikante Hemmung der Metanephrinsekretion dieser Primärkulturzellen durch Somatostatin ($P < 0,05$) und SOM230 ($P < 0,05$) nachweisbar (Abb. 23B). Auch Dexamethason und Octreotid bewirkten eine wenn auch nicht signifikante Hemmung.

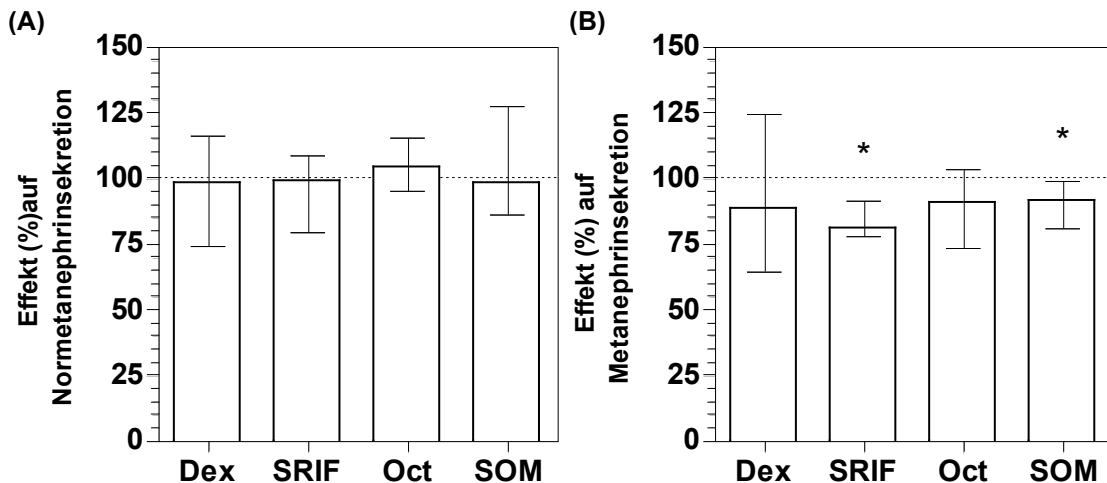


Abb. 23: Effekte der Testhormone auf die Normetanephrin- (A) und Metanephrinsekretion (B) von Primärkulturzellen aus Phäochromozytomen. Dargestellt ist der durch das jeweilige Testhormon hervorgerufene Effekt (%); *: $P < 0,05$.

Bei den hormoninaktiven Tumoren ließ sich erwartungsgemäß keine Hormonproduktion nachweisen.

4.1.2.4 Effekte von Somatostatin und der Analoga Octreotid und SOM230 auf den Zellzyklus von Primärkulturzellen aus gesundem Nebennierengewebe und Gewebe von Nebennierenadenomen unterschiedlicher Ätiologien

Die Effekte der Testhormone ACTH, Angiotensin II (ANG), Dexamethason (Dex), Somatostatin (SRIF) und der Somatostatin-Analoga Octreotid (Oct) und SOM230 (SOM) auf den Zellzyklus der Primärkulturzellen wurden mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) untersucht. Ein limitierender Faktor für diese Analyse war die auf die geringen Mengen an Ausgangsgewebe zurückzuführende begrenzte Zellzahl, so dass eine Untersuchung nur an einer kleinen Zahl von Geweben möglich war. Ein weiteres Problem bestand in der Fixierung der Zellen in Ethanol, um die Zellmembran für das Eindringen des Farbstoffs Propidiumiodid permeabel zu machen. Der Zeitraum

zwischen der durchflußzytometrischen Messung und der Fixierung der Zellen in Ethanol musste möglichst gering gehalten werden, da die Primärkulturzellen empfindlich auf die Behandlung reagierten. Untersucht wurde Gewebe von 17 Patienten, mit verwertbaren Ergebnissen bei 5 der untersuchten Primärkulturen. Es handelte sich dabei um 2 gesunde Nebennieren, 1 Aldosteron-produzierendes Adenom, 1 Cortisol-produzierendes Adenom sowie 1 Phäochromozytom.

Das aus dem FL2-W/FL2-A-Dotplot erstellte FL2-A-Histogramm (Abb. 24) wurde in Hinblick auf die in den verschiedenen Zellzyklusphasen befindlichen Anteile der insgesamt gemessenen Zellen mit dem ModFit LT Programm analysiert.

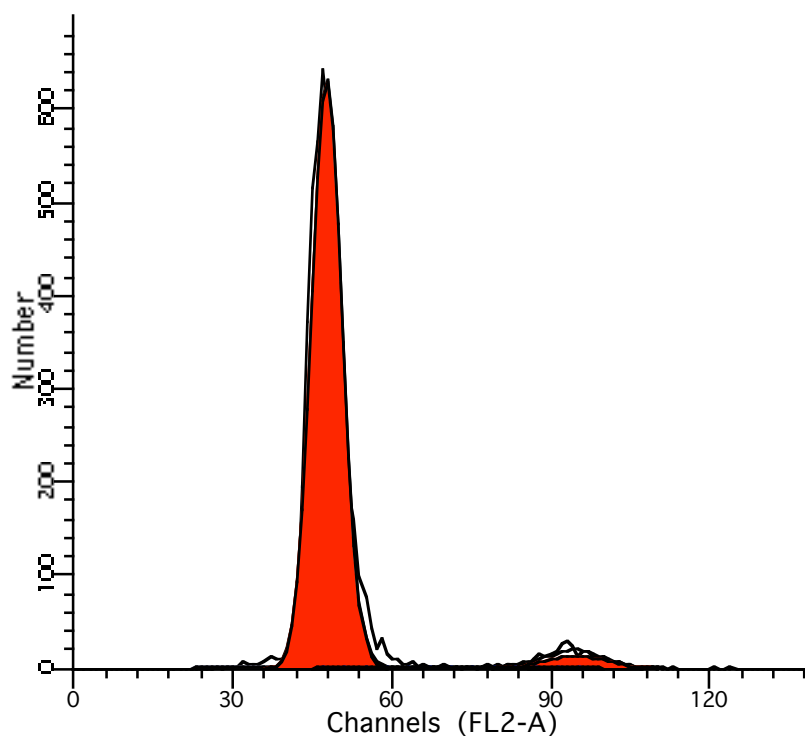


Abb. 24: FL2-A-Histogramm. Dargestellt ist beispielhaft ein vom ModFit LT Programm ausgewertetes FL2-A-Histogramm, in dem die Fluoreszenz der Einzelzellen (proportional dem DNA-Gehalt der Zelle) gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen wurde.

4.1.2.4.1 Vergleichende Zellzyklusanalyse von Primärkulturzellen aus Geweben gesunder Nebennieren und verschiedener Nebennierentumoren

Zum Zeitpunkt der FACS-Analyse befanden sich unter basalen Bedingungen 87% (Median) der Nebennierenprimärkulturzellen in der G1-Phase (Abb. 25). Der Anteil an Zellen in der S-Phase und der sich daran anschließenden G2-Phase lag bei 8% (Median) bzw. 4% (Median). Der Anteil der G1-Phase-Zellen war in Primärkulturen Aldosteron-

und Cortisol-produzierender Nebennierenadenome geringer als in denen der gesunden Nebenniere und des Phäochromozytoms (Abb. 25). Der Anteil der S-Phase--Zellen war in allen untersuchten Nebennierentumorprimärkulturen höher, während der Anteil der G2-Phase-Zellen niedriger als in der Primärkultur der gesunden Nebenniere war. Die statistische Auswertung ergab, dass nur die Mediane der G2-Phase-Anteile signifikant variierten ($P < 0,05$).

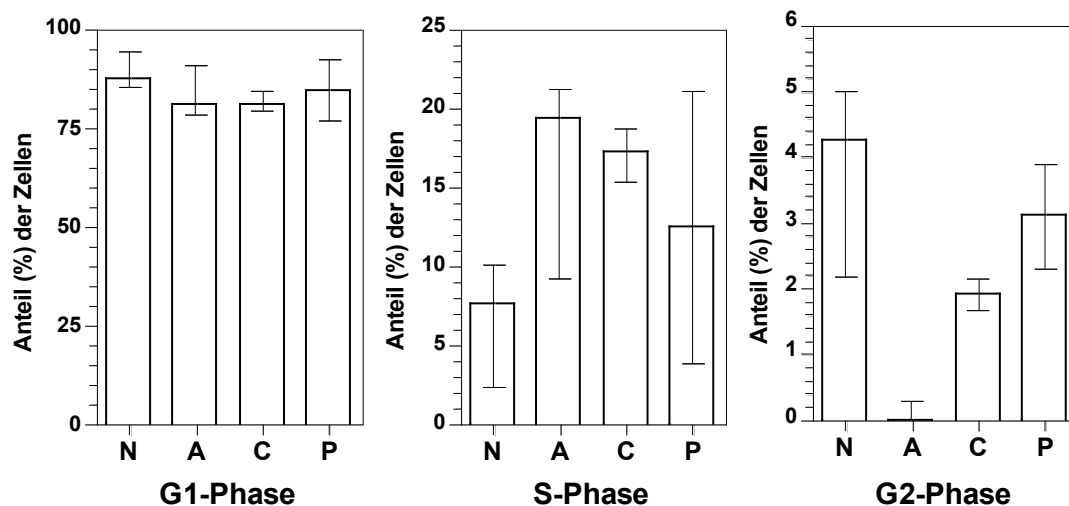


Abb. 25: Zellzyklusphasen der Primärkulturzellen gesunder Nebennierengewebe und aus Gewebe von Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien. Dargestellt ist der Anteil (%) der sich in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen der Primärkulturen aus Gewebe gesunder Nebennieren (N), Aldosteron-produzierendem Adenom (A), Cortisol-produzierendem Adenom (C) und Phäochromozytom (P).

4.1.2.4.2 Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Nebennierenprimärkulturzellen

Die Testhormone ACTH, Angiotensin II, Somatostatin, sowie die Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 hatten keinen Effekt auf den Anteil der Zellen der G1-Phase (Abb. 26A). Die Anteile der Zellen in der S-Phase wurden durch ACTH ($P < 0,05$), Angiotensin II und Dexamethason erhöht (Abb. 26B), bei gleichzeitiger Reduktion der G2-Phase-Anteile (Abb. 26C). Diese Daten sind vereinbar mit einer möglichen hemmenden Wirkung von ACTH, Angiotensin II und Dexamethason auf den Zellzyklus. Somatostatin und SOM230 zeigen keinen Effekt auf die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Bei der Gabe des Somatostatin-Analogs Octreotid ist eine Reduktion des S-Phase-Zellanteils und eine Erhöhung des G2-Phase-Anteils ($P < 0,05$) zu beobachten. Dies könnte einen die Proliferation stimulierenden Effekt vermuten lassen.

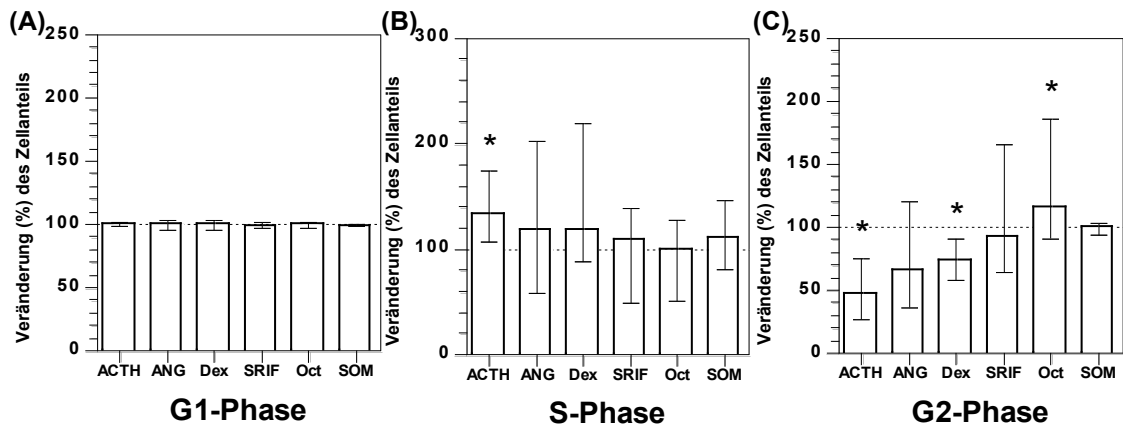


Abb. 26: Effekte der Testhormone auf den Zellzyklus primärer Nebennierenzellen. Dargestellt ist die Veränderung (%) des Anteils der in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen unter Einfluss der Testhormone (ACTH, ANG, Dex, SRIF, Oct, SOM);*: P<0,05.

4.1.2.4.3 Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Primärkulturzellen aus Aldosteronproduzierenden Adenomgewebe

Die Testhormone ACTH und Angiotensin II führten in der Primärkultur eines Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenoms zu einer Verringerung des Zellanteils in der S-Phase und einer auffällig starken Erhöhung des G2-Phase-Anteils (Abb. 27). Eine mögliche den Zellzyklus-stimulierende Wirkung von ACTH und Angiotensin II ist zu diskutieren. Bei Gabe von Somatostatin und Octreotid kam es zu einer ebenfalls deutlichen Reduktion des S-Phase-Anteils, ohne relevante Veränderung der G2-Phase. Das Somatostatin-Analog SOM230 bewirkte ebenfalls eine Verringerung der S-Phase, aber gleichzeitig auch der G2-Phase. Eine mögliche Hemmung des Zellzyklus durch SOM230 ist dementsprechend zu diskutieren.

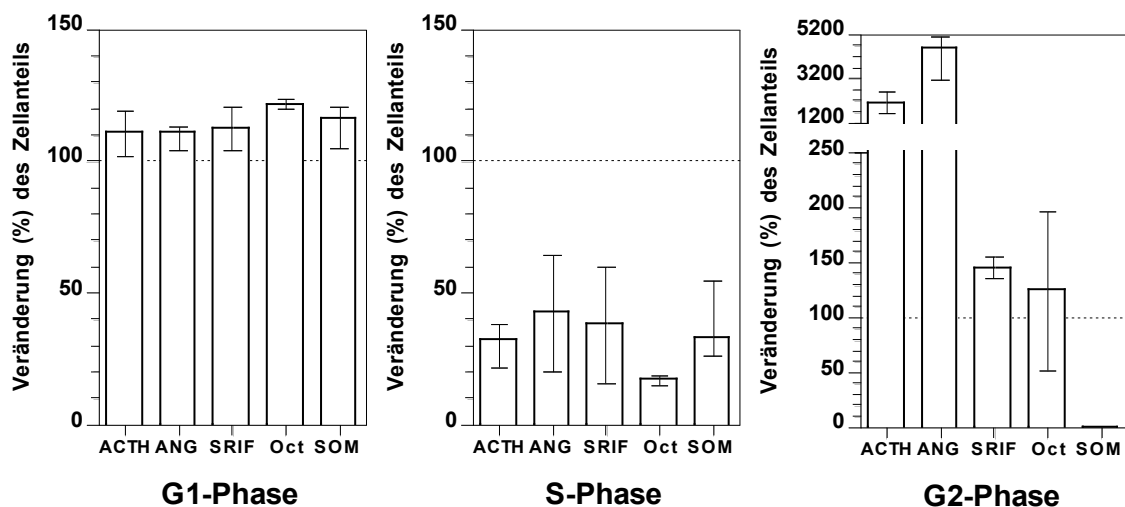


Abb. 27: Effekte der Testhormone auf den Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Aldosteronproduzierenden Nebennierenadenoms. Dargestellt ist die Veränderung (%) des Anteils der in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen unter Einfluss der Testhormone (ACTH, ANG, SRIF, Oct, SOM).

4.1.2.4.4 Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Cortisol-produzierenden Adenoms

Nach Gabe von ACTH kam es zu einer Zunahme des S-Phase-Zellanteils und zu einer Verringerung des G2-Phase Anteils, während der G1-Phase-Anteil unverändert blieb (Abb. 28), auf einen eventuell hemmenden Effekt von ACTH auf die Proliferation von Primärkulturzellen aus Cortisol-produzierenden Adenomen hindeutend. Somatostatin und die Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 führten zu keiner Veränderung des G1-Phase-Anteils. Während Somatostatin und SOM230 zu einer geringen Verringerung des S-Phase-Anteils, aber einer deutlicheren Reduktion des G2-Phase Anteils führten, kam es bei Octreotid zur Zunahme des S-Phase Zellanteils und einer Reduktion des G2-Phase Anteils. Diese Verteilungen könnten auf eine antiproliferative Wirkung von Somatostatin und seinen Analoga hindeuten, wobei Somatostatin und SOM230 vermutlich den Übergang der Zellen in die S-Phase blockieren, während Octreotid den Übergang von der S-Phase in die G2-Phase verlangsamt oder hemmt.

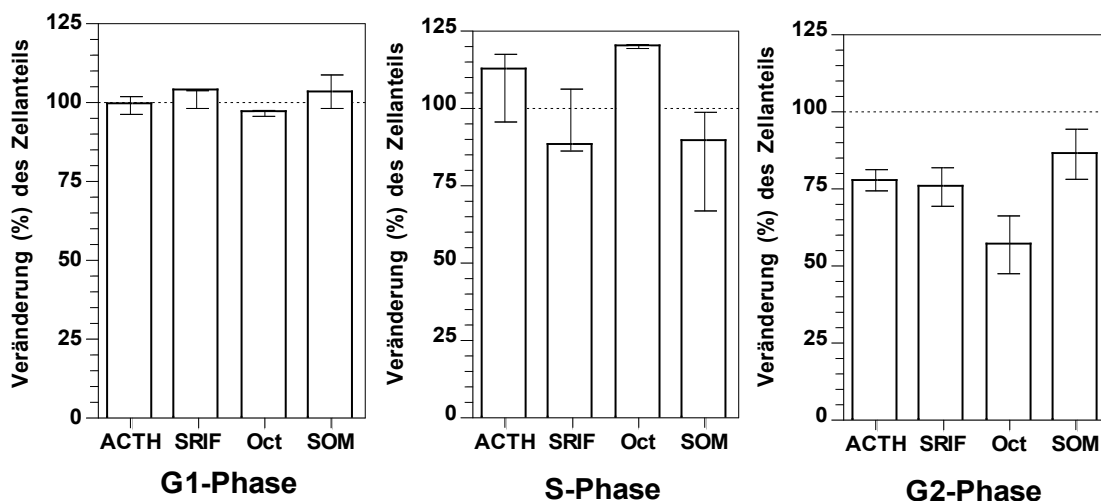


Abb. 28: Effekte der Testhormone auf den Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Cortisol-produzierenden Nebennierenadenoms. Dargestellt ist die Veränderung (%) des Anteils der in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen unter Einfluss der Testhormone (ACTH, SRIF, Oct, SOM).

Hormonelle Kontrolle des Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Phäochromozytoms:

In der Primärkultur des Phäochromozytoms führte die Gabe von Dexamethason zu einer deutlichen Zunahme des Anteils in der G2-Phase-Zellen bei leichter Zunahme der S-Phase-Zellanteils (Abb. 29), auf einen möglichen den Zellzyklus stimulierenden Effekt hindeutend. Somatostatin und SOM230 hingegen führten zu einer deutlichen Zunahme

der S-Phase-Zellanteils, mit parallel leichter Abnahme des Anteils der G2-Phase-Zellen durch Somatostatin bzw. unverändertem G2-Phase-Zellanteil für SOM230, auf einen möglichen die Proliferation-hemmenden Effekt hinweisend.

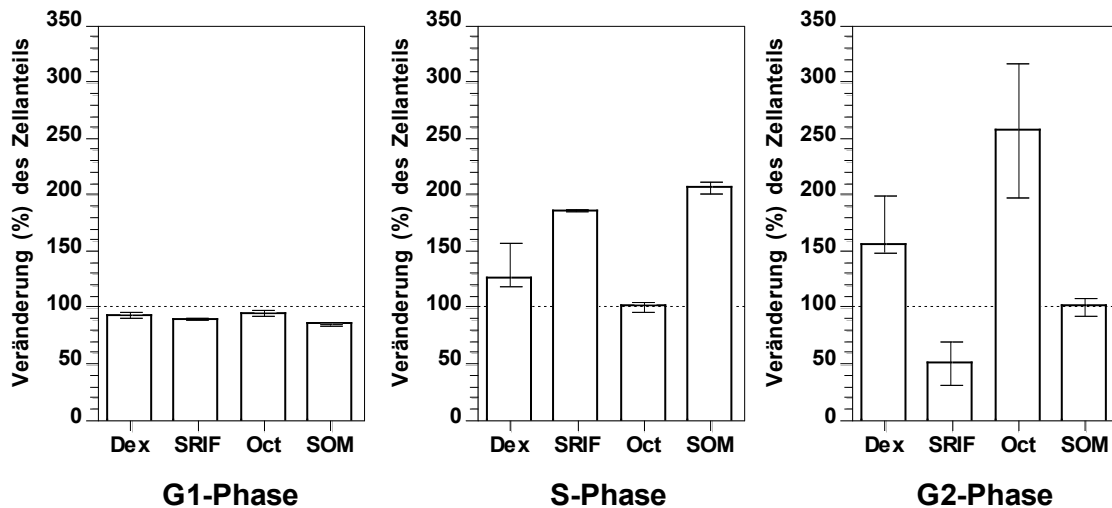


Abb. 29: Effekte der Testhormone auf den Zellzyklus von Primärkulturzellen eines Phäochromozytoms. Dargestellt ist die Veränderung (%) des Anteils der in der jeweiligen Zellzyklusphase befindlichen Zellen unter Einfluss der Testhormone (Dex, SRIF, Oct, SOM).

4.1.3 Analyse der transkriptionellen Promotoraktivität der Somatostatin-Rezeptorsubtypgene (*sst1-5*) in Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen

Zur Untersuchung der transkriptionellen Steuerung der *sst*-Expression in verschiedenen Nebennierenzelllinien wurden Reportergenkonstrukte, welche die in der Hypophyse charakterisierten *sst*-Promotorregionen (78-80) enthielten, transient in Nebennierenrindenzellen des Menschen NCI-H295, Nebennierenrindenzellen der Maus Y1 und Nebennierenmarkzellen der Ratte PC-12 transfiziert. Die Promotorfragmente besaßen unterschiedliche Längen mit identischen 3'-Enden und waren 5' des Reportergens Luziferase in den Luziferase-Expressionsvektor inkloniert worden.

Als Positivkontrolle der Transfektion wurden die Experimente parallel in Rattenhypophysenzellen GH4 durchgeführt, welche eine relevante Promotoraktivität aller 5 *ssts* zeigten (Abb. 30A). Zum Vergleich mit anderen Geweben wurde eine COS-7 Affennieren-Zelllinie mitgeführt (Abb. 30A). In NCI-H295-Zellen ließ sich eine relevante Aktivität des *sst5*-Promotors nachweisen, in Y1-Zellen eine Aktivität aller 5 *sst*-Promotoren. (Abb. 30B). In PC12-Zellen war bei keinem der transfizierten Promotorfragmente eine transkriptionelle Aktivität messbar (Abb. 30B).

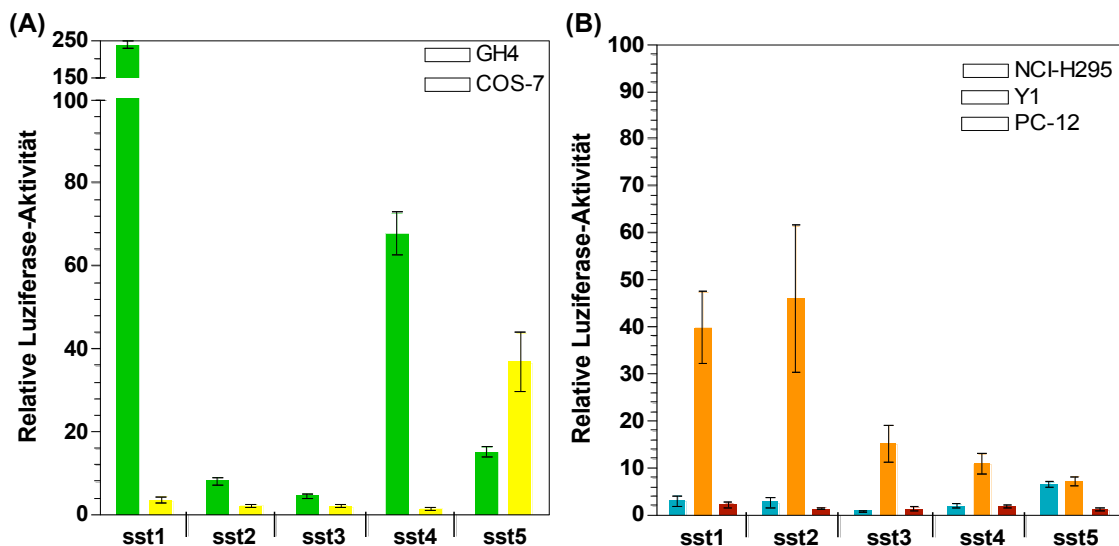


Abb. 30: Aktivitäten der 5 *sst*-Promotoren in verschiedenen Zelllinien. Die Promotorkonstrukte 2834hsst1/luc (*sst1*), 1100hsst2/luc (*sst2*), 2536hsst3/luc (*sst3*), 984hsst4/luc (*sst4*) und 1740hsst5/luc (*sst5*) wurden parallel zu den promotorlosen Kontrollvektoren pGL2basic bzw. pGL3basic in GH4- (A), COS-7- (A), NCI-H295- (B), Y1- (B) und PC-12-Zellen (B) mittels CLONfectin bzw. FuGENE6 eingebracht. Die Werte der Luciferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL2basic bzw. pGL3basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

4.1.3.1 Lokalisation transkriptionell-aktiver Promotorelemente in NCI-H295-Zellen

Um zellspezifische Elemente des *sst5*-Promotors in NCI-H295-Zellen näher zu charakterisieren, erfolgte die Transfektion unterschiedlicher Abschnitte des *sst5*-Promotors (Abb. 31). Das kleinste Konstrukt mit 101 bp 5'-flankierender Sequenz erhöhte die Luciferase-Aktivität um das 10-fache. Die Konstrukte 317hsst5/luc, 991hsst5/luc und 1296hsst5/luc führten zu einer 6- bis 8-fachen Steigerung der Aktivität, während das größte Konstrukt mit 1740 bp 5'-flankierender Sequenz eine 9-fache Erhöhung bewirkte. Bereiche möglicher Bindungsstellen für verstärkende Transkriptionsfaktoren sind somit zwischen Nukleotid -101 und der Transkriptionsstartstelle zu vermuten.

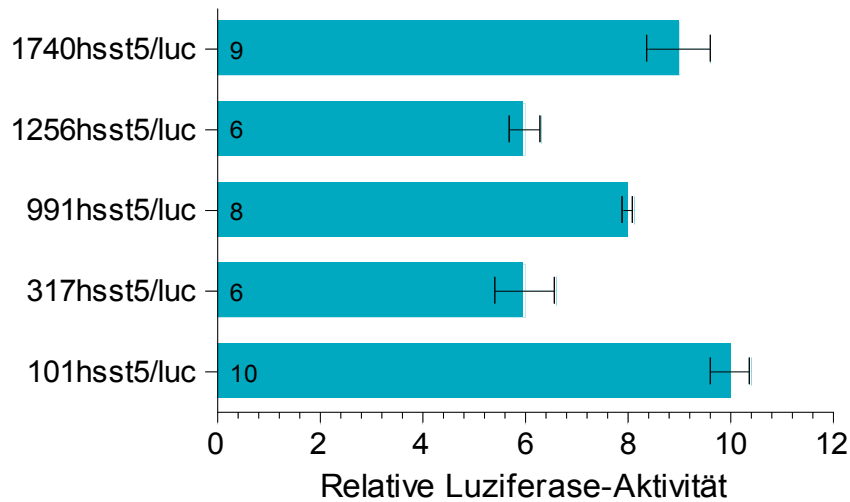


Abb. 31: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst5*-Promotors in NCI-H295-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst5*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende (Position -33 relativ zur Transkriptionsstartstelle), aber unterschiedlichen 5'-Enden (Position -1740 bis -101) und wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL3basic in NCI-H295-Zellen mittels FuGENE6 eingebracht. Die Werte der Luciferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL3basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

Eine Anzahl von putativen Bindungsstellen für in der Nebenniere exprimierten Transkriptionsfaktoren wurde durch Vergleich mit der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX im *sst5*-Promotor lokalisiert (Abb. 32). Im Bereich von -101 bis zur Transkriptionsstartstelle waren allerdings keine Konsensussequenzen von in der Nebenniere relevanten oder *sst*-Gen-regulierenden Transkriptionsfaktoren zu finden.

```

-1741  ↓ ggccagggga ctctgcccc gaactcaggg tggccgatgt_ggggaggggc actgtggggc
                                     GATA-I
-1681  cgacagggtcc cctctctggc _catcaggccc ccaggagggc ccagggtgctt ggaggtgggg
                                     GATA-I
-1621  ggtgtcccag cttgatgttg gggatgtgag tagatccagc gccaccccac ccgcagggct
                                     GATA-I
-1561  gagctcccac tgggcgctgg gccgtgactc gcacaccgga cctgcaccc ctggggcacc
-1501  cagtgattcc agaacagtgg gaccccagag gcttctcagg gagccccaga acatgacaga
-1441  tgggggcccc ggtgcgaggc agtgggagct ggaggaacac agccaggggc tgaggcgaga
-1381  accatgagga tgggtgggag aggctgaggg gaggggcagc agatggagat_gggggaggag
                                     GATA-I
-1321  ttaggggtca caaagggggg tctcagagga tctgccttgg gaagccactg ctgtgggagg
-1261  gtgggagggg tacagcccag gtacctccag agaggatgga aaggcttatg gggcggattc
                                     ↓
-1201  tgggcagggg acctgggacc agcctgcagc ctcccctgag ggctgggcca tggccgcagc
-1141  ctggggagga ggggagggga ccttggggcc aggtgccatg gtcctctaag cactcttgc
-1081  cgatggtaaa cataacacgc gctgcttga gaacatgtgg aaacactgaa acgcttaaag
-1021  gagagaacat ggtcccggta cccggccttc ↓ aagggagctg ctggcgctg ttcaacagga
-961   gccgacccca cctgtgaaca gacggcaggc ggctgctccc atgtcccctc agagaggggc
-901   cctccgagtt ctgctgtcac ctgggggggc ctcaactcat tcagccagtg ggggggctcc
-841   ctgggtcggc acagagtcag gggagggggc tgggggacct cctggtggga aaatgtccg
-781   tgatccccag cctccgcgct cagcgggagg aggcgctcgg tcccgttct tacaaccagc
-721   ggcgctcacg gcgggcccg ggcacagcat cccgggagct tctcaggaat gcagattccc
-661   aggcocctac tgccctggga gtccggggcc cagctogagg cccaggaatc tgctttgagg
-601   acccaggtga ctctgctgcc tgccctgagaa cccacctta ggtgagggac taaggtgtac
-541   ccatggattc atttcagggg aaataaaaag aacaacttag caggtagtct atgcttaa
-481   atgtgtagga tccacaaata aggcattgat aaaaccogag tggagtgtcc tggaaatccc
-421   acgaccacgg acccccctcg ctggggctgc ctgccgccc caccagcctc cacacacca
-361   cttatctcca caaccccagc ccacccctca gagacgtctg cagagcccc gaccctctcc
                                     ↓
-301   ccttgaacaa ggaccctcca ccctcttcag actctcgacg agggaccccc tggactcctg
-241   ctggcggcag gacccccacc ccaagctggg gtctaccaca gagcggacag caagaaaata
-181   ggggtggggg gcaggcgatc atggggtcac tgccagtggg accagggctg tgggcgagt
                                     AP-1
-121   cgccaggggt cccggaggcc ↓ agacgtggga cccgggagtc gagcaggtga agcggccctg
-61   ccccgcccc accaggcact ggccccgcc ccgccccgcc ccgccccctc ccagccggcg
-1 c

```

Abb. 32: Darstellung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *ss15*-Promotor. Bindungsstellen sind als gestrichelte Linie unter der Sequenz angegeben. ↓: markiert 5'-Ende der Promotorfragmente.

4.1.3.2 Lokalisation transkriptionell-aktiver Promotorelemente in Y1-Zellen

Bei relevanter Aktivität der untersuchten Promotoren aller 5 *ssts* wurden in weiteren Transfektionsexperimenten unterschiedliche Promotorabschnitte zur Charakterisierung zellspezifischer Elemente untersucht.

Für *sst1* führte das kleinste Konstrukt von 342 bp 5'-flankierender Sequenz zu einer 43-fachen Erhöhung der transkriptionellen Aktivität, während beim nächst größeren Konstrukt von 467 bp eine signifikante Erhöhung auf das 416-fache nachweisbar war (Abb. 33). Die Aktivitätserhöhung sank beim Konstrukt mit 656 bp 5'-flankierender Sequenz auf das 187-fache und stieg beim Konstrukt 1151*hsst1/luc* wieder auf das 266-fache an. Die größeren Konstrukte von 1495 bp (98-fach), 1813 bp (99-fach) und 2834 bp (150-fach) führten im Vergleich zu den kleineren Fragmenten zu einer deutlich geringeren Erhöhung der transkriptionellen Aktivität. Verstärkende Elemente binden vermutlich zwischen -467 und dem ATG-Startcodon, inhibierende Elemente sind im Bereich zwischen -1495 und -1151 zu vermuten.

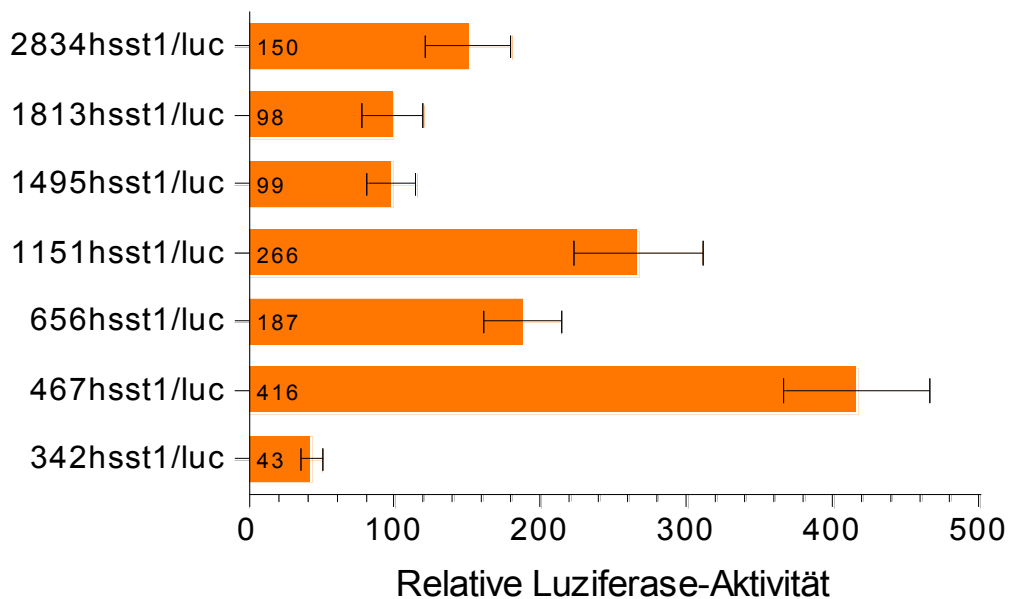


Abb. 33: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst1*-Promotors in Y1-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst1*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende an Position -110 relativ zur Transkriptionsstartstelle, aber unterschiedlichen 5'-Enden (Positionen -2834 bis -342). Die Promotorkonstrukte wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL2basic in Y1-Zellen mittels CLONfectin eingebracht. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL2basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

Durch Vergleich mit der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX konnte eine Anzahl von putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in Bereichen lokalisiert werden, welche zuvor in der Promotoranalyse als Bereiche möglicher relevanter Bindungsstellen eingegrenzt wurden (Abb. 34). Der in der Nebenniere exprimierte Transkriptionsfaktor GATA-1 wies dabei putative Bindungsstellen an Position -1332 und -213, während putative Bindungsstellen für Pbx-1 an den Positionen -1292, -1206 und -45 lokalisiert waren. Außerdem wurden putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SREBP an Position -1224, AP-1 an Position -296, c-Ets an Position -192 und für C/EBPb an Position -95 identifiziert.

```

-3000 cccctggcaa ccactaacgt accttgtctg tatgtattgc ctgccctggg catgtcatat aaatggaatc atgccacacg
-2920 tggccttttg tgtctggctt ctttcccttt gcatagtgtt ttcaagcttc gtctacgctg aagcagggtat tagtacttca
-2840 tttcttttta tggttgaata ctattccatt gtatggatat accacaattt attaattcag caattgatgg atattttggat
-2760 tgtttctaat ttttggctat tatgaaatag gctgctatga atgttcatgc acaagttttt gattaaacac ctgttttcaa
-2680 ttttgaggag taaatagaag tggaaattgct ggctcatatg gtcattcttt taaactttta aactttttta gcaattgcca
-2600 aaattttttt ctgaagtgtc tgcacatctt tttattccca ccagcaatgt atgagtgttc taattttctc acattctcac
-2520 taacgtttat tttttgtttt taaaaatggt cttatagcca tcctagtggg tgaaaagtgg catctcaaaa aaataaaaat
-2440 aaaaggcatt ctcacgtcag gtcttaagtt ttcttctttt gtatatgagg ccacaaaatt gagagaaatt ttccctaaga
-2360 tgagctgaaa gtgaatttaa tgaattctg aacaacagag ctgtttttca ctgactcca tcacacactt cccaaagagc
-2280 aaccatgac aaagccaagg catctaaata atgactgttg aaatccaagc tcccagaggt acagatagtc aggtgtcttt
-2200 agtcagtgat tggcagaggc atctaaggca ttatatgagg ctggcctagt aaaatgctct tctgggattc tgggacaata
-2120 cccactctct tttcttttaa cttaatgaac atttatttct tctccatag tgctgtattt gtaaagaaa aataaatata
-2040 actaaacacc aattgtacat tccactttaa agaaggcaat ttgttcaggt aaaataatgg gttaaaacag tttcagcctg
-1960 atgaaatttc aaattccatc ctagcacatt cctcattaat aattgcacac attcctatga aagtctgtca tttattttag
-1880 tctttgattg ctatcatcaa cacactacag aagtatttct ttcctgttca agacaattag ttttgggaac taaaacacat
-1800 gcagtatatg taagtgatta cctggataaa gcaacagggc attaggaat atactttttt gtttttaatt tctgcatcca
-1720 tttcttcatt ctggaccggt acagatagcc tccatgagga gtttagcctc tccctggagt aaactctact gagaggagga
-1640 aaactgagac ttacagtaca gcgggcacag cctggttgag gagaaggaga aactaaggaa aaactggaga cagcaaagct
-1560 tgaaggaggc agagcactaa gctgctgcgg gtcactcttc ctgtgaacag gctagtttca aataaaggct tgcagggatc
-1480 ttaccgagca aagcaacggt tatgaaaagg aacagggaag ttgcatggag tgtgattctt ccttccacag gaacagtggg
-1400 aaagccaaa agacctaga gtaagaatgg tggtaagtcc cagggttctg ttaaaatcct gataacggaa catacattct
-1320 ttcttacggg aaaaccggtt tgattcttaa atgaagtcag tgagcttcag gcttgctac attgatctc cctaagtgtt
-1240 tgggcacggt acccagagcc agctcacaaa tcaagcctca gaaagagctg acatcctagc tcttcccgga aaaactcgaa
-1160 tgtgcctcgt ccgttctctg gggttggtgac aggtctggtc atgcacggc ggcagctcct cacctggatt tagaagagct
-1080 ggcttcccc cccgcccagg cctttaaact ctctctgccc agaaccgcc aactctccag ggtacaaaat acagcagggg
-1000 cgcgggtgga gcccttccaa gcgggcgcagc cttatcttcc ccgagtgaac acctaggtgg attcccaaca ccgcgctggy
-920 cacgtttctg gagggagtct caagctctcc cagagctccc agctgcgctg cctcgtttct gcagtcgata ttcctgtggg
-840 agacacgggg ggctctgagc gctacgagct ttattaagag atttgcgaat gggtcactca ggctcctgaa cactcccaat
-760 agcctaagct gctctgctgt ttatagcgca gaagccccta acgcacgggt gttgtccttt cttctcataa cgctcgcagc
-680 ttaggggccag tttcccgcat tctaagagta attgctggg cactctgctt ggggcccagg ccaaagaagg gagttggctt
-600 gcgcgaagat cgtcaacctg ctaacagacc gcacatgcac tttgcaccga ccatctactg ctcagtctgg aggttgcgca
-520 ctttgggtaa ggagggcccc gaacttccct ggcggtctg agctgcaagg caagcgaggg tgggaaagg gaatttaggg
-440 ttctggactg cgggacggga gagaagctgg ggtctccaga gaaaaggca gcaatggagg gaaactgaga tgaactccag
-360 acatccatgt tcatggatcc gtttgagtct ttgctttggg taggagagga gtggaatgag acagaatcta tacctttggt
-280 tcccaccgc cctccagtaa ggccgaggaa ctctcttggg tccctgaga gcaagaggca gatggtgctg cgagggaaac
-200 cgggaagag ccactaaagt tgagcagagt gcaggactgg gaagaaaaa aatggggggc gggggggaca agcccctat
-120 gtgctctct cctcttctcc accccaccct ctttttctgt agctgctgac gcgctggtgg tgcctattaa tcatcttcca
-40 gtccagagcc gcgccagtta atggctgtgc cgtgcgggtg

```

Abb. 34: Darstellung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *ssII*-Promotor. Bindungsstellen sind als gestrichelte Linie unter der Sequenz angegeben. ↓: markiert 5'-Ende der Promotorfragmente.

Bezüglich der Aktivität des *sst2*-Promotors in Y1-Zellen zeigten Promotorabschnitte mit 163 bp (52-fach), 252 bp (50-fach), 325 bp (63-fach) und 465 bp (65-fach) 5'-flankierender Sequenz eine vergleichbare transkriptionelle Aktivität (Abb. 35). Eine gesteigerte Aktivität war bei Verwendung der Konstrukte von 707 bp und 905 bp (96- bzw. 99-fach) messbar. Bei den größten Konstrukten (993 bp bzw. 1100 bp) erfolgte eine Expressionssteigerung des Luziferase-Gens um das 72- bzw. 89-fache. Für die *sst2*-Promotoraktivität relevante Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind dementsprechend im Bereich zwischen -707 und -465, sowie zwischen -163 und dem ATG-Startcodon zu vermuten.

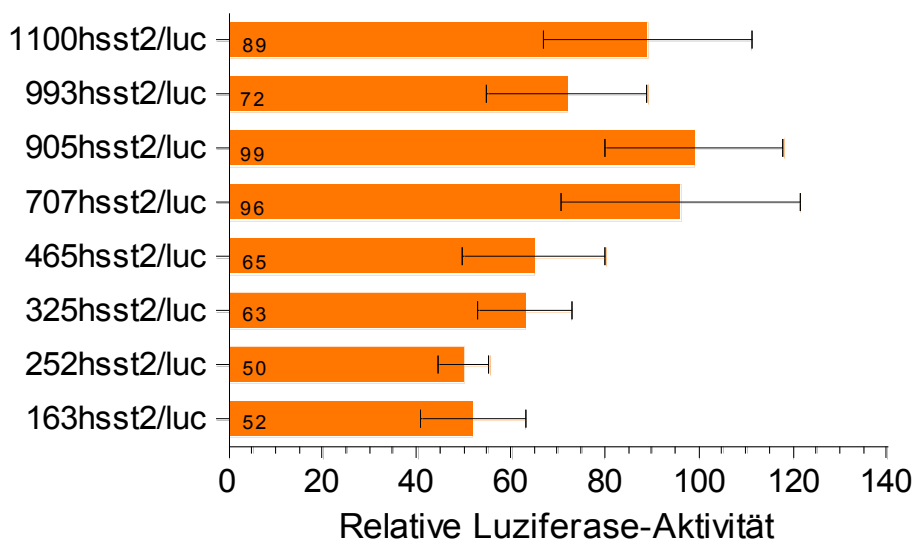


Abb. 35: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst2*-Promotors in Y1-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst2*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende an Position -30 relativ zur Transkriptionsstartstelle, aber unterschiedlichen 5'-Enden (Positionen -1100 bis -163). Die Promotorkonstrukte wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL2basic in Y1-Zellen mittels CLONfectin eingebracht. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL2basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

Die Suche nach putativen Bindungsstellen von in der Nebenniere exprimierten oder an der transkriptionellen Regulation der Somatostatin-Rezeptoren beteiligten Transkriptionsfaktoren in der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX in diesen Bereichen ergab eine putative Bindungsstelle von GATA-1 an Position -104 (Abb. 36). An Position -921, -667 und -141 waren mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor C/EBP lokalisiert. Des Weiteren fanden sich putative Bindungsstellen für Oct-1 an Position -689 und für AP-1 an den Positionen -610 und -484.

```

-1470 tccaggcccc caacccccgt gatatttttt gaatggctgt atatcaatca ttaattatg
-1410 ggatgaacta ttgttttaga tcttaagcca agccaatagt gctccaatta tttctcagc
-1350 aaggaagtaa cacaggagtc agttgcttca aaccaaagcc cagttatcag ccgttcggtc
-1290 tctaggccac tgaggagcag aggggatgcc ttgagacgtg caaaagactt ggggccaggt
-1230 ggctgtgtt cacatcccag ctccaccaat tatgtgcaag agaatggggg gagctcetta
-1170 aactctctta agcctcagtt tccacatctc taaaatgggg gtaattatcc ctaccacata
-1110 ggacagttgg ↓ggagatcaag ggactcgtga atgtgaatga attatatcag tactggaagc
-1050 cttctgctta cttctgtgaa agagcttgtg tcccacacct gcttcccgtt tttgtccgta
-990 attagaaaat ggagggcaaa tttttgggtg ttacagcatt gggagcagca tccccttagg
-930 gaatttgga aagagctctt gaggaagtca agcattaggt attggaaaac aaaaatagaa
-870 gaaaaacaaa aaataaactg aagcctacat ttcaaaaatg aaagcaaac agacttttat
-810 ttttaatact gaagactata aattgtttca ccacgtaggt agatttcaat aatcagaga
-750 taatgagatg gtagaggaaa acatgggggg aaacaactta cgagggtccc attatgagcc
-690 caacgcaagg ctaggcattt tcacatatat tccatcattt aaccttcattg acgccccat
-630 gtgaagaaat aagagtcaga accattaagg accaggcatg tggtcacacg ggctcagcag
-570 tggaaaccgg tttgttctgc ctctagagtc tgggtttttt ccactatggc attttcagaa
-510 tggaaagact ccaaggcagt cagcaagtca gcatagattt cctggtaggg aagaggccag
-450 gaatgtcagt gtcagacct tctgagggtca ggcgctgaac ttctccaagc tctgccttc
-390 tgcagtttag atcagtcaac ttcttagggg tcaaagtatg tgctttttga agccacagcc
-330 ctcccgcaca tgtgcgtcag cagatgatgg ctgaaccaa acccttcctt actattggaa
-270 aaacaactca aaaagtctgc aactgatga ggaactctag agcttaatgt tgatgtggaa
-210 agataataca tttttcaatt taagagtatg tctgagaggc taaaccagaa atgtgtaaat
-150 ttggtgagac ttaaacagc ctgtgaccga cgggccaatc ttcctctttt ccttcagat
-90 gtcacactgg atccttgccc tccagggtcc attaaggtga gaataagatc tctgggctgg
-30 ctggaactag cctaagactg aaaagcagcc ATG

```

Abb. 36: Darstellung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *sst2*-Promotor. Bindungsstellen sind als gestrichelte Linie unter der Sequenz angegeben. ↓: markiert 5'-Ende der Promotorfragmente.

Nach Transfektion der unterschiedlichen *sst3*-Promotorabschnitte war bei den kleineren Fragmenten mit 182 bp bis 1033 bp der 5'-flankierenden Sequenz nur eine sehr geringe Erhöhung der Aktivität (3- bis 6-fach) im Vergleich zum pGL3basic messbar (Abb. 37). Die Promotorkonstrukte 1444hsst3/luc, 1896hsst3/luc und 2536hsst3/luc bewirkten dagegen eine deutlichere Aktivitätssteigerung auf das 13-, 10- bzw. 15-fache.

Bindungsstellen verstärkender Elemente sind somit im Bereich zwischen -1444 und -1033 zu vermuten.

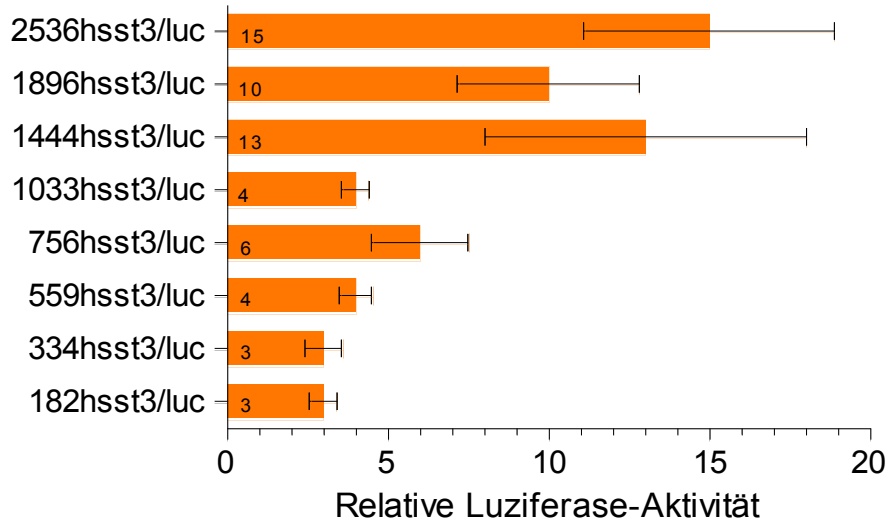


Abb. 37: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst3*-Promotors in Y1-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst3*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende an Position -29 relativ zur Transkriptionsstartstelle, aber unterschiedlichen 5'-Enden (Positionen -2536 bis -182). Die Promotorkonstrukte wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL3basic in Y1-Zellen mittels CLONfectin eingebracht. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL3basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

Putative Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, welche in der Nebenniere exprimiert werden oder möglicherweise eine Rolle bei der transkriptionellen Promotoraktivität der *ssrs* spielen wurden, mittels Vergleich der Sequenz des *sst3*-Promotors mit der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX ermittelt (Abb. 38). In dem durch die Promotoranalyse festgelegten Bereich möglicher relevanter Transkriptionsfaktoren wurden putative Bindungsstellen für GATA-1 an Position -1410, für C/EBPb an Position -1172 und für Oct-1 an Position -1149 lokalisiert.

```

↓
-2536 ttggcctcga ctctccttat ctggtaatgt ctttcctcct cctggcatag ggagggcgtc
-2476 tttcacaagg cgttttagct cctgctttca ggaagaaaag gggagggtcag agcccccttt
-2416 ctgcacctgc tgtttctgaa gtgccttttag tgcagagaaa tcaatatgcc agagtgggtgt
-2356 attctgggggt ggcgtgtcct gaaccccttc agtggcctgg ctcagacggg agcctgtgga
-2296 tggagagcag tggacgggtt ccaggctgga gcagtaaggc tcggtgctgg ggagggtgtgt
-2236 ggcagggggc acactgatga gcattcactc ctttaacctt cgcaagaacc cccaggccag
-2176 gcagtcaggt gtgtacaatc tactgaagga gaaaaccgaa gtttaagttc agtgcacggc
-2116 aggggtagag ctggggctca aactcccttg tccagtcttc agccccata ccccaacctg
-2056 caggaataag tgaatgaata catgagctg ggtacgcctg gggcacagag gagcgagtga
-1996 aatcagcaga ggaggaggcc cgcgcaggcg gcaggaatca aggatgcagt gccagggtggg
-1936 ctgcggcgag agagctttat tctgagggca gtgagaagcc gtgggtaggg gtgggtggtc
-1876 agtgccatgg aaaaccacc cttgacctg aggacacgct cccaggagcc caccacacc
-1816 tcatgaactt gtacggaca ggacaatggg aggctgagac ctggagcaag ggccttgtcc
-1756 cgggcacaag gcaaaggac gggcagcgtt aagagaccag gccggctccg gctggaagtg
-1696 ggtgtgtcct actgtgtgct gccgcctgca tggtagcacc tctggatgca tccaacttc
-1636 agttctctgc agtgccaggt acctagtgc aaaggaggtc cagccctggg cccagggaat
-1576 ggcccagttt ggaaagcagc ctaggtagc cctggcacat agtaggtgct cagccaagac
-1516 gtgtgtcctt ttccttccg tctctgactg ttccttctt tatcactcct gtgctgaggc
-1456 aggaatcagc acaggcaggg gcacggcacc ccaagacatc tgggcctgtg ctcaggactg
                                     GATA-1
-1396 tacggcagag tctcttagac caaagatcag taaatatggc ccacggggca aatcccacc
-1336 actgcctgtt tttgtacagc ctaggagctg agaatggttt ttacggatga acatttgcaa
-1276 tcggtttgat gaaacactaa ctctaaactc caattaagca aaagggtgat tctgtaaaaa
-1216 gaactctatt cttctcatga gtggacctac atpcaaaaat actggcctca attattatta
                                     C/EBPβ                               Oct-1
-1156 ttctatttttg agttttgtca gttacaaaat agtaaaaatc tgttttctca ctgcacaatg
-1096 attttgccct caaagcctaa aatattgggt ctctgttctg tccctccact cctcaccctg
-1036 cctggggctc tccagatgta accaatccca ggactaatga cccccaccg gcctccccag
-976 tggtcctgtc tggggcgggt gtgcccact gcaggcctgg actgtggact cccgggctgg
-916 ccagccccac acccagcctt gccttgggac acagctgctg ccccggggga cctgtgccgc
-856 agtggcctca cgagctgctc tggctactgg ctggcagcct cggtccccct gagcactgag
-796 cacattcttc tctccaactc cctgcaggag ccaaggccag cgggcgtggg tggctgaaat
-736 ctccccggtg acagggctct gcccccctc gctccccctc cgggcctcct cccttaacct
-676 gcacccccgc cccaccccc acacctgctc tccggccctc agccccctcc tgettactcc
-616 ctccctcaag ggctccatgt caccatctgt ggcacagtcc ctctctgtca ctctccctgc
-556 cccccctca ttctccttc tccctcctgc ctctctctgc atctctccct ctccccctg
-496 tctctctcc tctcttctc tctctcttc tccctgtcac gcatctctca tcaactcccc
-436 tcattctgcc tttcctccta ctacaggtct cctctccctc tgcctctctc tctctcccc
-376 tccctcttct tctctctctc tctttctcca cctcctcccg acccccttct cctctattt
-316 ctattggctt ctgtgtccct tgcctccctc ttctcttct caccctggga agcttctccc
-256 cctatcctt gcccctgccc cccaggatg tgcctgggag atgggggggtg acgtaccagg
-196 ctctgggttg gaagtcaggg ccggagacca gatgggagag gctctgtgga cagccgtggc
-136 cgagggcctg ggagggaaac tgagcccgca agcggctctg aagtgggtgc cttgtgggga
-76 ccctagttag gagtgcctct ggggcacctg gggactgggc agggagaggg gacagcagaa
-16 tgataaccag cctggc

```

Abb. 38: Darstellung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *ss3*-Promotor. Bindungsstellen sind als gestrichelte Linie unter der Sequenz angegeben. ↓: markiert 5'-Ende der Promotorfragmente.

Bei den transfizierten *sst4*-Promotorkonstrukten führte der kleinste Promotorabschnitt mit 209 bp 5'-flankierender Sequenz zu einer nur sehr geringen Aktivitätserhöhung (5-fach), während das nächst größere Konstrukt 266hsst4/luc eine deutliche Steigerung auf das 18-fache zeigte (Abb. 39). Die transkriptionelle Aktivität ist beim Promotorkonstrukt mit 363 bp 10-fach und beim Konstrukt mit 459 bp 29-fach erhöht. Der größte untersuchte Promotorabschnitt von 984 bp 5'-flankierender Sequenz führte zu einer 13-fachen Expressionssteigerung des Luziferase-Gens. Verstärkende Transkriptionsfaktoren sind somit zwischen -266 und -209 zu vermuten.

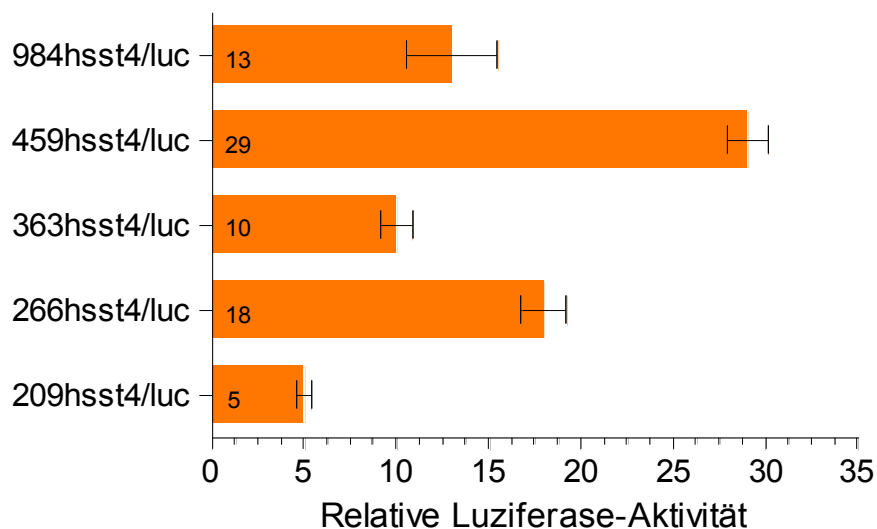


Abb. 39: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst4*-Promotors in Y1-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst4*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende an Position -25 relativ zur Transkriptionsstartstelle, aber unterschiedlichen 5'-Enden (Positionen -984 bis -209). Die Promotorkonstrukte wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL2basic in Y1-Zellen mittels CLONfectin eingebracht. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL2basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

Durch den Vergleich der *sst4*-Promotorsequenz mit der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX wurden im eingegrenzten Bereich möglicher relevanter Bindungsstellen keine Konsensussequenzen von Nebennieren-spezifischen oder *sst*-Gen-regulierenden Transkriptionsfaktoren lokalisiert (Abb. 40).


```

-1520 tcaactatgg ggctgcaactg gtgctgatca tgcccgctgt cccatcccac acctggataa
-1460 acagcagtgg gcagcttccc ccacccccca gtcttagaaa ggctcctcc agttgcaaca
-1400 ggactccctc ctccccatcg ctgtcccagc caccagcgg aaagctgaga ccccccccc
-1340 cagggtggcca attttagacc cactaaaggc ctttctgggc tgtactgggg gctaaagggg
-1280 gccaccatcc cacagagaag gggccaaaga cagccaggat cctaaaagtc agagctactt
-1220 taagaataac tttcccaggc caatccccag ttcaggaaag ttctgtgccc ctgtgcccagt
-1160 tagagggact agggctggag cgggcggtg ctctgggtg tccagtcag gagccagtga
-1100 actcactatc tctggagttt agcagaagaa ggtaattcc aggccggaac cccttttttt
-1040 cccgactttt caaccacagt cctccccagg cacattttag tggccagggg tgggagaccg
-980 cggataatga ctgaaccagg tcacaggggtg aaggttctga gatgtccggc tcccgtagct
-920 tctgccagtt cccgagggag ctagcacagg cttggccttc tttgggggca tttctgcctc
-860 cacctgtccg tctccattcc ttgtgcccac agcacctcag ctgctcggac acagaagtta
-800 aaaggtccgg catctgcaact tgtccagagt gggttgggga gcagagaaag gagtgggtgag
          GATA-1
-740 ctgtggggaa aactggacat cctgacagac ctgaaattca ccaagccgcc agtgggaagcc
          c-Ets
-680 tcaggttccg cctctataaa agggactcag ccattgtgcaa ggatgggtcg tcgagaggat
-620 taaagggcag ggtgagggga tgtcaagtgc aaggcaagtg gtccaagctt ccaggtggtc
-560 cctgaccagt tcggggcaca tctttacca aaggaggac tccgggaccc ccagccccgc
          c-Ets Oct-1
-500 cggcgagac cccctgtagc aaagcagggg actggacctc aaagggctgc tggggaagac
-440 gggatctgaa tagaggtctg aaggaaagaa gccaggcggg ggacccccggg agggccggac
-380 ggggctgggg gtgctgttga cactggagcc ggactggaga cctgggaacc tggggcagag
-320 tcggcagcgg ggagggggcg accgaggtgg gaaaacgggg cggggccgga gacgactcca
-260 gggctgggtg aggcgctgac ccccaggagc tggggtgccg aggggcgagg gccacagcgg
-200 tgcgagccag tcggggcgccc gcgcggtggg gcgcgcggcg cggggattgg cgggcgctcc
-140 ccggtgcccg cagctcttca gcgtagccgg gaagagccgc gcgtctgccc gccagcccc
-80 gccctgggce cggcgccga gctctctggc gcagcgctag ctccgcccgg ctccagctgcc
-20 ctgcgcccgc acccctggtc ATG

```

Abb. 40: Darstellung putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *sst4*-Promotor. Bindungsstellen sind als gestrichelte Linie unter der Sequenz angegeben. ↓: markiert 5'-Ende der Promotorfragmente.

Das kleinste *sst5*-Promotorfragment mit 101 bp 5'-flankierender Sequenz wies eine relevante 99-fache Steigerung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum pGL3basic auf (Abb. 41). Die weiteren größeren Promotorabschnitte mit 317 bp (59-fach), 991 bp (72-fach), 1256 bp (55-fach) und 1740 bp 5'-flankierender Sequenz (42-fach) zeigten verglichen damit geringere Aktivität. Bindungsstellen verstärkender Elemente sind somit im Bereich zwischen -101 und der Transkriptionsstartstelle anzunehmen.

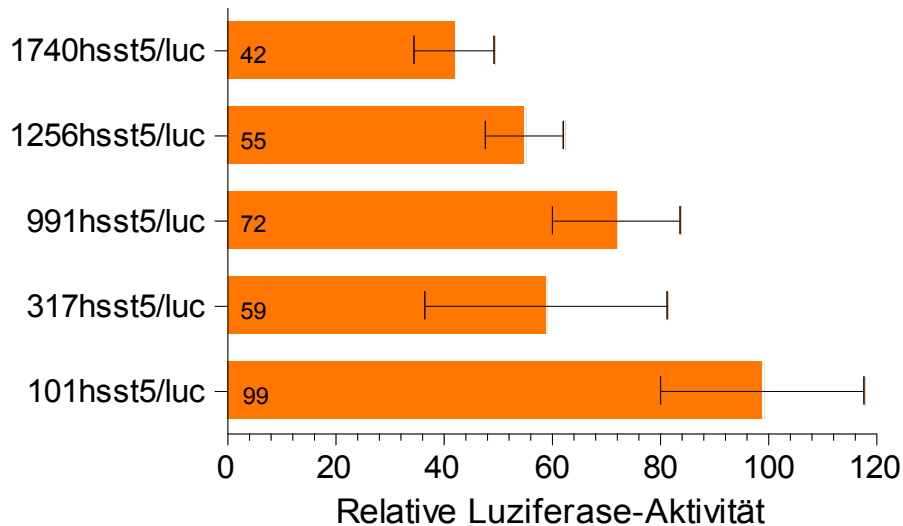


Abb. 41: Transkriptionelle Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte des *sst5*-Promotors in Y1-Zellen. Die transfizierten Promotorkonstrukte des *sst5*-Promotors enthalten unterschiedliche Promotorabschnitte mit gleichem 3'-Ende an Position -33 relativ zur Transkriptionsstartstelle, aber unterschiedlichen 5'-Enden (Positionen -1740 bis -101). Die Promotorkonstrukte wurden parallel zum promotorlosen Kontrollvektor pGL3basic in Y1-Zellen mittels CLONfectin eingebracht. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden relativ zur Aktivität von pGL3basic als -fache Erhöhung ausgedrückt.

In den mittels Promotoranalyse zuvor bestimmten Bereichen putativer Transkriptionsfaktoren konnten nach Sequenzvergleich mit der Transkriptionsfaktor-Datenbank TFMATRIX keine Bindungsstellen für Nebennieren-spezifische oder *sst*-Gen-regulierende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Abb. 32).

4.2 Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a

4.2.1 Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a in der Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren im Vergleich zu anderen humanen Geweben

Die Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a wurde in 24 humanen Normalgeweben, einschließlich der Nebenniere, mittels RealTime RT-PCR untersucht. Außerdem erfolgte die Expressionsanalyse unter Verwendung von zuvor isolierter Gesamt-RNA aus 13 Phäochromozytomen (PHEO), 15 Cortisol-produzierenden Adenomen (CPA), 12 Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA) und 16 hormoninaktiven Nebennierenadenomen (NFA) (Tab.6).

Die unteren Detektionsgrenzen in der RealTime RT-PCR lagen bei 0,1 Molekülen/ μ g Gesamt-RNA für Ghrelin und bei 5 Molekülen/ μ g Gesamt-RNA für den Ghrelin-Rezeptor.

Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)	Nr.	Alter	Geschlecht	Ätiologie	Gr. (cm)
P1	46	w	PHEO	2	A2	33	w	APA	3
P2	32	w	PHEO	2	A3	49	w	APA	2,5
P3	35	w	PHEO	4	A4	19	w	APA	3
P4	24	w	PHEO	3	A5	56	m	APA	3
P5	42	w	PHEO	3	A6	36	w	APA	2,5
P6	58	m	PHEO	3,5	A7	64	w	APA	3
P7	17	m	PHEO	3,5	A8	45	m	APA	1,5
P8	52	w	PHEO	2,5	A9	28	w	APA	1,5
P9	57	m	PHEO	6	A10	43	w	APA	2,5
P10	15	m	PHEO	3	A11	71	w	APA	2,5
P11	44	m	PHEO	3	A12	60	w	APA	0,7
P12	55	w	PHEO	2,5	N1	29	m	NFA	2
P13	39	m	PHEO	1,5	N2	66	w	NFA	1
C1	49	w	CPA	4,8	N3	31	w	NFA	2,5
C2	59	w	CPA	n.v.	N4	35	w	NFA	6,5
C3	30	w	CPA	1,8	N5	66	w	NFA	6
C4	56	w	CPA	3,2	N6	57	m	NFA	3,5
C5	54	w	CPA	4	N7	35	m	NFA	2,5
C6	31	w	CPA	2	N8	48	m	NFA	2
C7	31	w	CPA	2	N9	62	w	NFA	2,5
C8	69	w	CPA	4	N10	31	m	NFA	0,6
C9	33	w	CPA	3	N11	64	m	NFA	6
C10	39	w	CPA	3,7	N12	66	m	NFA	7
C11	36	w	CPA	5	N13	68	w	NFA	3
C12	77	w	CPA	2,5	N14	68	w	NFA	2,2
C13	56	w	CPA	3,2	N15	40	m	NFA	3,5
C14	40	w	CPA	3	N16	51	m	NFA	2
C15	41	w	CPA	2					
A1	46	m	APA	2,5					

Tab. 6: Klinische Daten zu Patienten, deren Tumormaterial untersucht wurde; *Nr.*: Probennummer; *Gr.*: TumorgroÙe; *m*: männlich; *w*: weiblich; *PHEO*: Phäochromozytom; *CPA*: Cortisol-produzierendes Adenom; *APA*: Aldosteron-produzierendes Adenom; *NFA*: hormoninaktives Nebennierenadenom; *n.v.*: nicht vorhanden.

4.2.1.1 Ghrelin mRNA Expression in humanen Geweben

In allen 24 untersuchten Normalgeweben konnte Ghrelin mRNA nachgewiesen werden, mit einer erheblichen Spannweite von 60 bis 100000 Molekülen/ μ g RNA (Abb. 42). In der Lunge (62 Kopien/ μ g RNA [cp]) und dem Ovar (300 cp) war die Expression am geringsten, in Magen (100000 cp), Dünndarm (60000 cp), Hypophyse (20000 cp) und Knochenmark (10000 cp) am höchsten. In der gepoolten Nebennieren-RNA, welche aus Nebennieren von 61 weiblichen/männlich Kaukasiern stammte, war ebenfalls eine relevante Ghrelin-Expression mit 10000 cp nachweisbar, vergleichbar der Expression in den 7 untersuchten einzelnen gesunden Nebennieren mit 3000-20000 cp mit einem Median von 6000 cp (Abb. 43).

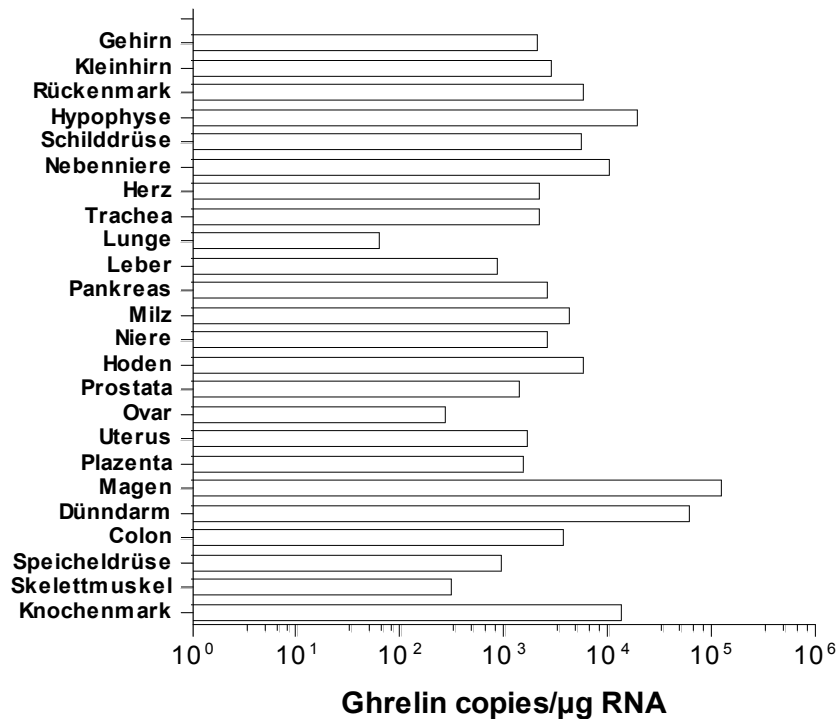


Abb. 42: Quantitative Analyse der Expression von Ghrelin in menschlichen Geweben mittels RealTime RT-PCR. Dargestellt ist die Kopienzahl des Ghrelin-Moleküls/ μ g RNA.

4.2.1.2 Ghrelin mRNA Expression in verschiedenen Nebennierentumoren

Die Expression von Ghrelin mRNA war in allen untersuchten Nebennierentumoren nachweisbar (Abb. 43). In Phäochromozytomen wurde die Ghrelin mRNA zwischen 500 und 5000 cp mit einem Median von 2100 Kopien/ μ g RNA quantifiziert, in den Cortisol-produzierenden Adenomen zwischen 300 und 10000 cp mit einem Median von 2100 cp, in den Aldosteron-produzierenden Adenomen zwischen 300 und 7000 cp mit einem Median von 1700 cp, und in den untersuchten hormoninaktiven Nebennierenadenomen zwischen 300 und 14000 cp mit einem Median von 2300 cp. Die Expression von Ghrelin war im Median geringer als in der gesunden Nebenniere, die Unterschiede waren für Phäochromozytome und Aldosteron-sezernierende Adenome signifikant.

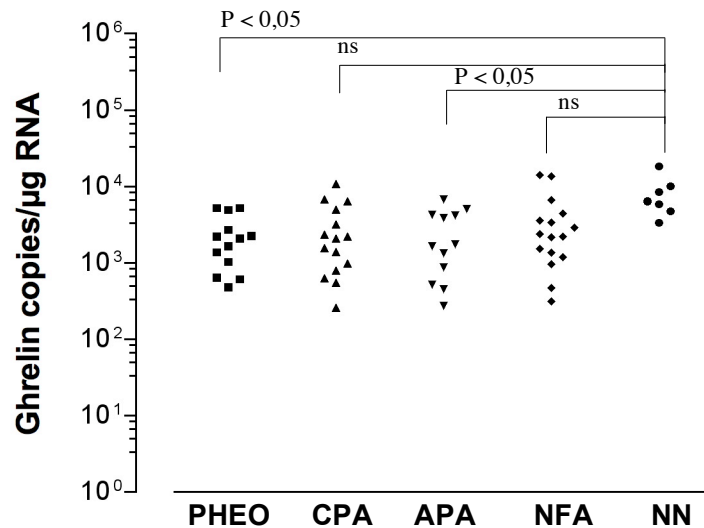


Abb. 43: RealTime RT-PCR Analyse der Expression von Ghrelin in verschiedenen Nebennierentumoren im Vergleich zur gesunden Nebenniere. Dargestellt ist die Kopienzahl des Ghrelin-Moleküls/μg RNA in Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien und in gesunden Nebennieren. PHEO: 13 Phäochromozytome; CPA: 15 Cortisol-produzierende Adenome; APA: 12 Aldosteron-produzierende Adenome; NFA: 16 hormoninaktive Nebennierenadenome; NN: 7 gesunde Nebennieren; Angegeben ist außerdem das Ergebnis des Dunn's Vergleichstests nach Varianzanalyse (P-Werte bzw. ns: nicht signifikant).

4.2.1.3 GHS-R1a mRNA Expression in verschiedenen humanen Geweben

GHS-R1a mRNA Expression war in 42% der untersuchten humanen Gewebe nachweisbar (Abb. 44). Die stärkste GHS-R1a mRNA-Expression wurde in der Hypophyse (300000 cp) detektiert, während die geringsten GHS-R1a mRNA Mengen im Dünndarm (6 cp) und Ovar (6 cp) vorlagen.

Ähnlich wie beim Ghrelin konnte auch in der gesunden Nebenniere eine relevante GHS-R1a mRNA Expression mit 1900 cp nachgewiesen werden, vergleichbar mit den in den sieben isolierten Nebennieren-RNAs einzelner Patienten detektierten Mengen, welche zwischen 40 und 10000 cp mit einem Median von 4000 cp variierten (Abb. 45). Das als Positivkontrolle für die Expression von GHS-R1a mRNA eingesetzte Wachstumshormon (GH)-produzierende Hypophysenadenom zeigte eine 311-fach höhere Expression als die gesunde Nebenniere.

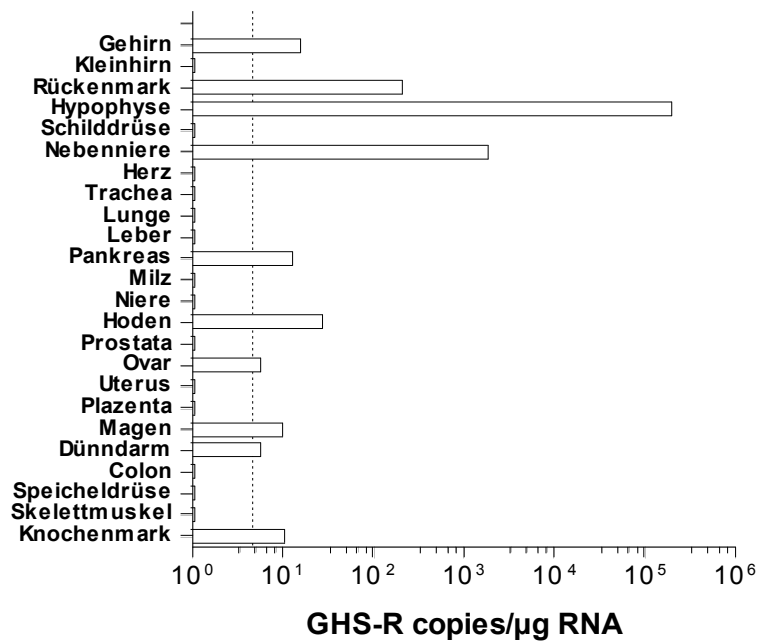


Abb. 44: Quantitative Analyse der Expression von GHS-R1a in menschlichen Geweben mittels RealTime RT-PCR. Dargestellt ist die Kopienzahl des GHS-R1a-Moleküls/μg RNA.

4.2.1.4 GHS-R1a mRNA Expression in Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Eine Expression der GHS-R1a mRNA war insgesamt nur in 20% der Tumoren nachweisbar (Abb. 45). So war GHS-R1a mRNA in 38% der Phäochromozytome detektierbar mit 60-2000 cp und einem Median von 300 cp, ohne statistisch signifikanten Unterschied zur Expression in den gesunden Nebennieren. Von den Cortisol-produzierenden Adenomen wiesen 13% GHS-R1a mRNA auf, mit 100-300 cp bei einem Median von 200 cp und somit signifikant geringerer Expression als in der gesunden Nebenniere ($P < 0,001$). In Aldosteron-produzierenden Adenomen wurden GHS-R1a mRNA Mengen nicht nachgewiesen. Bezüglich der hormoninaktiven Nebennierenadenome war eine GHS-R1a mRNA-Expression in 25% dieser Tumoren nachweisbar, mit zwischen 10 und 200 cp bei einem Median von 60 cp und war damit signifikant niedriger als in der gesunden Nebenniere ($P < 0,001$).

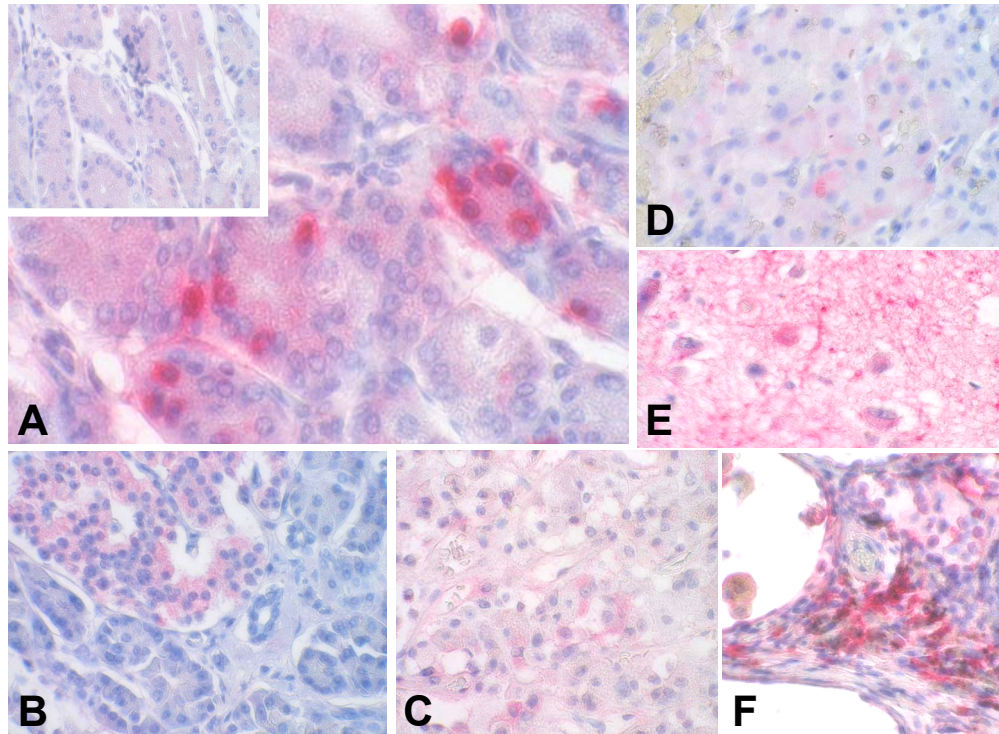


Abb. 46: Immunhistochemische Detektion von Ghrelin in verschiedenen menschlichen Geweben. Paraffinschnitte vom Magencorpus wurden als Positivkontrolle bei der Färbung des Ghrelin-Proteins mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ghrelin eingesetzt (A). Das Inlett von (A) zeigt das Ergebnis der Neutralisation der Primärantikörperbindung nach Präinkubation mit dem entsprechenden blockierenden Peptid. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die weiteren Ausschnitte zeigen die Ghrelin-Färbung von Pankreas (B), Hypophyse (C), Ovar (D), Hypothalamus (E) und Lunge (F). (Vergrößerung A-F: 400x)

Die Expression von Ghrelin konnte mittels der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen nur in 30% der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden (Tab. 7). Betrachtet man die endokrinen Organe, war Ghrelin in den Inselzellen des Pankreas (Abb. 46B), in Einzelzellen des Hypophysenvorderlappens (Abb. 46C) und der Zona reticularis der Nebenniere (Abb. 48) nachweisbar. Bei den untersuchten Organen des Reproduktionssystems waren nur die Granulosa-Lutein-Zellen des Ovars positiv (Abb. 46D). Auch in einzelnen Zellen des Hypothalamus (Abb. 46E), der Lunge (Abb. 46F), sowie in Zellen der proximalen und distalen Tubuli, aber nicht in den Glomeruli und Sammelrohren der Niere konnte die Expression von Ghrelin detektiert werden (Abb. 47).

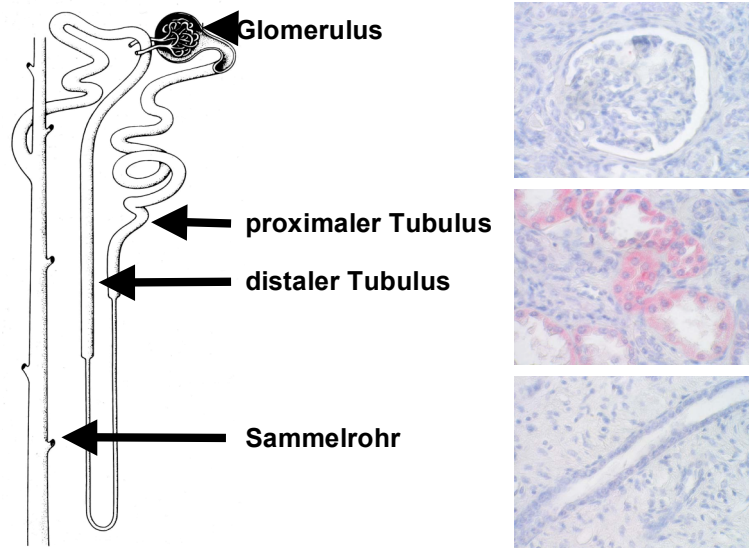


Abb. 47: Immunhistochemische Detektion von Ghrelin in der Niere. In der menschlichen Niere war die Expression des Ghrelin-Peptids in den proximalen und distalen Tubuli (*mittlerer Ausschnitt: 400x*), aber nicht in den Glomeruli (*oberer Ausschnitt: 400x*) und Sammelrohren nachweisbar (*unterer Ausschnitt: 400x*).

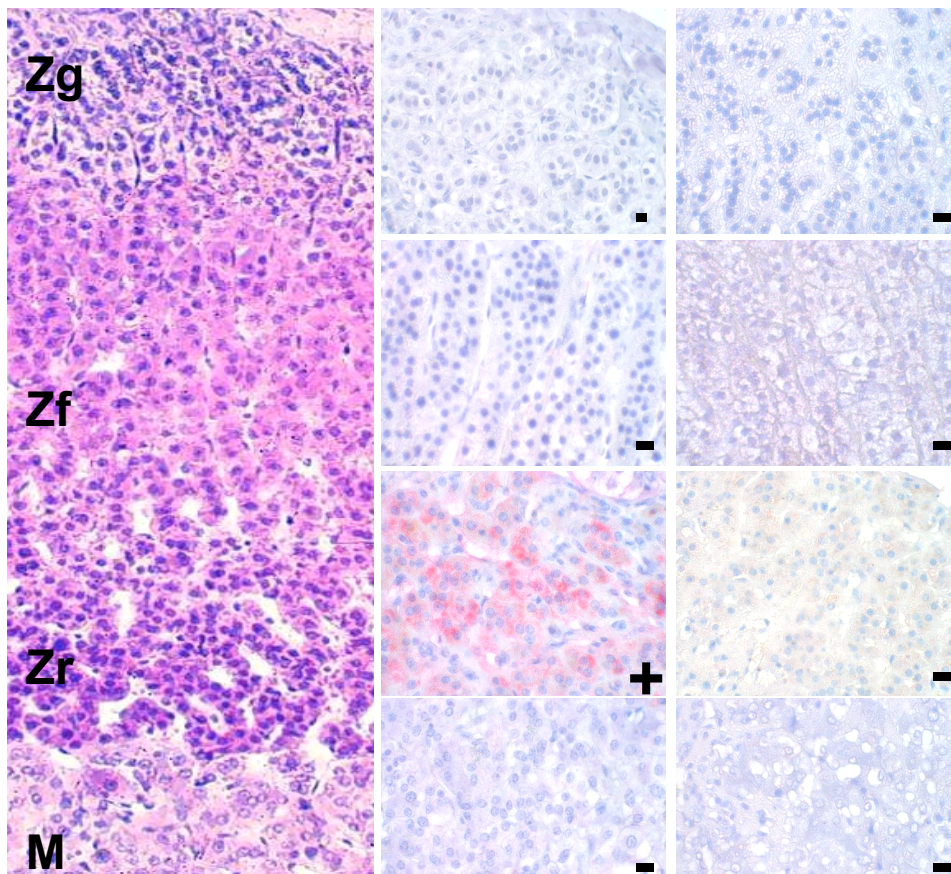


Abb. 48: Immunhistochemische Detektion von Ghrelin und GHS-R1a in der normalen Nebenniere. *Linke Spalte:* HE-Färbung der Nebenniere (Zg: Zona glomerulosa; Zf: Zona fasciculata; Zr: Zona reticularis; M: Mark); *mittlere und rechte Spalte:* Ausschnitte (400x) zeigen die verschiedenen Schichten der Nebenniere, welche der Ghrelin- (*mittlere Spalte*) bzw. GHS-R1a-Färbung (*rechte Spalte*) mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ghrelin bzw. GHS-R1a und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin unterzogen wurde. +: Expression; -: keine Expression.

In den untersuchten Nebennierentumoren, war das Ghrelin-Peptid in keinem der untersuchten Phäochromozytome, in 87% der Cortisol-produzierenden Adenome, in 55% der Aldosteron-produzierenden Adenome, sowie in 54% der hormoninaktiven Nebennierenadenome nachweisbar (Tab. 8, Abb. 49).

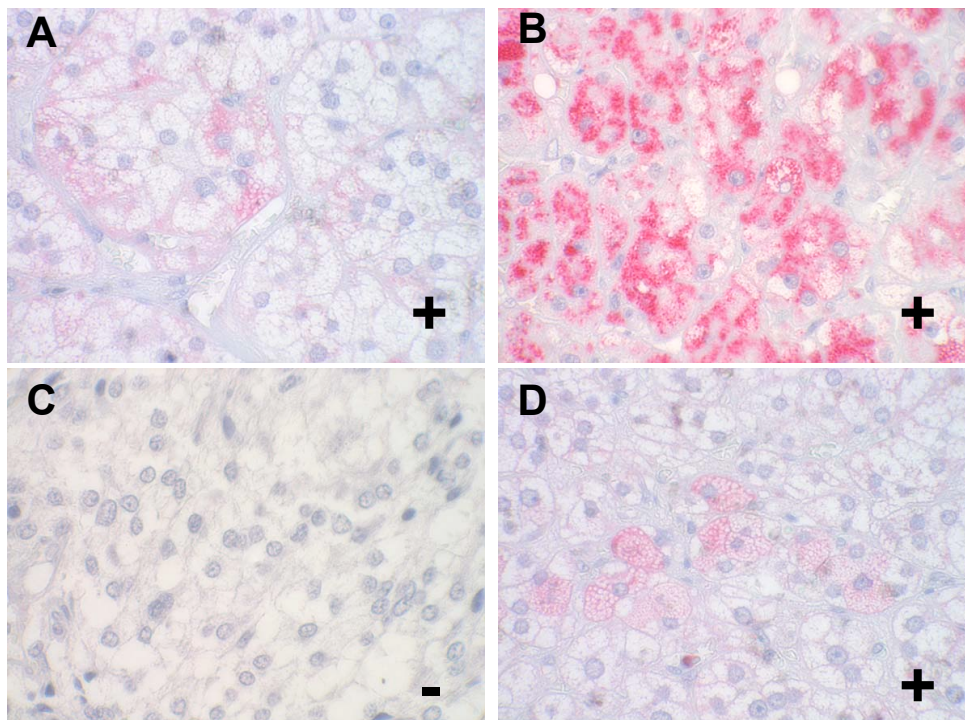


Abb. 49: Immunhistochemische Detektion von Ghrelin in verschiedenen Nebennierentumoren. Die Gewebeschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ghrelin gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Ausschnitte (400x) zeigen repräsentative Färbungen der verschiedenen Tumorentitäten (A: Aldosteron-produzierende Adenome; B: Cortisol-produzierende Adenome; C: Phäochromozytome; D: hormoninaktive Nebennierenadenome). +: Ghrelin Expression; -: keine Ghrelin Expression.

4.2.2.2 Expression des GHS-Rezeptor Typ 1a

Für den immunhistochemischen Nachweis der GHS-R1a-Expression wurden Schnitte eines GH-produzierenden Hypophysenadenoms als Positivkontrolle eingesetzt. In diesen Schnitten ließen sich einzelne Zellen spezifisch anfärben (Abb. 50A).

In 63% der Gewebe mit nachweisbarer mRNA-Expression war der GHS-Rezeptor auch auf Proteinebene nachweisbar (Tab. 7). So waren GHS-R1a-exprimierende Zellen im Hypophysenvorderlappen (Abb. 50B), dem Großhirn, sowie dem Kleinhirn detektierbar. Die Expression konnte außerdem in den Leydig-Zellen des Hodens (Abb. 50C), den Inselzellen des Pankreas (Abb. 50D), und in einzelnen Zellen von Knochenmark (Abb. 50E), Schilddrüse (Abb. 50F), und Trachea (Abb. 50G) gezeigt werden, nicht jedoch in den 3 untersuchten Nebennieren (Abb. 48).

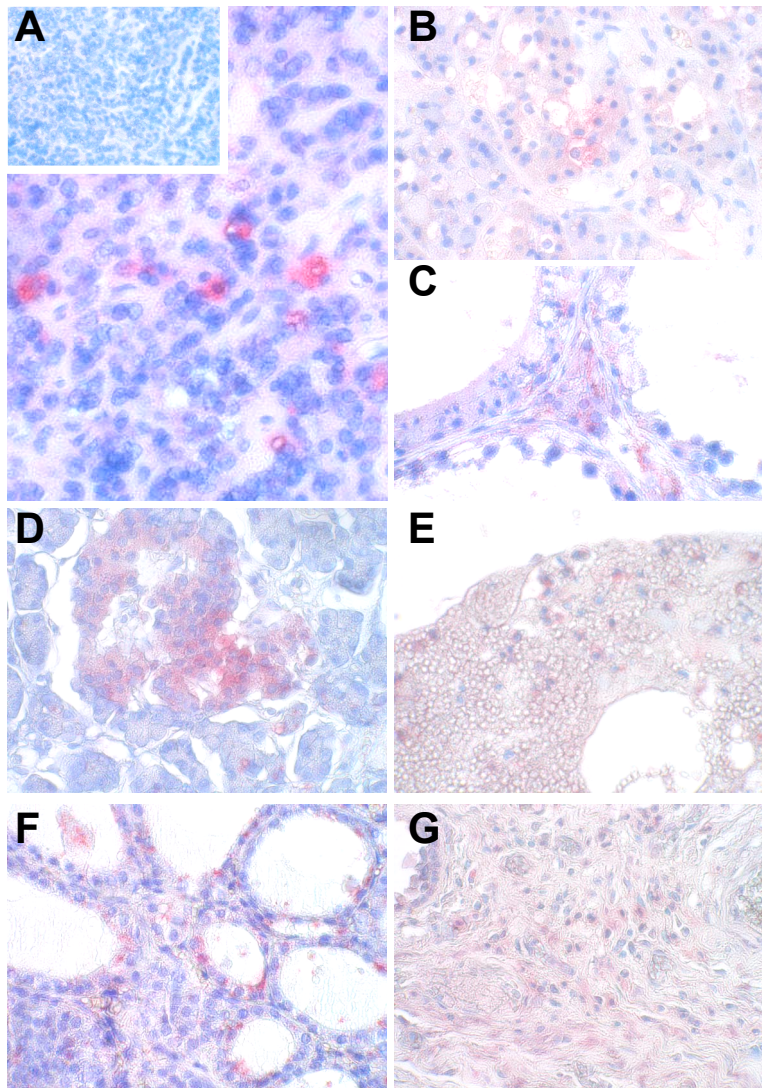


Abb. 50: Immunhistochemische Detektion von GHS-R1a in menschlichen Geweben. Paraffinschnitte eines GH-produzierenden Hypophysenadenoms wurden als Positivkontrolle bei der Färbung des GHS-R1a Proteins mit einem polyklonalen Antikörper gegen GHS-R1a eingesetzt (A). Das Inlett von (A) zeigt das Ergebnis der Färbung ohne Primärantikörper. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. GHS-R1a Protein Expression war ebenfalls nachweisbar im Hypophysenvorderlappen (B), Hoden (C), Pankreas (D), Knochenmark (E), Schilddrüse (F) und Trachea (G). (Vergrößerung A-G: 400x)

In Phäochromozytomen war das GHS-R1a-Protein in 50% der mRNA-exprimierenden Tumoren nachweisbar (Tab. 8, Abb. 51). Auch fand sich das GHS-R1a-Protein in keinem der Phäochromozytome ohne GHS-R1a mRNA. Bezüglich der Cortisol-produzierenden Adenome war GHS-R1a in 50% der mRNA-positiven Tumoren auch auf Proteinebene nachweisbar. Dagegen fehlte das GHS-R1a-Protein in 91% der Aldosteron-produzierenden Adenome und in allen hormoninaktiven Nebennierentumoren.

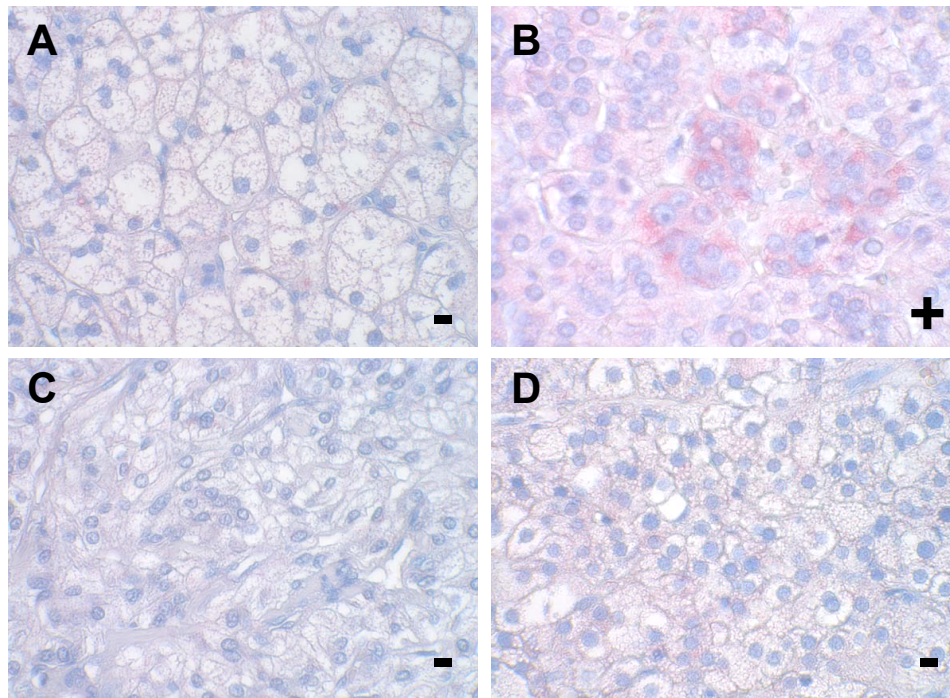


Abb. 51: Immunhistochemische Detektion von GHS-R1a in Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien. Die Gewebeschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen GHS-R1a gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Ausschnitte (400x) zeigen repräsentative Färbungen der verschiedenen Tumorentitäten (A: Aldosteron-produzierende Adenome; B: Cortisol-produzierende Adenome; C: Phäochromozytome; D: hormoninaktive Nebennierenadenome). +: GHS-R1a Expression; -: keine GHS-R1a Expression.

Gewebe	Ghrelin		GHS-R1a	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Gehirn, Großhirn	+	-	+	+
Kleinhirn	+	-	-	+
Hypophyse	+	-	+	+
Hypothalamus	n.v.	+	n.v.	+
Schilddrüse	+	-	-	+
Nebenschilddrüse	n.v.	-	n.v.	+
Nebenniere	+	+	+	-
Myokard	+	-	-	-
Trachea	+	-	-	+
Lunge	+	+	-	-
Leber	+	-	-	-
Pankreas	+	+	+	+
Milz	+	-	-	-
Niere	+	+	-	-
Hoden	+	-	+	+
Prostata	+	-	-	-
Ovar	+	+	+	-
Plazenta	+	-	-	-
Corpus Endometrium	n.v.	-	n.v.	-
Magen - Magencorpus	+	+	+	-
- Magenantrum	+	+	+	-
Dünndarm, Ileum	+	-	+	-
Colon	+	-	-	-
Speicheldrüse	+	-	-	-
Skelettmuskel	+	-	-	-
Knochenmark	+	-	+	+

Tab. 7: Expression von Ghrelin und GHS-R1a in verschiedenen humanen Geweben auf mRNA- und Proteinebene. n.v.: nicht vorhanden; +: Expression; -: keine Expression.

	Ghrelin		GHS-R1a	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein
PHEO	100%	0%	25%	12%
CPA	100%	87%	17%	8%
APA	100%	55%	0%	0%
NFA	100%	54%	25%	0%

Tab. 8: Expression von Ghrelin und GHS-R1a in verschiedenen Nebennierentumoren auf mRNA- und Proteinebene. Die aufgeführten Prozentzahlen ergeben sich aus der Anzahl der Tumoren, welche sowohl mittels der RealTime als auch der Immunhistochemie analysiert werden konnten. PHEO: Phäochromozytome; CPA: Cortisol-produzierende Adenome; APA: Aldosteron-produzierende Adenome; NFA: hormoninaktive Adenome.

5 Diskussion

5.1 Expression der Somatostatin-Rezeptorsubtypen *sst1-5* in der Nebenniere und verschiedenen Nebennierentumoren

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen in der gesunden menschlichen Nebenniere sowie teils in Tumorgewebe mittels RT-PCR und anschließender Southern Blot-Analyse wie auch mittels RealTime RT-PCR in Primärkulturzellen dieser Gewebe nachgewiesen werden. Eppelbaum et. al (37) demonstrierte ebenso die Expression aller fünf *ssts* in der menschlichen Nebenniere mittels RT-PCR. In der Ratte wurde *sst2* mittels Immunhistochemie in Zona fasciculata-Zellen der Nebenniere der Ratte demonstriert (81). Eine Rolle von Somatostatin in der Kontrolle der endokrinen Aktivität der Nebenniere ist daher zu diskutieren.

Die untersuchten Nebennierentumoren unterschieden sich teils deutlich von der in der gesunden Nebenniere gezeigten *sst*-Expression. So war in der Mehrzahl der untersuchten Phäochromozytome die Expression von *sst4* und *sst5*, in den meisten Cortisol-produzierenden Adenomen die Expression von *sst1* und *sst4*, sowie in den meisten hormoninaktiven Nebennierenadenomen die Expression von *sst1*, *sst4* und *sst5* nicht nachweisbar. In Aldosteron-produzierenden Adenomen hingegen waren alle fünf *ssts* in jeweils mehr als 50% dieser Tumoren exprimiert. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche *sst*-Expression in den verschiedenen Nebennierentumoren könnte ein spezifisches *sst*-Expressionsmuster der Zellschicht sein, in welcher der jeweilige Tumor seinen Ursprung hat. Die Unterschiede könnten allerdings auch auf pathophysiologische Veränderungen im Tumor zurückzuführen sein. In Phäochromozytomen wurde die Expression aller fünf *ssts* mittels semiquantitativer RT-PCR und Autoradiographie beschrieben (37, 82), insbesondere auch geringer Mengen von *sst5*. Trotz sehr hoher Sensitivität der RT-PCR kombiniert mit der Southern Blot-Analyse konnte die Expression von *sst5* in dem im Rahmen der vorgelegten Arbeit untersuchten Tumorkollektiv nicht bestätigt werden. Es bleibt zurzeit unklar, ob die isolierte Expression von *sst1-4* in diesen Tumoren dem physiologischen Expressionsmusters des Nebennierenmarks entspricht, oder der Verlust von *sst5* ein kausales Element oder Begleitphänomen bei der Entwicklung des Phäochromozytoms sein könnte. Andererseits war mit der wiederum noch sensitiveren Methode der

RealTime RT-PCR *sst5* in einigen, der in die Zellkultur übernommenen, Phäochromozytomen nachweisbar. Die Expression von *sst3*-mRNA war in der semiquantitativen RT-PCR-Analyse von Gewebeproben mehrheitlich erst nach anschließender Southern Blot-Analyse nachweisbar. Auch die mittels RealTime RT-PCR nachgewiesenen Mengen exprimierter *sst3*-mRNA in der Zellkultur waren sehr gering. Die physiologische Bedeutung einer solch geringen Expression ist derzeit unklar. Bei Untersuchungen auf Proteinebene mittels Bindungsstudien (83) und Immunhistochemie (84, 85) fand sich *sst3* in der Mehrzahl der untersuchten Phäochromozytome, während die Expression von *sst1*, *sst2*, *sst4* und *sst5* nur in einem geringen Prozentsatz nachweisbar war. *In vivo* wurde die klinische Relevanz der *sst*-Proteinexpression in Phäochromozytomen mittels Octreotid-Szintigraphie untersucht, mit Detektion von 25-30% der Phäochromozytome (86, 87). Mit derartigem Nachweis einer Somatostatin-Rezeptor-Expression in einem relevanten Anteil von Phäochromozytomen erscheinen neue medikamentöse und nuklearmedizinische Ansätze in der Therapie dieser Tumorentität denkbar.

Während die Expression von Somatostatinrezeptoren in Nebennierenrindenadenomen auf RNA-Ebene nach unserer Kenntnis bisher nicht strukturiert untersucht wurde, ist in einer früheren Studie die Expression von *sst2*- und *sst3*-Proteinen in Cortisolproduzierenden Nebennierenadenomen mittels Immunhistochemie gezeigt worden (85). Auch der schon beschriebene Nachweis von *sst2* in der Zona fasciculata würde auf eine physiologische Funktion dieses Rezeptors bei der Kontrolle der Glukokortikoid-Sekretion hinweisen (81). Weitergehende Studien hierzu sind allerdings nicht bekannt. In Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenomen wurde ebenfalls mittels Immunhistochemie die Expression aller fünf *ssts* gezeigt (85), in Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen auf RNA-Ebene. Interessanterweise fanden sich in einer weiteren Untersuchung mittels Autoradiographie unter Verwendung markierten Octreotids keine spezifischen Bindungsstellen in der Nebenniere (88). Aufgrund des speziellen Bindungsmusters von Octreotid können hieraus jedoch nur Rückschlüsse in Bezug auf den Somatostatin-Rezeptorsubtyp 2 gezogen werden. Der Nachweis eines Effekts von Somatostatin auf die Aldosteronsekretion und das Wachstum von Zona glomerulosa-Zellen würde eine physiologisch relevante Expression der Somatostatin-Rezeptorsubtypen in dieser Schicht der Nebenniere unterstützen (77, 89-95). Publierte Daten zur Expression oder funktionellen Rolle von Somatostatin-Rezeptoren in hormoninaktiven Nebennierenadenomen sind nicht bekannt. In Übereinstimmung mit

der Analyse der *sst*-Expression in Gewebe hormoninaktiver Nebennierentumoren war eine Expression von *sst4*- und *sst5*-mRNA in Primärkulturzellen eines hormoninaktiven Nebennierenadenoms nicht detektierbar, wohl aber eine Expression von *sst1-3*. In einer Publikation waren derartige Tumoren mittels Octreotid-Szintigraphie nicht nachweisbar, was auf das Fehlen des *sst2*-Proteins hinweist (86).

In der vorgelegten Arbeit konnte eine hohe Übereinstimmung (83%) zwischen der *sst*-Expression in Phäochromozytomen und dem Tumor-umgebenden Gewebe gezeigt werden. Bei Cortisol-produzierenden Nebennierenadenomen und ihrem umgebenden Gewebe war hingegen auffallend, dass *sst5* häufiger im Tumor als im jeweils Tumor-umgebenden Gewebe exprimiert wurde, was möglicherweise auf einen Zusammenhang mit der Entstehung dieser Tumoren hinweisen könnte. Deutliche Unterschiede in der *sst*-Expression waren auch zwischen Aldosteron-produzierenden Adenomen und dem umgebenden Nebennierengewebe nachweisbar. Die Unterschiede zwischen Tumor und umgebenden Gewebe waren ähnlich variabel, wie die Unterschiede der *sst*-Expression im Tumor selbst, was auf eine große Varianz des Genotyps dieser Tumoren hindeutet. In hormoninaktiven Nebennierenadenomen variierte nur die *sst2*-Expression deutlich zwischen Tumor und dem Tumor-umgebenden Gewebe.

Zusammenfassend zeigte Tumor-umgebendes Gewebe in den meisten Fällen ein ähnliches *sst*-Expressionsprofil wie der Tumor selbst, welches sich aber von dem der gesamten gesunden Nebenniere unterschied. Diese Unterschiede könnten auf ein spezifisches *sst*-Expressionsprofil der Zellschicht, aus welcher der Tumor sich bildet, zurückzuführen sein. Abweichungen im Expressionsmuster der Somatostatin-Rezeptorsubtypen in Cortisol- und Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenomen werden möglicherweise bei der Bildung dieser Tumoren verursacht.

5.2 Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf die Somatostatin-Rezeptor-Expression in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Bei der Untersuchung der hormonellen Kontrolle der Somatostatin-Rezeptor-Expression in der Kultur gesunder Nebennieren fand sich eine signifikante Hemmung der *sst2*-Expression durch ACTH und Angiotensin II, ohne Veränderung der Expression der

anderen Somatostatin-Rezeptorsubtypen. Interessanterweise berichteten Stalla et al. von einer relevanten Hemmung der ACTH-Sekretion corticotroper Hypophysenadenome durch den *sst2*-Liganden Octreotid *in vitro*, während *in vivo* kein Effekt zu beobachten war (96). Die Autoren schlussfolgerten einen suppressiven Effekt der erhöhten Glukokortikoidspiegel *in vivo* auf die *sst2*-Expression. Alternativ wäre jedoch auch ein suppressiver Effekt von ACTH auf die Rezeptorexpression denkbar, wie im Nebennieren-Zellmodell hier gezeigt.

Dexamethason führte in den hier durchgeführten Untersuchungen von menschlichen Nebennieren- und Nebennierentumorzellen zu einer Stimulation der *sst1* und *sst2* mRNA-Expression, sowie zu einer Hemmung der *sst4*- und *sst5*-Expression. Ähnlich berichteten Xu et al. über eine Stimulation der *sst1*- und *sst2*-Expression durch Dexamethason, allerdings in Hypophysenzellen der Ratte (97). Dieser Effekt ging mit länger werdender Inkubationszeit in eine Hemmung über. Mittels semiquantitativer RT-PCR wiesen Park et al. ebenfalls eine Hemmung der *sst4*-Expression, aber auch der *sst2*- und *sst3*-Expression, sowie eine Stimulation der *sst5*-Expression durch Glukokortikoide in primären Hypophysenzellen der Ratte nach (98). Van de Hoek et al. berichteten über eine Hemmung der *sst2*-Expression ohne Einfluss auf die *sst5*-Expression durch Dexamethason in corticotropen Hypophysenzellen der Maus (99). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Dexamethason in Rattenhypophysenzellen zu einer supprimierten [¹²⁵I]SRIF-Bindung durch Verringerung der Somatostatin-Rezeptoren pro Zelle führte (100). Die unterschiedlichen Beobachtungen sind möglicherweise auf unterschiedliche Zellsysteme (Hypophyse, Nebenniere) und Spezies (Mensch, Ratte, Maus) zurückzuführen, sowie auf unterschiedliche Expositionszeiten mit Glukokortikoiden. Die vielfältigen Beobachtungen deuten aber auf eine wichtige Rolle von Glukokortikoiden bei der Kontrolle der Somatostatin-Rezeptor-Expression hin. Die Wirkung von Glukokortikoiden auf die transkriptionelle Kontrolle der *sst*-Promotoren wurde in GH4-Hypophysenzellen der Ratte untersucht. Glukokortikoide hemmten die Aktivität des *sst2*-Promotors, ohne die Aktivität der anderen Promotoren zu beeinflussen (79). Die Regulation der Somatostatin-Rezeptoren in Hypophysenzellsystemen unterscheidet sich somit von der beobachteten Regulation in dem hier untersuchten Nebennierenzellsystem. Eine mögliche Erklärung stellt die Nutzung alternativer Promotoren dar, wie sie bereits für Somatostatin-Rezeptoren beschrieben wurde (101). Glukokortikoide binden und aktivieren Glukokortikoid-Rezeptoren (GRs). Diese GRs interagieren mit spezifischen Glukokortikoid-Response-

Elementen (GRE), welche im Promotor oder anderen transkriptionell-aktiven Regionen des Zielgens lokalisiert sind (102, 103). Die Bindung der Liganden-aktivierten GRs an GREs kann zu einer Stimulation oder Inhibition der Gentranskription führen. Die Art der GREs, die den beschriebenen Effekt der Glukokortikoide in Nebennierenzellsystemen vermittelt, ist bisher unbekannt.

Somatostatin zeigte im Median aller Untersuchungen in den hier untersuchten Primärkulturen keinen signifikanten Effekt auf die Expression der fünf *ssts*. In der Mehrzahl der Nebennierenadenome, die ja ein sehr unterschiedliches Expressionsprofil von Somatostatin-Rezeptorsubtypen aufwiesen und damit nur begrenzt als Einheit betrachtet werden können, war ein stimulierender Effekt auf die *sst3*-mRNA Expression, sowie ein inhibierender Effekt auf die *sst5*-Expression nachweisbar. Park et al. (98) zeigten ebenfalls einen stimulierenden Effekt von Somatostatin auf die *sst3*-Expression in primären Rattenhypophysenzellen mittels semiquantitativer RT-PCR. Dieser Effekt wurde auch bei Hypophysenzelllinien der Ratte beschrieben (104, 105). Ebenfalls korrelierend zu den hier gezeigten Ergebnissen wurde eine hemmende Wirkung von Somatostatin auf die *sst5*-Promotoraktivität in Rattenhypophysenzellen demonstriert (78). Der native Ligand der fünf bekannten Somatostatin-Rezeptoren scheint somit im Sinne einer Rückkopplung die Expression seiner Rezeptoren zu steuern, mit positiver und damit verstärkender Wirkung auf die *sst3*-vermittelten Effekte bzw. negativer Rückkopplung auf die *sst5*-vermittelten Effekte.

Das Somatostatin-Analog Octreotid mit seiner vorwiegenden Bindung an *sst2* und geringerer Bindung auch an *sst3* und *sst5* zeigte ein Somatostatin-ähnliches Bild, mit signifikanter Stimulation der *sst3*-Expression sowie Hemmung der *sst5*-, aber auch der *sst4*-Expression. Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der basalen *sst5*-Expression und dem Octreotid-vermittelten Effekt auf die *sst4*-Expression, so dass Octreotid über Bindung an *sst5* die *sst4*-Expression hemmen kann. Dieser über die Wirkung von nativem Somatostatin hinausgehende Effekt ist möglicherweise durch die längere Halbwertszeit von Octreotid bedingt.

SOM230, ein Somatostatin-Analog mit hoher Affinität für *sst1*, *sst2*, *sst3* und *sst5*, bewirkte in der Mehrzahl der Tumoren eine Hemmung der Expression von *sst1*, *sst2*, *sst4* und *sst5*. Im Unterschied zu Somatostatin und Octreotid war kein vorherrschender Effekt auf die Expression von *sst3* zu beobachten. Ursächlich ist das breitere Bindungsprofil kombiniert mit einer langen Halbwertszeit zu diskutieren. Die Hemmung der *sst1*-Expression korrelierte mit der Kopienzahl von *sst1* wie auch mit der

von *sst3*. Auch bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von *sst1* und der Hemmung von *sst2*. Der Multiligand SOM230 bewirkte somit eine von *sst1* und *sst3* vermittelte Hemmung der *sst1*-Expression, sowie eine von *sst1* vermittelte Hemmung der *sst2*-Expression.

5.3 Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf die Hormonsekretion in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Nach Charakterisierung der basalen Expressionsmuster und hormonellen Kontrolle der Somatostatin-Rezeptorsubtypen in den hier etablierten Nebennieren-Zellkultursystemen wurde die Kontrolle der Hormonsekretion unter besonderer Berücksichtigung des Rezeptorstatus untersucht. In der Mehrzahl der untersuchten Primärkulturen war eine relevante Sekretion von Hormonen der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarks als Hinweis auf vitale Zellen in der Kultur festzustellen. Nur für die präoperativ mit einem Hyperkortisolismus assoziierten Nebennierentumoren ließ sich in der Mehrzahl nur eine sehr geringe Cortisolsekretion trotz adäquatem mikroskopischem Zellbild in der Kultur messen. Dies ist möglicherweise auf die unscharfe klinische Definition eines prä-Cushing-Syndroms zurückzuführen, bei dem eine relevante Autonomie eines Nebennierentumors durch einen Dexamethason-Hemmtest nachweisbar ist, ohne wirklich erhöhte Ausschüttung an Cortisol über den Tag, wie z.B. zu messen durch Bestimmung des Cortisols im 24h-Sammelurin. Dementsprechend besteht Uneinigkeit, inwiefern diese Patienten zwingend operiert werden sollten. Die hier beobachtete nur geringe hormonelle Aktivität unterstützt ein abwartendes Vorgehen mit regelmäßigen Kontrollen.

Die höhere Sekretion einiger Hormone aus gesunden Nebennieren im Vergleich zu den benignen Nebennierentumoren ist möglicherweise auf die Interaktion verschiedener Zelltypen zurückzuführen, im Gegensatz zu der Monokultur allein von Tumorzellen bei den Adenomen. *In vivo* ist eine Interaktion des Adenoms mit den normalen Nebennierenzellen denkbar, wie auch die Kokultivierung von Zellen aus verschiedenen Nebennierenzonen zu einer Beeinflussung der Hormonsekretion führt (106, 107). Dies ist insbesondere für die Kontrolle der Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark

etabliert. Die Adrenalin-synthetisierenden Zellen des Nebennierenmarks sind in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert, welche aus der Nebennierenrinde kommen und deren Blut somit reich an Rindenhormonen ist. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Rindenhormone für die Bildung eines Enzyms benötigt werden, welches für den letzten Schritt der Adrenalinsynthese verantwortlich ist (108). Damit wäre auch die hier gezeigte deutlich höhere Metanephrinsekretion in der Primärkultur gesunder Nebennieren im Vergleich zu den Phäochromozytomen erklärbar.

Neben der basalen Hormonsekretion der Primärkulturzellen der Nebennierenadenome im Vergleich zu derjenigen der gesunden Nebennierenprimärkulturzellen wurde auch die Regulation der sezernierten Hormone untersucht. In Kontrollexperimenten an der gesunden Nebenniere wurde die Aldosteronsekretion der Primärkulturzellen durch ACTH und Angiotensin II stimuliert, die Cortisolsekretion durch ACTH stimuliert und in geringem Maße durch Dexamethason inhibiert. Mazzocchi et al. hatten ähnlich in Primärkulturen aus humanen adrenokortikalen Zellen einen stimulierenden Effekt von ACTH auf die Aldosteron- und Cortisolsekretion demonstriert (109), und mehrere Arbeitsgruppen zudem einen stimulierenden Effekt von Angiotensin II auf die Aldosteronsekretion nachgewiesen (109, 110). Die Effekte beider Substanzen in dem vorgestellten Zellkultursystem bestätigen die beobachtete Regulation der Hormonsekretion.

Somatostatin sowie die Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 zeigten, trotz nachgewiesener mRNA-Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen, hingegen keinen Effekt auf die Hormonsekretion. Ähnlich waren in Untersuchungen der Aldosteronsekretion von Zona glomerulosa-Zellen der Rattennebeniere keine Veränderungen der basalen Aldosteronproduktion durch Somatostatin-Analoga nachweisbar. In diesen Systemen war allerdings eine deutliche Hemmung der Angiotensin II-stimulierten Aldosteronsekretion messbar (89, 90, 92, 94, 111). Jones et al. beschrieben zudem eine Hemmung der Angiotensin II-vermittelten Stimulation der Aldosteronproduktion durch Somatostatin *in vivo* (77), während durch Gabe von Octreotid kein Effekt zu beobachten war (112). In eigenen Untersuchungen konnte eine inhibierende Wirkung von Somatostatin auf die Angiotensin II-vermittelte Stimulation nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die ACTH-stimulierte Aldosteron- (89, 90) und Cortisolsekretion von Zona fasciculata-Zellen (113, 114) ließ sich hingegen nicht durch Somatostatin beeinflussen. In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen fanden Moeller et al. ebenfalls auch keinen Effekt von Somatostatin auf

die Adrenalin- und Noradrenalinsekretion von primären Nebennierenmarkzellen des Rinds (115). Die vorwiegend im Tiersystem etablierten Ergebnisse zur physiologischen Regulation der Nebenniere durch Somatostatin ließen sich somit in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Zellsystem weitgehend bestätigen.

In Primärkulturen Aldosteron-produzierender Nebennierenadenome führte die Gabe von ACTH und Angiotensin II zu einer Stimulation der Aldosteronsekretion. Während Somatostatin selber keinen Effekt zeigte, war in den hier durchgeführten Untersuchungen ein stimulierender Effekt der Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 zu beobachten. Aguilera et al. beschrieben auch für Somatostatin eine Stimulation der Aldosteronsekretion von primären Zona glomerulosa-Zellen der Ratte, allerdings nur bei Anwendung von unphysiologisch hohen Somatostatinkonzentrationen von mehr als 10^{-8} M, nicht jedoch bei geringeren Konzentrationen (89). Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf die physiologisch zu erwartenden Konzentrationen von 10^{-8} M. Die Untersuchungen mit Somatostatin-Analoga mit längerer Halbwertszeit als das native Hormon zeigten auch in unserem System einen vergleichbaren stimulierenden Effekt.

In Primärkulturen aus Cortisol-produzierenden Nebennierenadenomen war erwartungsgemäß eine signifikante Stimulation der Cortisolsekretion durch ACTH nachweisbar, wie auch in früheren *in vivo* und *in vitro* Studien beschrieben (113, 114). Nach derzeitigem Kenntnisstand sind bisher keine Untersuchungen zum Einfluss von Somatostatin oder der Somatostatin-Analoga auf die Cortisolsekretion dieser Adenome publiziert. Bei fehlenden Effekten zumindest im hier untersuchten System erscheint der Einsatz auch neuerer Somatostatin-Analoga mit breiterem Bindungsprofil für Somatostatin-Rezeptorsubtypen nicht Erfolg versprechend.

Die Regulation der Katecholamin-Metaboliten Metanephrin und Normetanephrin wurde unter anderem durch Inkubation mit Dexamethason geprüft. Diese Substanz war aufgrund von Vorberichten über relevante Effekte auf die Katecholamin-Sekretion gewählt worden. Während in einer Nebennierenmark-Zelllinie der Ratte Dexamethason zu einer Stimulation der Dopaminsekretion führte (116, 117), war in Kulturen von Nebennierenmarkzellen des Schweins eine Hemmung der Katecholaminsekretion nach Gabe von Dexamethason beobachtet worden (118). Zudem wurde in der PC-12 Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte ein stimulierender Effekt von Glukokortikoiden auf die Katecholaminsynthese und -speicherung beschrieben (119, 120). In dem in der vorgelegten Arbeit untersuchten humanen System war allerdings kein Effekt von

Dexamethason auf die Sekretion von Normetanephrin und Metanephrin in Primärkulturen von Phäochromozytomen festzustellen. Dagegen führten Somatostatin und SOM230 zu einer signifikanten Hemmung der Metanephrinsekretion. Hiermit vereinbar wurde in vivo nach Gabe von Somatostatin bzw. seiner Analoga bei Patienten mit Phäochromozytomen eine Reduktion der Katecholaminsekretion beschrieben (82, 121, 122).

5.4 Effekte von Somatostatin und seinen Analoga auf den Zellzyklus in Zellmodellen der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Neben den Effekten von Somatostatin und seinen Analoga auf die Hormonsekretion der Nebenniere ist der Einfluss auf den Zellzyklus von besonderem Interesse. Für Octreotid wird eine antiproliferative Wirkung sehr kontrovers diskutiert (121, 123-128). Zur genaueren Charakterisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zellkultursystem mit Analyse der Zyklusphasen mittels FACS etabliert. Problematisch erwies sich die geringe zur Verfügung stehende Zellzahl, die eine valide Untersuchung nur in einer kleinen Zahl von Geweben und Tumoren erlaubte. Für die gesunde Nebenniere fanden sich Veränderungen der Zellzyklusphasen, die mit einer Hemmung der Proliferation durch ACTH, Angiotensin II und Dexamethason vereinbar sind, sowie einer Stimulation durch Octreotid. Somatostatin und der Multirezeptor-Ligand SOM230 wiesen keinen Effekt auf den Zellzyklus auf.

Eine antiproliferative Wirkung von ACTH auf den Zellzyklus von Nebennierenzellen wurde unter anderem am System der Y1-Zelllinie der Ratte beschrieben (129, 130). Dieser Effekt wurde durch Blockierung in der G1-Phase erzielt. Die Untersuchung von Nebennieren-Primärkulturen der Ratte (131) und des Rinds (132) zeigte einen ähnlichen antiproliferativen Effekt von ACTH. Für Angiotensin II wurde eine Hemmung des Zellzyklus in Primärkulturen aus Zona glomerulosa-Zellen der Ratte nachgewiesen (133, 134), während im Rind sowohl eine Stimulation (135-138) als auch eine Hemmung der Proliferation durch Angiotensin II beschrieben sind (139). Die divergenten Effekte von Angiotensin II hängen möglicherweise mit der differenzierten Expression der Angiotensin-Rezeptoren AT₁ und AT₂ zusammen. So wurde für AT₁

eine mitogene, für AT₂ hingegen eine antiproliferative Wirkung nach Bindung des Liganden beschrieben (140, 141). Auch für Dexamethason wurden sowohl Proliferations-stimulierende (142, 143) als auch antiproliferative Effekte (144-148) gezeigt. *In vivo* hemmte Dexamethason in der Ratte das kompensatorische Wachstum der kontralateralen Nebenniere nach unilateraler Adrenalektomie (149). Die erzielten Befunde an humanen Nebennieren unterstützen einen hemmenden Effekt aller drei Substanzen. Zugleich wird eine messbare Regulation des Zellzyklus in dem etablierten Zellsystem deutlich. Trotz der Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen ließ sich kein Effekt des nativen Liganden Somatostatin bzw. des Multiliganden SOM230 auf die Proliferation der Nebenzellen nachweisen. Nur der *sst2*-Ligand Octreotid mit seiner langen Halbwertszeit besaß einen geringen Einfluss auf den Zellzyklus, vereinbar eher jedoch mit einer gesteigerten Proliferation.

In der Primärkultur Aldosteron-produzierender Adenome war eine relevante Veränderung des Zellzyklus durch ACTH und Angiotensin II zu beobachten, vereinbar aber eher mit einer Stimulation der Proliferation. Arola et al. beschrieben einen biphasischen Effekt von ACTH auf adrenokortikale Zellen der Ratte, mit Hemmung des Zellzyklus in den ersten 24 h übergehend in einen stimulierenden Effekt nach 72 h (131). Die in der vorgelegten Arbeit beobachteten gegensätzlichen Effekte von ACTH und Angiotensin II in gesunden Nebennieren und Aldosteron-produzierenden Adenomen mögen mit dem Zeitpunkt der Analyse zusammenhängen, die jeweils nur eine Momentaufnahme des Zellzyklus darstellt, oder auch auf Alterationen der Zellzyklus-Kontrolle im Rahmen der Tumorentwicklung hinweisen. Bezüglich der eingesetzten Somatostatin-Analoga war eine starke Abnahme der G₂-Phase nach Inkubation mit SOM230 bemerkenswert, die auf eine antiproliferative Wirkung dieser Substanz bei diesen Tumoren hinweisen könnte.

Ähnlich wie in der Primärkultur gesunder Nebennieren waren in primären Cortisol-produzierenden Nebennierenadenomzellen Veränderungen des Zellzyklus vereinbar mit einer antiproliferativen Wirkung von ACTH zu beobachten. In Übereinstimmung wurde in einem Nebennierentumor-Modell der Maus *in vivo* eine Hemmung der Tumorpheriferation beschrieben (150). Interessanterweise induzierten Somatostatin und die Analoga Octreotid und SOM230 einen ACTH-vergleichbaren Effekt, so dass in dieser Tumorentität eine antiproliferative Wirkung von Somatostatin zu diskutieren ist, welche therapeutische Implikationen haben könnte.

Bei Primärkulturzellen aus Phäochromozytomgewebe führte die Inkubation mit Dexamethason zu Veränderungen, die mit einer Stimulation der Proliferation vereinbar wären und dem Effekt in der gesunden Nebenniere entsprechen. Insbesondere Somatostatin führte dagegen zu einer Abnahme der G2-Phase vereinbar mit einer abnehmenden Proliferation. Vergleichbar dem für Somatostatin beschriebenen antiproliferativen Effekt in zahlreichen endokrinen Tumoren sind somit auch in einigen Entitäten von Nebennierentumoren Veränderungen des Zellzyklus zu beobachten, die auf eine Hemmung des Zellzyklus hinweisen. In weitergehenden Untersuchungen wird die Relevanz dieses Befundes zu prüfen sein. Erschwert werden diese Untersuchungen durch die Heterogenität der Rezeptorexpression.

5.5 Charakterisierung transkriptionell-aktiver Gensequenzen der fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen in Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen

Die hier vorgestellte Analyse von Gewebe und Primärkulturzellen von gesunden Nebennieren und Nebennierenadenomen unterschiedlicher Ätiologien zeigte eine differentielle Expression der fünf bekannten Somatostatin-Rezeptorsubtypen. Daher wurde die transkriptionelle Aktivität der in unserer Arbeitsgruppe identifizierten, in der Hypophyse aktiven Promotorsequenzen in Nebennieren-Zellmodellen untersucht. Leider existieren nur wenige Zelllinien, die sich von spezifischen Zellen der Nebenniere ableiten. Der komplexe Aufbau der Nebenniere aus Nebennierenrinde mit verschiedenen funktionellen Zonen sowie Nebennierenmark mit unterschiedlicher endokriner Aktivität und Regulation erschwert die Ableitung typischer Zellmodelle. In den vorgestellten Studien wurden je eine Nebennierenrinden-Zelllinie des Menschen und der Maus sowie eine Nebennierenmark-Zelllinie der Ratte untersucht. Die untersuchten Gensequenzen stammten vom Menschen. In Kontrollexperimenten konnte eine transkriptionelle Aktivität auch in der Spezies Ratte nachgewiesen werden, unter Nutzung der mammo-somatotropen GH4-Zelllinie. Dennoch ist ein Spezies-bedingter Einfluss auf die Ergebnisse nicht auszuschließen. Uns sind jedoch keine etablierten Nebennierenmark-Zellsysteme bekannt, die auch transfizierbar sind.

In der Nebennierenrinden-Zelllinie des Menschen zeigte einzig der hypophysär-aktive *sst5*-Promotor eine transkriptionell-relevante Funktion. Die Untersuchung der gleichen Promotorsequenzen in einer Nebennierenrinden-Zelllinie der Ratte wies eine funktionelle Aktivität der hypophysär-aktiven Promotoren aller fünf *ssts* nach. Neben Spezies-Unterschieden sind hier auch funktionelle Alterationen der Zellsysteme im Rahmen der Immortalisation zu diskutieren. Die dabei häufig beobachtete Entdifferenzierung der Zellen ist meist mit dem Verlust spezifischer Eigenschaften verbunden. In Gegensatz zu den Zellmodellen der Nebennierenrinde fand sich in der Nebennierenmark-Zelllinie der Ratte für keinen der hypophysär-aktiven *sst*-Promotoren eine transkriptionelle Aktivität. Zu diskutieren sind neben Einschränkungen durch das Zellsystem die Nutzung alternativer Promotorsequenzen, wie sie z.B. für *sst3* und *sst5* bereits prinzipiell nachgewiesen wurden (151, 152). Um die Kontrolle der Expression besser verstehen zu können, ist die Charakterisierung transkriptionell-aktiver Promotoren für das Nebennierenmark sicherlich wichtig.

Die Untersuchung unterschiedlicher Promotorabschnitte erlaubte die Eingrenzung transkriptionell-aktiver Elemente. Für *sst1* wurden hier Konsensussequenzen des Homoeoboxproteins Pbx-1, welches an der Regulation der adrenokortikalen Entwicklung beteiligt ist (153-155), lokalisiert. Auch waren putative Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors SREBP, welcher in der Nebenniere exprimiert wird und als transkriptioneller Aktivator über Sterol-regulatorische Elemente wirkt (156, 157), zu finden. Des Weiteren konnten putative Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren c-Ets und C/EBP β (CCAAT Enhancer Binding Protein beta) (158-161) lokalisiert werden. Diese waren ebenfalls in den transkriptionell-aktiven Gensequenzen von *sst2*, *sst3* und *sst4* nachzuweisen, die zudem Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktors Oct-1 enthielten. Dabei handelt es sich um einen „POU-Domain“-Transkriptionsfaktor, der an der transkriptionellen Regulation der Somatostatin-Rezeptoren beteiligt ist (162-164). Die Klärung der funktionellen Bedeutung dieser Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen bedarf weiterer Untersuchungen.

5.6 Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor GHS-R1a in der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien

Das Hormon Ghrelin besitzt eine zentrale Rolle für die Appetitregulation mit vorwiegender Expression im Magen, wird aus noch unklaren Gründen aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert. Seine Ausschüttung wird von Somatostatin gehemmt (165). Da auch Hormone der Nebenniere an der Appetitregulation beteiligt sind und insbesondere einige Nebennierentumoren mit erheblichen Veränderungen des Essverhaltens einhergehen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Expression von Ghrelin und dem Ghrelin-Rezeptor im Vergleich zu einem breiten Spektrum anderer menschlicher Gewebe untersucht.

Die stärkste Ghrelin mRNA-Expression war in Magen und Dünndarm nachweisbar, wie bereits zuvor mittels RT-PCR, Northern Blot Analyse und Immunhistochemie demonstriert (40, 43, 56, 68, 166). Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass das Ghrelin-Protein in einzelnen Mucosazellen exprimiert wurde.

In unseren Untersuchungen von Organen des Reproduktionssystems war die Expression von Ghrelin mRNA in Hoden und Ovar nachweisbar. Während die im Hoden detektierten mRNA-Mengen mit den von Gnanapavan *et al.* (56) veröffentlichten Mengen übereinstimmten, waren die hier identifizierten Mengen im Ovar 40-fach niedriger. Ursächlich sind Unterschiede in den verwendeten RNAs, methodische Unterschiede in der Analytik sowie die Zyklus-abhängige Ghrelin-Expression im Ovar zu diskutieren (59). So wurden nur geringe Ghrelin-mRNA Mengen während des Proöstrus, hingegen aber deutlich höhere Mengen während des Diöstrus detektiert. Immunhistochemisch konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit das Ghrelin-Protein in den Granulosa-Lutein-Zellen des Ovars lokalisiert werden, vereinbar mit den Ergebnissen von Gaytan *et al.* (60), im Gegensatz zu von derselben Arbeitsgruppe gezeigten Ergebnissen allerdings nicht im Hoden (167). Letztere Diskrepanz ist möglicherweise durch unterschiedliche Sensitivität und/oder Spezifität der verwendeten Antikörper bedingt. Außerdem konnten wir die Expression der Ghrelin mRNA in Plazenta und erstmalig auch im Uterus nachweisen. Organe des Reproduktionssystems könnten durch Vermittlung von Ghrelin als zentralem Regulator des Appetits somit Einfluss auf den Stoffwechsel des Organismus nehmen.

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten zudem mit immunhistochemischen Methoden die Expression von Ghrelin im Hypothalamus

darstellen, wie zuvor auch von Korbonits et al. gezeigt (57). Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung in diesem Gewebe weisen auf eine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Wachstumshormonsekretion hin (74, 168-171). Die Expression von Ghrelin auf RNA- und Proteinebene in der Hypophyse sowohl in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen als auch in denen anderer Arbeitsgruppen (172) unterstützen eine Rolle bei der Interaktion von hypophysären Regelkreisen und Stoffwechsel. In einem anderen endokrinen Organ, der Schilddrüse, war dagegen nur Ghrelin-mRNA, nicht aber das Ghrelin-Protein zu detektieren, wie auch von Volante et al. (173) berichtet. Ob unter bestimmten Umständen auch eine Translation zum Protein stattfindet, ist zurzeit unklar. Die gut bekannten Zusammenhänge zwischen Funktionsstörungen der Schilddrüse und Veränderungen des Appetits und Stoffwechsels würden eine Expression von Ghrelin in der Schilddrüse vermuten lassen.

Überraschend war die Stärke der Expression in der Nebenniere, zwar geringer als im Magen, aber deutlich höher als in den meisten anderen untersuchten Geweben. Die einzige andere quantitative Untersuchung beschrieb etwa 100-fach niedrigere Ghrelin-mRNA-Mengen (56). Ursächlich ist die unterschiedliche Herkunft der RNA aus Operationsmaterial (56) bzw. Autopsie (hier vorliegende Arbeit) sowie die bekannte negative Korrelation zwischen der Ghrelin-mRNA Expression und dem Alter von Patienten (174) zu diskutieren. Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen konnte die Ghrelin-Expression in der innersten Schicht der Nebennierenrinde, die Zona reticularis, lokalisiert werden. In Untersuchungen zur physiologischen Signifikanz wurde beim Menschen ein stimulierender Effekt von Ghrelin auf die Sekretion von ACTH gezeigt (48), möglicherweise im Sinne eines positiven Feedbacks auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Im Rattenmodell war keine Wirkung auf die sekretorische Aktivität adrenocortikaler Zellen, aber eine erhöhte Proliferationsrate der Zona glomerulosa-Zellen unter Ghrelin-Einfluss nachweisbar (175). Eine Beteiligung von Ghrelin an der autokrinen/parakrinen Regulation adrenocortikaler Funktionen und an der Kontrolle der Proliferation adrenaler Zellen ist daher zu diskutieren.

Bei der Analyse von Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien war eine Expression von Ghrelin-mRNA in allen Tumoren nachweisbar, mit signifikant niedriger Expression in Phäochromozytomen und Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenomen im Vergleich zur gesunden Nebenniere. Barzon et al. berichteten

über eine quantitativ vergleichbare Expression in adrenocortikalen Nebennierenadenomen, ebenfalls mit der niedrigsten Expression in Aldosteronproduzierenden Adenomen (176). Mittels Immunhistochemie konnten die Ergebnisse der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Analyse bestätigt werden. In keinem der untersuchten Phäochromozytome und nur in der Hälfte der Aldosteronproduzierenden Nebennierenadenome war das Ghrelin-Protein detektierbar. Auch korrespondierte die fehlende Expression von Ghrelin in Phäochromozytomen mit den Untersuchungsergebnissen gesunder Nebennieren, bei denen in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks ebenfalls kein Ghrelin nachweisbar war. Die pathophysiologische Relevanz einer Ghrelin-Expression in Cortisol- und Aldosteronproduzierenden Nebennierenadenomen, welche aus Ghrelin-negativen Zellschichten der normalen Nebenniere hervorgehen, bleibt zu klären.

Für viele Hormone sind autokrine/parakrine Effekte im Ursprungsorgan beschrieben. Daher wurde die Expression des GHS-Rezeptors Typ 1a in der Nebenniere im Vergleich zu anderen Organen untersucht. Wie auch von Gnanapavan et al. (56) beschrieben, war die stärkste GHS-R1a mRNA-Expression in der Hypophyse detektierbar. In der immunhistochemischen Analyse konnte die Expression des Rezeptors in einzelnen Zellen des Hypophysenvorderlappens gezeigt werden, ohne dass der spezifische Zelltyp bisher genauer charakterisiert wurde. *In vivo* ist aber eine Stimulation der GH-Sekretion somatotroper Zellen durch Liganden des GH-R1a als Ausdruck der funktionellen Aktivität der nachgewiesenen Rezeptormoleküle gut beschrieben (177). Im Pankreas ließ sich die Ghrelin-Expression immunhistochemisch auf die Inselzellen lokalisieren, wie zuvor mittels RT-PCR und Bindungsstudien gezeigt (50, 58). Die spezifischen Inselzellen mit Expression des GHS-R1a konnten noch nicht genauer charakterisiert werden. Ein Einfluss von Ghrelin auf die Inselzellfunktion ist zu diskutieren. Zur *in vivo*-Regulation der Insulinsekretion finden sich widersprüchliche Berichte (50, 178). Eindrucksvoll war zudem die Expression des GHS-R1a im Hoden, die sich immunhistochemisch auf die Leydigzellen des Hoden lokalisieren ließ, übereinstimmend mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (56, 167).

Die Untersuchung der Nebenniere ergab eine im Vergleich zur Hypophyse deutlich geringere Expression des GHS-R1a, die andererseits aber deutlich höher als in allen anderen menschlichen Geweben war. Gnanapavan et al. beschrieben eine ähnlich hohe Expression in der Nebenniere (56). In weiteren Arbeiten wurden Ghrelin-Bindungsstellen in der menschlichen Nebennierenrinde, hauptsächlich in der Zona

glomerulosa und im äußeren Teil der Zona fasciculata, lokalisiert (76, 179). Auch in der Nebenniere der Ratte wurde die Expression von GHS-R1a mRNA und die Bindung von Ghrelin nachgewiesen (175). Die Bindungsstellen waren vorwiegend im äußeren Teil der Nebennierenrinde und nur zu einem geringen Teil im Nebennierenmark lokalisiert. Eine Lokalisation des GHS-R1a-Proteins mit immunhistochemischen Methoden ist nach derzeitigem Kenntnisstand bisher nicht beschrieben. Während der GHS-R1a in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analyse in anderen Geweben gut darstellbar war, gelang ein Nachweis in der gesunden Nebenniere nicht. Ursächlich ist die Expression eines modifizierten Proteins zu diskutieren, dass mit dem genutzten Antikörper nicht nachzuweisen ist, sowie eine unzureichende Sensitivität der Immunhistochemie bei geringer Rezeptorzahl. In Untersuchungen zur Klärung des physiologischen Effekts von Ghrelin auf die Corticosteroid-Sekretion in der Ratte fand sich kein relevanter Effekt (76). Ein Einfluss auf andere Funktionen der Nebenniere bleibt zu klären.

In Nebennierenadenomen war sowohl in der hier durchgeführten Auswertung als auch in einer anderen Arbeit (176) eine deutlich erniedrigte Expression des GHS-R1a zu beobachten. Die Ergebnisse der mRNA-Analyse konnten mittels Immunhistochemie auf Protein-Ebene bestätigt werden. Eine Expression der GHS-Rezeptor mRNA und des Proteins konnte nur in einigen der untersuchten Nebennierentumoren nachgewiesen werden. Das Fehlen des GHS-R1a-Proteins stimmte mit der fehlenden Expression des Rezeptors in der gesunden Nebenniere überein. Eine mögliche pathophysiologische Relevanz der GHS-R1a Expression in einigen der untersuchten Nebennierenadenome bleibt zu klären.

6 Zusammenfassung

Somatostatin ist ein im menschlichen Körper weit verbreitetes Hormon, das nahezu alle endo- und exokrinen Sekretionen hemmt. Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle als Inhibitor der Zellproliferation. Die unterschiedlichen Effekte von Somatostatin werden durch Bindung des Hormons an seine spezifischen Membranrezeptoren vermittelt. Bislang konnten fünf humane Somatostatin-Rezeptorsubtypen (*sst1-sst5*) identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die mRNA-Expression der fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen in der gesunden Nebenniere und Nebennierentumoren unterschiedlicher Ätiologien nachgewiesen werden. Während in der gesunden Nebenniere die Expression aller fünf *ssts* identifiziert wurde, zeigten die verschiedenen Nebennierentumoren ein sich jeweils von der gesunden Nebenniere unterscheidendes Expressionsmuster. Die unterschiedliche Expression könnte auf neue Aspekte in der Pathogenese dieser Tumoren deuten. Die differenzierte Expression könnte zudem die diagnostischen und therapeutischen Strategien in der Behandlung solcher Tumoren mit Einsatz spezifischer Analoga von Somatostatin in Abhängigkeit von der Tumorart und dem exprimierten Rezeptorsubtyp erweitern. In der Kultur vitaler Nebennierenzellen wurde zudem die Regulation der Somatostatin-Rezeptor-Expression untersucht. Während Somatostatin keine signifikanten Effekte besaß, zeigte das Somatostatin-Analog Octreotid stimulierende Wirkung auf die *sst3*-Expression und SOM230 hemmende Wirkung auf die *sst1*-Expression.

In *in vitro*-Experimenten wurde die Wirkung von Somatostatin und seiner Analoga auf die Hormonsekretion und den Zellzyklus untersucht. Während bei Primärkulturzellen aus nicht-tumorösem Nebennierengewebe und Cortisol-produzierenden Nebennierenadenomen kein Einfluss sichtbar wurde, war eine Stimulation der Hormonsekretion von Primärkulturzellen Aldosteron-produzierender Adenome durch Octreotid und SOM230, sowie eine Hemmung der Metanephrinsekretion primärer Phäochromozytomzellen durch Somatostatin und SOM230 nachweisbar. Ein Einsatz von Somatostatin-Analoga in der Therapie von Phäochromozytomen erscheint somit denkbar. Exemplarisch war zudem auch ein Effekt von Somatostatin-Analoga auf den Zellzyklus zu beobachten, vereinbar mit einer Hemmung.

Zur genaueren Charakterisierung der molekularen Regulation wurden die bekannten

Promotorregionen der einzelnen Somatostatin-Rezeptorsubtypgene bezüglich ihrer transkriptionellen Bedeutung in Nebennieren-Modellsystemen untersucht. In einer Nebennierenrinden-Zelllinie der Maus zeigten alle in der Hypophyse charakterisierten Promotorregionen eine Wirkung. In den aktiven Promotorregionen waren putative Bindungsstellen von bekannten in der Nebenniere exprimierten Transkriptionsfaktoren zu finden. In einem Modellsystem des Nebennierenmarks besaß hingegen keiner der Promotoren relevante Effekte, so dass hier alternative Promotoren der transkriptionellen Steuerung zu diskutieren sind.

Das Hormon Ghrelin ist an der Regulation von Appetit, endokriner Sekretion und auch der Zellproliferation beteiligt und interagiert mit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. In den vorgelegten Untersuchungen konnte eine sehr starke Expression von Ghrelin in der Nebenniere sowohl auf RNA wie auch auf Protein-Ebene gezeigt werden, die höher als in den meisten zum Vergleich untersuchten Geweben war. Ein Einfluss der Nebenniere auf die Appetitregulation und den Stoffwechsel unter Vermittlung von Ghrelin erscheint somit denkbar. In Nebennierentumoren war eine signifikante Abnahme der Ghrelin-Expression zu beobachten, deren pathophysiologische Relevanz noch unklar ist.

7 Referenzen

1. **Koch CA, Pacak K, Chrousos GP** 2002 The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5367-5384
2. **Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR** 2004 The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 25:309-340
3. **Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R** 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79
4. **Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB** 1995 The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249-1265
5. **Patel YC** 1999 Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198
6. **Hofland LJ, van Hagen PM, Lamberts SW** 1999 Functional role of somatostatin receptors in neuroendocrine and immune cells. *Ann Med* 31 Suppl 2:23-27
7. **Aguila MC, Rodriguez AM, Aguila-Mansilla HN, Lee WT** 1996 Somatostatin antisense oligodeoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte proliferation in culture. *Endocrinology* 137:1585-1590
8. **Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G** 1994 Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 93:2000-2006
9. **Reichlin S** 1983 Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med* 309:1556-1563
10. **Reichlin S** 1983 Somatostatin. *N Engl J Med* 309:1495-1501
11. **Smith-Jones PM, Bischof C, Leimer M, Gludovacz D, Angelberger P, Pangerl T, Peck-Radosavljevic M, Hamilton G, Kaserer K, Kofler A, Schlangbauer-Wadl H, Traub T, Virgolini I** 1999 DOTA-lanreotide: a novel somatostatin analog for tumor diagnosis and therapy. *Endocrinology* 140:5136-5148
12. **Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB** 1993 A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides. *FEBS Lett* 321:279-284
13. **Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HH, Panetta R, Patel YC, Niznik HB** 1993 Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *Mol Pharmacol* 43:894-901
14. **O'Carroll AM, Raynor K, Lolait SJ, Reisine T** 1994 Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5. *Mol Pharmacol* 46:291-298
15. **Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC** 1994 Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 45:417-427
16. **Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schule R** 1993 Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4196-4200
17. **Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M** 1993 Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun* 193:648-652
18. **Yamada Y, Kagimoto S, Kubota A, Yasuda K, Masuda K, Someya Y, Ihara Y, Li Q, Imura H, Seino S, et al.** 1993 Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 195:844-852
19. **Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S** 1992 Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:251-255
20. **Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S** 1992 Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol* 6:2136-2142
21. **Reisine T, Bell GI** 1995 Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* 16:427-442
22. **Patel YC** 1997 Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 20:348-367

23. **Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless** 1982 SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 31:1133-1140
24. **Heiman ML, Murphy WA, Coy DH** 1987 Differential binding of somatostatin agonists to somatostatin receptors in brain and adenohypophysis. *Neuroendocrinology* 45:429-436
25. **Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G** 2002 SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146:707-716
26. **Patel YC, Srikant CB** 1994 Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 135:2814-2817
27. **Cattaneo MG, Amoroso D, Gussoni G, Sanguini AM, Vicentini LM** 1996 A somatostatin analogue inhibits MAP kinase activation and cell proliferation in human neuroblastoma and in human small cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 397:164-168
28. **Reardon DB, Wood SL, Brautigan DL, Bell GI, Dent P, Sturgill TW** 1996 Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin. *Biochem J* 314 (Pt 2):401-404
29. **Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, Delesque N, O'Carroll AM, Schally AV, Vaysse N, Susini C, Buscail L** 1997 Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9343-9348
30. **Bito H, Mori M, Sakanaka C, Takano T, Honda Z, Gotoh Y, Nishida E, Shimizu T** 1994 Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 269:12722-12730
31. **Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ** 1999 Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* 13:24-37
32. **Sharma K, Patel YC, Srikant CB** 1999 C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* 13:82-90
33. **Sharma K, Patel YC, Srikant CB** 1996 Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol* 10:1688-1696
34. **Panetta R, Patel YC** 1995 Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci* 56:333-342
35. **Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC** 1999 Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes* 48:77-85
36. **Balster DA, O'Doriso MS, Summers MA, Turman MA** 2001 Segmental expression of somatostatin receptor subtypes sst(1) and sst(2) in tubules and glomeruli of human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F457-465
37. **Epelbaum J, Bertherat J, Prevost G, Kordon C, Meyerhof W, Wulfsen I, Richter D, Plouin PF** 1995 Molecular and pharmacological characterization of somatostatin receptor subtypes in adrenal, extraadrenal, and malignant pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1837-1844
38. **Kimura N, Schindler M, Kasai N, Kimura I** 2001 Immunohistochemical localization of somatostatin receptor type 2A in rat and human tissues. *Endocr J* 48:95-102
39. **Sestini R, Orlando C, Peri A, Tricarico C, Pazzagli M, Serio M, Pagani A, Bussolati G, Granchi S, Maggi M** 1996 Quantitation of somatostatin receptor type 2 gene expression in neuroblastoma cell lines and primary tumors using competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2:1757-1765
40. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
41. **van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E** 2004 Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457
42. **Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G** 2001 Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1738-1745
43. **Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2000 Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261

44. **Korbonits M, Trainer PJ, Edwards R, Besser GM, Grossman AB** 1995 Benzodiazepines attenuate the pituitary-adrenal responses to corticotrophin-releasing hormone in healthy volunteers, but not in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:29-35
45. **Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA** 1997 Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18:621-645
46. **Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E** 2001 Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1169-1174
47. **Cunha SR, Mayo KE** 2002 Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogues potentiate GH-releasing hormone (GHRH)-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in cells expressing transfected GHRH and GH secretagogue receptors. *Endocrinology* 143:4570-4582
48. **Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2000 Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911
49. **Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2001 Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083-5086
50. **Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S** 2002 Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129
51. **Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH, Jr.** 2002 Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185-190
52. **Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K** 2002 Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674
53. **Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K** 2001 Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1483-1487
54. **Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E** 2002 Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143:717-725
55. **Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992
56. **Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M** 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988
57. **Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB** 2001 Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14:101-104
58. **Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M** 2002 Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300-1308
59. **Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C** 2003 Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144:1594-1602
60. **Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2003 Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88:879-887
61. **Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M** 2002 Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 50:1013-1021
62. **Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2000 Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486:213-216

63. **Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F** 2001 Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788-794
64. **Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S** 2002 Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321:157-160
65. **Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C** 2001 GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4284-4291
66. **Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH** 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977
67. **Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4984-4990
68. **Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E** 2001 Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5052-5059
69. **Rindi G, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Cocchi D, Paolotti D, Solcia E** 2002 Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol* 117:521-525
70. **McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD** 1997 Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11:415-423
71. **Petersenn S** 2002 Growth hormone secretagogues and ghrelin: an update on physiology and clinical relevance. *Horm Res* 58 Suppl 3:56-61
72. **Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV** 2000 Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 43:4370-4376
73. **Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K** 2001 Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 287:142-146
74. **Kojima M, Hosoda H, Kangawa K** 2001 Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 56 Suppl 1:93-97
75. **Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD** 1997 Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48:23-29
76. **Tortorella C, Macchi C, Spinazzi R, Malendowicz LK, Trejter M, Nussdorfer GG** 2003 Ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone-secretagogue receptor, is expressed in the human adrenal cortex. *Int J Mol Med* 12:213-217
77. **Jones CR, Millar JA, Lawrie C, Sumner DJ, Reid JL** 1984 Specific inhibition of aldosterone responses to endogenous and exogenous angiotensin II by somatostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 21:279-284
78. **Petersenn S, Rasch AC, Bohnke C, Schulte HM** 2002 Identification of an upstream pituitary-active promoter of human somatostatin receptor subtype 5. *Endocrinology* 143:2626-2634
79. **Petersenn S, Rasch AC, Presch S, Beil FU, Schulte HM** 1999 Genomic structure and transcriptional regulation of the human somatostatin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol* 157:75-85
80. **Petersenn S, Rasch AC, Presch S, Beil FU, Schulte HM** 2002 Characterization of the human somatostatin receptor type 4 promoter. *Mol Cell Endocrinol* 188:75-83
81. **Pisarek H, Pawlikowski M** 2002 Immunohistochemical localization of the somatostatin receptor subtype 2A in the rat adrenal gland. *Folia Histochem Cytobiol* 40:27-30
82. **Zatelli MC, Piccin D, Bondanelli M, Tagliati F, De Carlo E, Culler MD, Uberti EC** 2003 An in vivo OctreoScan-negative adrenal pheochromocytoma expresses somatostatin receptors and responds to somatostatin analogs treatment in vitro. *Horm Metab Res* 35:349-354

83. **Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA** 2001 Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 28:836-846
84. **Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Hollt V, Steinke R, Lehnert H** 2003 Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5150-5157
85. **Unger N, Serdiuk I, Sheu SY, Walz MK, Schulz S, Schmid KW, Mann K, Petersenn S** 2004 Immunohistochemical determination of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, 4, and 5 in various adrenal tumors. *Endocr Res* 30:931-934
86. **Maurea S, Lastoria S, Caraco C, Klain M, Varrella P, Acampa W, Muto P, Salvatore M** 1996 The role of radiolabeled somatostatin analogs in adrenal imaging. *Nucl Med Biol* 23:677-680
87. **van der Harst E, de Herder WW, Bruining HA, Bonjer HJ, de Krijger RR, Lamberts SW, van de Meiracker AH, Boomsma F, Stijnen T, Krenning EP, Bosman FT, Kwekkeboom DJ** 2001 [(123I)]metaiodobenzylguanidine and [(111In)]octreotide uptake in benign and malignant pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86:685-693
88. **Reubi JC, Maurer R, von Werder K, Torhorst J, Klijn JG, Lamberts SW** 1987 Somatostatin receptors in human endocrine tumors. *Cancer Res* 47:551-558
89. **Aguilera G, Harwood JP, Catt KJ** 1981 Somatostatin modulates effects of angiotensin II in adrenal glomerulosa zone. *Nature* 292:262-263
90. **Boscaro M, Scaroni C, Edwards CR, Mantero F** 1982 Inhibitory effect of somatostatin on the aldosterone response to angiotensin II: in vitro studies. *J Endocrinol Invest* 5:173-177
91. **Kasprzak A, Rebuffat P, Andreis PG, Mazzocchi G, Nussdorfer GG** 1991 Effects of prolonged cysteamine administration on the rat adrenal cortex: evidence that endogenous somatostatin is involved in the control of the growth and steroidogenic capacity of zona glomerulosa. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38:469-473
92. **Mazzocchi G, Malendowicz LK, Meneghelli V, Nussdorfer GG** 1992 Evidence that endogenous somatostatin (SRIF) exerts a tonic inhibitory effect on the rat renin--angiotensin--aldosterone system. *In Vivo* 6:9-12
93. **Mazzocchi G, Robba C, Rebuffat P, Gottardo G, Nussdorfer GG** 1985 Effect of somatostatin on the zona glomerulosa of rats treated with angiotensin II or captopril: stereology and plasma hormone concentrations. *J Steroid Biochem* 23:353-356
94. **Rebuffat P, Belloni AS, Musajo FG, Rocco S, Markowska A, Mazzocchi G, Nussdorfer GG** 1994 Evidence that endogenous somatostatin (SRIF) exerts an inhibitory control on the function and growth of rat adrenal zona glomerulosa. The possible involvement of zona medullaris as a source of endogenous SRIF. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48:353-360
95. **Rebuffat P, Mazzocchi G, Gottardo G, Nussdorfer GG** 1989 Further studies on the involvement of dopamine and somatostatin in the inhibitory control of the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Exp Clin Endocrinol* 93:73-81
96. **Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J, Muller OA** 1994 Octreotide exerts different effects in vivo and in vitro in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol* 130:125-131
97. **Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF** 1995 Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH4C1 cells. *Endocrinology* 136:5070-5075
98. **Park S, Kamegai J, Kineman RD** 2003 Role of glucocorticoids in the regulation of pituitary somatostatin receptor subtype (sst1-sst5) mRNA levels: evidence for direct and somatostatin-mediated effects. *Neuroendocrinology* 78:163-175
99. **van der Hoek J, Waaijers M, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij D, Feelders RA, Schmid HA, Schoeffter P, Hoyer D, Cervia D, Taylor JE, Culler MD, Lamberts SW, Hofland LJ** 2005 Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E278-287
100. **Schonbrunn A** 1982 Glucocorticoids down-regulate somatostatin receptors on pituitary cells in culture. *Endocrinology* 110:1147-1154
101. **Kraus J, Woltje M, Schonwetter N, Hollt V** 1998 Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene. *FEBS Lett* 428:165-170
102. **Karin M** 1998 New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 93:487-490

103. **Park S, Kamegai J, Johnson TA, Frohman LA, Kineman RD** 2000 Modulation of pituitary somatostatin receptor subtype (sst1-5) messenger ribonucleic acid levels by changes in the growth hormone axis. *Endocrinology* 141:3556-3563
104. **Berelowitz M, Xu Y, Song J, Bruno JF** 1995 Regulation of somatostatin receptor mRNA expression. *Ciba Found Symp* 190:111-122; discussion 122-116
105. **Presky DH, Schonbrunn A** 1988 Somatostatin pretreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin. *J Biol Chem* 263:714-721
106. **Axelrod J, Reisine TD** 1984 Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224:452-459
107. **Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA** 1997 Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech* 36:520-533
108. **Wurtman RJ, Axelrod J** 1965 Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* 150:1464-1465
109. **Mazzocchi G, Gottardo L, Aragona F, Albertin G, Nussdorfer GG** 2000 Glucagon inhibits ACTH-stimulated cortisol secretion from dispersed human adrenocortical cells by activating unidentified receptors negatively coupled with the adenylate cyclase cascade. *Horm Metab Res* 32:265-268
110. **Bird IM, Walker SW, Williams BC** 1990 Agonist-stimulated turnover of the phosphoinositides and the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *J Mol Endocrinol* 5:191-209
111. **Hausdorff WP, Aguilera G, Catt KJ** 1989 Inhibitory actions of somatostatin on cyclic AMP and aldosterone production in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Cell Signal* 1:377-386
112. **Sieber C, Gnadinger M, Del Pozo E, Shaw S, Weidmann P** 1988 Effect of a new somatostatin analogue SMS 201-995 (Sandostatin) on the renin-aldosterone axis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 28:25-32
113. **Diel F, Holz J, Bethge N** 1981 Failure of somatostatin and beta-endorphin to affect bovine adrenal cortex cells in vitro. *Horm Metab Res* 13:95-98
114. **Rebuffat P, Robba C, Mazzocchi G, Nussdorfer GG** 1984 Inhibitory effect of somatostatin on the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *J Steroid Biochem* 21:387-390
115. **Moeller I, Bunn SJ, Marley PD** 1989 Actions of somatostatin on perfused bovine adrenal glands and cultured bovine adrenal medullary cells. *Brain Res* 484:192-202
116. **Bethea CL** 1987 Glucocorticoid stimulation of dopamine production in PC12 cells on extracellular matrix and plastic. *Mol Cell Endocrinol* 50:211-222
117. **Kasai Y, Ohta T, Nakazato Y, Ito S** 2001 Release of dopamine and ATP from PC12 cells treated with dexamethasone, reserpine and bafilomycin A1. *J Vet Med Sci* 63:367-372
118. **Wagner PG, Jorgensen MS, Arden WA, Jackson BA** 1999 Stimulus-secretion coupling in porcine adrenal chromaffin cells: acute effects of glucocorticoids. *J Neurosci Res* 57:643-650
119. **Kim KT, Park DH, Joh TH** 1993 Parallel up-regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by dexamethasone in PC12 cells. *J Neurochem* 60:946-951
120. **Tischler AS, Perlman RL, Morse GM, Sheard BE** 1983 Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures. *J Neurochem* 40:364-370
121. **Kopf D, Bockisch A, Steinert H, Hahn K, Beyer J, Neumann HP, Hensen J, Lehnert H** 1997 Octreotide scintigraphy and catecholamine response to an octreotide challenge in malignant pheochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:39-44
122. **Koriyama N, Kakei M, Yaekura K, Okui H, Yamashita T, Nishimura H, Matsushita S, Tei C** 2000 Control of catecholamine release and blood pressure with octreotide in a patient with pheochromocytoma: a case report with in vitro studies. *Horm Res* 53:46-50
123. **Delgrange E, Trouillas J, Gustin T, Gilliard C, Donckier JE** 2001 Antiproliferative effect of octreotide in somatotroph pituitary adenomas: discussion from a single case report. *Acta Neurochir (Wien)* 143:733-736
124. **Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS** 2003 Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 9:2362-2365
125. **Hofland LJ, van Koetsveld PM, Wouters N, Waaijers M, Reubi JC, Lamberts SW** 1992 Dissociation of antiproliferative and antihormonal effects of the somatostatin analog octreotide on 7315b pituitary tumor cells. *Endocrinology* 131:571-577

126. **Thapar K, Kovacs KT, Stefanescu L, Scheithauer BW, Horvath E, Lloyd RV, Li J, Laws ER, Jr.** 1997 Antiproliferative effect of the somatostatin analogue octreotide on growth hormone-producing pituitary tumors: results of a multicenter randomized trial. *Mayo Clin Proc* 72:893-900
127. **Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, Paez-Pereda M, Erneux C, Florio T, Pagotto U, Stalla GK** 2006 Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing *Zac1* expression. *Cancer Res* 66:1576-1582
128. **Weckbecker G, Liu R, Tolcsvai L, Bruns C** 1992 Antiproliferative effects of the somatostatin analogue octreotide (SMS 201-995) on ZR-75-1 human breast cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res* 52:4973-4978
129. **Armelin HA, Lotfi CF, Lepique AP** 1996 Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells. *Endocr Res* 22:373-383
130. **Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA** 2004 c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 33:623-638
131. **Arola J, Heikkila P, Voutilainen R, Kahri AI** 1994 Protein kinase C signal transduction pathway in ACTH-induced growth effect of rat adrenocortical cells in primary culture. *J Endocrinol* 141:285-293
132. **Hornsby PJ, Gill GN** 1977 Hormonal control of adrenocortical cell proliferation. Desensitization to ACTH and interaction between ACTH and fibroblast growth factor in bovine adrenocortical cell cultures. *J Clin Invest* 60:342-352
133. **Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N** 2005 Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 146:633-642
134. **Otis M, Gallo-Payet N** 2006 Differential involvement of cytoskeleton and Rho-GTPases in growth -promoting effects of angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*
135. **Clyne CD, Nicol MR, MacDonald S, Williams BC, Walker SW** 1993 Angiotensin II stimulates growth and steroidogenesis in zona fasciculata/reticularis cells from bovine adrenal cortex via the AT1 receptor subtype. *Endocrinology* 132:2206-2212
136. **Gill GN, Ill CR, Simonian MH** 1977 Angiotensin stimulation of bovine adrenocortical cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5569-5573
137. **Natarajan R, Gonzales N, Hornsby PJ, Nadler J** 1992 Mechanism of angiotensin II-induced proliferation in bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 131:1174-1180
138. **Tian Y, Balla T, Baukal AJ, Catt KJ** 1995 Growth responses to angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 268:E135-144
139. **Horiba N, Nomura K, Shizume K** 1990 Exogenous and locally synthesized angiotensin II and glomerulosa cell functions. *Hypertension* 15:190-197
140. **Inagami T, Yamano Y, Bardhan S, Chaki S, Guo DF, Ohyama K, Kambayashi Y, Takahashi K, Ichiki T, Tsuzuki S, et al.** 1995 Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors. *Adv Exp Med Biol* 377:311-317
141. **Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ** 1995 The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10663-10667
142. **Bourcier T, Forgez P, Borderie V, Scheer S, Rostene W, Laroche L** 2000 Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:4133-4141
143. **Langeveld CH, van Waas MP, Stoof JC, Sutanto W, de Kloet ER, Wolbers JG, Heimans JJ** 1992 Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurosci Res* 31:524-531
144. **Brunetti M, Colasante A, Mascetra N, Piantelli M, Musiani P, Aiello FB** 1998 IL-10 synergizes with dexamethasone in inhibiting human T cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 285:915-919
145. **Kylmaniemi M, Oikarinen A, Oikarinen K, Salo T** 1996 Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. *J Dent Res* 75:919-926
146. **Reil TD, Kashyap VS, Sarkar R, Freishlag J, Gelabert HA** 2000 Dexamethasone inhibits the phosphorylation of retinoblastoma protein in the suppression of human vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res* 92:108-113

147. **Shiao RT, Miglietta L, Khera SY, Wolfson A, Freter CE** 1995 Dexamethasone and suramin inhibit cell proliferation and interleukin-6-mediated immunoglobulin secretion in human lymphoid and multiple myeloma cell lines. *Leuk Lymphoma* 17:485-494
148. **Takenawa J, Kaneko Y, Okumura K, Yoshida O, Nakayama H, Fujita J** 1995 Inhibitory effect of dexamethasone and progesterone in vitro on proliferation of human renal cell carcinomas and effects on expression of interleukin-6 or interleukin-6 receptor. *J Urol* 153:858-862
149. **Phillips R, Crock C, Funder J** 1985 Effects of mineralocorticoids and glucocorticoids on compensatory adrenal growth in rats. *Am J Physiol* 248:E450-456
150. **Zwermann O, Schulte DM, Reincke M, Beuschlein F** 2005 ACTH 1-24 inhibits proliferation of adrenocortical tumors in vivo. *Eur J Endocrinol* 153:435-444
151. **Glos M, Kreienkamp HJ, Hausmann H, Richter D** 1998 Characterization of the 5'-flanking promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 3 gene. *FEBS Lett* 440:33-37
152. **Gordon DF, Woodmansee WW, Lewis SR, James RA, Wood WM, Ridgway EC** 1999 Cloning of the mouse somatostatin receptor subtype 5 gene: promoter structure and function. *Endocrinology* 140:5598-5608
153. **Bischof LJ, Kagawa N, Moskow JJ, Takahashi Y, Iwamatsu A, Buchberg AM, Waterman MR** 1998 Members of the meis1 and pbx homeodomain protein families cooperatively bind a cAMP-responsive sequence (CRS1) from bovine CYP17. *J Biol Chem* 273:7941-7948
154. **Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP** 2005 Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146:1018-1024
155. **Schnabel CA, Selleri L, Cleary ML** 2003 Pbx1 is essential for adrenal development and urogenital differentiation. *Genesis* 37:123-130
156. **Cao G, Zhao L, Stangl H, Hasegawa T, Richardson JA, Parker KL, Hobbs HH** 1999 Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol Endocrinol* 13:1460-1473
157. **Imachi H, Murao K, Sato M, Hosokawa H, Ishida T, Takahara J** 1999 CD36 LIMPII analogous-1, a human homolog of the rodent scavenger receptor B1, provides the cholesterol ester for steroidogenesis in adrenocortical cells. *Metabolism* 48:627-630
158. **Chen YF, Shin SJ, Lin SR** 2005 Ets1 was significantly activated by ERK1/2 in mutant K-ras stably transfected human adrenocortical cells. *DNA Cell Biol* 24:126-132
159. **Eastman HB, Fawcett TW, Udelsman R, Holbrook NJ** 1996 Effects of perturbations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis on the acute phase response: altered C/EBP and acute phase response gene expression in lipopolysaccharide-treated rats. *Shock* 6:286-292
160. **Magalini A, Savoldi G, Ferrari F, Garnier M, Ghezzi P, Albertini A, Di Lorenzo D** 1995 Role of IL-1 beta and corticosteroids in the regulation of the C/EBP-alpha, beta and delta genes in vivo. *Cytokine* 7:753-758
161. **Yu L, Wu Q, Yang CP, Horwitz SB** 1995 Coordination of transcription factors, NF-Y and C/EBP beta, in the regulation of the mdr1b promoter. *Cell Growth Differ* 6:1505-1512
162. **Baumeister H, Meyerhof W** 2000 Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J Physiol Paris* 94:167-177
163. **Baumeister H, Meyerhof W** 2000 The POU domain transcription factor Tst-1 activates somatostatin receptor 1 gene expression in pancreatic beta -cells. *J Biol Chem* 275:28882-28887
164. **Baumeister H, Wegner M, Richter D, Meyerhof W** 2000 Dual regulation of somatostatin receptor subtype 1 gene expression by pit-1 in anterior pituitary GH3 cells. *Mol Endocrinol* 14:255-271
165. **Silva AP, Bethmann K, Raulf F, Schmid HA** 2005 Regulation of ghrelin secretion by somatostatin analogs in rats. *Eur J Endocrinol* 152:887-894
166. **Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753-4758
167. **Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2004 Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:400-409
168. **Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S** 2001 A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198
169. **Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Ghrelin, an endogenous growth

- hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-232
170. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
171. **Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325-4328
172. **Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB** 2001 The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:881-887
173. **Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M** 2003 Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 162:645-654
174. **Carraro G, Albertin G, Aragona F, Forneris M, Casale V, Spinazzi R, Nussdorfer GG** 2006 Age-dependent decrease in the ghrelin gene expression in the human adrenal cortex: a real-time PCR study. *Int J Mol Med* 17:319-321
175. **Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP, Nussdorfer GG** 2003 Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: Evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett* 536:173-179
176. **Barzon L, Pacenti M, Masi G, Stefani AL, Fincati K, Palu G** 2005 Loss of growth hormone secretagogue receptor 1a and overexpression of type 1b receptor transcripts in human adrenocortical tumors. *Oncology* 68:414-421
177. **Petersenn S, Jung R, Beil FU** 2002 Diagnosis of growth hormone deficiency in adults by testing with GHRP-6 alone or in combination with GHRH: comparison with the insulin tolerance test. *Eur J Endocrinol* 146:667-672
178. **Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T** 2004 Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53:3142-3151
179. **Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G** 2000 Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3803-3807

8 Liste der Veröffentlichungen

“Differential expression of the human somatostatin receptor subtypes *sst1-5* in various adrenal tumors and normal adrenal gland”

Bianca Ueberberg, Helmut Tourne, Anja Redmann, Martin K. Walz, Kurt W. Schmid, Klaus Mann, Stephan Petersenn

Hormone and Metabolic Research 2005; 37: 722-728

Eingereicht:

„Differential expression of ghrelin and its receptor (GHS-R1a) in various adrenal tumors and normal adrenal gland”

Ueberberg B., Unger N., Sheu S. Y., Walz M. K., Schmid K. W., Saeger W., Mann K., Petersenn S.; Endocrine-related Cancer

“Expression of ghrelin and its receptor in several human tissues”

Ueberberg B., Unger N., Saeger W., Mann K., Petersenn S.; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Abstracts

47. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (2003)

“Differential expression of the human somatostatin receptor subtype 1, 2 and 5 in adrenal tumors and normal adrenal gland”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Walz MK, Mann K, Petersenn S

6. European Congress of Endocrinology (EFES) 2003

“Expression of human somatostatin receptor subtypes in various adrenal tumors”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Walz MK, Mann K, Petersenn S

ENDO 2003- The Endocrine Society's 85th Meeting

“Expression of Human Somatostatin Receptor Subtypes in Various Adrenal Tumors and Normal Adrenal Gland”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Walz MK, Schmid KW, Mann K, Petersenn S

Symposium der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Endokrinologie 2004

“Transkriptionelle Promotoraktivität der menschlichen Somatostatin-Rezeptor-Subtypen 1-5 in Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen”

Ueberberg B., Redmann A., Tourne H., Unger N., Mann K., Petersenn S.

48. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (2004)

“Expression of ghrelin and its receptor (GHS-R1a) in adrenal tumors and normal adrenal gland”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Unger N, Walz MK, Mann K, Petersenn S

ENDO 2004- The Endocrine Society's 86th Meeting

“Quantitative analysis of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in adrenal tumors and normal adrenal gland”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Unger N, Walz MK, Mann K, Petersenn S

49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (2005)

“Transcriptional regulation of the human somatostatin receptor subtypes (*sst1-5*) in adrenal cortex and medulla cells”

Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Unger N, Mann K, Petersenn S

European Congress of Endocrinology 2005

“Immunohistochemical detection of ghrelin and its receptor in normal human tissues”

Ueberberg B, Unger N, Tourne H, Redmann A, Saeger W, Mann K, Petersenn S

ENDO2005- The Endocrine Society's 87th Meeting

“Immunohistochemical detection of ghrelin in several human tissues and various adrenal tumors”

Ueberberg B, Unger N, Tourne H, Redmann A, Schmid KW, Walz MK, Saeger W, Mann K, Petersenn S

50. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (2006)

“Effects of somatostatin and its analogues in primary cell cultures of adrenal tumors”

Ueberberg B, Walz MK, Unger N., Schmid KW, Mann K, Petersenn S

9 Lebenslauf

Bianca Ueberberg

Wetterstrasse 17
45884 Gelsenkirchen
Tel.: 0209/138323
E-Mail: Bianca.ueberberg@uni-essen.de

Geboren am 28.05.1976 in Gelsenkirchen
Ledig

Schulbildung

Aug. 1982 – Juni 1986	Grundschule in Gelsenkirchen, NRW
Aug. 1986 – Juni 1995	Grillo-Gymnasium in Gelsenkirchen, NRW Abitur (Note: 2,7)

Studium

Okt. 1995 – April 2002	Biologie , Ruhr-Universität-Bochum Abschluß: Diplom-Biologin Abschlußnote: sehr gut Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie/Biophysik, Cytologie Diplomarbeit angefertigt in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Fakultät für Medizin mit dem Titel »Versuch der Identifikation eines <i>agr</i> -Systems bei <i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i> «
Mai 2002 – Oktober 2006	Dissertation angefertigt in der Klinik für Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen mit dem Titel »Charakterisierung neuer Regulationsmechanismen in der Nebenniere durch Somatostatin und Ghrelin«

10 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Charakterisierung neuer Regulationsmechanismen in der Nebenniere durch Somatostatin und Ghrelin" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Bianca Ueberberg befürworte.

Essen, 30.09.06

Unterschrift

(PD Dr. med. Stephan Petersenn)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 30.09.06

Unterschrift

(Dipl.-Biol. Bianca Ueberberg)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 30.09.06

Unterschrift

(Dipl.-Biol. Bianca Ueberberg)