

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I,
Lehrstuhl für Endokrinologie und Diabetologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Lehrstuhlinhaber: Professor Dr. med. Martin Fassnacht-Capeller

**Effektormechanismen von Mitotane und anderen Inhibitoren
der Sterol-O-Acyl-Transferasen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

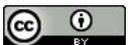
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annemarie Winkler

aus Hannover

Würzburg, Juli 2021



Referentenliste

Referent: Prof. Dr. Dr. Matthias Kroiß

Koreferent: Prof. Dr. Markus Böck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomie und Funktion der Nebennieren.....	1
1.2	Nebennierenrindenkarzinom.....	1
1.3	Therapie des Nebennierenrindenkarzinoms mit Mitotane.....	10
1.4	Wichtige Signalkaskaden und Stoffwechselwege der Nebennierenrinde.....	11
1.4.1	ER-Stress	11
1.4.2	Steroidstoffwechsel.....	16
1.5	Fragestellung dieser Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Reagenzien und Chemikalien.....	19
2.2	Geräte	21
2.3	Zellkultur	21
2.4	Zellzählung	22
2.5	Inkubation mit Mitotane, Thapsigargin, ATR 101, AZD 3988, Sandoz 58-035	22
2.6	Herstellung Ganzzellextrakt.....	23
2.7	Proteinbestimmung	23
2.8	Western Blot	24
3	Ergebnisse	29
3.1	Thapsigargin als Marker für ER-Stress	29
3.2	Mitotane führt zur Induktion des CHOP-Proteins in NCI-H295R-Zellen.....	31
3.3	Einfluss von Mitotane auf weitere am ER-Stress beteiligte Proteine.....	32
3.4	Mitotane beeinflusst einen Transkriptionsfaktor des Lipidstoffwechsels in NCI-H295R-Zellen.....	34
3.5	Effekt von verschiedenen SOAT-Inhibitoren auf NCI-H295R-Zellen.....	35
3.5.1	ATR 101 und Mitotane führen zu einem Anstieg der CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen	36
3.5.2	Auswirkungen von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf die SREBP-1-Expression in NCI-H295R-Zellen.....	37
3.6	Mitotane führt auch in anderen Zelllinien zur Induktion des CHOP-Proteins.	39
3.7	CHOP-Induktion durch die SOAT-Inhibitoren ATR 101, Sandoz 58-035 und AZD 3988 in verschiedenen Zelllinien.....	40

3.8	Einfluss von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf SREBP-1 in verschiedenen Zelllinien	43
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis.....	59
	Appendix.....	71
I	Abkürzungsverzeichnis	71
II	Abbildungsverzeichnis	73
III	Tabellenverzeichnis.....	75
IV	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion der Nebennieren

Ein kleines jedoch sehr wichtiges Organ des menschlichen Körpers ist die Nebenniere. Das paarig angelegte Organ ist beidseits kranial des oberen Nierenpols lokalisiert und besteht aus dem Nebennierenmark und der Nebennierenrinde. Letztere nimmt eine zentrale Rolle bei der Synthese von Mineralokortikoiden, Glukokortikoiden, Androgenen und deren Vorstufen ein [1]. Um diese Funktionen zu erfüllen, sind die Zellen der Nebennierenrinde reich an glattem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien [2]. Tumore der Nebenniere können entweder vom Nebennierenmark (Phäochromozytom) oder von der Nebennierenrinde ausgehen. Gutartige Tumore der Nebennierenrinde (Nebennierenadenome) kommen bei circa 3% der Menschen über 50 Jahre vor und können sowohl endokrin aktiv als auch endokrin inaktiv sein [3].

1.2 Nebennierenrindenzarzinom

Das adrenokortikale Karzinom (ACC) ist mit einer Inzidenz von etwa 0,7–2,0 pro eine Million pro Jahr [4-6] äußerst selten und gehört zu den aggressivsten endokrinen Tumoren [2]. Das Alter bei Erstdiagnose eines adrenokortikalen Karzinoms liegt im Median zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr [7, 8]. Ein zweiter Altersgipfel ist in der Kindheit zu beobachten. Frauen sind mit 55–60% häufiger betroffen als Männer [8, 9]. In der Vergangenheit wurden neben Nikotinkonsum bei Männern und dem Einsatz oraler Kontrazeptiva bei Frauen [10] auch genetische Risikofaktoren diskutiert. Zu den genetischen Prädispositionen gehört unter anderem die Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgens TP53 im Rahmen des LiFraumeni-Syndroms [11]. In älteren Studien konnte bei 50–80% der adrenokortikalen Karzinome im Kindesalter diese Keimbahnmutation nachgewiesen werden [12, 13]. Dabei liegt vor allem in Südbrasilien auf Grund einer TP53-Keimbahnmutation im Sinne eines LiFraumeni-like Syndroms eine deutlich erhöhte Inzidenz vor [14]. Im Erwachsenenalter zeigten hingegen lediglich 3–7% der Erkrankten eine TP53-Keimbahnmutation [8, 15]. Eine weitere mit ACC assoziierte Erkrankung scheint das Beckwith-Wiedemann-Syndrom zu sein [16].

Bedeutend seltener tritt das Nebennierenrindenzarzinom im Zusammenhang mit dem MEN1-Syndrom (multiple endokrine Neoplasie Typ 1) auf [17, 18].

Auffällig wird das adrenokortikale Karzinom in etwa 60% [19] bis 70% der Fälle durch Symptome des Steroidhormonexzesses [20]. Häufig manifestiert sich das Nebennierenrindenzarzinom in Form eines sich rasch entwickelnden Cushing-Syndroms mit oder ohne Virilisation [19]. Die Patienten berichten über einen neu aufgetretenen Diabetes mellitus, schwere Hypertonie und oft ausgeprägte Muskelatrophie [21]. Weitere typische Symptome des Cushing-Syndroms wie Stammfettsucht, Mondgesicht, Striae, und Plethora [22] treten vermutlich auf Grund der raschen Entwicklung des Hyperkortisolismus eher selten auf [21]. Ein massiver Anstieg des Kortisolspiegels kann zudem den Mineralokortikoidrezeptor aktivieren, was zu schwerwiegenden Hypokaliämien führen kann [23]. Bei 40%–60% der hormonaktiven Tumoren zeigen sich die Symptome eines Androgenüberschusses. Betroffene Frauen klagen über Akne, Hirsutismus, Oligomenorrhoe und Virilisation [21]. Im Gegensatz dazu treten lediglich bei 5–10% der männlichen Patienten Gynäkomastie, Libidoverlust und Hodenatrophie als Zeichen eines östrogenproduzierenden Tumors auf [7]. Die eher seltenen Mineralokortikoide produzierenden adrenokortikalen Karzinome äußern sich klinisch durch Bluthochdruck und schwere Hypokaliämie [24], sodass eine klinische Abgrenzung zu kortisolproduzierenden Tumoren erschwert sein kann [19]. Weitere Symptome des Nebennierenrindenzarzinoms können durch lokales Tumorwachstum entstehen. Bei nicht hormonproduzierenden Tumoren sind sie häufig Erstsymptome [21]. Patienten berichten über abdominale Schmerzen, Völlegefühl, Übelkeit und Erbrechen [7]. Klassische Symptome im Sinne einer B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Gewichtsverlust und subfebrilen Temperaturen finden sich eher selten [7, 20]. Ein zunehmender Anteil der adrenokortikalen Karzinome wird auf Grund des vermehrten Einsatzes bildgebender Verfahren zufällig entdeckt (sog. Inzidentalom) [21].

Bei klinischem Verdacht auf einen Tumor der Nebennierenrinde empfiehlt das ENSAT-Konsortium sowohl hormonelle als auch bildgebende Diagnostik (Tabelle 1).

Tabelle 1: empfohlene Diagnostik bei V.a. ACC
 modifiziert nach Fassnacht et al. [25]

Hormondiagnostik	Bestimmung von
Glukokortikoidexzess	Dexamethason-Hemmtest oder freies Kortisol im 24-Stunden-Urin
	basales Plasma-ACTH
Mineralokortikoidexzess	Kalium
	Aldosteron-Renin-Quotient
Androgenexzess	DHEAS
	17-OH-Progesteron
	Androstendione
	Testosteron
Zur Abgrenzung zum Phäochromozytom	17 β -Östradiol
	Metanephrine im 24-Stunden-Urin oder freie Metanephrine im Plasma
Bildgebung	
	Computertomografie oder Magnetresonanztomografie des Abdomens
Staging	Computertomografie des Thorax, ggf. Knochenszintigrafie, FDG-PET

Mittels der bildgebenden Verfahren kann ein erstes klinisches Staging erfolgen. Die erste prognostisch relevante Klassifikation wurde im Rahmen des ENSAT-Konsortiums retrospektiv vorgenommen. Die ENSAT-Stadieneinteilung umfasst analog zur WHO-Klassifikation vier Stadien. Tumoren im Stadium I sind lokal auf die Nebenniere begrenzt und messen ≤ 5 cm, während Tumoren im Stadium II > 5 cm sind. Hat sich der Tumor in das umliegende Gewebe ausgebreitet oder sind lokale Lymphknoten infiltriert, handelt es sich um einen Stadium-III-Tumor. Sobald gesicherte Fernmetastasen vorliegen, besteht das Tumorstadium IV. Häufig betroffene Organe einer Metastasierung sind Lunge, Leber und Knochen [7], praktisch nie kommt ein Befall der kontralateralen Nebenniere vor. Da das ACC häufig lange asymptomatisch bleibt, werden die meisten Tumoren erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Zur Diagnosesicherung eignet

sich analog zu anderen Tumorerkrankungen am ehesten eine histopathologische Untersuchung. Zumeist wird das Gewebe durch eine Computertomografie-gesteuerte Punktion gewonnen [26]. Allerdings sollten Feinnadelpunktionen bei hochsuspekten Raumforderungen vermieden werden, um einer möglichen Streuung des Tumormaterials im Stichkanal vorzubeugen [27]. 1984 entwickelte Lawrence M. Weiss Richtlinien für die histopathologische Beurteilung adrenokortikaler Neoplasien [28]. Weiss postulierte, dass es sich bei Vorhandensein von drei oder mehr Kriterien (Tabelle 2) um einen malignen Tumor handelt.

*Tabelle 2: Weiss-System zur Beurteilung adrenokortikaler Neoplasien
Bei Vorliegen von 3 oder mehr Kriterien gilt eine Neoplasie als maligne.
HPF = High power field
modifiziert nach Weiss et al. [28]*

mäßige bis starke Kernatypien	Trotz des Weiss-Scores ist die strikte Trennung in malignes und benignes Gewebe eine Herausforderung und auch die sichere Zuordnung zum Ursprungsgewebe gelingt nicht immer sicher [29], sodass man sich zunehmend immunhistochemischer Methoden bedient. Etablierte immunhistochemische Marker für die Nebennierenrinde sind α -Inhibin [30], Calretinin [31], Melan A [32] und der Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor 1 (SF1) [33].
Mitoserate >5/50 HPF	
atypische Mitosen	
Helle Zellen < 25% des Tumors	
diffuses Wachstum	
Nekrosen	
Veneneinbruch	
Sinusinvasion	
Tumorkapsleinbruch	Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor 1 (SF1) [33].

Sie dienen vor allem zur Abgrenzung zu anderen Ursprungsgeweben. SF1 weist mit hoher Spezifität und Sensitivität adrenokortikales Gewebe nach. Die differentialdiagnostisch zum ACC in Betracht kommenden Tumoren der Nebenniere wie das Phäochromozytom oder Metastasen anderer Primärtumoren waren in retrospektiven Studien SF1-negativ. Des Weiteren scheint eine hohe SF1-Expression mit einem schlechteren klinischen Outcome vergesellschaftet zu sein. Eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Raumforderungen der Nebennierenrinde gelingt anhand dieses Markers allerdings nicht [33]. Hilfreich zur Unterscheidung zwischen ACC und ACA scheint die Bestimmung von hsa-miR-483-5p im Plasma zu sein. Decman et al. fanden deutlich erhöhte Plasma-Level dieser Mikro-RNA in Karzinomen [34].

Für eine prognostische Einschätzung ist der immunhistochemische Marker Ki67 besser geeignet. In 2001 beschrieben Sasano et al. Ki67 als bis dahin einzigen verwertbaren immunhistochemischen Marker [29]. Ki67 gilt als in allen Zellen vorkommendes Antigen [35], das ausschließlich in proliferativ aktiven Zellen nachgewiesen werden kann, jedoch nicht in Zellen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden [36]. Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich der Anteil an Ki67-positiven Zellen bestimmen und somit eine Aussage über die Proliferationsaktivität des Gewebes treffen. Im Allgemeinen können Tumore mit einem Anteil größer als 5 % als maligne betrachtet werden [37]. Ein hoher Ki67-Index scheint zudem prognostisch ungünstig zu sein [38]. Dies konnte unlängst in einer großen ENSAT-Kohortenstudie validiert werden [39]. Ein weiterer Marker ist IGF-2, der in Untersuchungen eine geringere Sensitivität aufwies [40]. Kombiniert mit Ki67 berichten Schmitt et al. allerdings über eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 95,5 % für den Nachweis eines adrenokortikalen Karzinoms [40].

Um wirksame Therapien zu entwickeln, ist es sinnvoll die molekularpathologischen Veränderungen und die Stoffwechselwege des Nebennierenrindenzellkarzinoms zu kennen. Eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen genetische Alterationen, die beispielsweise zu einer Aktivierung von Protoonkogenen und Onkogenen (Chromosomen 4, 5 und 12) und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Chromosomen 1p und 17p) führen [41]. Bei bis zu 92 % der Patienten konnten sogenannte ‚losses of heterozygosity‘ nachgewiesen werden. Diese finden sich vor allem auf 11q13, 17p13 und 2p16 [42, 43] und korrespondieren ebenfalls mit Onkogenen und Tumorsuppressorgenen [21]. Ein wichtiges, bereits seit langem identifiziertes und auf 11p15 lokalisiertes Onkogen ist ‚insulin-like growth factor 2‘ (IGF-2). Die IGF-Signalkaskade ist an der Entwicklung und Aufrechterhaltung differenzierter adrenokortikaler Funktionen beteiligt [21]. Das IGF-2 Gen kodiert einen fetalen Wachstumsfaktor, welcher ausschließlich vom paternal geerbten Allel exprimiert wird [44]. Oft findet sich beim ACC ein Verlust des maternalen Allels, woraufhin das paternale Allel dupliziert wird [45]. Die Folge dieser paternalen Isodisomie ist die Überexpression von IGF-2 mRNA [45, 46]. Es handelt sich um das im Vergleich zum Adenom am meisten hochregulierte Gen [47]. IGF-2 vermittelt über den IGF-1 Rezeptor einen autokrinen

und/oder parakrinen Wachstumseffekt [48]. Allerdings scheint eine IGF-2 Überexpression allein für die Entstehung eines Nebennierenrindenzarzinoms nicht ausreichend. Ein weiterer wichtiger Signalweg in der Tumorgenese ist der ‚Wnt/ β -Catenin-Pathway‘, der bei der Embryonalentwicklung physiologisch aktiv ist [21]. Eine konstitutive β -Catenin Aktivierung ist – wie auch in verschiedenen anderen Tumoren – die häufigste Alteration in ACC und ACA [49, 50]. In einem Mausmodell induzierte die permanente Erhöhung des β -Catenin-Spiegels adrenale Hyperplasie und begünstigte die Karzinomentwicklung [51]. Untersuchte adrenokortikale Karzinome zeigten häufig eine Aktivierung der WNT-Signalkaskaden-Zielgene [52]. Neben dem ‚WNT/ β -Catenin-Pathway‘ ist ebenfalls das Tumorsuppressorgen TP53 für die Entstehung eines Nebennierenkarzinoms entscheidend. Dies ist sowohl bei genetisch prädisponierten Patienten, wie beim LiFraumeni-Syndrom [21], als auch bei sporadischen Varianten des Nebennierenrindenzarzinoms der Fall [53-55]. All diese Veränderungen wurden in der Vergangenheit als typische Kandidaten-Gene identifiziert. Jüngste Genom-weite Untersuchungen haben dies klar bestätigt und konnten mit Zinc and ring finger 3 (ZNRIF3) ein weiteres im WNT/ β -Catenin-Signalweg relevantes Protoonkogen ausfindig machen [56, 57]. Bemerkenswerterweise sind diese wiederkehrenden Alterationen allerdings nur in circa 60 % der Tumore anzutreffen. Dies bedeutet umgekehrt, dass bei 40 % der Tumore individuelle Ereignisse zur malignen Transformation führen [56]. Daneben wurde – insbesondere in Hinblick auf potenzielle Therapieoptionen – VEGF (Vascular endothelial growth factor) als Regulator der Tumorangiogenese in adrenokortikalen Karzinomen gefunden. Sowohl die Expression [47, 58] als auch der Serumspiegel [59] sind in Karzinomen im Vergleich zu Adenomen erhöht.

Die Prognose des Nebennierenrindenzarzinoms ist in fortgeschrittenen Stadien ungünstig. Abhängig sind das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Zeit vor allem vom Tumorstadium bei Diagnosestellung und dem Resektionsstatus bei operablen Tumoren [21]. Patienten im Tumorstadium ENSAT I haben eine mediane 5-Jahres-Überlebensrate von 81%, während bei Stadium ENSAT IV lediglich noch 13% der Betroffenen 5 Jahre nach Diagnosestellung leben [60]. Alter, Geschlecht und ein

adrenaler Hormonexzess spielen eine eher untergeordnete Rolle [21]. Andere ungünstige Prognosefaktoren sind ein hoher mitotischer Index, Tumornekrosen, atypische Mitosefiguren, ein hoher Ki67-Index und eine TP53-Mutation [38, 61, 62]. Das Zusammenspiel der verschiedenen Parameter führt zu einer individuellen Variation der 5-Jahres-Überlebensrate [2]. Zur Unterscheidung in zwei prognostische Gruppen wurden durch Genexpressionsanalysen Gen-Cluster gebildet [63, 64].

Die Therapieempfehlungen sind in Abbildung 1 und Abbildung 2 schematisch dargestellt.

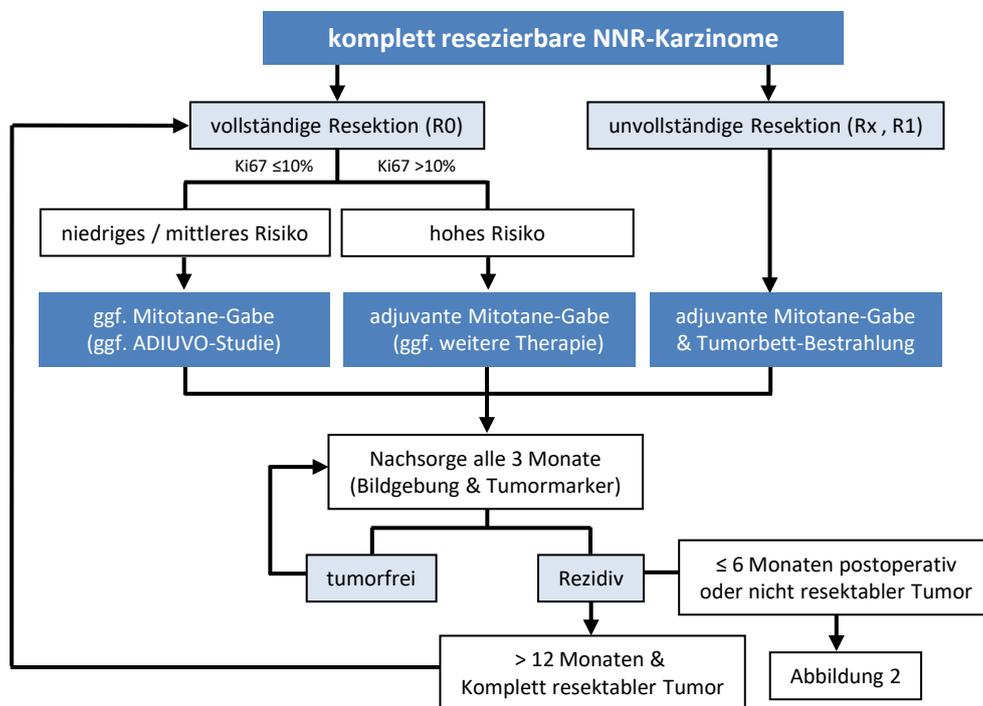


Abbildung 1: Therapieempfehlung für komplett resezierbare adrenokortikale Karzinome

NNR = Nebennierenrindenzinom

Zur Verfügung gestellt von Fassnacht et al. [25]

Der einzig kurative Ansatz ist derzeit die chirurgische Therapie. In Stadium I und II ist diese nicht zwingend als offene Adrenaektomie durchzuführen, sondern bei kleineren Tumoren auch durchaus laparoskopisch möglich [65, 66]. In Stadium III ist eine offene Adrenaektomie bei operablen Patienten eindeutig indiziert [21]. Eine lokoregionale Entfernung der Lymphknoten scheint sowohl das therapeutische Outcome als auch die diagnostische Genauigkeit zu verbessern [67]. Allerdings wurde auch bei R0-Resektionen mit Lymphknotendissektion eine Rezidivrate von 30% bis 50%

beobachtet [68], sodass eine adjuvante Therapie mit Mitotane sinnvoll ist [69]. Bei R1-Resektionen oder unbekanntem R-Status wird empfohlen, in der adjuvanten Situation eine Kombination aus Mitotane mit Strahlentherapie zu erwägen [70-72]. Bei Auftreten von Rezidiven wird ebenfalls die operative Therapie favorisiert, sofern seit der Erstoperation mindestens 6 Monate vergangen sind und eine R0-Resektion möglich ist [73].

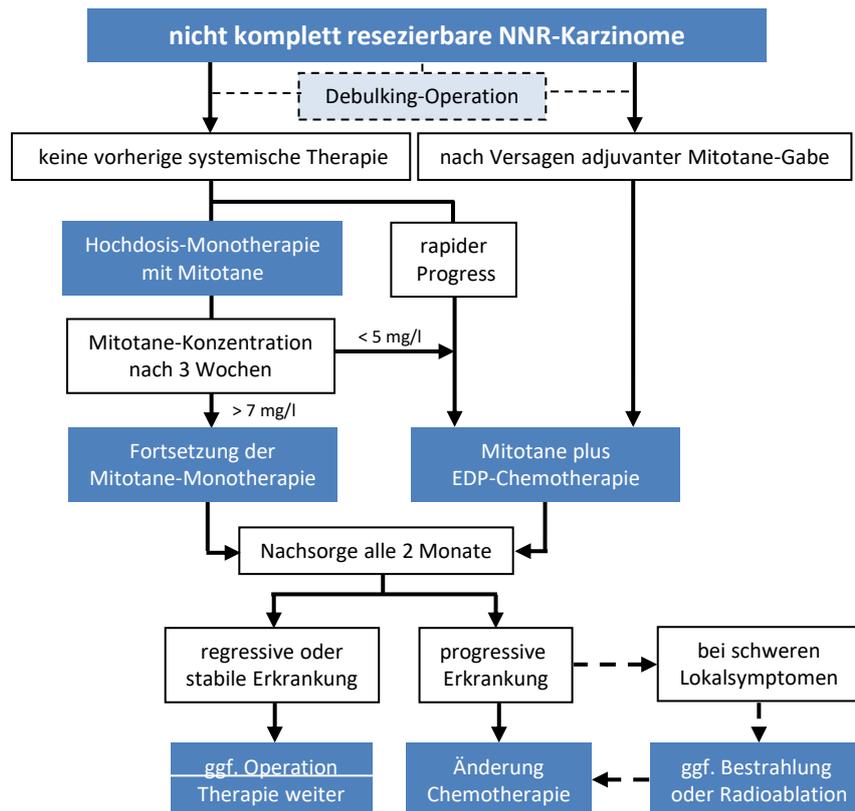


Abbildung 2: Therapieschema für fortgeschrittene adrenokortikale Karzinome

Im Fokus steht die Chemotherapie in erster Linie mit Mitotane. Bei rapidem Tumorprogress oder nach Versagen der adjuvanter Mitotane-Gabe kann die Chemotherapie um Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin erweitert werden. Im weiteren Verlauf kann eine Operation, eine Bestrahlung oder eine Radioablation ebenfalls in Betracht gezogen werden.

EDP = Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin, NNR = Nebennierenrindenzarzinom

Zur Verfügung gestellt von Fassnacht et al. [25]

In fortgeschrittenen Tumorstadien steht die medikamentöse Therapie im Vordergrund [21]. Zur Verfügung stehen zurzeit eine Mitotane-Monotherapie [21] als einzige zugelassene Therapie, sowie Kombinationen von Mitotane mit Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin (EDP-Mitotane) [74] oder Streptozocin [75]. Die FIRM-ACT-Studie hat die Kombination von Mitotane und Etoposid als Standard-Chemotherapie des

fortgeschrittenen ACC etabliert [76]. Im Vergleich zur kombinierten Gabe von Mitotane und Streptozocin konnte eine signifikant bessere objektive Ansprechrates und ein längeres progressionsfreies Überleben gezeigt werden. Ernüchternd war hingegen die nur geringe Verlängerung des Gesamtüberlebens (14,8 Monate vs. 12,0 Monate) [76]. Als Zweit- bzw.-Drittlinien-Therapie kann Gemcitabine in Kombination mit Capecitabine [77, 78] oder die Behandlung mit Thalidomide [79, 80] versucht werden. Begleitend zu allen chemotherapeutischen Varianten sollte supportiv eine symptomatische Therapie zur Kontrolle des Hormonexzesses erfolgen. Ketoconazol, Metyrapone, Etomidat und Mifepristone stehen bei Hyperkortisolismus zur Verfügung [81-85], Spironolacton und Eplerenon können bei Hypokaliämie neigung auf Grund eines Gluko- oder Mineralokortikoidexzesses eingesetzt werden und im Einzelfall Aromataseinhibitoren bei Östrogenüberschuss [2].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz sind sogenannte ‚targeted therapies‘, die in den letzten Jahren zum Beispiel bei der Behandlung von Brustkrebs, Lungentumoren und chronisch lymphatischer Leukämie etabliert werden konnten [86]. Als vielversprechendes Ziel galt dabei zunächst IGF-2, da es das am meisten überexprimierte Gen des Nebennierenrindenzinoms zu sein scheint. Bei einer 2015 veröffentlichten Phase III Studie konnte keine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens mit dem IGF-1-Rezeptorantagonisten Linsitinib erzielt werden. Vier Patienten zeigten allerdings eine ausgeprägte Tumorantwort im Sinne einer partiellen Remission [87], eine Patientin befindet sich auch nach Absetzen von Linsitinib in einer nun kompletten Remission (M. Fassnacht, persönliche Mitteilung). Auch der VEGF-Inhibitor Sunitinib erzielte in einer klinischen Studie der Phase II keine objektive Ansprechrates [88]. Eine Parallelstudie mit Sorafenib in Kombination mit Paclitaxel zeigte ebenfalls kein relevantes Ansprechen der Erkrankung [89]. Der Einsatz der Strahlentherapie wird bei dürftiger Studienlage kontrovers diskutiert, jedoch ist ihr Einsatz nach klinischer Erfahrung in einigen Fällen sinnvoll und kann bei symptomatischen Metastasen zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen oder eine drohende Beeinträchtigung vermeiden [2, 71, 90].

1.3 Therapie des Nebennierenrindenzinoms mit Mitotane

Das derzeit wichtigste und bislang einzige von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) und der European Medicine Executive Agency zugelassene Medikament in der Behandlung des Nebennierenrindenzinoms ist Mitotane ([1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-di-chloroethane (o,p'-DDD)]) [91]. Es handelt sich dabei um ein Derivat des Insektizids Dichlorodiphenyltrichlorethan, welches seit 1959 zur Therapie des adrenokortikalen Karzinoms eingesetzt wird [92]. Der genaue Wirkmechanismus ist bis jetzt nicht geklärt. In der Vergangenheit zeigten sich jedoch Auswirkungen auf die Steroidsynthese [93-96] und eine gesteigerte Produktion des Kortisol- und Sexualhormon-bindenden Globulins [97, 98]. Beschrieben sind des Weiteren der inhibierende Effekt auf die 5α -Reduktase und die Induktion von CYP3A4 [99], dem Hauptenzym der Steroidhormonmetabolisierung in der Leber [100-102]. Dadurch kommt es unter Einnahme von Mitotane zu einem erhöhten Abbau von Cortisol und Testosteron, jedoch auch zum beschleunigten Abbau zahlreicher Arzneimittel [103]. Über die Hemmung der 5α -Reduktase wird zusätzlich die Umwandlung in das potentere 5α -Dihydrotestosteron vermindert [99], sodass sich ein Glukokortikoid- und Androgenmangel entwickeln kann.

Weitere – teils widersprüchliche – Effekte von Mitotane wurden bislang beschrieben, wie die metabolische Aktivierung von o,p'-DDD und die kovalente Bindung eines Reaktionsproduktes an mitochondriale Proteine. Mitotane scheint über die Inhibition der Cholesterol-Ketten-Spaltung und der 11β -Hydroxylierung die Sekretion adrenokortikaler Hormone effektiv zu blockieren [104]. Es wurde vermutet, dass dabei das Enzym CYP11A1 als eines der kovalent gebundenen ‚targets‘ von Mitotane eine Rolle spiele [11]. Ob darüber hinaus zusätzlich ein antiproliferativer Effekt besteht, wird derzeit kontrovers diskutiert [104].

Die Pharmakokinetik von Mitotane ist komplex. Etwa 40% der oral verabreichten Menge an Mitotane werden vom Gastrointestinaltrakt absorbiert [105]. Eine Plasmakonzentration über 20 mg/l führt in den meisten Fällen zu reversiblen neurologischen Nebenwirkungen wie beispielsweise Fatigue, Somnolenz bis hin zum Stupor, Ataxie und Depression. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen sind Übelkeit,

Erbrechen, Durchfälle, Leberversagen, Verlust der Libido, Hypercholesterinämie und Veränderungen der Blutwerte. Das Auftreten schwerwiegender – vor allem neurologischer – Nebenwirkungen ist der häufigste Grund für eine Reduktion der Mitotane-Tagesdosis oder das Aufteilen in drei bis vier Einzeldosen. Supportiv können zum Beispiel Antiemetika, Loperamid und Statine eingesetzt werden. Dabei ist die starke CYP3A4-Induktion durch Mitotane zu beachten und gegebenenfalls eine Dosisanpassung vorzunehmen. Der mitunter erwünschten Nebenwirkung der adrenalen Insuffizienz sollte besondere Beachtung geschenkt werden, da ein Kortisolmangel schwerwiegende Folgen haben kann. Eine begleitende Substitution mit Hydrokortison ist deshalb unerlässlich [11].

1.4 Wichtige Signalkaskaden und Stoffwechselwege der Nebennierenrinde

1.4.1 ER-Stress

Vorangehende Experimente unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass ein Teil der Wirkung von Mitotane in der Auslösung von ER-Stress besteht, der nach längerem Bestehen in eine Apoptose mündet. Die Signalkaskade des ER-Stress' wurde in den letzten Jahren zunehmend erforscht. Klassischerweise erfolgt die Auslösung von ER-Stress durch die Ansammlung ungefalteter Proteine [106]. Hierfür ursächlich können zum Beispiel Hypoxie, Nährstoffmangel oder eine gestörte Calciumregulation sein. Es gibt zwei Möglichkeiten für die Zelle, auf die Anhäufung von ungefalteten Proteinen zu reagieren. Zum einen kann die Proteinsynthese insgesamt reduziert werden [107], zum anderen kann die Faltungskapazität durch die Hochregulation von Chaperonen erhöht werden [108]. Als Teil des ER-Stress' gilt die ‚unfolded protein response‘ (UPR). Dieser Mechanismus ist vor allem für sekretorische Zellen wichtig, um die Entwicklung und das Überleben zu garantieren, da er als Bremse für den ER-Stress fungieren und somit die Apoptose gegebenenfalls verhindern kann [106]. Die ‚unfolded protein response‘ scheint nach heutigem Forschungsstand über drei verschiedene Signalwege zu funktionieren, an deren Startpunkt IRE1 (Inositol requiring element 1), PERK (Protein kinase-like ER kinase) und ATF6 (Activating transcription factor 6) stehen. Hierbei handelt es sich um ER-Transmembranproteine mit je einer luminalen und einer

zytoplasmatischen Domäne [109]. Unter normalen Bedingungen ohne erhöhtes Aufkommen ungefalteter Proteine bilden diese drei Transmembranproteine über ihre luminaire Seite mit GRP 78 (Glucose-regulated protein 78 kDa) einen inaktiven Komplex [110, 111]. Bei GRP 78 (auch BiP, ‚binding immunoglobulin protein‘), handelt es sich um ein im ER befindliches Chaperon, das das Verlassen von ungefalteten Proteinen aus dem ER verhindert [112]. Steigt die Konzentration an ungefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum an, kommt es zur Dissoziation von GRP 78 aus dem inaktiven Komplex, da GRP 78 bevorzugt an ungefaltete Proteine bindet [110, 111, 113]. Hierdurch wird die Oligomerisation mit anschließender Autophosphorylierung von PERK und IRE1 ermöglicht [110, 113]. Abbildung 3 gibt schematisch einen vereinfachten Überblick über die ablaufenden Vorgänge.

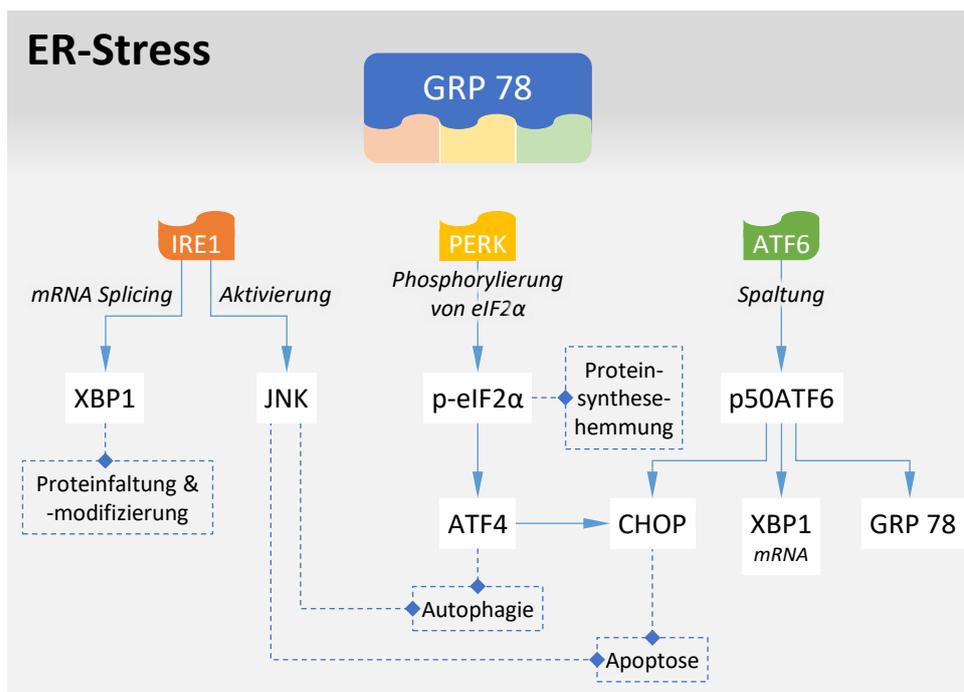


Abbildung 3: vereinfachter Überblick über die ER-Stress-Signalkaskade

IRE1, PERK und ATF6 bilden unter normalen Bedingungen jeweils einen Komplex mit GRP 78. Nach Auslösung von ER-Stress löst sich GRP 78 von seinen Bindungspartnern. Dadurch können IRE1 und PERK Oligomere bilden. Durch Autophosphorylierung kommt es zur Aktivierung dieser beiden Proteine. IRE1 führt einerseits zum Splicing von XBP1-mRNA, wodurch letztlich über weitere Zwischenschritte die Proteinfaltung und -modifizierung unterstützt wird. Andererseits kann die Signalkaskade über das JNK-Protein den Weg der Autophagie und Apoptose einleiten. PERK führt über die Phosphorylierung von eIF2 α zu p-eIF2 α zur Hemmung der Proteinsynthese und im Verlauf über ATF4 zur Autophagie. Zudem ist ATF4 an der Induktion von CHOP auf dem Weg zur Apoptose beteiligt. Durch die Dissoziation von ATF6 aus dem Komplex mit GRP 78 ist eine Spaltung von ATF6 in die aktive Form p50ATF6 möglich. Diese kann zum Zellkern wandern und dort die Synthese des Chaperons GRP 78 und CHOP induzieren. So wird einerseits die Faltungskapazität der Zelle erhöht, andererseits kann bei andauerndem ER-Stress die Apoptose über CHOP eingeleitet werden. Des Weiteren kann p50ATF6 zur Bildung von XBP1-mRNA beitragen und somit die Kaskade über IRE1 unterstützen.

ATF4 = ‚Activating transcription factor 4‘, ATF6 = ‚Activating transcription factor 6‘, CHOP = ‚C/EBP-homologous protein‘, eIF2 α = ‚Eukaryotic translation initiation factor 2 α ‘, GRP78 = ‚Glucose-regulated protein 78 kDa‘, IRE1 = ‚Inositol requiring element 1‘, JNK = ‚C-JUN NH₂-terminal kinase‘, p-eIF2 α = Phosphoryliertes eIF2 α , PERK = ‚Protein kinase-like ER kinase‘, XBP1 = ‚X-box binding protein 1‘

Signalkaskade über IRE1

An der zytoplasmatischen Seite von IRE1 befindet sich eine Proteinkinase, welche unter normalen Bedingungen im Monomer vorliegt und lediglich eine geringe Kinaseaktivität aufweist. Durch die Oligomerisierung und Autophosphorylierung, welche durch eine Anhäufung von ungefalteten Proteinen ausgelöst wird, kommt es zur Steigerung der Kinaseaktivität [113]. Zudem führt aktiviertes IRE1 dank seiner Endoribonukleaseaktivität zum Spleißen von XBP1-mRNA (X-box binding protein 1). Dadurch entsteht ein hochaktiver Transkriptionsfaktor, der in der ‚unfolded protein response‘ eine wichtige Rolle spielt, [114] da er die Transkription vieler UPR-Gene bewirkt, die die Proteinsynthese und -sekretion unterstützen [115]. Gleichzeitig wird über die Bindung von aktiviertem IRE1 an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) die Aktivierung von JNK (C-JUN NH₂-terminal kinase) unterstützt [116, 117]. Dieser Teil der Signalkaskade erlaubt es Zellen, sich durch die Initiierung von Autophagie an den ER-Stress anzupassen [118] und stellt somit einen Überlebensmechanismus dar, der beschädigte Zellen oder Organellen eliminieren kann [119]. Zusätzlich kann über die JNK-Aktivierung bei nicht mehr zu beherrschendem Stress die Aktivierung von Kaspasen und somit die Einleitung der Apoptose induziert werden [117].

Signalkaskade über PERK

Analog zu IRE1 befindet sich an der zytoplasmatischen Domäne von PERK ebenfalls eine Proteinkinase. Diese wird durch die Autophosphorylierung, ausgelöst durch die Dissoziation von GRP78 und darauffolgender Oligomerisierung, aktiviert. Mittels der Proteinkinaseaktivität wird der Translationsinitiationsfaktor eIF2 α (Eukaryotic translation initiation factor 2) an Serin 51 phosphoryliert (p-eIF2 α) [109]. p-eIF2 α bindet an eIF2B, welches für die Bildung des translationalen Präinitiationskomplexes benötigt wird [120]. Über diesen Schritt wird die Translation von mRNA zu Proteinen in der Zelle gehemmt, sodass eine zusätzliche Quelle von weiterem ER-Stress in Form von neu

synthetisierten ungefalteten Proteinen wegfällt [109]. Des Weiteren steigert p-eIF2 α die Expression des Transkriptionsfaktors ATF4 [120], was zu einer Steigerung der Transkription vor allem von UPR-Ziel-Genen führt (zum Beispiel C/EBP-homologous protein (CHOP)) [121]. Insgesamt wurden bisher vier verschiedene eIF2 α -Kinasen identifiziert (PERK, GCN2 (General control non-derepressible 2), PKR (Proteinkinase R) und HRI (Heme Regulated Inhibitor)), die alle zu einer Phosphorylierung von eIF2 α führen können. Dabei wird jede dieser Kinasen durch andere Signalkaskaden aktiviert, [122] was die Komplexität des ER-Stress-Signalwegs nochmals verdeutlicht.

Signalkaskade über ATF6

Wie bereits weiter oben ausgeführt, gibt es noch einen dritten Signalweg in der ER-Stress-Kaskade. Dieser beginnt mit der Aktivierung von ATF6. Hierbei handelt es sich um ein 670 Aminosäuren langes Transmembranprotein mit einer zytosolischen und einer ins ER-Lumen reichenden Domäne [123]. Es konnte gezeigt werden, dass die inaktive Form von ATF6 permanent gebildet wird. Unter ER-Stress-Bedingungen kommt es zur Umwandlung des Vorläufers p90ATF6 in die aktive Form p50ATF6. Zur Aktivierung wird die Transmembrandomäne von ATF6 proteolytisch abgespalten, was es dem Protein ermöglicht, in den Zellkern zu wandern. Dort kann p50ATF6 an das ER-Stress-Response-Element (ERSE) binden und es aktivieren. Hierüber kommt es zur Steigerung der Transkription von GRP-Proteinen, wie zum Beispiel GRP78 und GRP94 um die Faltkapazitäten der Zelle zu erhöhen [124, 125]. Allerdings ist auch hier die alleinige Bindung von ATF6 an ERSE nicht ausreichend, sodass noch weitere Proteine bei diesem Signalweg eine Rolle spielen müssen [126]. Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Bildung von xBP1-mRNA, die unter dem Einfluss von IRE1 α gespleißt und dadurch zu einem hochaktiven Transkriptionsfaktor der ‚unfolded protein response‘ wird [114]. Somit unterstützt der ATF6-Signalweg den IRE1-Zweig des ER-Stress‘ [106].

Endstrecke über GADD 153 (CHOP)

Bei dem Protein CHOP oder GADD 153 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch Zellstresssignale aktiviert wird [121]. Experimente mit GADD 153 haben gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration dieses Proteins zu einem Arrest der Zelle in der

G1- oder S-Phase des Zellzyklus führen kann [127]. Allerdings ist durch CHOP auch die Induktion von Apoptose möglich [128]. Da es sich somit um ein essenzielles Protein handelt, das über das Zellüberleben mitentscheidet, gibt es diverse Mechanismen zur Hemmung und Induktion von CHOP. Eine Aktivierung kann über ATF4 erfolgen [121]. Allerdings scheint eine alleinige Akkumulation von ATF4 nicht ausreichend für die CHOP-Induktion, sodass es noch weitere Aktivatoren geben muss [122]. Den Gegenspieler bildet ATF3, das supprimierend auf CHOP einwirkt. Beide ATF-Moleküle konkurrieren um Bindungsstellen an GADD 153, wobei ATF3 die höhere Affinität zu haben scheint [121].

Letztlich gibt es unter den einzelnen Zweigen der Signalkaskade enge Verbindungen, sodass trotz eines Ausfalls eines Proteins oder gar eines gesamten Zweigs die Mechanismen zur Bewältigung des ER-Stress' weiter ablaufen können [115]. Die genauen Interaktionen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollends geklärt und sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Thapsigargin als bekannter Auslöser von ER-Stress

Der bekannte ER-Stressor Thapsigargin kann aus der Pflanze *Thapsia garganica* extrahiert werden [129]. Das Sesquiterpen-Lacton führt zu einem dosisabhängigen Anstieg des intrazellulären Kalziums durch Interaktion mit der ubiquitär vorkommenden kalziumabhängigen sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulum ATPase (SERCA). Hierdurch wird gespeichertes Kalzium aus dem ER freigesetzt. Die Dauer des intrazellulären Kalziumanstiegs hängt hierbei von der extrazellulären Kalziumkonzentration ab [130]. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt im Verlauf zu einer Fragmentierung von DNA und letztlich zur Apoptose [131]. So konnte gezeigt werden, dass durch Thapsigargin eine vom Zellzyklus unabhängige Apoptose in Prostatakarzinomzellen ausgelöst wird [132, 133]. Die Zellen werden in die G0-Phase überführt und über Zwischenschritte kommt es zur Fragmentierung von Doppelsträngen, Verdichtung des Chromatins mit Schrumpfen des Nukleus und letztlich zur Apoptose [132].

1.4.2 Steroidstoffwechsel

Der Hauptteil des Steroidstoffwechsels findet in der Nebennierenrinde statt, sodass er auch im Nebennierenrindenzinon abläuft. Es verwundert daher nicht, dass es als quasi obligate Nebenwirkung von Mitotane zu einer Nebenniereninsuffizienz kommt [11]. In den drei Zonen der Nebennierenrinde werden unterschiedliche Hormone gebildet. In der ‚Zona glomerulosa‘ erfolgt die Produktion des Mineralokortikoids Aldosteron, das für die Natrium- und Flüssigkeitsretention sowie für die Kaliumsekretion sorgt. Die Steuerung der Synthese erfolgt über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Die Glukokortikoide Kortisol und Kortison werden in der ‚Zona fasciculata‘ gebildet und beeinflussen die Glukoneogenese und den Proteinkatabolismus. Sie dienen als Stresshormon und sorgen zum Beispiel in Stresssituationen für die Energiebereitstellung in Form von Glukose und Fettsäuren. Ihre Sekretion wird über das hypothalamische Kortikotropin-Releasinghormon (CRH) und das im Hypophysenvorderlappen gebildete Adrenokortitrope Hormon (ACTH) gesteuert. Über einen negativen Feedbackmechanismus kann durch die Glukokortikoide die Konzentration von CRH und ACHT gesenkt werden. In der dritten Zone, der ‚Zona reticularis‘, erfolgt die Bildung der Androgenvorstufen Dehydroepiandrosteron und Androstendion, die eine wichtige Rolle in der Proteinsynthese und der Virilisierung spielen [134]. Als Ausgangsprodukt aller drei in der Nebennierenrinde synthetisierten Hormone steht Cholesterin.

Regulation des Steroidstoffwechsels und Rolle der ‚sterol regulatory element binding proteins‘

Der Steroidstoffwechsel unterliegt analog zu anderen Stoffwechselwegen einer strikten Regulation, da zum Beispiel erhöhte Konzentrationen von Cholesterin zur Bildung solider Kristalle und letztlich zum Zelltod führen können [135]. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die HMG-CoA-Synthase, die HMG-CoA-Reduktase und der LDL-Rezeptor, die jeweils über Feedbackmechanismen regulatorisch eingreifen können [136]. Herrschen in der Zelle lediglich geringe Konzentrationen an LDL (Low-density Lipoprotein), so steigt die Aktivität der HMG-CoA-Synthase und -Reduktase an, um Cholesterin zu synthetisieren. Umgekehrt reduziert sich die Aktivität der beiden Enzyme

unter hohen LDL-Konzentrationen, sodass lediglich geringe Mengen an Mevalonat gebildet werden, die für die Bildung der nichtsteroidalen Endprodukte benötigt werden [137]. Gleichzeitig wird das LDL-Rezeptor-Gen unter hohen zellulären Steroidkonzentrationen inhibiert, um die externe Zufuhr zu drosseln [138]. An der Regulation sind die sogenannten ‚sterol regulatory element binding proteins‘ (SREBP) beteiligt. Es handelt sich hierbei um membrangebundene Proteine, deren N-terminales Ende als Transkriptionsfaktor fungiert, während das C-terminale Ende eine regulatorische Funktion übernimmt [139]. Unter geringen Konzentrationen an Sterolen wird SREBP-2 durch die Protease 1 gespalten, wodurch die kovalente Bindung zwischen den zwei Transmembrananteilen gebrochen wird. Allerdings bleiben beide Spaltprodukte in der Membran verankert. Im zweiten Schritt spaltet die Protease 2 einen Teil des N-terminalen Fragments ab, welches daraufhin ins Zytosol freigesetzt wird und zum Nucleus wandern kann, wo es als Transkriptionsfaktor für am Lipidstoffwechsel beteiligte Enzyme fungiert [140, 141]. Obwohl dieser Mechanismus vor allem bei SREBP-2 untersucht wurde, ist davon auszugehen, dass für SREBP-1 ähnliche Vorgänge ablaufen [139].

Rolle der Sterol-O-Acyl-Transferase im Lipidstoffwechsel

Sterol-O-Acyl-Transferasen (SOAT) – auch Acyl-CoenzymeA:Cholesterin-Acyl-Transferasen (ACAT) genannt – katalysieren die Veresterung von Cholesterin mit Fettsäuren wie Oleat oder Palmitat [142]. Der so entstandene Ester wird in Form von Lipidtropfen gespeichert. Vor allem in den Zellen der Nebennierenrinde dienen die Lipidtropfen als Cholesterinreservoir für die Steroidhormonsynthese [143]. Dieser Schritt ist notwendig, um die Menge von freiem Cholesterin zu regulieren, das bei Akkumulation in der ER-Membran Funktionsstörungen herbeiführen würde [144]. So zeigte sich beispielsweise eine Hemmung der SERCA-Pumpe [144] mit Erhöhung der Calcium-Konzentration im Plasma, wodurch es letztlich über die bekannten Wege des ‚ER-Stress‘ zur Apoptose kommen kann [145].

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Obwohl Mitotane seit langem für die Therapie des Nebennierenrindenzellkarzinoms eingesetzt wird, sind die genauen Wirkmechanismen weiterhin unklar. Dank einiger Vorarbeiten konnten bereits Gene identifiziert werden, die unter dem Einfluss von Mitotane hoch- bzw. herunterreguliert werden. Unter den dreißig am stärksten herunterregulierten Genen in der Genexpressionsanalyse waren vor allem am Lipidstoffwechsel beteiligte Gene (z. B. Squalenepoxidase, LDL-Rezeptor, SREBP-1). Des Weiteren fand sich eine Herunterregulation von Genen, die eine Rolle während der Apoptose spielen (z. B. „growth differentiation factor 15“ – GDF15 und CHOP) [146]. Welche Mechanismen sich allerdings auf Proteinebene unter dem Einfluss von Mitotane abspielen, ist weiterhin nicht geklärt. Diese Arbeit hat das Ziel, einen Beitrag zur Klärung von vielen offenen Fragen zu leisten.

Im Einzelnen geht es um die Beantwortung folgender Fragen:

1. Können die Ergebnisse der bereits mittels Genexpressionsanalysen gefundenen Effektormechanismen von Mitotane in NCI-H295R-Zellen (Nebennierenrindenzellkarzinomzellen) auf Proteinebene bestätigt werden?
2. Lösen andere SOAT-Inhibitoren auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien ähnliche Veränderungen auf Proteinebene aus wie Mitotane? Lassen sich hieraus neue Therapiemöglichkeiten entwickeln?
3. Sind die durch Mitotane ausgelösten Veränderungen auf Proteinebene zelltypspezifisch oder lassen sie sich auch in anderen Zelllinien nachweisen?

2 Material und Methoden

Soweit nicht explizit erwähnt, wurden alle Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Wenn nicht anders spezifiziert, wurden die Reagenzien und Chemikalien von Sigma-Aldrich verwendet.

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
α -Tubulin monoklonaler Antikörper	Cell signaling
Aqua	B. Braun, Melsungen
ATR 101	Activate scientific, Prien
AZD 3988	Tocris, Bristol (UK)
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM-AQ-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM / Nutrient mixture F12 Ham-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
eIF2 α (D7D3) XP Rabbit monoclonal antibody	Cell signaling
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (fetal calf serum)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
GADD 153 (R-20)	Santa Cruz
GRP 78 (N-20)	Santa Cruz
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IRE1 α (H-190)	Santa Cruz
JNK (D-6)	Santa Cruz
L-Glutamin	Life technologies, Carlsbad (USA)
Mitotane	ISP Columbus, Wayne (USA)
Mini-PROTEAN TGX Precast Gel	Bio-Rad, Hercules (USA)

Produkt	Hersteller
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PERK (D11A8) Rabbit monoclonal Antibody	Cell signaling
Phosphatase-Inhibitor Cocktail B	Santa Cruz
Phosphatase-Inhibitor Cocktail C	Santa Cruz
Phospho-eIF2 α (Ser51) (119A11) Rabbit monoclonal Antibody	Cell signaling
Phospho-PERK (Thr980) (16F8) Rabbit monoclonal Antibody	Cell signaling
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185 (G9)) Mouse monoclonal Antibody	Cell signaling
Protease-Inhibitor	Calbiochem/Merck, Darmstadt
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-Lumin ultra Lösung 1 & 2	Roth, Karlsruhe
RPMI1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sandoz 58-038	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Selenium	Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen
SREBP-1 (H-160)	Santa Cruz
Thapsigargin	Appllichem / Santa Cruz
Transferrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
WesternSure Pen	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad, Hercules (USA)

2.2 Geräte

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte

Produkt	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen
Ecomax X-Ray Film Processor	Protec, Oberstenfeld
Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra-System	Bio-Rad, Hercules (USA)
Heizblock Dri-Block DB-2D	Techne, Burlington (USA)
Megafuge 1.OR	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS, Brigachtal
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
PowerPac Basic	Bio-Rad, Hercules (USA)
PowerPac 200	Bio-Rad, Hercules (USA)
Röntgenkassette	Hartenstein, Würzburg
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich, Tuttlingen
Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules (USA)
Wet-Blot-Kammer Mini-Protean II	Bio-Rad, Hercules (USA)
Wippschüttler	neoLab, Heidelberg

2.3 Zellkultur

Verwendet wurden NCI-H295R-Suspensionszellen, HeLaz91wt-Zellen, HEK293T-Zellen, IMR32-Zellen und HepG2-Zellen. Die NCI-H295R-Zellen wurden in T 175 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 0,1 mg/ml Transferrin, 5 µg/ml Insulin, 5,2 µg/ml Selenium und 10 % FCS, in Suspension gehalten. Die HeLaz91wt-Zellen, HEK293T-Zellen und IMR32-Zellen wurden in DMEM-AQ-Medium mit 10 % FCS, die HepG2-Zellen in DMEM/Nutrient mixture F12 HAM-Medium mit 1 % L-Glutamin und 10 % FCS kultiviert. Alle Zelllinien wuchsen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel oder ein Splitten im Verhältnis 1:2. In regelmäßigen Abständen wurde auf Mykoplasmen getestet, Verunreinigungen oder Pathologien wurden mittels Mikroskopie ausgeschlossen. Zudem durchliefen alle Zelllinien ‚Short tandem repeat‘-Untersuchungen.

2.4 Zellzählung

Die Zellzählung und Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen erfolgte mittels Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Da die avitalen Zellen den Farbstoff nicht ausschließen können, erscheinen sie tiefblau, während vitale Zellen nicht angefärbt werden. Der Inhalt einer Zellkulturflasche wurde in ein Falcon überführt und anschließend zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das abzentrifugierte Pellet mit 10 ml des entsprechenden Mediums pipettiert bis eine Suspension entstanden ist. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt und hiervon 10 µl in die Zählkammer gegeben. Die Summe der nicht angefärbten Zellen der äußeren vier Eckquadrate der Zählkammer ergab die Anzahl an vitalen Zellen, die in folgende Formel eingesetzt wurde:

$$\text{Anzahl der Zellen in 10 ml Suspension} = \frac{\text{Anzahl an vitalen Zellen}}{4} \cdot 10 \times 10 \times 10.000$$

2.5 Inkubation mit Mitotane, Thapsigargin, ATR 101, AZD 3988, Sandoz 58-035

Um eine zeit- und konzentrationsabhängige Aussage zur Wirkung der einzelnen Substanzen treffen zu können, wurden für die Experimente verschiedene Inkubationszeiten und Konzentrationen gewählt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der verwendeten Substanzen, ihren Konzentrationen, den Inkubationszeiten und dem Lösungsmittel, welches als Negativkontrolle genutzt wurde. Für die Negativkontrollen wurde das entsprechende Lösungsmittel in der Konzentration äquivalent zu den Wirksubstanzen mit dem Medium versetzt.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Substanzen mit Konzentrationen, Inkubationszeiten und zugehörigen Negativkontrollen

Substanz	Konzentrationen	Inkubationszeiten	Lösungsmittel / Negativkontrolle
Mitotane	0 μ M, 50 μ M, 100 μ M	30 min, 1 h, 2h, 6 h, 24 h	Ethanol
Thapsigargin	0 μ M, 1 μ M, 5 μ M	20 min, 1 h, 6 h, 24 h	Ethanol
ATR 101	0 μ M, 50 μ M	6 h, 24 h	Ethanol
AZD 3988	0 μ M, 50 μ M	6 h, 24 h	DMSO
Sandoz 58-035	0 μ M, 50 μ M	6 h, 24 h	Ethanol

Zur Inkubation wurden 6-Well-Platten genutzt. Es wurden je 1×10^6 Zellen pro 6-Well mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Suspension in ein Falcon überführt und die Zellen bei 700 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert werden. Die Überstände wurden abpipettiert und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

2.6 Herstellung Ganzzellextrakt

Die eingefrorenen Zellpellets wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l RIPA-Puffer pro 1×10^6 Zellen aufgeschlossen. Zudem wurde Protease-Inhibitor im Verhältnis 1:200, Phosphatase-Inhibitor C im Verhältnis 1:50 und Phosphatase-Inhibitor B im Verhältnis 1:100 hinzugefügt und anschließend mittels Vortex gründlich vermischt. Bei teilweise nicht komplett aufgeschlossenen Zellpellets kam der Ultraschall zur Zertrümmerung zur Anwendung.

2.7 Proteinbestimmung

Um die Banden des Western Blots vergleichbar zu machen, mussten die Gele mit gleichen Mengen an Protein beladen werden. Deshalb war eine Proteinbestimmung der einzelnen Proben unabdingbar. Die Bestimmung erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit von Novagen. Dieses basiert auf der Biuret-Reaktion, der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einer alkalischen Lösung. Das reduzierte Kupfer bildet mit der BCA-Lösung violette Komplexe. Je höher der Proteingehalt, desto mehr Komplexe werden

gebildet und desto dunkler färbt sich das Gemisch. Das Kit wurde nach den Anweisungen des Herstellers benutzt. Die quantitative Auswertung der Färbung erfolgte im Anschluss mittels BioPhotometer von Eppendorf.

2.8 Western Blot

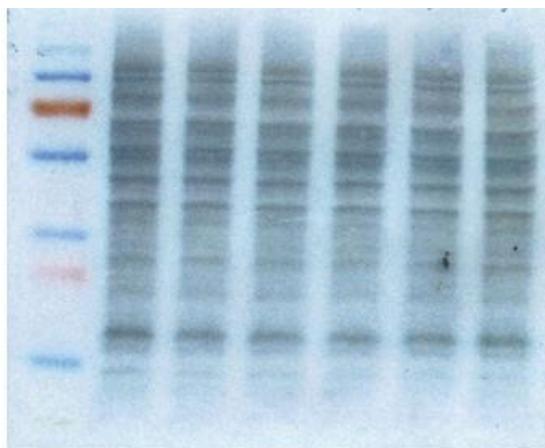
Vor Beladung der Gele mussten zunächst Lösungen mit definiertem Proteinanteil hergestellt werden. Abhängig von den verschiedenen Zellen und dem Proteingehalt der Proben wurden folgende Proteinmengen gewählt: 25 µg, 20 µg, 15 µg. Aus der Formel

$$\frac{\text{Proteinmenge } x \text{ } \mu\text{g}}{\text{Proteinkonzentration } y \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}} = n \text{ } \mu\text{l}$$

ergab sich die benötigte Menge an Lösung. Hinzugefügt wurden 5,0 oder 7,5 µl SDS-Probenpuffer. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde zunächst mit Hilfe des Vortex vermennt und anschließend sechs Minuten bei 95 °C inkubiert. Vor Beladen der Gele erfolgte eine erneute Durchmischung.

Sämtliche nun folgenden Inkubationsvorgänge fanden unter ständiger Bewegung durch einen Schüttler statt. Die selbst gegossenen oder gebrauchsfertigen Mini-PROTEAN TGX Precast Gele von Bio-Rad wurden in die Halterungen des Mini-PROTEAN Tetra-Systems eingespannt und die Kammer bis zur Markierung mit Running-Buffer befüllt. Im Anschluss erfolgte die Beladung der Taschen mit 25 µl der Probe. Als Marker zur Größenzuordnung der Banden wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific genutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem PowerPac Basic für etwa 45 Minuten bei konstanten 180 V. Anschließend wurde das Sammelgel abgetrennt und die Gele in 4 °C kaltem Blotting Buffer für 10 Minuten equilibriert. Zu Beginn der Experimente kam der Wet-Blot zum Einsatz. Hierbei wurde die Wet-Blot-Kammer Mini-Protean II mit den zugehörigen Cool-Packs genutzt. Das Gel wurde luftblasenfrei zusammen mit einer in Methanol eingelegten PVDF-Membran (Amersham Hybond P 0.45 PVDF, GE Healthcare) zwischen je vier Whatman-Paper in die Halterung der bereits ebenfalls mit 4 °C kaltem Blotting Buffer befüllten Blotting-Kammer eingespannt. Geblottet wurde eine Stunde bei konstanten 350 mA. Im Verlauf der

Untersuchungen erfolgte ein Wechsel auf das Semidry-Blot-Verfahren. Nach dem Equilibrieren der Gele wurden diese zusammen mit der vorher in Methanol eingelegten PVDF-Membran wiederum luftblasenfrei zwischen je vier Lagen Whatman-Paper gelegt. Der Aufbau der einzelnen Lagen fand bereits in der Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell statt. Geblottet wurde mit dem PowerPac 200 eine Stunde bei konstanten 200 mA. Im Anschluss an beide Blotting-Verfahren erfolgte die Färbung der Membran mit Amidoschwarz (Abbildung 4) oder Ponceau (Abbildung 5) zur Kontrolle des Membrantransfers und der gleichmäßigen Beladung der Gele.



Marker mit Protein beladene Taschen

Abbildung 4: Beispiel für die Färbung der Membranen mit Amidoschwarz

Links ist der Marker zu erkennen. Er dient im Verlauf der Einordnung der Proteingröße. Die sich rechts anschließenden Spuren zeigen die der Größe nach aufgetrennten Proteine. Es stellt sich eine gleichmäßige Beladung der Taschen dar. Die Auftrennung der Proteine der Größe nach erscheint ebenfalls gleichmäßig.



Marker mit Protein beladene Taschen

Abbildung 5: Beispiel für Ponceau-Färbung einer Membran

Analog zu der Färbung mit Amidoschwarz ist der Marker links zu erkennen. Anhand der Färbung lässt sich sowohl eine gleichmäßige Beladung der Taschen mit Protein sowie eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine nach der Größe in allen Spuren erkennen.

Nach Entfärbung und einmaligem Waschen mit TBST konnten die unspezifischen Bindungen mit einer 5%-igen Milchpulver-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden. Die Inkubation mit den Erst-Antikörpern wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und die zugehörigen Konzentrationen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper
 sc = Santa Cruz; cs = Cell Signaling

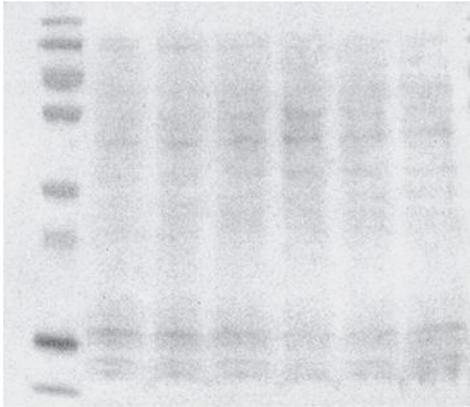
Antikörper	Konzentration	Zweit-Antikörper	Größe des Proteins
GADD 153 (sc)	1 : 200 o. 1 : 400	Anti-rabbit	30 kDa
CHOP	1 : 1 000	Anti-mouse	27 kDa
eIF2 α (cs)	1 : 1 000	Anti-rabbit	38 kDa
p-JNK (cs)	1 : 1 000	Anti-mouse	46 kDa, 54 kDa
p-eIF2 α (cs)	1 : 1 000	Anti-rabbit	38 kDa
PERK (cs)	1 : 1 000	Anti-rabbit	140 kDa
JNK (sc)	1 : 200	Anti-mouse	46 kDa, 54 kDa
p-PERK (cs)	1 : 1 000	Anti-rabbit	170 kDa
SREBP-1 (sc)	1 : 200	Anti-rabbit	68 kDa, 125 kDa
GRP 78 (sc)	1 : 200	Anti-goat	78 kDa
IRE1 α (sc)	1 : 100	Anti-rabbit	120 kDa
GDF 15 (abcam)	1 : 1 000	Anti-rabbit	34 kDa
α -Tubulin	1 : 1 000	Anti-mouse	50 kDa
p-PERK (sc)	1 : 200	Anti-rabbit	125 kDa
GDF 15 (cs)	1 : 100	Anti-rabbit	13 kDa, 35 kDa
p-JNK (sc)	1 : 100	Anti-mouse	46 kDa, 54 kDa
p-eIF2 α (sc)	1 : 200	Anti-goat	36 kDa

Am nächsten Tag wurden die Membranen viermal 15 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem zugehörigen Zweit-Antikörper inkubiert (Tabelle 6). Sowohl der Anti-mouse- als auch der Anti-rabbit-Antikörper waren HRP-konjugiert und wurden in der Konzentration 1:5000 benutzt. Nachfolgend wurden die Membranen wiederum dreimal 15 Minuten mit TBST und abschließend einmal mit TBS gewaschen. Zur Detektion der Banden wurde zu Beginn der Experimente Roti-Lumin ultra Lösung 1 & 2 genutzt, während im Verlauf eine Umstellung auf WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate erfolgte. Beide Produkte wurden nach Anweisung des Herstellers verwendet und lösten eine Chemilumineszenz-Reaktion aus. Um den Marker auch auf dem Film sichtbar zu machen, wurde dieser mit dem

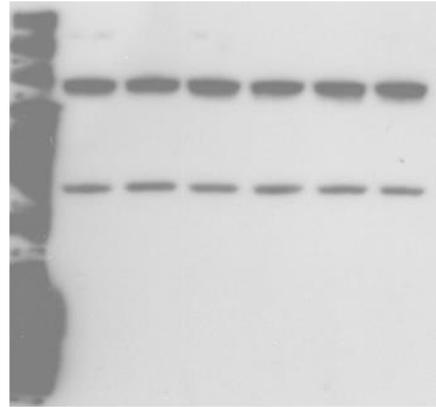
WesternSure Pen nachgezeichnet. Anschließend erfolgte die Belichtung von Fuji Medical X-Ray-Filmen in Röntgenkassetten. Entwickelt wurden die Filme mittels ECOMAX X-Ray Film Processor.

Um Ladekontrollen und weitere Inkubationen mit anderen Antikörpern mit der gleichen Membran durchführen zu können, mussten die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurden die Membranen zunächst mit TBST gewaschen und anschließend dreimal 20 Minuten mit Stripping-Buffer behandelt, bevor wiederum vier Waschgänge á 15 Minuten mit TBST folgten. Die unspezifischen Bindungsstellen der Membranen mussten daraufhin erneut mit 5 %-iger Milchlösung blockiert werden. Folgend konnten die bereits beschriebenen Schritte der Inkubation mit den Antikörpern und der Entwicklung der Filme durchgeführt werden.

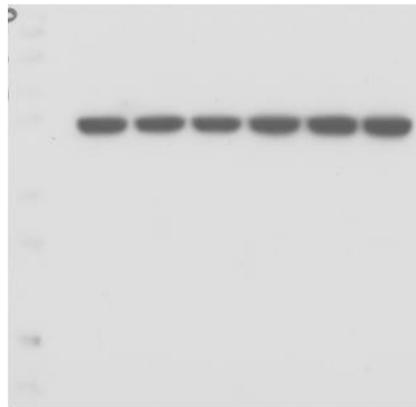
Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Ablauf einer Ladekontrolle. Auf Grund der Komplexität der Ladekontrolle mit α -Tubulin und β -Actin wurden diese Methoden nur stichprobenartig verwendet. Die Färbung mit Amidoschwarz oder Ponceau erfolgte hingegen nach jedem Membrantransfer.



mit Ponceau angefärbte Membran



entwickelter Röntgenfilm nach Inkubation mit dem SREBP-1-Antikörper und dem zugehörigen Zweit-Antikörper



Entwickelter Röntgenfilm nach Inkubation mit β -Actin und dem zugehörigen Zweit-Antikörper zur Ladekontrolle

Abbildung 6: exemplarische Darstellung der durchgeführten Ladekontrollen

Zunächst wurden die Membranen mit Amidoschwarz oder Ponceau gefärbt. Hier zeigte sich bereits eine gleichmäßige Beladung der Taschen und Auftrennung der Proteine. Nach dem Entfärben erfolgte wie bereits beschrieben die Inkubation mit dem Erst- und Zweit-Antikörper mit anschließender Entwicklung der Röntgenfilme. Nach dem Strippen, also Entfernen der bereits gebundenen Antikörper konnte nach Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Milchlösung eine Inkubation der Membran mit α -Tubulin und dem zugehörigen Zweit-Antikörper zur Ladekontrolle erfolgen. Auch hier zeigten sich allenfalls geringe Unterschiede der Bandenstärke, sodass von einer gleichmäßigen Beladung der Gele ausgegangen werden kann. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass sichtbare Unterschiede in den Bandenstärken bei den untersuchten Proteinen auf Änderungen der Expression durch die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen resultieren und nicht Effekt einer ungleichmäßigen Proteinkonzentration bei der Beladung der Geltaschen sind.

3 Ergebnisse

Ein wesentliches Ziel der Arbeit bestand in der Etablierung geeigneter Western-Blot Marker für ER-Stress. Dies umfasste sowohl die Austestung verschiedener Western Blot Methoden für den jeweiligen Antikörper als auch die Wahl der geeigneten Antikörperkonzentrationen. Unter der Annahme, dass Mitotane in den Nebennierenrindenzellen ER-Stress auslöst, erschien der bekannte ER-Stressor Thapsigargin für die Anfangsphase der Experimente als Positivkontrolle sinnvoll. Zudem war es das Ziel, den Zeitverlauf der Expressionsveränderungen auf Proteinebene aufzuzeigen. Hierzu wurden NCI-H295R-Zellen wie im Methodenteil beschrieben mit Thapsigargin inkubiert.

3.1 Thapsigargin als Marker für ER-Stress

Mit Hilfe der durchgeführten Western Blots ließ sich zeigen, dass Thapsigargin in die Regulierung verschiedener am ER-Stress beteiligter Proteine eingreift. Besonders eindrucksvoll ließ sich dies anhand des 30 kDa großen CHOP-Proteins erkennen. Wie Abbildung 7 exemplarisch aufzeigt, fand sich GADD 153 in Lysaten von NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin für sechs Stunden im Vergleich zur Negativkontrolle in signifikant größerer Menge. Nach 24 Stunden war ebenfalls noch ein Unterschied in der Bandenstärke zu erkennen. Somit kann auf eine Induktion des CHOP-Proteins durch Thapsigargin geschlossen werden. Zusammen mit dem Wissen, dass Thapsigargin über ER-Stress zur Apoptose führt, konnte von GADD 153 als geeigneter Marker für ER-Stress ausgegangen werden.



Abbildung 7: Anstieg der CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin
Aufgetragen wurden jeweils Proben von NCI-H295R-Zellen nach 1, 6 und 24 Stunden Inkubationszeit mit entweder Ethanol (E) oder Thapsigargin (T). Die Abbildung zeigt die Banden bei einer Proteingröße von 30 kDa. Es finden sich sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden gut abgrenzbare Banden nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol. Nach einer Stunde Inkubationszeit zeichnet sich hingegen noch kein Unterschied in der CHOP-Expression durch Thapsigargin ab.

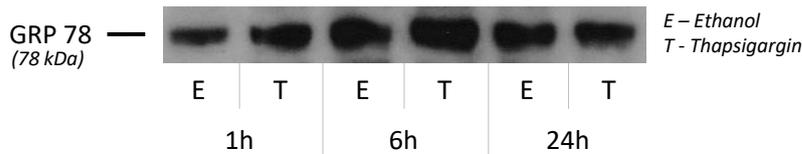


Abbildung 8: Zunahme der GRP78-Bande nach Inkubation von NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin im zeitlichen Verlauf

Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Ethanol (E) oder Thapsigargin (T) zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden).

Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin steigt die Expression von GRP 78 im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol an. Zu einer weiteren Steigerung kommt es nach 6 Stunden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit ist kein signifikanter Unterschied in der Bandenstärke mehr erkennbar. Insgesamt scheint es zu einer frühen Hochregulation des GRP 78-Proteins durch Thapsigargin zu kommen.

Zudem ist es mir gelungen, Änderungen in der Abundanz weiterer am ER-Stress beteiligter Proteine mittels Western Blot festzustellen. So hat nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin die Bandenstärke von GRP 78 gegenüber der Negativkontrolle mit Ethanol beginnend nach einer Stunde im zeitlichen Verlauf zugenommen (Abbildung 8). Da dieses Protein besonders in der frühen Phase der ER-Stress-Induktion eine Rolle spielt, verwundert es nicht, dass nach 24 Stunden keine Zunahme der Bandenstärke im Vergleich zur Negativkontrolle mehr zu erkennen war. Obwohl sich nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin mittels Western Blot keine signifikanten Änderungen der Expression an IRE1 α nachweisen ließen, zeigte der analoge Versuchsaufbau mit dem JNK-Antikörper eine Zunahme nach einer und sechs Stunden (Abbildung 9). Hierbei verhielten sich beide Isoformen des JNK-Proteins im zeitlichen Verlauf gleich, wobei sich die Banden bei 46 kDa deutlicher kontrastierten. Somit weisen die durchgeführten Experimente zwar auf eine Aktivierung des JNK-Proteins hin, ob diese allerdings über IRE1 α ausgelöst wird, lässt sich auf Grundlage meiner Untersuchungen weder ausschließen noch bestätigen.

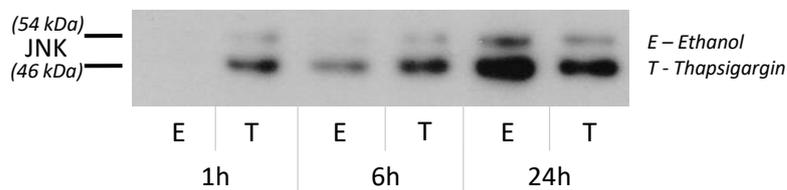


Abbildung 9: Auswirkungen der Expression von JNK in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin

Aufgetragen wurden Proben von unterschiedlich lange (1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden) mit Thapsigargin (T) und Ethanol (E) inkubierten NCI-H295R-Zellen.

Bereits nach einer Stunde zeigt sich eine Zunahme vor allem der 46 kDa-Bande im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol. Im zeitlichen Verlauf kommt es zur weiteren Expressionssteigerung des JNK-Proteins, welche letztlich nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Das 54 kDa JNK-Protein verhält sich analog dazu, allerdings sind die Effekte weniger stark ausgeprägt.

Eine signifikante Aktivierung des ER-Stress' über PERK und eIF2 α scheint es durch Thapsigargin nicht zu geben. Beide Proteine zeigten nach Inkubation mit dem bekannten ER-Stressor allenfalls geringe Expressionsänderungen in den hierzu durchgeführten Western Blots (Abbildung 22 und Abbildung 23 im Anhang). Die Expression von PERK nahm nach einer und sechs Stunden im Vergleich zur Negativkontrolle leicht ab, nach 24 Stunden Inkubationszeit ließ sich kein Unterschied in der Bandenstärke mehr nachweisen. Die Western Blots zu dem nachgeschalteten eIF2 α -Protein zeigten hingegen keine Änderung der Expression durch Thapsigargin. Auf eine Untersuchung der Expression von ATF6 verzichtete ich, da das ATF6-Protein selbst und viele der nachgeschalteten Proteine Querverbindungen zu den anderen Zweigen der ER-Stress-Signalkaskade aufweisen. Eine Aktivierung des dritten Zweigs der ER-Stress-Signalkaskade über ATF6 wäre somit wahrscheinlich nicht sicher nachzuweisen gewesen.

3.2 Mitotane führt zur Induktion des CHOP-Proteins in NCI-H295R-Zellen

Nach der erfolgreichen Etablierung der Methode mit Hilfe der Experimente mit Thapsigargin stellte sich die Frage, ob es durch Mitotane ebenfalls zu einer Induktion des CHOP-Proteins in den NCI-H295R-Zellen kommt. Die Western Blots wurden hierzu wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben durchgeführt.

Die Experimente zeigten eine Hochregulation des CHOP-Proteins. Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit ließen sich geringe Änderungen der Bandenstärke gegenüber der Negativkontrolle mit Ethanol finden. Im zeitlichen Verlauf nahm die CHOP-Expression nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen weiter zu, sodass sich nach 24 Stunden eine deutliche Bande kontrastierte (Abbildung 10). Somit bewirkt Mitotane in den NCI-H295R-Zellen eine zeitabhängige Hochregulation des CHOP-Proteins.

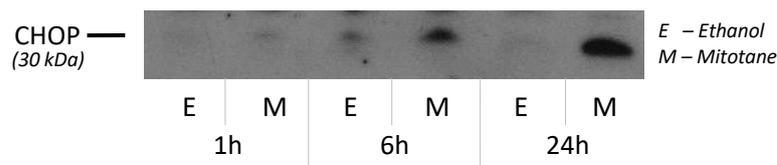


Abbildung 10: Mitotane bewirkt in NCI-H295R-Zellen eine zeitabhängige Hochregulation von CHOP. Aufgetragen wurden Proben jeweils mit Ethanol (E) oder Mitotane (M) inkubierter NCI-H295R-Zellen unterschiedlicher Inkubationszeiten (1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden).

Es kommt unter Mitotane zu einer zeitabhängigen Hochregulation der CHOP-Expression. Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit der NCI-H295R-Zellen lässt sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine Zunahme der Bandenstärke erkennen. Nach 6 Stunden nimmt die Expression weiter zu, nach 24 Stunden kontrastiert sich die Bande noch stärker.

3.3 Einfluss von Mitotane auf weitere am ER-Stress beteiligte Proteine

Analog zu den Untersuchungen mit Thapsigargin stellte sich bei Mitotane außerdem die Frage, über welche Proteine die ER-Stress-Kaskade ausgelöst wird bzw. welche Pathways durch das Medikament aktiviert werden.

Wie Thapsigargin, scheint Mitotane ebenfalls zu einer Hochregulation des GRP 78 Proteins zu führen (Abbildung 24 im Anhang). Bereits nach einer Stunde hat sich eine Steigerung der GRP 78 Expression gezeigt, die im zeitlichen Verlauf weiter zugenommen hat. Die stärkste Bande ist nach 24 Stunden vorzufinden.

Einer der nachgeschalteten Pathways des ER-Stress' beginnt mit der Aktivierung von IRE1 α . Eine Hochregulation dieses Proteins fand sich zwar nicht in den durchgeführten Western Blots, allerdings kam es zu einer Expressionsänderung des Effektorproteins JNK. Nach Inkubation der Zellen mit Mitotane zeigte sich in der Frühphase zunächst eine reduzierte Menge an JNK. Im weiteren zeitlichen Verlauf ließ sich aber eine signifikante Zunahme der Bandenstärke erkennen (Abbildung 11). Hieraus lässt sich eine Aktivierung des IRE1 α -JNK-Pathways durch Mitotane vermuten. Da Thapsigargin bereits ähnliche Ergebnisse lieferte, könnte der fehlende Nachweis der IRE1 α -Expressionsänderung an den für dieses Protein zu spät gewählten Untersuchungszeitpunkten liegen.

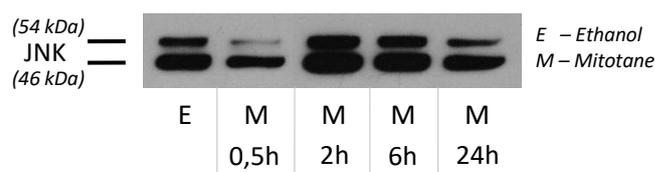


Abbildung 11: Verhalten von JNK in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane
Aufgetragen wurden Proben nach Inkubation mit Ethanol (E), sowie nach unterschiedlich langer Inkubation (30 Minuten, 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden) mit Mitotane (M).
Im Vergleich zur Negativkontrolle lässt sich eine Abnahme beider JNK-Proteine unter dem Einfluss von Mitotane erkennen. Nach 2 und 6 Stunden nimmt die Expression von JNK wieder zu, um letztlich nach 24 Stunden Inkubationszeit erneut abzunehmen.

Ein zweiter Signalweg, der GRP 78 nachgeschaltet ist, beginnt mit der Aktivierung des PERK-Proteins. Nach Inkubation mit Mitotane ließ sich eine im zeitlichen Verlauf abnehmende Bandenstärke erkennen. Dieser Prozess setzte bereits nach 30 Minuten ein. Nach 24 Stunden scheint die Expression soweit abgenommen zu haben, dass sich

keine Bande mehr abgrenzen ließ (Abbildung 12). In weiteren Western Blots konnte die zeitabhängige Expressionsabnahme von PERK durch Mitotane bestätigt werden. Am ehesten liegt dies an der Autophosphorylierung zu p-PERK. Leider ließen sich die Phospho-Antikörper mittels der genutzten Western Blot Methode nicht valide nachweisen, sodass diese These nicht bestätigt werden konnte. Des Weiteren könnte die ausgeprägte Expressionsabnahme auf der Tatsache beruhen, dass die Zellen im zeitlichen Verlauf apoptotisch werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit Mitotane betrifft dies fast alle Zellen, sodass kein PERK mehr gebildet werden kann.

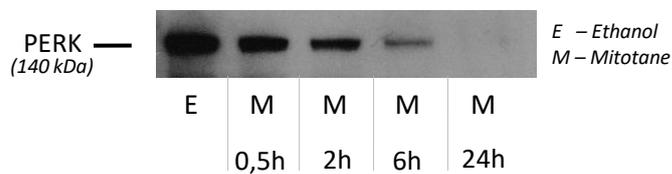


Abbildung 12: Abnahme der PERK-Expression in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane
Aufgetragen wurden Proben von unterschiedlich lange (0,5 Stunden, 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden) mit Mitotane (M) inkubierten NCI-H295R-Zellen und Ethanol (E) als Negativkontrolle.
Es zeigt sich bereits nach 30 Minuten eine Abnahme der PERK-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach 2 und 6 Stunden reduziert sich die Bandenstärke weiter bis nach 24 Stunden keine Bande mehr erkennbar ist. Somit kann auf eine zeitabhängige Herunterregulation des PERK-Proteins durch Mitotane geschlossen werden.

Ein Effektorprotein von PERK ist eIF2 α . Unter dem Einfluss von Mitotane verhält es sich analog zu PERK. Es zeigte sich in den durchgeführten Western Blots eine zeitabhängige Abnahme der Expression von eIF2 α (Abbildung 13).

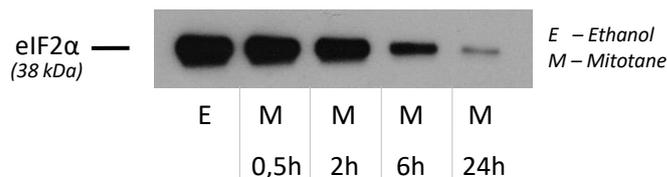


Abbildung 13: Mitotane führt zur zeitabhängigen Expressionsabnahme von eIF2 α in NCI-H295R-Zellen
Aufgetragen wurden Proben nach Inkubation von NCI-H295R-Zellen mit Mitotane (M) unterschiedlicher Inkubationszeiten (0,5 Stunden, 2 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden). Als Negativkontrolle wurde Ethanol (E) verwendet.
Es zeigt sich nach Inkubation der Zellen mit Ethanol eine hohe Expression von eIF2 α . Je länger die NCI-H295R-Zellen mit Mitotane inkubiert wurden, desto niedriger ist die nachweisbare Menge an eIF2 α im Western Blot. Hieraus lässt sich schließen, dass es zu einer Herunterregulation von eIF2 α durch Mitotane kommt.

Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Expressionsänderung zum einen durch die Phosphorylierung zu p-eIF2 α (aktive Form des Proteins) und zum anderen durch die nach 24 Stunden fehlende Synthese auf Grund der vielen bereits apoptotisch gewordenen Zellen zurückzuführen ist. Erstere Hypothese wird durch die Ergebnisse der

Western Blots mit p-eIF2 α gestützt. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, kommt es unter der Einwirkung von Mitotane zu einer Zunahme der Expression von p-eIF2 α . Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit fand sich eine deutlich abgrenzbare Bande. In der Negativkontrolle mit Ethanol hingegen war keine Bande zu erkennen. Gleiches gilt nach sechs Stunden. Allerdings scheint die Expression an p-eIF2 α hier bereits wieder rückläufig zu sein.

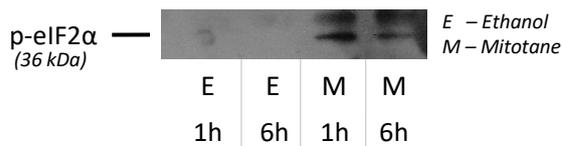


Abbildung 14: Mitotane induziert p-eIF2 α in NCI-H295R-Zellen

Aufgetragen wurden die Proben von Mitotane (M) behandelten NCI-H295R-Zellen nach 1 und 6 Stunden Inkubationszeit. Gleiches galt für die Negativkontrolle mit Ethanol (E).

Es zeigt sich durch den Einfluss von Mitotane bereits nach 1 Stunde Inkubationszeit eine Zunahme der p-eIF2 α -Expression im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Zellen. Nach 6 Stunden Inkubationszeit ist ebenfalls noch eine Bande erkennbar, die jedoch etwas schmaler erscheint. Insgesamt lässt sich auf eine verstärkte Expression von p-eIF2 α durch Mitotane schließen. Des Weiteren finden sich in diesem Experiment Banden von unspezifischen Antikörperbindungen. Diese sind am rechten oberen Bildrand angeschnitten.

Anhand der durchgeführten Experimente lässt sich demnach auf eine Aktivierung der ER-Stress-Signalkaskade über PERK schließen. Zudem ist die zusätzliche Aktivierung über IRE1 α auf Grund der Ergebnisse mit dem JNK-Antikörper wahrscheinlich. Analog zu den Untersuchungen mit Thapsigargin kann keine Aussage zur Aktivierung über ATF6 getroffen werden, da Expressionsveränderungen von ATF6 nicht untersucht wurden.

3.4 Mitotane beeinflusst einen Transkriptionsfaktor des Lipidstoffwechsels in NCI-H295R-Zellen

Da die Nebennierenrinde ein wichtiges Organ für den Lipidstoffwechsel im Körper ist, stellt sich die Frage, inwieweit die Aktivierung von ER-Stress durch eine Wirkung auf den Lipidstoffwechsel mitbedingt sein könnte. Bereits in vorangegangenen Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Gene, die im Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, herunterreguliert werden [146]. Zur Untersuchung des Einflusses von Mitotane auf den Lipidstoffwechsel habe ich die Expression des SREBP-1-Proteins untersucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich um ein Transmembranprotein, das bei fallenden Steroidkonzentrationen gespalten

wird. Durch diese Aktivierung kann es als Transkriptionsfaktor fungieren und die Steroidsynthese steigern. Der für die Western Blots verwendete Antikörper kann sowohl die inaktive Vorstufe mit einer Größe von 125 kDa, als auch die aktive 68 kDa große Form nachweisen.

Der Effekt von Mitotane auf SREBP-1 lässt sich anhand der durchgeführten Western Blots nicht eindeutig ableiten. In Abbildung 15 zeigt sich eine zeitabhängige Expressionsabnahme sowohl des Vorläuferproteins als auch der aktiven Form. In weiteren Experimenten zu dieser Fragestellung konnte lediglich die Abnahme vor allem der aktiven Form von SREBP-1 unter dem Einfluss von Mitotane reproduziert werden. Somit kann vermutet werden, dass Mitotane den Lipidstoffwechsel hemmt.

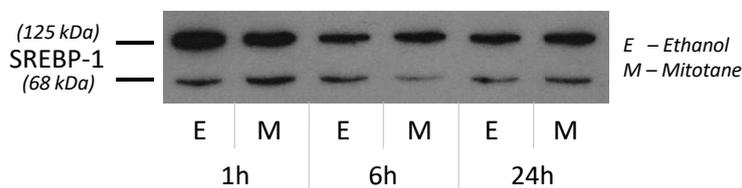


Abbildung 15: Mitotane hemmt die SREBP-1-Synthese in NCI-H295R-Zellen
Aufgetragen wurden Proben nach Behandlung der NCI-H295R-Zellen mit Mitotane (M) und Ethanol (E) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden).
Vor allem nach 6 Stunden Inkubationszeit zeigt sich durch den Einfluss von Mitotane eine Abnahme der Proteinmenge der aktiven Form von SREBP-1 (68 kDa).

3.5 Effekt von verschiedenen SOAT-Inhibitoren auf NCI-H295R-Zellen

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob es Substanzen gibt, die auf Proteinebene ähnliche Reaktionen wie Mitotane auslösen und somit für neue therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung stehen könnten. Als zu testende Substanzen wurden ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 ausgewählt. Da sich in den vorangegangenen Experimenten die beiden Proteine CHOP – als Indikator für ER-Stress – und SREBP-1 – als Indikator für Veränderungen des Lipidhaushaltes – etablieren konnten, konzentrierten sich die nachfolgend dargestellten Untersuchungen auf diese beiden Proteine. Um eine Vergleichbarkeit der Substanzen zu erreichen wurden diese jeweils in einer Konzentration von 50 µM verwendet. Des Weiteren wurde auf den frühen Untersuchungszeitpunkt nach einer Stunde verzichtet, da sich in den vorangegangenen Experimenten die größten Expressionsänderungen erst nach sechs Stunden zeigten.

3.5.1 ATR 101 und Mitotane führen zu einem Anstieg der CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen

Betrachtet man zunächst die Banden nach Inkubation der Zellen mit Mitotane und die dazugehörigen Negativkontrollen mit Ethanol, findet sich eine Bestätigung der bisherigen Ergebnisse. Mitotane führte sowohl nach sechs Stunden als auch nach 24 Stunden zu einem Anstieg der CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen. Der Effekt zeigte sich nach 24 Stunden am stärksten (Abbildung 16).

Der SOAT-Inhibitor ATR 101 hingegen ließ eine frühere Hochregulation des CHOP-Proteins im Vergleich zu Mitotane erkennen. Es kontrastierte sich bereits nach sechs Stunden eine deutliche Bande, die im zeitlichen Verlauf bereits wieder abnahm. Die mit ATR 101 behandelten Zellen werden vermutlich früher apoptotisch. Die avitalen Zellen synthetisieren das CHOP-Protein nicht mehr, sodass die Konzentration im Zelllysat letztlich wieder abnimmt.

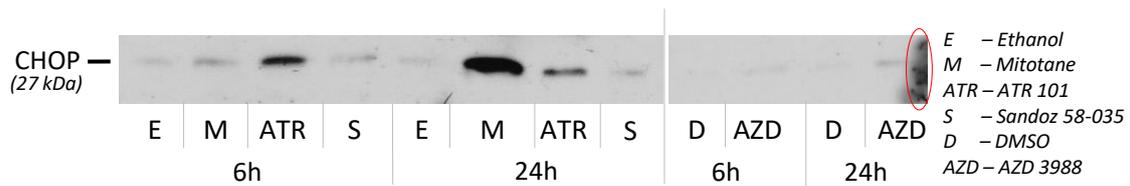


Abbildung 16: Effekt Von Mitotane und ausgewählten SOAT-Inhibitoren auf die CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen
Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (6 Stunden, 24 Stunden) mit Ethanol (E), Mitotane (M), ATR 101 (ATR), DMSO (D) und Sandoz 58-035 (S). Es handelt sich um 2 separate Western Blots, die zur besseren Vergleichbarkeit in dieser Abbildung zusammengefügt wurden.
Es zeigt sich vor allem nach 6 Stunden ein signifikanter Anstieg der CHOP-Expression nach Inkubation mit ATR 101. Mitotane führt zu einem späteren Anstieg der CHOP-Expression. Die weiteren untersuchten Substanzen zeigen allenfalls einen geringen Effekt auf das CHOP-Protein. Bei dem rot markierten Bereich handelt es sich um Artefakte, die bei der Entwicklung des Western Blots entstanden sind.

Die zwei weiteren verwendeten SOAT-Inhibitoren Sandoz 58-035 und AZD 3988 hatten im Vergleich zu Mitotane und ATR 101 allenfalls einen geringen Effekt auf die CHOP-Expression in den untersuchten Zeiträumen. Es ließen sich – wie in Abbildung 16 dargestellt – zwar schmale Banden abgrenzen, die sich etwas stärker kontrastierten als die zugehörigen Negativkontrollen, aber ein signifikanter Anstieg von CHOP nach Inkubation mit den beiden Substanzen war nicht zu erkennen. Lediglich durch AZD 3988 schien es nach 24 Stunden zu einem leichten Anstieg der CHOP-Expression zu kommen (Abbildung 17).

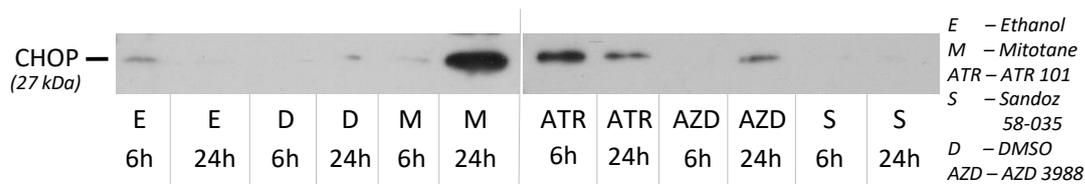


Abbildung 17: Verhalten von CHOP in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren

Aufgetragen wurden jeweils Proben von NCI-H295R-Zellen nach 6 oder 24-stündiger Inkubation mit Ethanol (E) und DMSO (D) als Negativkontrollen und Mitotane (M), ATR 101 (ATR), AZD 3988 (AZD) und Sandoz 58-035 (S) als Substanzen von Interesse. Es handelt sich um 2 separate Western Blots, die auf Grund der einfacheren Vergleichbarkeit zusammen dargestellt wurden.

Es zeigt sich vor allem nach 24 Stunden Inkubationszeit ein signifikanter Anstieg der CHOP-Expression durch Mitotane. Zusätzlich finden sich nach 6- und 24-stündiger Behandlung der NCI-H295R-Zellen mit ATR 101 deutlich erkennbare Banden. In diesem Experiment hat AZD 3988 ebenfalls eine Steigerung der CHOP-Expression nach 24 Stunden Inkubationszeit zur Folge.

Der Effekt trat zwar deutlich später ein als bei Mitotane und ATR 101, ob er aber insgesamt wirklich abgeschwächerter war, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente nicht ableiten. Hierzu fehlen Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten, da die maximalen Auswirkungen von AZD 3988 ggf. erst nach längerer Inkubationszeit auftreten könnten.

Zusammenfassend lässt sich anhand der dargestellten Experimente erkennen, dass sowohl Mitotane als auch ATR 101 zu einer signifikanten Hochregulation von CHOP innerhalb der ersten 24 Stunden nach Inkubationsbeginn führten. Zu den gewählten Zeitpunkten scheint Mitotane die potenteste Substanz für einen Anstieg der CHOP-Expression zu sein. AZD 3988 und Sandoz 58-035 hatten allenfalls geringe Auswirkungen auf die Synthese dieses für den ER-Stress wichtigen Proteins.

3.5.2 Auswirkungen von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf die SREBP-1-Expression in NCI-H295R-Zellen

Die Experimente zu SREBP-1 zeigten ebenfalls Unterschiede in den Auswirkungen der einzelnen Substanzen auf. Betrachtet man zunächst den Einfluss von Mitotane auf die NCI-H295R-Zellen, ließ sich nach sechs Stunden Inkubationszeit eine Abnahme sowohl der 125 kDa als auch der 68 kDa Bande erkennen. Nach 24 Stunden nahmen beide Bandenstärke im gleichen Maße weiter ab (Abbildung 18). Es zeigte sich demnach eine verminderte Synthese der SREBP-1-Vorstufe. Ob die analoge Abnahme der aktiven Form auf der fehlenden Bildung des Precursors oder einer verminderten Spaltung in das

68 kDa große Protein beruht, lässt sich anhand des Versuchsaufbaus nicht eruieren. Allerdings kann man ableiten, dass Mitotane die Steroidbiosynthese durch eine zeitabhängige Herunterregulation des SREBP-1-Proteins hemmt.

Die Inkubation mit ATR 101 scheint einen ähnlichen Effekt auf die Steroidbiosynthese zu haben wie Mitotane. Es zeigte sich eine Abnahme vor allem der Bande des Vorläuferproteins bei 125 kDa nach sechs Stunden. Nach insgesamt 24 Stunden Inkubationszeit nimmt die 125 kDa-Bande nochmals ab, sodass auch hier von einer zeitabhängigen Herunterregulation von SREBP-1 ausgegangen werden kann (Abbildung 18). Obwohl die Expression des Vorläuferproteins abnahm, nahm die aktive Form nicht signifikant zu. Somit scheint es sich nicht um eine Umwandlung in die aktive Form, sondern um eine Mindersynthese des Vorläuferproteins zu handeln.

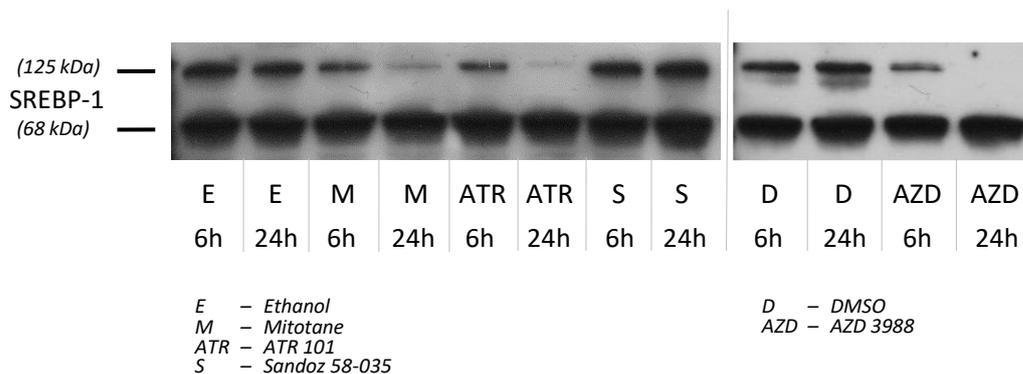


Abbildung 18: Auswirkungen von Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren auf SREBP-1 in NCI-H295R-Zellen. Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen, die jeweils 6 oder 24 Stunden mit Ethanol (E), Mitotane (M), ATR 101 (ATR), Sandoz 58-035 (S), DMSO (D) oder AZD 3988 inkubiert wurden. Es handelt sich um 2 separate Western Blots mit gleichem Versuchsaufbau, die zur besseren Vergleichbarkeit in einer Abbildung zusammengefügt wurden. Es zeigt sich im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol bzw. DMSO eine Abnahme der Vorstufe von SREBP-1 vor allem nach 24-stündiger Inkubation mit Mitotane, ATR 101 und AZD 3988. Allerdings lässt sich nach 6-stündiger Inkubationszeit ebenfalls eine dezente Abnahme der Bandenstärke durch diese 3 Substanzen erkennen. Allein Sandoz 58-035 scheint keinen Effekt auf die Expression der SREBP-1-Vorstufe zu haben. Die Expression der aktiven Form von SREBP-1 wurde in diesem Experiment nicht beeinflusst.

Zudem nahm die Expression des Vorläuferproteins von SREBP-1 durch die Inkubation mit AZD 3988 ab. Nach 24 Stunden ließ sich teilweise keine Bande mehr nachweisen. Die Bande der aktiven Form zeigte zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten hingegen keine signifikante Veränderung, sodass der Einfluss auf den Lipidstoffwechsel im Vergleich zu Mitotane weniger stark zu sein scheint.

Die einzige Substanz, bei der man nach einem Tag Inkubationszeit keine Auswirkungen auf die Expression von SREBP-1 erkennen konnte, war Sandoz 58-035. Weder die Vorstufe noch die aktive Form zeigten einen signifikanten Unterschied in der Bandenstärke nach Inkubation der Zellen mit dieser Substanz.

Insgesamt hatten analog zu den Experimenten mit dem CHOP-Protein Mitotane und ATR 101 den stärksten Effekt auf die SREBP-1-Expression. Während Mitotane zu einer Herunterregulation sowohl der Vorstufe als auch der aktiven Form führte, schien ATR 101 hauptsächlich Auswirkungen auf die Expression der Vorstufe zu haben. Gleiches galt für die mit AZD 3988 inkubierten Zellen in abgeschwächter Form. Die Wirkung schien gegenüber ATR 101 deutlich geringer auszufallen. Sandoz 58-035 als vierte Substanz hatte allenfalls einen minimalen Effekt auf die SREBP-1-Expression in den NCI-H295R-Zellen.

3.6 Mitotane führt auch in anderen Zelllinien zur Induktion des CHOP-Proteins

Ein weiterer Teil der Experimente beschäftigte sich mit dem Effekt von Mitotane auf andere Zelllinien. Ziel war es, herauszufinden, ob die bei NCI-H295R-Zellen ER-Stress-auslösenden Substanzen möglicherweise auch in anderen Tumorentitäten wirksam sein könnten. Untersucht wurden vier verschiedene Zelllinien aus unterschiedlichen Gewebearten. Es handelte sich um HepG2-Zellen (Lebertumorzellen), IMR32-Zellen (Neuroblastomzellen), HEK293T-Zellen (,human embryonic kidney cells') und HeLaz91wt-Zellen (Gebärmutterhalskarzinomzellen). Der Versuchsaufbau war analog zu den bisherigen Experimenten. Die Zelllinien wurden jeweils für sechs und 24 Stunden mit 50 µM Mitotane inkubiert. Als Negativkontrolle diente Ethanol.

Mitotane führte in jeder dieser Zelllinien zu einem Anstieg der CHOP-Expression. Das Ausmaß des Anstieges war allerdings unterschiedlich. Abbildung 19 gibt einen Überblick über die Änderungen der CHOP-Expression.

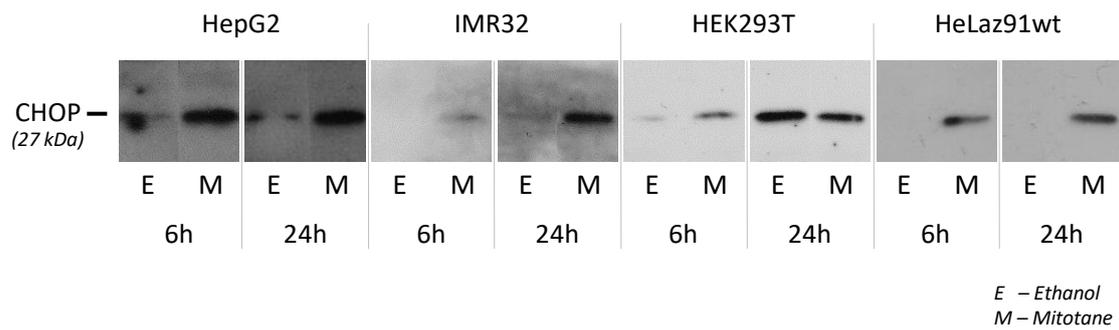


Abbildung 19: Übersicht über die Auswirkungen von Mitotane auf die Expression des CHOP-Proteins in verschiedenen Zelllinien

Aufgetragen wurden Proben von verschiedenen Zelllinien (HepG2, IMR32, HEK293T, HeLaz91wt), die jeweils 6 oder 24 Stunden mit Mitotane (M) oder Ethanol (E) inkubiert wurden. Die einzeln angefertigten Blots wurden zur besseren Übersicht in einer Abbildung zusammengefasst.

Es zeigt sich in allen Zelllinien eine unterschiedlich starke Zunahme der Expression des CHOP-Proteins nach der Inkubation der Zellen mit Mitotane im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol.

Nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Mitotane kontrastierte sich bereits nach sechs Stunden eine signifikante Bande. Gleiches galt in etwas abgeschwächter Form für die HeLaz91wt-Zellen. Die IMR32- und HEK293T-Zellen schienen zwar ebenfalls das CHOP-Protein nach sechs Stunden hochzuregulieren, allerdings in noch geringerem Maße. Nach 24 Stunden Inkubationszeit nahm die Bandenstärke bei den HepG2-Zellen nicht mehr weiter zu. Eine Verlängerung der Einwirkzeit von Mitotane schien keinen weiteren Effekt mehr zu haben. Allerdings kann eine weitere Hochregulation zwischen sechs und 24 Stunden auf Grund der gewählten Zeitpunkte der Experimente nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich nahmen die Bandenstärken bei 24 Stunden in den anderen Zelllinien leicht zu, sodass die höchste CHOP-Expression zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wurde als in den HepG2-Zellen.

Anhand dieser Experimente lässt sich ableiten, dass Mitotane in der verwendeten Konzentration von 50 μM nicht nur in Nebennierenrindenzellen zu ER-Stress führt, sondern auch in weiteren Zelllinien anderer Gewebearten.

3.7 CHOP-Induktion durch die SOAT-Inhibitoren ATR 101, Sandoz 58-035 und AZD 3988 in verschiedenen Zelllinien

Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die bereits in NCI-H295R-Zellen untersuchten SOAT-Inhibitoren analog zu Mitotane in anderen Zelllinien ebenfalls zu Änderungen der CHOP-

Expression führen. Erneut wurde die etablierte Methode des Western Blots verwendet. Für die Vergleichbarkeit wurden die Zellen jeweils mit 50 µM der Substanzen inkubiert. Besonders aussagekräftig sind die Experimente mit den IMR32-Zellen (Abbildung 20) und den HeLaz91wt-Zellen (Abbildung 21). Es zeigte sich vor allem ein Anstieg der CHOP-Expression durch die Inkubation der Zellen mit ATR 101. Dieser setzte bereits deutlich früher ein als nach Behandlung der Zellen mit Mitotane oder AZD 3988. Sandoz 58-035 scheint hingegen zu den Untersuchungszeitpunkten allenfalls einen geringen Effekt auf die CHOP-Expression in diesen beiden Zelllinien zu haben. Lediglich nach sechs Stunden Inkubationszeit ließ sich eine dezente Bande abgrenzen.

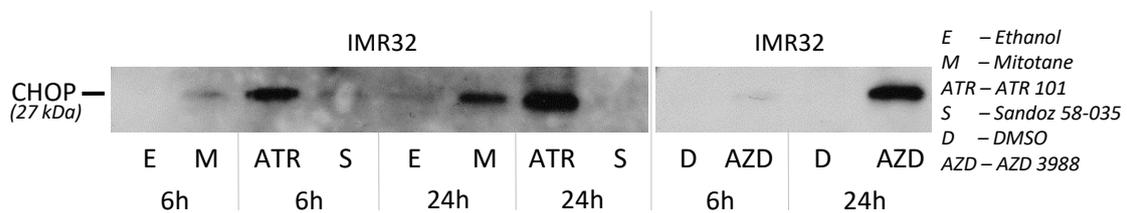


Abbildung 20: CHOP-Expression in IMR32-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und SOAT-Inhibitoren

Aufgetragen wurden Proben von IMR32-Zellen nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit Mitotane (M), ATR 101 (ATR), Sandoz 58-035 (S) und AZD 3988 mit den zugehörigen Negativkontrollen Ethanol (E) und DMSO (D). Die Abbildung besteht aus zwei getrennten Western Blots, da auf einem Gel lediglich 10 Spuren beladen werden konnten.

Es zeigt sich vor allem nach der Inkubation der IMR32-Zellen mit ATR 101 ein Anstieg der CHOP-Expression bereits nach 6 Stunden. In geringerem Maße wird dieser Effekt auch durch Mitotane und AZD 3988 ausgelöst. Nach 24-stündiger Inkubationszeit steigt die Expression des CHOP-Proteins durch diese 3 Substanzen noch weiter an. Lediglich Sandoz 58-035 scheint in IMR32-Zellen keinen Einfluss auf die Expression von CHOP zu haben.

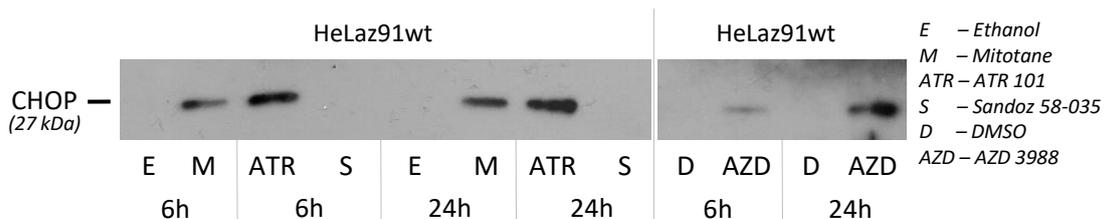


Abbildung 21: Vergleich der Auswirkungen verschiedener SOAT-Inhibitoren und Mitotane auf die CHOP-Expression in HeLaz91wt-Zellen

Aufgetragen wurden Proben von HeLaz91wt-Zellen nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit Mitotane (M), ATR 101 (ATR), Sandoz 58-035 (S) und AZD 3988 (AZD), sowie deren Negativkontrollen Ethanol (E) und DMSO (D). Das Experiment wurde in 2 Western Blots aufgeteilt, die zum besseren Verständnis in einer Abbildung zusammengefasst wurden.

Sowohl Mitotane als auch ATR 101 und AZD 3988 führen nach 6 Stunden Inkubationszeit zu einem Anstieg der CHOP-Expression in den HeLaz91wt-Zellen. Nach insgesamt 24-stündiger Behandlung mit diesen Substanzen zeigt sich ein weiterer Anstieg der im Western Blot nachweisbaren CHOP-Menge. Lediglich durch Sandoz 58-035 ändert sich die CHOP-Expression nicht.

Im Gegensatz dazu sind die Auswirkungen auf die Expression des CHOP-Proteins in den HEK293T-Zellen und den HepG2-Zellen weniger ausgeprägt. Allerdings scheint ATR 101 hier ebenfalls den stärksten Effekt zu haben (Abbildung 25 und Abbildung 26 im Anhang). Des Weiteren fiel auf, dass Sandoz 58-035 in den HepG2-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien zu einer deutlich höheren CHOP-Expression führte.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die mittels Western Blot gewonnenen Erkenntnisse zur Änderung der CHOP-Expression durch die einzelnen Substanzen in verschiedenen Zelllinien.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswirkungen auf das CHOP-Protein durch Mitotane, ATR 101, Sandoz 58-035 und AZD 3988 in verschiedenen Zelllinien

	NCI-H295R		HepG2		HEK293T		IMR32		HeLaZ91wt	
	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
Mitotane	↑	↑↑↑	→	↑	↑↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑
ATR 101	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑	↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Sandoz 58-035	↑/→	↑/→	→	↑↑	→	↓	↑	→	→	→
AZD 3988	↑/→	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑↑

- ↑↑↑ steigt stark
- ↑↑ steigt
- ↑ steigt leicht
- ↑/→ leichte Zunahme bis keine Änderung
- keine Änderung
- ↓ nimmt ab

Insgesamt gesehen scheint ATR 101 die potenteste Substanz zu sein, um in den untersuchten Zellen zu den gewählten Zeitpunkten die CHOP-Expression zu steigern und somit potenziell für Apoptose über den Weg des ER-Stress' zu sorgen. In fast allen untersuchten Zelllinien kam es zu einem signifikanten Anstieg des ER-Stress-Markers. Aber auch Mitotane führte letztlich in allen vier Zelllinien zu einer Hochregulation des CHOP-Proteins. Allerdings war diese im Vergleich zu ATR 101 zeitlich zumeist verzögert und der Expressionsanstieg zumindest zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten etwas geringer. AZD 3988 konnte die CHOP-Expression ebenfalls steigern. Der Effekt war zwar noch ausgeprägter als bei Sandoz 58-035, aber deutlich schwächer als durch

ATR 101 und Mitotane. Betrachtet man die Zelllinien viel des Weiteren auf, dass vor allem in IMR32- und HeLaZ91wt-Zellen durch die Substanzen die CHOP-Synthese stieg.

3.8 Einfluss von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf SREBP-1 in verschiedenen Zelllinien

Die Veränderung der SREBP-1-Expression nach Inkubation mit den vier Substanzen in den unterschiedlichen Zelllinien wurde ebenfalls mittels Western Blot untersucht. Der Versuchsaufbau war hierbei analog zu den Experimenten mit dem CHOP-Protein. Einen Überblick über die Ergebnisse bietet Tabelle 8.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Auswirkungen von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf SREBP-1 in verschiedenen Zelllinien

		NCI-H295R		HepG2		HEK293T		IMR32		HeLaZ91wt	
		6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
Mitotane	Precursor	↓	↓↓↓	↑	→	→	↑/→	↑	↑	↓	↓
	aktive Form	↓	↓↓↓	↑	→	→	→	↑	↓	↑	↓
ATR 101	Precursor	↓	↓↓↓	↑	→	↓	↓↓↓	↑	↓	↓	↓↓↓
	aktive Form	→	→	↑	↓	↑	↓	↑/→	↓	↓/→	↓
Sandoz 58-035	Precursor	→	→	–	–	↓	→	↑	↑	↓	↑
	aktive Form	→	→	–	–	↑	↓	↑	↑	↓	↓
AZD 3988	Precursor	↓	↓↓↓	↑	↑↑	→	→	↓	↓	↑	↑
	aktive Form	→	→	–	–	→	→	↓/→	→	→	→

- ↑ steigt leicht
- ↑/→ leichte Zunahme bis keine Änderung
- keine Änderung
- ↓/→ leichte Abnahme bis keine Änderung
- ↓ nimmt ab
- ↓↓↓ nimmt stark ab
- keine valide Aussage anhand der Experimente möglich

Insgesamt gesehen sind die Ergebnisse zu den einzelnen Substanzen und Zelllinien inhomogen. So ließen sich zwar in HeLaZ91wt-Zellen ähnliche Veränderungen durch Mitotane und ATR 101 wie in NCI-H295R-Zellen finden, aber gerade die HepG2-Zellen scheinen eher zu einer leicht gesteigerten Expression von SREBP-1 als Transkriptionsfaktor des Lipidstoffwechsel zu führen. Zusätzlich fiel auf, dass in vielen Experimenten keine Veränderung der SREBP-1-Expression zu erkennen war. Weder die Vorläuferform noch die aktive Form hatten Änderungen in der Bandenstärke gezeigt. Teilweise fanden sich auch widersprüchliche Ergebnisse beim Versuch der Reproduktion, sodass beispielsweise zur Auswirkung von Sandoz 58-035 auf SREBP-1 in

HepG2-Zellen keine valide Aussage gemacht werden konnte. Um den Effekt dieser Substanzen auf den Lipidstoffwechsel zu klären, müssten im Verlauf weitere Untersuchungen erfolgen. Die hier gezeigten Ergebnisse geben lediglich einen Hinweis auf mögliche Auswirkungen.

4 Diskussion

Aufgrund des hohen klinischen Bedarfs an wirksameren und besser verträglichen Therapieformen des Nebennierenrindenzinoms ist der Wirkmechanismus des einzigen bei dieser Erkrankung zugelassenen Medikaments Mitotane in den Fokus des Interesses gerückt.

In Genexpressionsanalysen von mit Mitotane behandelten NCI-H295R-Zellen zeigte sich eine Hochregulation vor allem pro apoptotischer Gene, zu denen unter anderem auch CHOP gehört. Im Gegensatz dazu scheinen Gene, die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind wie beispielsweise die Squalenepoxidase, der LDL-Rezeptor und SREBP-1 unter dem Einfluss von Mitotane herunterreguliert zu werden. Diese Ergebnisse sind in einer Arbeit publiziert, in die auch Ergebnisse aus diesem Projekt eingeflossen sind [146].

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es zunächst, die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse auf Proteinebene zu bestätigen. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Veränderungen auf Proteinebene zelltypspezifisch sind oder sich auch in anderen Zelllinien nachweisen lassen. Im letzten Schritt wurden die Auswirkungen von Mitotane im Vergleich zu anderen SOAT-Inhibitoren in verschiedenen Zelllinien untersucht.

Um diese Fragen zu klären, schien die Methode des Western Blots als geeignete Methode. Nach Etablierung des Verfahrens zeigten sich besonders für das CHOP-Protein und SREBP-1 interessante und für das Verständnis der SOAT-Inhibitoren beim Nebennierenrindenzinom relevante Ergebnisse.

Die Methode besitzt spezifische Vorteile aber auch Limitationen, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Vorteilhaft ist die vergleichsweise hohe Spezifität, die durch die Auftrennung des Proteingemischs nach molekularer Masse und die Detektion mit einem gegen das Protein generierten Antikörpers erreicht wird. So sind deutlich mehr Antikörper kommerziell zu erwerben, die für den Western Blot geeignet sind, als solche die beispielsweise für die Immunfluoreszenz evaluiert wurden.

Nachteilig sind die fehlende intrazelluläre Ortsauflösung und die fehlende zeitliche Dimension, die durch die Wahl serieller Zeitpunkte versucht wurde auszugleichen.

Gerade auf Grund der Komplexität des Western Blots mit vielen verschiedenen Schritten bestehen allerdings zahlreiche Fehlerquellen. Ein Beispiel ist die ungleichmäßige Beladung des Gels. Bereits geringe Messungenauigkeiten in den einzelnen Teilschritten können zu signifikanten Unterschieden in der Bandenstärke auf dem Röntgenfilm führen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl der Zellen basiert allerdings letztlich auf einer Hochrechnung aus einer Stichprobe einer mehr oder minder homogenen Zellsuspension, sodass es zu geringen Abweichungen kommen kann. Im nächsten Schritt erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen aus den Zellkulturen gewonnenen Proben. Das verwendete BCA Protein Assay Kit basiert auf der Biuret-Reaktion von Kupferionen mit den Aminogruppen des Proteins. Die Messung erfolgte mittels Photometer. Eine Fehlbestimmung der Proteinkonzentration durch geringe zeitliche Verzögerungen oder minimale Pipettierfehler lässt sich nicht ausschließen. Zudem mag das Proteininventar verschiedener Zellen unterschiedliche Ergebnisse in der Biuret-Reaktion ergeben, sodass die Geltaschen ggf. nicht in jedem Fall mit der identischen Proteinmenge beladen wurden. Des Weiteren kann einsetzender Zelltod ebenfalls zu Änderungen im Proteom führen. Um signifikante Fehlbeladungen auszuschließen, wurden die Membranen nach der Gelelektrophorese mit Amidoschwarz oder Ponceau angefärbt, so dass ein visueller Eindruck von der Beladung gewonnen werden konnte und zugleich etwaige Probleme im Membrantransfer detektiert werden konnten. Nur Western-Blots mit entsprechender gleichmäßiger Proteinbeladung wurden herangezogen. Des Weiteren erfolgte teilweise eine Ladekontrolle mit β -Actin, einem Zytoskelettprotein, das als in etwa gleichmäßig und konstant exprimiert gilt. Allerdings handelt es sich auch hierbei um eine Vereinfachung, denn diese sogenannten Haushaltsproteine („housekeeping proteins“), die als Ladekontrolle herangezogen werden, können unbemerkt einer Regulation unterliegen im gleichen Sinn oder aber auch gegensinnig zu dem Protein von Interesse. Dies kommt insbesondere dann zum Tragen, wenn verschiedene Zelltypen

verglichen werden, die zum Teil deutlich differierende Mengen dieser ‚housekeeping‘-Proteine exprimieren [147]. Wir haben uns daher entschieden, die gleichmäßige Beladung mittels der Amidoschwarz- bzw. Ponceaufärbung sicher zu stellen, die ich exemplarisch im Methodenteil dargestellt habe.

Essentiell für die Interpretation der Ergebnisse war die Kontrolle für das Lösungsmittel der jeweilig untersuchten SOAT-Inhibitoren (Negativkontrolle). Ob bereits durch das Lösungsmittel allein Teile der ER-Stress-Kaskade in Gang gesetzt werden, ist nicht sicher zu beurteilen. Hierzu fehlen Vergleichsexperimente ohne den Einsatz der Lösungsmittel. Des Weiteren handelt es sich um eine rein optische und keine quantitative Auswertung der Röntgenfilme. Hierbei werden lediglich offensichtliche Unterschiede in den Bandenstärken detektiert. Geringe Abweichungen der Expression der Proteine sind nicht sichtbar.

Es ist grundsätzlich möglich, durch Densitometrie von Filmen eine semiquantitative Expressionsbestimmung vorzunehmen, was jedoch u.a. voraussetzt, dass sich die Intensität der Banden auf dem Film innerhalb von dessen dynamischem Empfindlichkeitsbereich befindet und dies auch für die jeweilige Ladekontrolle gilt. Aufgrund der Vielzahl an explorativen Untersuchungen in dieser Arbeit und der beschriebenen Limitationen habe ich auf eine solche Quantifizierung bewusst verzichtet.

Durch die Auswahl verschiedener Zeitpunkte wurde versucht, den zeitlichen Verlauf der Expression von Markerproteinen abzubilden. Allerdings bleiben große Zeitkorridore zwischen den Untersuchungszeitpunkten, an denen keine Aussage zu Expressionsveränderungen getroffen werden können. Die Zeitmarken wurden anhand der Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen ausgewählt. In einigen Experimenten wurden zudem noch weitere Zeitpunkte mit dreißig Minuten und zwei Stunden hinzugenommen, sodass sich auch frühere Veränderungen besser beurteilen ließen. Da hierbei keine wesentlichen neuen Erkenntnisse gewonnen werden konnten, schien eine Fokussierung auf die bereits vorher gewählten Zeitmarken sinnvoll.

Zu guter Letzt wurden die Experimente an Zellkulturen durchgeführt. Ob die hier gezeigten Veränderungen auch *in vivo* ablaufen, kann nicht mit letzter Sicherheit

angenommen werden. Ebenfalls unklar bleiben die Auswirkungen auf andere Zellen des menschlichen Körpers. Dies wurde teilweise durch Einbeziehung anderer als der hauptsächlich im Fokus dieser Arbeit stehenden NCI-H295R-Zelllinie versucht auszugleichen, allerdings bleibt diese Auswahl naturgemäß exemplarisch.

Anhand der durchgeführten Western Blots lassen sich die Erkenntnisse aus den Genexpressionsanalysen teilweise bestätigen. Sowohl das CHOP-Protein als Endstrecke des ER-Stress' und Teil der Apoptoseinduktion als auch weitere an der ER-Stress-Kaskade beteiligte Proteine verändern unter dem Einfluss von Mitotane ihre Expression.

Das GRP 78-Protein zeigt im Vergleich zum CHOP-Protein bereits einen früheren Expressionsanstieg sowohl unter dem Einfluss von Thapsigargin als auch von Mitotane. Am ehesten handelt es sich dabei um einen Feedbackmechanismus des ER-Stress', der zu einer vermehrten Expression des Chaperons GRP 78 führt, um dem Anfall von ungefalteten Proteinen bzw. anderer ER-Stressoren entgegenzuwirken. Anhand der durchgeführten Experimente lässt sich erkennen, dass Mitotane alleine im Gegensatz zu Thapsigargin einen geringeren bzw. erst später auftretenden Effekt auf die Expression von GRP 78 hat. Die ansonsten allerdings analogen Veränderungen sprechen für eine ähnliche Wirkweise der beiden Substanzen.

Ob Mitotane ER-Stress über die IRE1 α /JNK-Kaskade auslöst, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht sicher abgeleitet werden. Die Untersuchungen zu IRE1 α zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. Weder nach Inkubation mit dem bekannten ER-Stressor Thapsigargin noch mit Mitotane fanden sich signifikante Unterschiede in den Bandenstärken. Allerdings konnten nach frühen Untersuchungszeitpunkten erhöhte Konzentrationen des nachgeschalteten JNK-Proteins nach Behandlung der Zellen mit den beiden Substanzen gefunden werden, sodass für einen Nachweis des IRE1 α -Proteins wahrscheinlich eine noch kürzere Inkubationszeit hätte gewählt werden müssen. Auch die aktivierte Form von JNK, p-JNK, lag in einem vorläufigen Experiment unter Mitotane vermehrt vor. Somit weisen die Untersuchungen letztlich zumindest auf eine geringe Aktivierung der IRE1 α /JNK-Signalkaskade hin. Das Fehlen einer Änderung der IRE1 α -Expression in den

durchgeführten Western Blots könnte entweder den Untersuchungszeitpunkten geschuldet sein, da IRE α zu Beginn der ER-Stress-Kaskade eine Rolle spielt und es sich bei JNK um ein nachgeschaltetes Protein handelt oder es gibt noch einen weiteren Signalweg über den es letztlich zur JNK-Aktivierung kommt. In diesem Fall würde die Aktivierung des ER-Stress' nicht über den IRE1 α -Pathway ablaufen. Alternativ ist es auch denkbar, dass der genutzte Antikörper nicht ausreichend sensitiv und somit für den Nachweis des IRE1 α -Proteins in den untersuchten Zellen nicht geeignet ist.

Anhand der durchgeführten Experimente lässt sich ebenfalls ableiten, dass Mitotane zusätzlich die ER-Stress-Kaskade über PERK und eIF2 α auslöst. Durch die Behandlung der NCI-H295R-Zellen mit Mitotane kam es zu einer signifikanten Abnahme der PERK-Expression im zeitlichen Verlauf. Da sich durch die Anhäufung ungefalteter Proteine GRP 78 von PERK löst, kann dieses Oligomere bilden [110, 111, 113]. Dadurch wird PERK zu p-PERK phosphoryliert [109]. Leider ist es mir in meinen Experimenten nicht gelungen, phosphorylierungsspezifische Antikörper für PERK zu etablieren. Ich habe verschiedene Strategien verfolgt und insbesondere Phosphataseinhibitoren zur Herstellung des Ganzzellextrakts eingesetzt. Zudem habe ich versucht, durch Wechsel des Antikörpers und Umstieg vom Wet auf den Semi-Dry-Blot mögliche Einflussfaktoren zu eliminieren, was jedoch in dieser Hinsicht ebenfalls erfolglos blieb.

Die Konzentration des in der Signalkaskade nachgeschalteten eIF2 α , welches durch Phosphorylierung (p-eIF2 α) aktiviert wird [109], nahm ebenfalls ab. Die Expression von eIF2 α zeigte sich in den Western Blots im zeitlichen Verlauf entsprechend rückläufig, während sich die Menge an p-eIF2 α zu erhöhen scheint. Auf Basis dieser Ergebnisse kann auf eine Aktivierung dieses Pathways geschlossen werden.

Die Untersuchung des CHOP-Proteins hat in dieser Arbeit eine zentrale Stellung eingenommen, da es sich zum einen zuverlässig mittels Western Blot nachweisen ließ und zum anderen gleichzeitig als guter Marker für die Apoptoseinduktion durch ER-Stress gilt.

Das CHOP-Protein gehört zur Familie der CCAAT / ,enhancer binding'-Proteine (C/EBP). Es besteht aus zwei funktionellen Domänen, der N-terminalen ,transcription activation'-

Domäne und der C-terminalen ‚basic leucine zipper‘-Domäne [148]. Unter normalen Bedingungen wird CHOP in den Zellen lediglich in geringen Konzentrationen gebildet [149]. Dies zeigte sich auch in den durchgeführten Western Blots. Nach Inkubation mit Ethanol als Negativkontrolle lassen sich entweder gar keine Banden oder lediglich sehr schmale Banden darstellen. Erst durch die Auslösung von ER-Stress kommt es zu einer vermehrten Synthese des CHOP-Proteins [148]. So führte die Inkubation mit dem ER-Stressor Thapsigargin in den durchgeführten Experimenten zu einem Anstieg der CHOP-Expression. Analog dazu verhielten sich die Zellen nach Behandlung mit Mitotane, sodass von einem vergleichbaren Wirkmechanismus ausgegangen werden kann. Der zögerliche Expressionsanstieg mit sehr schwachen Banden nach einer Stunde (Abbildung 10) lässt sich anhand der Signalkaskade des ER-Stress‘ erklären. Das CHOP-Protein steht nicht zu Beginn dieser Kaskade, sondern ist Teil der Endstrecke auf dem Weg zum programmierten Zelltod. Somit ist eine erhöhte Expression dieses Proteins erst im Verlauf zu erwarten.

CHOP bildet Heterodimere mit anderen C/EBP-Proteinen wie C/EBP α und C/EBP β [148]. Diese Komplexe fungieren im Verlauf als Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression vieler anti- und proapoptotischer Gene regulieren [150, 151]. So führt CHOP über die Inhibierung antiapoptotischer Gene wie BCL-2 (B-cell lymphoma 2), BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) und MCL-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1) bei gleichzeitig steigender Wirkung auf die Expression des proapoptotischen BIM-Gens (BCL-2-like protein 11) zum programmierten Zelltod [152, 153].

Vorangegangene Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Mitotane haben gezeigt, dass es unter dem Einfluss dieser Substanz zu einer Hemmung der Steroidhormonbiosynthese kommt [99-102]. In der Arbeitsgruppe wurde im Vorfeld auf mRNA-Ebene nachgewiesen, dass dies indirekt durch Herabregulation von Genen erfolgen könnte, die die Steroidbiosynthese regulieren [146]. In dieser Arbeit habe ich die Wirkung von Mitotane auf die SREBP-1 Proteinexpression untersucht.

Vor allem die Expression der Vorläuferform hat unter dem Einfluss von Mitotane zeitabhängig abgenommen. Im Vergleich dazu waren die Expressionsänderungen durch

die Inkubation mit Thapsigargin weniger stark ausgeprägt und zeigten sich zu einem späteren Zeitpunkt. Da SREBP-1 als Transkriptionsfaktor für die an der Lipid- und damit indirekt Steroidhormonsynthese beteiligten Enzyme fungiert, kann anhand der Ergebnisse darauf geschlossen werden, dass es durch Mitotane zu einer Inhibierung des Lipidstoffwechsels kommt. Untermauern lässt sich diese Schlussfolgerung durch die Untersuchungsergebnisse von Sbiera et al. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Mitotane zu einem Anstieg der Konzentrationen an freiem Cholesterin und gesättigten sowie ungesättigten Fettsäuren in NCI-H295R-Zellen führt [146]. Vermutlich verhindern diese erhöhten Konzentrationen an Sterolen die Spaltung und somit Aktivierung von SREBP-1. Es bleibt als Vorstufe (125 kDa) membrangebunden und kann nicht als Transkriptionsfaktor dienen [139]. Die im Western Blot nachweisbare Expression der aktiven Form (68 kDa) nahm entsprechend in meinen Experimenten ab, während sich die Expression der Vorläuferform nicht signifikant änderte. Auf Grund dieses negativen Feedbackmechanismus könnte es zu einem weiteren Anstieg des toxisch wirkenden freien Cholesterins kommen, was im Verlauf zur Apoptose führen könnte.

Je zellspezifischer ein Chemotherapeutikum wirkt, desto weniger Nebenwirkungen sind zu erwarten. Um herauszufinden, ob Mitotane in weiteren Zelltypen ebenfalls zu Apoptoseinduktion über ER-Stress und eine Herunterregulation des Lipidstoffwechsels führt oder es sich um NCI-zelltypspezifische Effekte handelt, wurden zusätzlich HepG2-, IMR32-, HEK293T- und HeLaz91wt Zellen in die Experimente mit einbezogen.

In allen vier Zelllinien ließ sich eine CHOP-Induktion durch Mitotane nachweisen. Diese fiel allerdings geringer aus im Vergleich zu den NCI-H295R. Vor allem die HepG2-Zellen zeigten lediglich eine geringe Veränderung der CHOP-Expression. Ein signifikanter Anstieg ließ sich hier erst nach 24 Stunden Inkubationszeit nachweisen. Ob eine längere Inkubationszeit zu einer weiteren Expressionssteigerung geführt hätte, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente nicht ableiten. Hierzu wären Versuche mit späteren Untersuchungszeitpunkten notwendig gewesen. Die CHOP-Induktion durch Mitotane in den IMR32-Zellen im Vergleich zu den NCI-H295R-Zellen war hingegen nur dezent geringer. Obwohl es auch hier zu einem leicht verzögertem Expressionsanstieg zu kommen scheint. Die HEK293T-Zellen und HeLaz91wt-Zellen zeigten ebenfalls eine

Zunahme der CHOP-Expression, die im Vergleich zu NCI-H295R und IMR32 allerdings signifikant schwächer ausfiel. Die Frage, ob die Messungen der Expression zu anderen Untersuchungszeitpunkten gleichwertige Ergebnisse zu Mitotane gezeigt hätten, bleibt ebenfalls offen. Gegebenenfalls liegt das Expressionsmaximum bei diesen Zelllinien auch zwischen den gewählten Zeitpunkten.

Demnach handelt es sich bei der klinisch beobachteten Wirkung auf die Nebennierenrinde lediglich um einen relativ gewebsspezifischen Effekt, so dass sich daraus auch Nebenwirkungen erklären könnten. Die Ursache dieser unterschiedlichen Wirksamkeit ist in den aktuellen Experimenten nicht zu klären, könnte aber mit der spezifischen Ausstattung von Nebennierenzellen mit der für den Sterolstoffwechsel erforderlichen Maschinerie, insbesondere hoher Expression von SOAT1, zusammenhängen. Diese Frage ist Gegenstand weiterer Untersuchungen im Labor.

Eine genauere Kenntnis der zu Grunde liegenden Mechanismen könnte auch eine Möglichkeit zum Einsatz des Medikaments bei anderen Tumorentitäten schaffen.

Im Gegensatz zu CHOP hat Mitotane auf die Expression von SREBP-1, das eine Rolle als genereller Regulator des Lipidstoffwechsels spielt, in anderen Zelllinien einen teilweise zu den Auswirkungen in NCI-H295R-Zellen konträren Effekt. Sowohl in den HepG2-Zellen, den IMR32-Zellen und den HEK293T-Zellen kommt es eher zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors SREBP-1, auch wenn dieser verhältnismäßig gering ausfällt. Lediglich in den HeLaz91wt zeigt sich analog zu den Nebennierenrindenzellen ein Abfall der SREBP-1-Expression. Unterschiede im Lipidstoffwechsel zwischen Zelltypen sind plausibel, so dass die Induktion von CHOP, die letztlich in allen Zelllinien gefunden wurde, eventuell nicht auf eine gleichsinnige Änderung im Lipidstoffwechsel zurückzuführen ist.

Wie anhand der Datenlage zu Mitotane erkennbar und durch die durchgeführten Experimente unterstrichen, ist dieses Medikament nebenwirkungsreich mit einer geringen therapeutischen Breite.

Zudem beträgt die Rate des objektiven Therapieansprechens auf Mitotane beim fortgeschrittenen Nebennierenrindenzellenkarzinom nur etwa 20% [154]. Es stellt sich also

die Frage, ob es Substanzen gibt, die zwar ähnlich wie Mitotane über ER-Stress den programmierten Zelltod auslösen können, dabei aber ggf. selektiver oder potenter sind und somit eine niedrigere Dosis („Pillenlast“) erfordern oder geringere Nebenwirkungen bergen.

Während Experimenten zur Erforschung von Medikamenten zur Therapie der Hypercholesterinämie und Atherosklerose entdeckte man den zytotoxischen Effekt von ATR 101 auf Zellen der Nebennierenrinde [155-157]. ATR 101 oder auch PD132301-2 genannt, ist ein Inhibitor der Sterol-O-Acyl-Transferase 1 (SOAT1), das auch als Acyl-CoenzymA:Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT) bezeichnet wird [158].

Sowohl in den NCI-H295R-, als auch in den HepG2-, IMR32- und HeLaz91wt-Zellen fand sich eine CHOP-Induktion durch ATR 101. Auffällig ist hierbei der deutlich frühere und teilweise auch stärker ausgeprägte Expressionsanstieg. Lediglich in den HEK293T-Zellen zeigte sich kein signifikanter Anstieg der CHOP-Expression. Somit bewirkt der Einsatz von ATR 101 nicht nur in den adrenokortikalen Karzinomzellen eine CHOP- und damit wahrscheinlich Apoptoseinduktion, sondern auch in allen anderen getesteten Zelllinien. Diese Erkenntnisse passen nicht zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen, in denen ATR 101 als speziell auf adrenokortikale Zellen zytotoxisch wirkende Substanz beschrieben wird [155-157]. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe um LaPensee, dass für die Auslösung der Apoptose durch ATR 101 ausreichende Mengen an Cholesterin in den Zellen vorhanden sein müssen. Allerdings wurden Konzentrationen von ATR 101 zwischen 3 nM und 3 µM genutzt [158]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war die Konzentration mit 50 µM deutlich höher. Cheng et al. beschrieben 2016, dass hohe Konzentrationen ATR 101 den Zelltod unabhängig vom ACAT-Enzym und der Zugabe von Cholesterin auslösen können. Über die Blockierung der ATPase-Aktivität und einen Anstieg des mitochondrialen Membranpotenzials kommt es durch nachgeschaltete – nicht genauer aufgeklärte – Mechanismen zur mitochondrialen Fragmentierung und im Verlauf zur Apoptose [159]. Dieser Effekt könnte in den gezeigten Western Blots zum Tragen gekommen sein.

Anhand der Western Blots der mit ATR 101 inkubierten Zellen unter Verwendung des SREBP-1-Antikörpers ließ sich in den meisten Zelllinien insgesamt eine Abnahme vor

allem der Vorläuferform erkennen. Besonders in den Helaz91wt-, IMR32- und HEK293T-Zellen zeigte sich allerdings zudem eine abnehmende Expression der reifen Form. Die Anhäufung von freiem Cholesterin in den Zellen durch die Blockade des ACAT-Enzyms könnte dementsprechend zu einer Hemmung der SREBP-1-Synthese sowie einer verminderten Umwandlung in die aktive Form führen. Eine Hypothese wäre, dass die Zellen eine weitere Überladung mit freiem Cholesterin zu verhindern suchen, um die Funktionalität aufrecht zu erhalten. Geng et al. konnten 2016 zeigen, dass die Inhibierung des SOAT1-Enzyms durch Avasimibe – ein bekannter SOAT1 Inhibitor – zu einer Herunterregulation von SREBP-1 und den nachgeschalteten Enzymen des Lipidstoffwechsels in Glioblastomzellen führt. Avasimibe bewirkte *in vitro* ein verringertes Wachstum der Glioblastomzellen [160].

Ähnlich wie ATR 101 wurde auch AZD 3988 zunächst bei der Erforschung von neuen Behandlungsmethoden anderer Erkrankungen, zum Beispiel Diabetes und Übergewicht, eingesetzt. AZD 3988 fungiert als ein Inhibitor der Acyl-CoenzymA:Diacylglycerol-O-Acyl-Transferase 1 (DGAT1). Dieses Enzym katalysiert die Triglyzeridsynthese aus Diacylglycerol und Acyl-CoenzymA [161], welche vor allem im Fettgewebe, in der Leber und im Darm abläuft [162]. Das hydrophobe Protein mit mehreren membrandurchspannenden Domänen [163] gehört zur gleichen Enzymfamilie wie SOAT1 und SOAT2 [164] und sorgt ebenfalls für den Umbau von freiem, für die Zellen toxischem, Cholesterin in die Speicherform. Untersuchungen konnten zeigen, dass der DGAT1-Inhibitor AZD 3988 ebenfalls hemmende Effekte auf die SOAT-Enzyme hat [161].

Analog zu den SOAT-Inhibitoren Mitotane und ATR 101 zeigte sich bei AZD 3988 eine adrenale Toxizität bei Hunden, sodass es sich um einen potenziellen Kandidaten für die Behandlung des Nebennierenrindenzinoms handeln könnte. Anhand der durchgeführten Experimente konnte ich zeigen, dass AZD 3988 in allen getesteten Zelllinien zu einem Anstieg der CHOP-Expression führt. Allerdings sind die Effekte im Vergleich zu Mitotane und ATR 101 weniger ausgeprägt. Eine Ausnahme bilden die IMR32-Zellen. Am ehesten lässt sich dieser Effekt durch die Anhäufung von freiem Cholesterin durch die Inhibierung des SOAT-Enzyms bzw. anderer Enzyme dieser Familie

wie DGAT durch AZD 3988 erklären. Analog zu ATR 101 konnte gezeigt werden, dass letztlich auch AZD 3988 zu einer Störung der SERCA-Pumpe in der ER-Membran führt [144]. Auf Grund dessen wird die Funktion kalziumabhängiger Proteine zu denen beispielsweise Chaperone wie GRP 78 gehören [144] eingeschränkt und es kommt zur Anhäufung von ungefalteten Proteinen, die über die bekannten Wege der ‚unfolded proteine response‘ mittels ER-Stress in Apoptose enden können.

Die Auswirkungen von AZD 3988 auf den Lipidstoffwechsel scheinen demgegenüber in den einzelnen Zelllinien unterschiedlich zu sein. Während in den NCI-H295R- und IMR32-Zellen eine Abnahme der Expression der Vorläuferform von SREBP-1 zu beobachten war, nahm diese in den HepG2- und HeLaz91wt-Zellen zu. Allerdings bleibt auffällig, dass sich ein Anstieg der aktiven Form in keinem der Experimente nachweisen ließ. Der unspezifische Lipidstoffwechsel der HEK293T-Zellen blieb – wenn man dies auf die SREBP-1-Expression bzw. -aktivierung bezieht – durch AZD 3988 unbeeinflusst, was auf zelltypspezifische Unterschiede im Lipidstoffwechsel hinweist, wie bereits oben für Mitotane diskutiert. Bereits 2001 konnten Cheng et al. zeigen, dass HEK293E-Zellen (modifizierte HEK293-Zelllinie, die das EBNA-1-Protein (Epstein Barr nuclear antigen 1) zusätzlich exprimieren kann) lediglich eine geringe DGAT-Aktivität aufweisen [165], sodass es plausibel erscheint, dass der DGAT-Inhibitor allenfalls einen geringen Effekt auf diese Zellen haben kann. Des Weiteren konnten Sbiera et al. zeigen, dass SOAT1 vor allem in Zellen der Nebennierenrinde (gesunde Zellen, Adenomzellen und circa die Hälfte der Karzinomzellen) und in Prostata-Karzinomzellen stark exprimiert wird. In weiteren untersuchten Zelllinien fand sich allenfalls eine geringe SOAT1-Expression (HEK293T-, IMR32-, HeLa-Zellen) [146]. Somit ist ein vermindertes Ansprechen dieser Zelllinien auf AZD 3988 als kombinierter DGAT- und SOAT-Inhibitor zu erklären.

Sandoz 58-035 als dritte und letzte Substanz in den Untersuchungen gehört wiederum zur Gruppe der SOAT-Inhibitoren [166]. Analog zu ATR 101 wird die Bildung von Cholesterinestern verhindert. Allerdings konnten vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass es anders als durch ATR 101 lediglich zu einem geringen Anstieg des freien Cholesterins in den Zellen kommt. Auffällig ist, dass die Gesamtcholesterinmenge in den Zellen bestehend aus der Summe aus freiem und verestertem Cholesterin durch

Inkubation mit Sandoz 58-035 abfällt [166]. Über andere Mechanismen, zum Beispiel Abbau und Abtransport oder geringere Syntheseleistung wird die Menge an freiem Cholesterin weitestgehend konstant gehalten [166, 167]. So konnte gezeigt werden, dass Sandoz 58-035 die Acyl-CoenzymA:Cholesterin-Acyl-Transferase Aktivität inhibiert, andere Acyltransferasen werden hiervon nicht beeinflusst [166]. Sandoz 58-035 führt allerdings darüber hinaus zu einer verminderten Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und einer Herunterregulation des LDL-Rezeptors, sodass es zu einer verminderten Synthese und Aufnahme von Cholesterin kommt [167].

Somit verwundert es nicht, dass es weder in den NCI-H295R-Zellen noch in den anderen untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Hochregulation des CHOP-Proteins – als Indikator für ER-Stress-induzierte Apoptose – durch Sandoz 58-035 kam. Die Zellen schützen sich durch die beschriebenen Mechanismen vor einer Anhäufung an freiem Cholesterin und letztlich vor der Apoptose.

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich ableiten, dass der SOAT-Inhibitor ATR 101 von den untersuchten Substanzen das größte Potenzial als neue Therapieoption des Nebennierenrindenzarzinoms hat. Bereits 2013 wurde eine klinische Studie der Phase I mit ATR 101 in den USA begonnen. Die Universitätsklinik in Würzburg als Zentrum für adrenokortikale Karzinome in Deutschland nahm ebenfalls teil. Insgesamt konnten 63 Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium bis Ende 2016 eingeschlossen werden. Ziel war es, die Verträglichkeit von ATR 101 sowie die Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel und die Tumorprogression zu untersuchen [168]. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit des SOAT1-Inhibitors Nevanimibe. Allerdings konnten die Wirkspiegel, die für eine apoptotische Wirkung erforderlich gewesen wären, nicht erreicht werden. Insgesamt fand sich lediglich eine geringe Wirksamkeit von Nevanimibe bei den Patienten mit fortgeschrittenem ACC, sodass die Weiterentwicklung dieses Medikaments zur Behandlung des Nebennierenrindenzarzinoms zunächst nicht weiterverfolgt wird [169].

Da sich in den hier gezeigten Experimenten die zuvor beschriebene zellspezifische Wirkung von ATR 101 auf adrenokortikale Zellen nicht bestätigen ließ, ist ein durchaus

breites Nebenwirkungsspektrum der Substanz möglich. Dies könnte wie bei vielen Medikamenten, Mitotane eingeschlossen, allerdings konzentrationsabhängig sein. Ob ATR 101 oder AZD 3988 zukünftig eine Rolle in der Therapie des Nebennierenrindenzellkarzinoms spielen, muss sich in weiteren vor allem klinischen Untersuchungen zeigen. Meine Daten zeigen jedenfalls klar, dass durch alle drei Substanzen *in vitro* eine ER-Stress-induzierte Apoptose mittels CHOP und eine Herunterregulation des Lipidstoffwechsels erreicht werden kann.

5 Zusammenfassung

Die für diese Arbeit durchgeführten Experimenten konnten einen kleinen Beitrag zur Klärung des Wirkmechanismus von Mitotane leisten. Es zeigte sich, dass diese Substanz zur Induktion des CHOP-Proteins führt. Da es ebenfalls gelang weitere Expressionsveränderungen von am ER-Stress-beteiligten Proteinen nachzuweisen, kann von einer ER-Stress-Induktion durch Mitotane ausgegangen werden. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass die gesteigerte CHOP-Expression nicht zelltypspezifisch ist, da sie sich ebenfalls in weiteren Zelllinien nachweisen ließ. Hierzu gehörten IMR32-, HeLaz91wt-, HepG2- und HEK293T-Zellen. Zudem kam es durch die Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Mitotane zu einer Abnahme der Expression von SREBP-1 sowohl der Vorläuferstufe als auch der aktiven Form. Dies weist auf eine Herunterregulation des Lipidstoffwechsels durch Mitotane hin.

Neben Mitotane gab es mit ATR 101 und AZD 3988 weitere Substanzen, die zu einer Zunahme der CHOP-Expression geführt haben. Die Stärke der CHOP-Expressionsänderung hing hierbei von den Zelltypen ab. Insgesamt war der Effekt von ATR 101 in den durchgeführten Experimenten am stärksten. Die Auswirkungen der verschiedenen Substanzen auf die SREBP-1-Expression in den einzelnen Zelllinien zeigte sich insgesamt inkonsistent.

Ob sich durch die dargestellten Ergebnisse neue Therapiemöglichkeiten des Nebennierenrindenzarzinoms oder gar weiterer Tumorentitäten ableiten lassen, bleibt abzuwarten und ist Gegenstand aktueller Forschungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G., *Anatomie*. 3., aktualisierte Aufl. ed. 2014, Stuttgart: Thieme. 1332 S.
2. Ronchi, C.L., et al., *EJE prize 2014: current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go?* Eur J Endocrinol, 2014. **171**(1): p. R1-R11.
3. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. Ann Intern Med, 2003. **138**(5): p. 424-9.
4. National Cancer, I., et al., *Third national cancer survey: incidence data*. National Cancer Institute monograph ;41. 1975, Bethesda, Md. : Washington: U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute ; for sale by the Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off. x, 454 p.
5. Kebebew, E., et al., *Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress?* World J Surg, 2006. **30**(5): p. 872-8.
6. Kerkhofs, T.M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993*. Eur J Cancer, 2013. **49**(11): p. 2579-86.
7. Fassnacht, M. and B. Allolio, *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(2): p. 273-89.
8. Herrmann, L.J., et al., *TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(3): p. E476-85.
9. Fassnacht, M., M. Kroiss, and B. Allolio, *Update in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(12): p. 4551-64.
10. Hsing, A.W., et al., *Risk factors for adrenal cancer: an exploratory study*. Int J Cancer, 1996. **65**(4): p. 432-6.
11. Else, T., et al., *Adrenocortical carcinoma*. Endocr Rev, 2014. **35**(2): p. 282-326.
12. Wagner, J., et al., *High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(22): p. 1707-10.
13. Varley, J.M., et al., *Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(4): p. 995-1006.
14. Custodio, G., et al., *Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **351**(1): p. 44-51.
15. Raymond, V.M., et al., *Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(1): p. E119-25.
16. Rodriguez-Galindo, C., et al., *Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children*. Pediatr Blood Cancer, 2005. **45**(3): p. 265-73.

17. Skogseid, B., et al., *Adrenal lesion in multiple endocrine neoplasia type 1*. Surgery, 1995. **118**(6): p. 1077-82.
18. Waldmann, J., et al., *Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening*. Langenbecks Arch Surg, 2007. **392**(4): p. 437-43.
19. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
20. Luton, J.P., et al., *Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(17): p. 1195-201.
21. Fassnacht, M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a clinician's update*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(6): p. 323-35.
22. Galdiero, M., et al., *Cushing, acromegaly, GH deficiency and tendons*. Muscles Ligaments Tendons J, 2014. **4**(3): p. 329-32.
23. Stewart, P.M., et al., *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(12): p. 3617-20.
24. Seccia, T.M., et al., *Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 149-59.
25. Fassnacht, M., et al., *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, 2018. **179**(4): p. G1-g46.
26. Bancos, I., et al., *DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: The diagnostic performance of adrenal biopsy: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Endocrinol, 2016. **175**(2): p. R65-80.
27. Delivanis, D.A., et al., *Procedural and clinical outcomes of percutaneous adrenal biopsy in a high-risk population for adrenal malignancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 2016. **85**(5): p. 710-716.
28. Weiss, L.M., *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. Am J Surg Pathol, 1984. **8**(3): p. 163-9.
29. Sasano, H., T. Suzuki, and T. Moriya, *Discerning malignancy in resected adrenocortical neoplasms*. Endocr Pathol, 2001. **12**(4): p. 397-406.
30. Arola, J., et al., *Expression of inhibin alpha in the human adrenal gland and adrenocortical tumors*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 865-7.
31. Jorda, M., M.B. De, and M. Nadji, *Calretinin and inhibin are useful in separating adrenocortical neoplasms from pheochromocytomas*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002. **10**(1): p. 67-70.

32. Ghorab, Z., et al., *Melan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003. **11**(4): p. 330-3.
33. Sbiera, S., et al., *High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(10): p. E161-71.
34. Decmann, A., et al., *Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy*. *J Biotechnol*, 2019. **297**: p. 49-53.
35. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *Int J Cancer*, 1983. **31**(1): p. 13-20.
36. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. *J Immunol*, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
37. Wachenfeld, C., et al., *Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful?* *Eur J Endocrinol*, 2001. **145**(3): p. 335-41.
38. Morimoto, R., et al., *Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas*. *Endocr J*, 2008. **55**(1): p. 49-55.
39. Beuschlein, F., et al., *Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(3): p. 841-9.
40. Schmitt, A., et al., *IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours*. *Histopathology*, 2006. **49**(3): p. 298-307.
41. Sidhu, S., et al., *Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(7): p. 3467-74.
42. Kjellman, M., et al., *Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(2): p. 730-5.
43. Gicquel, C., et al., *Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6762-7.
44. DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. *Cell*, 1991. **64**(4): p. 849-59.
45. Gicquel, C., et al., *Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(8): p. 2559-65.
46. Boulle, N., et al., *Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(5): p. 1713-20.

47. de Fraipont, F., et al., *Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1819-29.
48. Logie, A., et al., *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line*. J Mol Endocrinol, 1999. **23**(1): p. 23-32.
49. Tissier, F., et al., *Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7622-7.
50. Tadjine, M., et al., *Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(2): p. 264-70.
51. Berthon, A., et al., *Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(8): p. 1561-76.
52. Giordano, T.J., et al., *Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis*. Am J Pathol, 2003. **162**(2): p. 521-31.
53. Reincke, M., et al., *p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(3): p. 790-4.
54. Libe, R., et al., *Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 844-50.
55. Ohgaki, H., P. Kleihues, and P.U. Heitz, *p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors*. Int J Cancer, 1993. **54**(3): p. 408-10.
56. Assie, G., et al., *Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma*. Nat Genet, 2014.
57. Zheng, S., et al., *Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma*. Cancer Cell, 2016. **29**(5): p. 723-736.
58. Bernini, G.P., et al., *Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 4961-5.
59. Kolomecki, K., et al., *Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours*. Endocr Regul, 2001. **35**(1): p. 9-16.
60. Fassnacht, M., et al., *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification*. Cancer, 2009. **115**(2): p. 243-50.
61. Vassilopoulou-Sellin, R. and P.N. Schultz, *Adrenocortical carcinoma. Clinical outcome at the end of the 20th century*. Cancer, 2001. **92**(5): p. 1113-21.
62. Assie, G., et al., *Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 148-54.

63. de Reynies, A., et al., *Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival.* J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1108-15.
64. Giordano, T.J., et al., *Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 668-76.
65. Brix, D., et al., *Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients.* Eur Urol, 2010. **58**(4): p. 609-15.
66. Porpiglia, F., et al., *Retrospective evaluation of the outcome of open versus laparoscopic adrenalectomy for stage I and II adrenocortical cancer.* Eur Urol, 2010. **57**(5): p. 873-8.
67. Reibetanz, J., et al., *Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma.* Ann Surg, 2012. **255**(2): p. 363-9.
68. Fassnacht, M., et al., *Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively by specialized centers.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 4925-32.
69. Terzolo, M., et al., *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma.* N Engl J Med, 2007. **356**(23): p. 2372-80.
70. Fassnacht, M., et al., *Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4501-4.
71. Polat, B., et al., *Radiotherapy in adrenocortical carcinoma.* Cancer, 2009. **115**(13): p. 2816-23.
72. Sabolch, A., et al., *Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. **80**(5): p. 1477-84.
73. Erdogan, I., *Impact of surgery on clinical outcome in patients with recurrence of adrenocortical carcinoma, in 10th European Congress of Endocrinology.* 2009.
74. Berruti, A., et al., *Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial.* Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(3): p. 657-66.
75. Khan, T.S., et al., *Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use.* Ann Oncol, 2000. **11**(10): p. 1281-7.
76. Fassnacht, M., et al., *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma.* N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2189-97.
77. Sperone, P., et al., *Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study.* Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(2): p. 445-53.

78. Henning, J.E.K., et al., *Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(11): p. 4323-4332.
79. Chacon, R., et al., *CASE 2. Response in a patient with metastatic adrenal cortical carcinoma with thalidomide*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1579-80.
80. Kroiss, M., et al., *Treatment of Refractory Adrenocortical Carcinoma with Thalidomide: Analysis of 27 Patients from the European Network for the Study of Adrenal Tumours Registry*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. **127**(9): p. 578-584.
81. Miller, J.W. and L. Crapo, *The medical treatment of Cushing's syndrome*. Endocr Rev, 1993. **14**(4): p. 443-58.
82. Schulte, H.M., et al., *Infusion of low dose etomidate: correction of hypercortisolemia in patients with Cushing's syndrome and dose-response relationship in normal subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **70**(5): p. 1426-30.
83. Fassnacht, M., et al., *New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line*. Eur J Clin Invest, 2000. **30 Suppl 3**: p. 76-82.
84. Johanssen, S. and B. Allolio, *Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome*. Eur J Endocrinol, 2007. **157**(5): p. 561-9.
85. Castinetti, F., et al., *Merits and pitfalls of mifepristone in Cushing's syndrome*. Eur J Endocrinol, 2009. **160**(6): p. 1003-10.
86. Kurzrock, R. and M. Markman, *Targeted Cancer Therapy*. 2008, Totowa, NJ: Humana Press, Totowa, NJ.
87. Fassnacht, M., et al., *Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 426-35.
88. Kroiss, M., et al., *Sunitinib Inhibits Cell Proliferation and Alters Steroidogenesis by Down-Regulation of HSD3B2 in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 27.
89. Berruti, A., et al., *Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(3): p. 451-8.
90. Hermsen, I.G., et al., *Response to radiation therapy in adrenocortical carcinoma*. J Endocrinol Invest, 2010. **33**(10): p. 712-4.
91. Schteingart, D.E., et al., *Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(3): p. 667-80.
92. Bergenstal, D., *Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in man by o,p'-DDD*. Trans AM Physicians, 1959. **72**: p. 341-350.
93. Southren, A.L., et al., *Remission in Cushing's syndrome with o,p'-DDD*. J Clin Endocrinol Metab, 1966. **26**(3): p. 268-78.

94. Temple, T.E., Jr., et al., *Treatment of Cushing's disease. Correction of hypercortisolism by o,p'DDD without induction of aldosterone deficiency*. N Engl J Med, 1969. **281**(15): p. 801-5.
95. Luton, J.P., et al., *Treatment of Cushing's disease by O,p'DDD. Survey of 62 cases*. N Engl J Med, 1979. **300**(9): p. 459-64.
96. Donadille, B., et al., *Management of Cushing's syndrome due to ectopic adrenocorticotropin secretion with 1,ortho-1, para'-dichloro-diphenyl-dichloro-ethane: findings in 23 patients from a single center*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 537-44.
97. Nader, N., et al., *Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2165-70.
98. Daffara, F., et al., *Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(4): p. 1043-53.
99. Chortis, V., et al., *Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5alpha-reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(1): p. 161-71.
100. Waxman, D.J., et al., *Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme*. Arch Biochem Biophys, 1988. **263**(2): p. 424-36.
101. Ged, C., et al., *The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III A induction*. Br J Clin Pharmacol, 1989. **28**(4): p. 373-87.
102. Wrighton, S.A., et al., *Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLP3)*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(2): p. 207-13.
103. Kroiss, M., et al., *Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2011. **75**(5): p. 585-91.
104. Germano, A., et al., *Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 1-7.
105. Hogan, T.F., et al., *o,p'-DDD (mitotane) therapy of adrenal cortical carcinoma: observations on drug dosage, toxicity, and steroid replacement*. Cancer, 1978. **42**(5): p. 2177-81.
106. Todd, D.J., A.H. Lee, and L.H. Glimcher, *The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 663-74.
107. Brostrom, C.O. and M.A. Brostrom, *Regulation of translational initiation during cellular responses to stress*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **58**: p. 79-125.
108. Lee, A.S., *Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family*. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**(2): p. 267-73.

109. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. *Nature*, 1999. **397**(6716): p. 271-4.
110. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(6): p. 326-32.
111. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 99-111.
112. Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius, *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*. *Science*, 1999. **286**(5446): p. 1882-8.
113. Shamu, C.E. and P. Walter, *Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. *Embo j*, 1996. **15**(12): p. 3028-39.
114. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. *Cell*, 2001. **107**(7): p. 881-91.
115. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
116. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. *Science*, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
117. Yoneda, T., et al., *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(17): p. 13935-40.
118. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(24): p. 9220-31.
119. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(9): p. 741-52.
120. Novoa, I., et al., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
121. Fawcett, T.W., et al., *Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response*. *Biochem J*, 1999. **339 (Pt 1)**(Pt 1): p. 135-41.
122. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. *Mol Cell*, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
123. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3787-99.

124. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
125. Wang, Y., et al., *Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27013-20.
126. Yoshida, H., et al., *Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33741-9.
127. Barone, M.V., et al., *CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest*. Genes Dev, 1994. **8**(4): p. 453-64.
128. Matsumoto, M., et al., *Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells*. FEBS Lett, 1996. **395**(2-3): p. 143-7.
129. Rasmussen, U., S. Brøgger Christensen, and F. Sandberg, *Thapsigargin and thapsigargin, two new histamine liberators from Thapsia garganica L*. Acta Pharm Suec, 1978. **15**(2): p. 133-40.
130. Thastrup, O., et al., *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2466-70.
131. Jakobsen, C.M., et al., *Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells*. J Med Chem, 2001. **44**(26): p. 4696-703.
132. Furuya, Y., et al., *The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin*. Cancer Res, 1994. **54**(23): p. 6167-75.
133. Lin, X.S., et al., *Mechanism and role of growth arrest in programmed (apoptotic) death of prostatic cancer cells induced by thapsigargin*. Prostate, 1997. **33**(3): p. 201-7.
134. Baenkler, H.-W., *Innere Medizin*
1010 Abbildungen, 643 Tabellen. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. ed. 2009,
 Stuttgart: Thieme.
135. Small, D.M. and G.G. Shipley, *Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis*. Science, 1974. **185**(4147): p. 222-9.
136. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
137. Brown, M.S., S.E. Dana, and J.L. Goldstein, *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(7): p. 2162-6.

138. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol*. J Lipid Res, 1984. **25**(13): p. 1450-61.
139. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. Cell, 1997. **89**(3): p. 331-40.
140. Sakai, J., et al., *Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1037-46.
141. Duncan, E.A., et al., *Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12778-85.
142. Müller-Esterl, W., *Biosynthese von Cholesterin, Steroiden und Membranlipiden, in Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 671-690.
143. Kraemer, F.B., et al., *Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(3): p. 549-57.
144. Li, Y., et al., *Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 37030-9.
145. Kellner-Weibel, G., Y.J. Geng, and G.H. Rothblat, *Cytotoxic cholesterol is generated by the hydrolysis of cytoplasmic cholesteryl ester and transported to the plasma membrane*. Atherosclerosis, 1999. **146**(2): p. 309-19.
146. Sbiera, S., et al., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3895-908.
147. Ferguson, R.E., et al., *Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies*. Proteomics, 2005. **5**(2): p. 566-71.
148. Ubeda, M., et al., *Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1479-89.
149. Ron, D. and J.F. Habener, *CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription*. Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 439-53.

150. Bromati, C.R., et al., *UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **300**(1): p. R92-100.
151. Campos, G., et al., *The transcription factor CHOP, a central component of the transcriptional regulatory network induced upon CCl4 intoxication in mouse liver, is not a critical mediator of hepatotoxicity*. *Arch Toxicol*, 2014. **88**(6): p. 1267-80.
152. Iurlaro, R. and C. Muñoz-Pinedo, *Cell death induced by endoplasmic reticulum stress*. *Febs j*, 2016. **283**(14): p. 2640-52.
153. Tsukano, H., et al., *The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(10): p. 1925-32.
154. Megerle, F., et al., *Mitotane Monotherapy in Patients With Advanced Adrenocortical Carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(4): p. 1686-1695.
155. Dominick, M.A., et al., *Subacute toxicity of a novel inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in beagle dogs*. *Fundam Appl Toxicol*, 1993. **20**(2): p. 217-24.
156. Dominick, M.A., et al., *Morphogenesis of a zone-specific adrenocortical cytotoxicity in guinea pigs administered PD 132301-2, an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*. *Toxicol Pathol*, 1993. **21**(1): p. 54-62.
157. Wolfgang, G.H., et al., *Biochemical alterations in guinea pig adrenal cortex following administration of PD 132301-2, an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*. *Life Sci*, 1995. **56**(13): p. 1089-93.
158. LaPensee, C.R., et al., *ATR-101, a Selective and Potent Inhibitor of Acyl-CoA Acyltransferase 1, Induces Apoptosis in H295R Adrenocortical Cells and in the Adrenal Cortex of Dogs*. *Endocrinology*, 2016. **157**(5): p. 1775-88.
159. Cheng, Y., R.E. Kerppola, and T.K. Kerppola, *ATR-101 disrupts mitochondrial functions in adrenocortical carcinoma cells and in vivo*. *Endocr Relat Cancer*, 2016. **23**(4): p. 1-19.
160. Geng, F., et al., *Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1-Mediated Lipogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(21): p. 5337-5348.
161. Floettmann, J.E., et al., *ACAT-selective and nonselective DGAT1 inhibition: adrenocortical effects--a cross-species comparison*. *Toxicol Pathol*, 2013. **41**(7): p. 941-50.
162. Yen, C.L., et al., *The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(7): p. 1502-11.
163. Cases, S., et al., *Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(22): p. 13018-23.

164. Farese, R.V., Jr., S. Cases, and S.J. Smith, *Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase*. *Curr Opin Lipidol*, 2000. **11**(3): p. 229-34.
165. Cheng, D., et al., *Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein*. *Biochem J*, 2001. **359**(Pt 3): p. 707-14.
166. Ross, A.C., et al., *Selective inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase by compound 58-035*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(2): p. 815-9.
167. Tabas, I., D.A. Weiland, and A.R. Tall, *Inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyl transferase in J774 macrophages enhances down-regulation of the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and prevents low density lipoprotein-induced cholesterol accumulation*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(7): p. 3147-55.
168. ClinicalTrials.gov. *Phase 1 Study of ATR-101 in Subjects With Advanced Adrenocortical Carcinoma*. [cited 2020 13.12.]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01898715?term=atr101>.
169. Smith, D.C., et al., *A phase 1 study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma*. *Invest New Drugs*, 2020. **38**(5): p. 1421-1429.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ACC	adrenokortikales Karzinom
ACA	adrenokortikales Adenom
ACAT	Acyl-CoenzymA:Cholesterin-Acyl-Transferase
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ATF4	Activating transcription factor 6
ATF6	Activating transcription factor 6
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIM	BCL-2-like protein 11
BiP	Binding immunoglobulin protein
CHOP	C/EBP-homologous protein
CRH	Kortikotropin-Releasinghormon
cs	Cell Signaling
DGAT1	Acyl-CoenzymA:Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
EBNA-1	Epstein Barr nuclear antigen 1
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2
ENSAT	European network for the study of adrenal tumors
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERSE	ER-Stress-Response-Element
FCS	Fetal calf serum
GADD 34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GADD 153	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 153
GCN2	General control non-derepressible 2
GRP 78	Glucose-regulated protein 78 kDa

HRI	Heme Regulated Inhibitor
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IRE1	Inositol requiring element 1
IRE1 α	Inositol requiring element 1 α
JNK	C-JUN NH ₂ -terminal kinase
LDL	Low-density Lipoprotein
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MC2R	Melanocortin 2-receptor
MEN1	Multiple endocrine Neoplasie Typ I
PERK	Protein kinase-like ER kinase
PKR	Proteinkinase R
sc	Santa Cruz
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SF1	Steroidogenic factor 1
SOAT	Sterol-O-Acyl-Transferase
SOAT1	Sterol-O-Acyl-Transferase 1
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
SREBP-2	Sterol regulatory element-binding protein 2
TP53	Tumorprotein p53
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor 2
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XBP1	X-box binding protein 1
ZNRF3	Zinc and ring finger 3

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapieempfehlung für komplett resezierbare adrenokortikale Karzinome	7
Abbildung 2: Therapieschema für fortgeschrittene adrenokortikale Karzinome	8
Abbildung 3: vereinfachter Überblick über die ER-Stress-Signalkaskade	12
Abbildung 4: Beispiel für die Färbung der Membranen mit Amidoschwarz	25
Abbildung 5: Beispiel für Ponceau-Färbung einer Membran	25
Abbildung 6: exemplarische Darstellung der durchgeführten Ladekontrollen	28
Abbildung 7: Anstieg der CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin	29
Abbildung 8: Zunahme der GRP78-Bande nach Inkubation von NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin im zeitlichen Verlauf	30
Abbildung 9: Auswirkungen der Expression von JNK in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin	30
Abbildung 10: Mitotane bewirkt in NCI-H295R-Zellen eine zeitabhängige Hochregulation von CHOP	31
Abbildung 11: Verhalten von JNK in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane	32
Abbildung 12: Abnahme der PERK-Expression in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane	33
Abbildung 13: Mitotane führt zur zeitabhängigen Expressionsabnahme von eIF2 α in NCI-H295R-Zellen	33
Abbildung 14: Mitotane induziert p-eIF2 α in NCI-H295R-Zellen	34
Abbildung 15: Mitotane hemmt die SREBP-1-Synthese in NCI-H295R-Zellen	35
Abbildung 16: Effekt Von Mitotane und ausgewählten SOAT-Inhibitoren auf die CHOP-Expression in NCI-H295R-Zellen	36
Abbildung 17: Verhalten von CHOP in NCI-H295R-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren	37
Abbildung 18: Auswirkungen von Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren auf SREBP-1 in NCI-H295R-Zellen	38

Abbildung 19: Übersicht über die Auswirkungen von Mitotane auf die Expression des CHOP-Proteins in verschiedenen Zelllinien	40
Abbildung 20: CHOP-Expression in IMR32-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und SOAT-Inhibitoren	41
Abbildung 21: Vergleich der Auswirkungen verschiedener SOAT-Inhibitoren und Mitotane auf die CHOP-Expression in HeLaz91wt-Zellen.....	41
Abbildung 22: Thapsigargin hat keinen signifikanten Effekt auf die Expression von eIF2 α	76
Abbildung 23: Thapsigargin führt zu einer leichten Abnahme der Expression von PERK	76
Abbildung 24: späte GRP 78-Induktion durch Mitotane in NCH-H295R-Zellen	76
Abbildung 25: Verhalten von CHOP in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren.....	76
Abbildung 26: Verhalten von CHOP in HEK293T-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren.....	77

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: empfohlene Diagnostik bei V.a. ACC	3
Tabelle 2: Weiss-System zur Beurteilung adrenokortikaler Neoplasien	4
Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien	19
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte	21
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Substanzen mit Konzentrationen, Inkubationszeiten und zugehörigen Negativkontrollen	23
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswirkungen auf das CHOP-Protein durch Mitotane, ATR 101, Sandoz 58-035 und AZD 3988 in verschiedenen Zelllinien	42
Tabelle 8: Zusammenfassung der Auswirkungen von Mitotane, ATR 101, AZD 3988 und Sandoz 58-035 auf SREBP-1 in verschiedenen Zelllinien	43

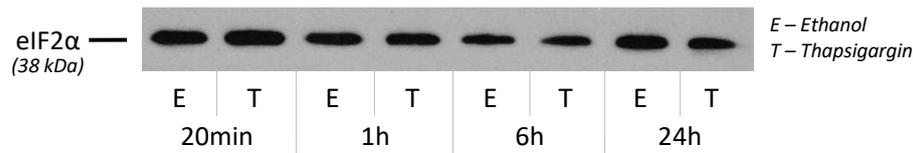


Abbildung 22: Thapsigargin hat keinen signifikanten Effekt auf die Expression von eIF2 α

Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten (20 Minuten, 1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden) mit Thapsigargin (T) und Ethanol (E).

Es zeigt sich zu allen untersuchten Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Bandenstärke nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol. Durch beide Substanzen scheint es zunächst zu einer Abnahme der Expression mit einem Minimum nach 6 Stunden zu kommen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit kontrastieren sich die Banden wieder ähnlich stark wie nach 20 Minuten Inkubationszeit.

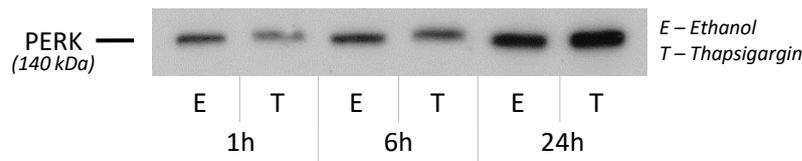


Abbildung 23: Thapsigargin führt zu einer leichten Abnahme der Expression von PERK

Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen nach 1-, 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit Thapsigargin (T) oder Ethanol (E).

Nach Inkubation der NCI-H295R-Zellen mit Thapsigargin nimmt die Expression von PERK zunächst ab. Nach 1 und 6 Stunden zeigt sich eine deutlich schmalere Bande unter dem Einfluss von Thapsigargin im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol. Nach 24 Stunden Inkubationszeit ist die Herunterregulation nicht mehr nachweisbar. Es zeichnet sich eher eine Zunahme gegenüber der Behandlung mit Ethanol ab.

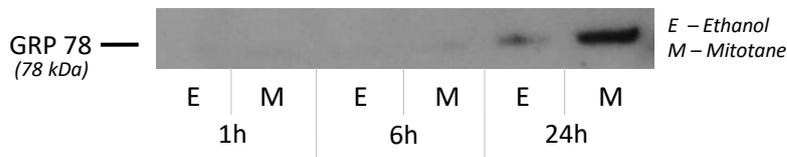


Abbildung 24: späte GRP 78-Induktion durch Mitotane in NCI-H295R-Zellen

Aufgetragen wurden Proben von NCI-H295R-Zellen, die 1 bzw. 6 Stunden mit Mitotane (M) oder Ethanol (E) inkubiert wurden.

Die Inkubation von NCI-H295R-Zellen mit Mitotane hat nach 1 und 6 Stunden keinen signifikanten und mittels Western Blot messbaren Einfluss auf die Expression von GRP 78. Erst nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigt sich eine deutliche Zunahme der Bandenstärke im Vergleich zur Negativkontrolle mit Ethanol.

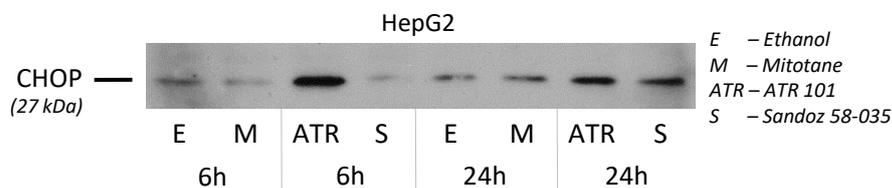


Abbildung 25: Verhalten von CHOP in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren

Aufgetragen wurden Proben von HepG2-Zellen nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit Mitotane (M), ATR 101 (ATR), Sandoz 58-035 und der zugehörigen Negativkontrolle Ethanol (E).

Nach 6 Stunden Inkubationszeit steigt die Expression von CHOP lediglich durch ATR 101 signifikant an. Die anderen beiden Substanzen haben im Vergleich zur Negativkontrolle keinen Effekt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit nimmt die Auswirkung von ATR 101 auf die CHOP-Expression bereits wieder ab.

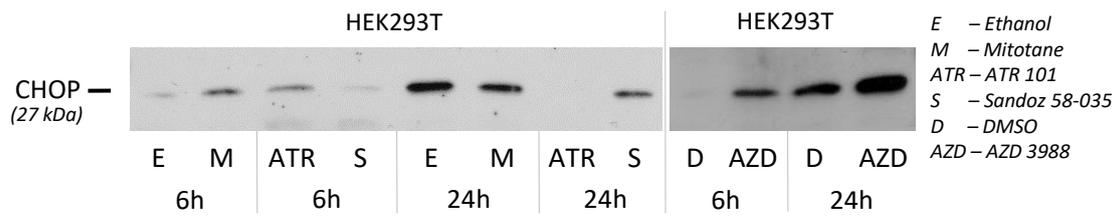


Abbildung 26: Verhalten von CHOP in HEK293T-Zellen nach Inkubation mit Mitotane und verschiedenen SOAT-Inhibitoren

Aufgetragen wurden Proben von HEK293T-Zellen nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit Mitotane (M), ATR 101 (ATR), Sandoz 58-035 (S) und AZD 3988 (AZD), sowie deren zugehörigen Negativkontrollen Ethanol (E) und DMSO (D). Es handelt sich um 2 verschiedene Western Blots, die auf Grund der besseren Vergleichbarkeit in dieser Abbildung zusammen dargestellt werden.

Es zeigt sich sowohl durch Mitotane als auch durch ATR 101 und AZD 3988 ein Anstieg der CHOP-Expression nach 6 Stunden Inkubationszeit. Nach 24-stündiger Behandlung mit den Substanzen lässt sich lediglich für AZD 3988 noch eine stärkere CHOP-Bande im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO feststellen. Die anderen Substanzen führen vergleichend zu Ethanol eher zu einer abnehmenden Expression des CHOP-Proteins.