

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**In-vitro-Untersuchungen zur
molekularen Wirkung von Mitotane
beim Nebennierenrindenzarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Laura Elisa Wiemer
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2013

Referent: Professor Dr. Martin Fassnacht

Korreferent: Professor Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Die Nebennieren und ihre Funktion	- 1 -
1.2	Wirkung und Synthese der Steroidhormone	- 2 -
1.3	Das Nebennierenrindenzarzinom	- 5 -
1.3.1	Epidemiologie und Prognose	- 5 -
1.3.2	Klinisches Erscheinungsbild	- 5 -
1.3.3	Stadieneinteilung und Metastasierung	- 6 -
1.3.4	Molekulare Pathogenese	- 7 -
1.3.5	Diagnostik und Therapie des Nebennierenrindenzarzinoms	- 8 -
1.3.5.1	Allgemeines zur Diagnostik und Therapie	- 8 -
1.3.5.2	Mitotane- Basis der medikamentösen Therapie des NNR-Karzinoms	- 12 -
1.4	Fragestellung dieser Arbeit	- 16 -
2.	MATERIAL UND METHODEN	- 17 -
2.1	Material	- 17 -
2.1.1	Auswahl wichtiger Reagenzien, Chemikalien	- 17 -
2.1.2	Auswahl kommerzieller Kits	- 17 -
2.1.3	Genexpressionsproben	- 18 -
2.1.4	Geräte	- 19 -
2.2	Methoden	- 19 -
2.2.1	Zellkultur	- 19 -

2.2.1.1	Zellzählung	- 20 -
2.2.1.2	Inkubation mit Mitotane	- 20 -
2.2.2	Hormonbestimmungen	- 21 -
2.2.3	Zelltodanalysen	- 21 -
2.2.3.1	Analysen mittels FACS	- 21 -
2.2.3.2	Analysen mittels ELISA	- 23 -
2.2.4	Analysen auf transkriptioneller Ebene	- 25 -
2.2.4.1	RNA-Isolierung	- 25 -
2.2.4.2	Reverse Transkription	- 26 -
2.2.4.3	Real-Time-PCR	- 26 -
2.2.5	Genexpressions-Analysen mittels Genchip	- 30 -
2.2.5.1	Beschreibung der Methodik des Genchips	- 30 -
2.2.5.2	Auswertung des Genchips	- 32 -
2.2.6	Statistische Analysen	- 33 -
3.	ERGEBNISSE	- 34 -
3.1	Effekte von Mitotane auf die adrenokortikale Hormonsekretion und wichtige Steroidogeneseenzyme	- 34 -
3.2	Einfluss von Mitotane auf das Zellwachstum der NCI- H295-Zellen	- 38 -
3.3	Veränderungen des "Transkriptoms" der NCI-H295- Zellen durch Mitotane	- 43 -
4.	DISKUSSION	- 60 -
4.1.	Mitotane-induzierte Suppression der adrenokortikalen Hormonsekretion	- 60 -

4.2	Mitotane hemmt das Zellwachstum der NCI-H295-Zellen - ist es Nekrose oder Apoptose ?	- 63 -
4.3	Mitotane-induzierte Veränderungen des "Transkriptoms" der NCI-H295-Zellen	- 65 -
4.3.1	Diskussion einzelner relevanter Gene mit Einfluss auf den Apoptose-Signalweg	- 66 -
4.3.2	Diskussion einzelner relevanter Gene mit Einfluss auf die Steroid-Homöostase	- 73 -
4.3.3	Die Rolle des ER-Stress	- 78 -
4.3.4	Diskussion limitierender Faktoren der Arbeit	- 81 -
4.3.5	Vorschlag zu einem möglichen Wirkmechanismus von Mitotane	- 82 -
5.	ZUSAMMENFASSUNG	- 85 -
6.	ANHANG	- 87 -
6.1	Microarray Genexpressionslisten	- 87 -
6.2	Ausführliche Erläuterung des ER-Stress	- 90 -
6.3	Abbildungen der Webgestaltsoftware	- 92 -
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
8.	LITERATURVERZEICHNIS	IV
9.	DANKSAGUNG	
10.	LEBENS LAUF	

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazolin-6-) Sulfonsäure
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Analysis of Variance
aP2	Adipocyte fatty acid binding protein
ASK1	Apoptosis signal regulating kinase 1
ATF-4	Activating transcription factor 4
ATF-6	Activating transcription factor 6
BiP	Immunoglobulin binding protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor
cDNA	Complementary DNA
cRNA	Complementary RNA
Ca	Carcinoma
CHOP	C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein
CRH	Corticotropin-releasing hormone
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DUSP4	Dual specificity MAP kinase phosphatase 4
eIF2a	Eukaryotic translation initiation factor 4
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EGR-1	Early growth response gene 1
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell scanning
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein
GADD34	Growth arrest and DNA damage inducible protein 34

GDF 15	Growth differential factor 15
GRE	Glucocorticoid response element
HDL	High density lipoprotein
HERP	Homocysteine inducible, endoplasmic reticulum stress inducible protein
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IRE-1	Inositol requiring protein 1
IVT	<i>In vitro</i> -Transfektion
JAB1	Jun activation domain-binding protein 1
JIK	C-Jun N-terminal inhibitory kinase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
5-JÜR	5-Jahres-Überlebens-Rate
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIC-1	Macrophage inhibitory cytokine 1
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	Nuclear factor-kappa light chain enhancer of activated B cells
NN	Nebenniere
NNR	Nebennierenrinde
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBA	4-phenyl butyric acid
PBS	Phosphate buffered saline
PDF	Prostate differentiation factor
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
PI	Propidium-Iodid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RT	Reverse Transkriptase

S1P	Site-1 protease
S2P	Site-2 protease
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
SF-1/2	Steroidogenetic factor 1/2
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT1	Signal transducer and activator of transcription1
SQLE	Squalen Epoxidase (Monooxygenase)
TGF	Transforming growth factor
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor 2
TRIB3	Tribbles homolog 3
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XBP-1	X-box binding protein 1

1. Einleitung

1.1 Die Nebennieren und ihre Funktion

Die paarig angelegten Nebennieren liegen kranial den Nieren auf und befinden sich in retroperitonealer Lage (1). Entwicklungsgeschichtlich lassen sie sich makroskopisch in Rinde und Mark einteilen. Die Zellen des Marks haben ihren Ursprung in der Neuralleiste und sezernieren Katecholamine. Die Rinde leitet sich vom Mesoderm ab und lässt sich histologisch in drei Zonen gliedern. Von außen nach innen sind dies: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Die Zona glomerulosa ist Syntheseort der Mineralocorticoide (wie Aldosteron), die Zona fasciculata sezerniert vorwiegend Glucocorticoide (z.B. Cortisol) und in der Zona fasciculata werden neben kleinen Mengen an Glucocorticoiden vor allem schwach wirksame Androgene gebildet (2). Physiologische Stimuli für die Sekretion der Mineralocorticoide sind Elektrolytschwankungen (Hyperkaliämie und Hyponatriämie) sowie Aktivierung durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Die Cortisolsynthese und auch die Androgensynthese werden durch das aus dem Hypophysenvorderlappen stammende adrenocorticotrope Hormon (ACTH) reguliert, welches wiederum durch CRH (Corticotropin releasing hormone) aus dem Hypothalamus stimuliert wird. Dadurch nimmt ACTH eine zentrale Stellung in der Steuerung der Nebennierenrindenhormone ein. Den Haupteinfluss auf den ACTH-Spiegel spielen die freie Cortisolkonzentration im Plasma, Stress und der Tag-Nacht-Rhythmus. Chronisch erhöhte ACTH-Spiegel führen zu Hypertrophie der Rinde und vermehrter Cortisol-Sekretion, seine Abwesenheit resultiert in einer Rindenatrophie (3, 4). Neben ACTH haben auch die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks eine positive Wirkung auf die Glucocorticoidsynthese (5). Weiterhin scheinen auch Zytokine und Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Nebennierenrinde zu nehmen. So können Peptidhormone wie bFGF, IGF und TGF- β , die durch Transkriptionsfaktoren wie

c-Jun und c-Fos vermittelt werden, die Hormonsekretion der Nebennierenrinde regulieren (6).

1.2 Wirkung und Synthese der Steroidhormone

Die in der Zona fasciculata produzierten Steroidhormone beeinflussen den Körper und dessen Systeme auf vielfältige Weise. Sie haben u.a. eine maßgebliche Wirkung auf den Glucose-Stoffwechsel. Durch Steigerung der Gluconeogenese und des Glykogenaufbaus, bei gleichzeitiger Hemmung der Glucoseaufnahme in peripheren Geweben, kommt es zu einer positiven Glucosebilanz im Blut. Gleichzeitig wirken sie sich auf den Fettstoffwechsel aus. So kommt es zur Mobilisation von Fettsäuren und zu ihrer Ablagerung in Fettdepots am Körperstamm. Eventuell haben die Steroidhormone aber auch lipolytische Wirkung. Katabole Wirkungen zeigen sich auf den Proteinmetabolismus. Zusätzlich kommt es zur Hemmung des Knochenaufbaus und zu Muskelschwund durch Glucose-Abbau in diesen Geweben. Weiterhin haben die Glucocorticoide starken Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt, was in einer arteriellen Hypertonie resultieren kann. Neben bedeutenden antiinflammatorischen Effekten wird durch die lipophilen Eigenschaften auch Einfluss auf das Zentralnervensystem und die Psyche genommen (3, 7). Die Hauptwirkung auf den Mineral- und Wasserhaushalt haben jedoch die Hormone der Zona glomerulosa mit ihrem Hauptvertreter, dem Aldosteron. Die Androgene aus der Zona reticularis sind an der Regulation der Sexualfunktion beteiligt.

Alle Steroidhormone leiten sich vom Cholesterin ab. Die Basisstruktur besteht aus einem Cyclopentanoperhydrophenanthren-Ring und wird Steran genannt (8) (siehe Abbildung 1).

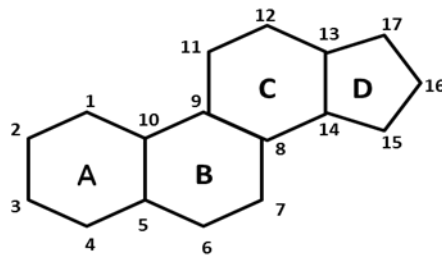


Abbildung 1 Steran

Die Steroidringe des Cyclopentanoperhydrophenanthren-Rings sind in Großbuchstaben markiert, die Kohlenstoffatome nummeriert. Eigene Darstellung.

Das aus der Nahrung stammende Cholesterin wird in die Zelle in Form von Lipoproteinen durch den LDL-Rezeptor aufgenommen (9). Durch andauernde Stimulation durch ACTH erhöht sich die LDL-Rezeptor-Dichte, bei ausreichendem intrazellulärem Vorrat wird die Dichte vermindert.

Was intrazellulär mit dem Cholesterin geschieht, wird hauptsächlich durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, der SREBF (Sterol regulatory element binding transcription factor)-Familie bestimmt.

Der Großteil des Cholesterinvorrats stammt aus plasmatischen low density lipoproteins (LDLs) (9). Diese werden mit dem LDL-Rezeptor in sogenannten „Coated pits“ durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (10). Diskutiert wird aber auch die Rolle eines spezifischen Rezeptors für high density lipoproteins (HDLs). So könnte HDL-Cholesterin selektiv über den Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in die Nebennierenzellen aufgenommen werden (11).

Cholesterin kann jedoch auch *de novo* aus Acetyl-CoA hergestellt werden. Die Zelle verfügt normalerweise allerdings über genügend Reserven in Form von Cholesterinestern (12).

Die Steroidsynthese findet in drei verschiedenen Kompartimenten statt. Die Aufnahme ins Zytosol wurde oben erwähnt. Bei Translokation vom Zytosol an die innere Mitochondrienmembran hilft das StAR-Protein (Steroidogenic acute regulatory protein). Dies ist der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidbiosynthese (13). Die Synthese der Steroide bedarf weiterhin einer zweifachen Hydroxylierung und Seitenkettenentfernung zwischen den Kohlenstoffatomen C₂₀ und C₂₂, was den zweiten

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ausmacht. Jegliche Hydroxylierung und Oxygenierung der Steroidbiosynthese wird durch Enzyme der HSD- (Hydroxysteroid-Dehydrogenase) oder der Cytochrom-P450-Familie katalysiert (14). Das P450_{scc}- (side chain cleavage) CYP11A1-Enzym ist für diese erste Umwandlung verantwortlich. Das durch die Abspaltung entstandene Pregnenolon wird im Endoplasmatischen Retikulum weiter in Aldosteron, Androgene oder Cortisol verarbeitet. Die 17- α -Hydroxylase leitet den Syntheseweg zum Cortisol ein (12). Die einzelnen Schritte der Steroidbiosynthese sind in Abbildung 2 dargestellt.

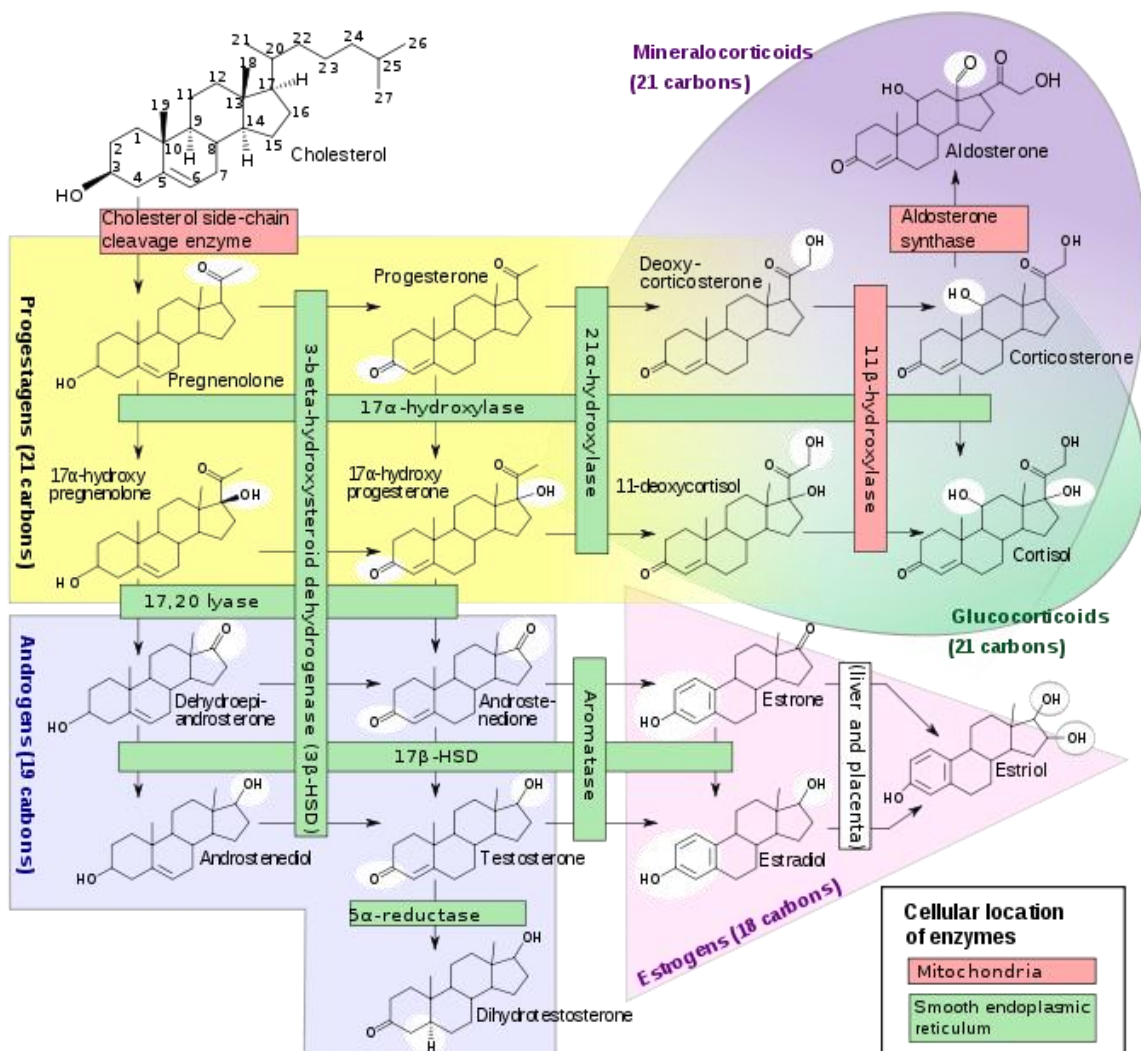


Abbildung 2 Steroidbiosynthese

Abgebildet ist die Synthese der humanen Steroidhormone aus Cholesterin. Rot dargestellt sind die mitochondrialen Enzyme, in grün Prozesse im glatten Endoplasmatischen Retikulum. Übernommen von (15).

Die lipophilen Steroide entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezifische intrazelluläre Rezeptoren, da sie ungehindert die Zellmembran durchdringen können. Bindet das Steroid am Rezeptor, kann dieser an bestimmte Sequenzen, sogenannte glucocorticoid response elements (GRE), eines Genes binden (7).

1.3 Das Nebennierenrindenzarzinom

1.3.1 Epidemiologie und Prognose

Das Nebennierenrindenzarzinom ist ein sehr seltener Tumor mit infauster Prognose. Die Inzidenz liegt bei 0,7-2 Fällen pro Million Einwohner pro Jahr (16, 17). Verglichen mit anderen Malignomen sind die Patienten jung. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 42 Jahren. Es zeigt sich eine bipolare Altersverteilung: Ein Drittel der Betroffenen ist jünger als 30 Jahre, ein zweiter Gipfel zeigt sich bei den über 50-jährigen (18). In Südbrasilien wurde eine ungewöhnliche hohe Inzidenz bei Kindern unter 15 Jahren festgestellt (3,4-4,2 pro 1 Million Kinder im Vergleich zum weltweiten Schnitt von 0,3 pro 1 Million Kinder) (19). Es wird vermutet, dass eine Genmutation in TP53 dafür verantwortlich ist. Mutationen in diesem, für das Tumorsuppressorgen p53 codierenden Gen sind in dieser Population hochfrequent.

Die mittlere Überlebensrate bei Nebennierenrindenzarzinomen liegt bei 45 Monaten (18). Über alle Stadien hinweg fanden sich Gesamt-5-Jahres-Überlebensraten von 16-35%. Durch komplette chirurgische Resektion kann die 5-JÜR auf 38-62% angehoben werden (20, 21). Im metastasierten Stadium überleben weniger als 10% der Patienten länger als 5 Jahre (18, 22).

1.3.2 Klinisches Erscheinungsbild

Beim Nebennierenrindenzarzinom unterscheidet man eine hormonaktive und eine hormoninaktive Form. Etwa die Hälfte der Tumore verursacht durch einen Hormonexzess klinische Symptome. Verbesserte endokrinologische Diagnostik zeigt jedoch, dass der Prozentsatz hormonproduzierender Karzinome ohne

Symptomatik deutlich höher liegen könnte als bislang gedacht (23). Durch den Fortschritt und die weitere Verbreitung moderner Bildgebung werden auch immer häufiger Inzidentalome, also zufällig gefundene Raumforderungen der Nebenniere, entdeckt (17,7% von 581 Patienten) (24). Die Mehrzahl der Inzidentalome ist gutartig, ein definitiver Verdacht auf Malignität besteht bei einem Durchmesser über 5 cm.

Am häufigsten manifestiert sich die Hormonüberproduktion über ein Cushing-Syndrom.

Meist ist die Cortisolproduktion in den Tumorzellen relativ ineffektiv, weshalb bei Auftreten von klinischen Zeichen schon eine große Tumormasse vorliegt. Zeichen des Cortisolexzesses sind Muskelschwäche, Hautmanifestationen (Ekchymosen, Striae rubrae distensae, Atrophie), Entwicklung einer Hypertonie und eines Diabetes mellitus. Durch die rasche Größenzunahme können Symptome wie Gewichtszunahme (Stammfettsucht, Stiernacken, Vollmondgesicht) und osteoporotische Veränderungen fehlen.

Überproduktion von Androgenen führt, vor allem bei Frauen, zu Akne und Hirsutismus, aber auch zur Virilisierung.

Östrogenproduzierende Nebennierentumore beim Mann führen zu Gynäkomastie und Hodenatrophie und sind prinzipiell als maligne anzusehen.

Nur selten führt die Überproduktion an Hormonen zu einem primären Hyperaldosteronismus.

Eine Besonderheit des hormoninaktiven Nebennierenrindenzellkarzinoms ist, dass sich wenige Allgemein- oder B-Symptome, wie z. B. Gewichtsverlust oder Nachtschweiß, zeigen. Patienten werden häufig durch Verdrängungs- oder Infiltrationserscheinungen wie Rückenschmerz oder abdominelles Druckgefühl klinisch auffällig (25).

1.3.3 Stadieneinteilung und Metastasierung

Die klinische Stadieneinteilung des Nebennierenrindenzellkarzinoms erfolgt bislang nach keiner einheitlichen Klassifikation. Frühe Einteilungen erfolgten nach der Klassifikation von MacFarlane in einer Modifikation von Sullivan et al. (26). Die 2004 ins Leben gerufene Einteilung der International Union Against Cancer

(UICC) orientiert sich am TNM-Status und beruht zum großen Teil auf diesen frühen Einteilungen. Um verbesserte prognostische Aussagen treffen zu können, wird weltweit zunehmend auf die ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors)-Klassifikation zurückgegriffen (27).

Stadium I	T1 N0 M0	Tumor < 5cm
Stadium II	T2 N0 M0	Tumor > 5cm
Stadium III	T1-T2, N1, M0 T3-T4, N0-1, M0	
Stadium IV	T1-T4, N0-N1, M1	

T1: Tumor <5 cm, T2: Tumor >5 cm, T3: lokal infiltrierend, ohne Organbefall, T4: Infiltration in Nachbarorgane oder Tumor/ Thrombus in V. cava/ V. renalis, N1: regionaler Lymphknotenbefall; M1: Fernmetastasen

Tabelle 1 Stadieneinteilung des Nebennierenrindencarzinoms (Nach ENSAT-Klassifikation)

Die Metastasierung betrifft neben Lymphknoten auch Lunge, Leber und Knochen.

1.3.4 Molekulare Pathogenese

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis der Tumorgenese erzielt werden konnten, bleibt die Pathogenese des Nebennierenrindencarzinoms bis heute weitgehend unverstanden. So bleibt weiterhin unklar, ob sich die Nebennierenrindencarzinome aus Adenomen entwickeln oder ob eine spontane Entwicklung stattfindet. Für die *de novo*-Tumorgenese sprechen vor allem die Langzeitbeobachtung von NNR-Adenomen und die Studie genetischer Alterationen. So konnten durch CGH (comparative genomic hybridization/komparative Hybridisierung) numerische chromosomale Verluste und durch Mikrosatelliten-Marker Mutationen in den Chromosomen-Banden 11q13 (> 90%), 17p12 (> 85%) und 2p16 (92%) bei Patienten mit Nebennierenrindencarzinom nachgewiesen werden. Inaktivierende Mutationen auf dem 17p13-Lokus, dem Ort, wo das Tumorsuppressorgen TP53 lokalisiert ist, und Veränderungen des 11p15-

Lokus, welcher zu einer IGF-II-Überexpression führt, können regelmäßig beobachtet werden (28). In vitro Experimente suggerieren, dass diese Überexpression zu einer Proliferation der Krebszellen führt (29, 30).

Weitere wichtige Genalterationen betreffen die konstitutive Aktivierung von β -Catenin und die Überexpression des Steroidogenen-Faktors 1 (SF1), sowie weiterer Wachstumsfaktoren wie z. B. VEGF (28). Möglicherweise hat auch ein Allelverlust des ACTH-Rezeptor-Gens Einfluss. ACTH wirkt an der Nebenniere als Differenzierungsfaktor, so dass der Verlust dieses Signalweges eine Entdifferenzierung begünstigen könnte (25).

Interessant ist die Verbindung der Nebennierenrindentumore mit verschiedenen hereditären Tumorsyndromen. Hierzu gehört das Li-Fraumeni-Syndrom mit einer Keimbahnmutation des p53-Tumorsuppressorgens und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das durch eine IGFII-Überexpression charakterisiert ist (31). Weiterhin besteht eine Verbindung zur Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1/ Wermer-Syndrom) und zur familiären adenomatösen Polyposis, bei der die konstitutive Aktivierung von β -Catenin eine Schlüsselrolle spielt (28).

1.3.5 Diagnostik und Therapie des Nebennierenrindenkarzinoms

1.3.5.1 Allgemeines zur Diagnostik und Therapie

Um eine adäquate Therapie des Nebennierenrindenkarzinoms zu gewährleisten, muss jeglicher Therapieentscheidung eine umfassende Diagnostik vorgeschaltet werden. Zu dieser gehört, neben Bestimmung einer vermehrten Nebennierenrinden-Hormonsekretion (Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene), auch der Ausschluss eines Phäochromozytoms durch Bestimmung der Metanephrine. Weitergehend ist eine Bildgebung mittels CT oder MRT (Thorax und Abdomen) unabdingbar. Bei Verdacht auf Skelettmetastasen muss eine Knochenszintigrafie angeschlossen werden, optional eine FDG-PET. Eine Feinnadelbiopsie ist bei operativer Intention nicht indiziert (28).

Die Basis der Therapieentscheidung basiert wesentlich auf der histopathologischen und immunhistochemischen Beurteilung. Zum einen muss vor Einleitung einer Behandlung die Unterscheidung zu benignen Tumoren, wie Nebennierenrindenadenomen, klar getroffen werden, zum anderen können prognostische und therapeutische Schlüsse gezogen werden. Einer der am weit verbreitetsten Diagnose-Scores ist der Weiss-Score, welcher anhand von Tumormorphologie,- zytologie- und -invasion eine Einteilung vornimmt (32). Ki67, der als Proliferationsmarker hilfreich zur Differenzierung von Karzinomen und Adenomen ist, kann als weitere Entscheidungshilfe bei rezervierbaren Tumoren herangezogen werden (28).

Aufgrund der limitierten Daten bezüglich eines klaren Therapieregimes sollten Patienten, wenn möglich, in Studien eingeschlossen werden.

Einziger kurativer Ansatz ist die chirurgische Exzision. Diese ist Primärtherapie in den Stadien I-II, sowie bei den meisten Patienten im Stadium III und in ausgewählten Fällen auch im Stadium IV. Die operative Therapie kann abhängig von Stadium und Tumormasse offen oder laparoskopisch durchgeführt werden (28). Die Äquivalenz der laparoskopischen Therapie bezüglich des Behandlungsergebnisses im Stadium I und II wird kritisch diskutiert (33). Der Resektionsstatus ist Hauptprädiktor für die Prognose des NNR-Karzinoms und die Tumorentfernung im Gesunden stellt die Grundvoraussetzung für ein Langzeitüberleben dar. Daher sollte die chirurgische Therapie nur durch erfahrene Operateure in spezialisierten Zentren durchgeführt werden (34).

Trotz erfolgreicher Resektion findet sich in der Literatur eine hohe Rate an Rezidiven, was die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie verdeutlicht. Die bislang effektivste Therapie bezüglich Tumorwachstum und gleichzeitiger Hormonsuppression stellt das Medikament Mitotane dar (35). Bei einem Residualtumor (R1) oder einem unklaren Resektionsstatus (Rx) sollte zusätzlich eine Tumorbettbestrahlung erwogen werden. Risikoadaptiert kann eine Kombinationstherapie von Mitotane und Streptozotocin gerechtfertigt sein (28).

Um die Frage zu klären, ob sich auch bei niedrigen bis moderatem Rezidivrisiko eine adjuvante Therapie, welche zurzeit bei den meisten Patienten angewendet wird, positiv auf das Langzeitüberleben auswirkt, wird aktuell die Mitotane-Therapie mit dem einfachen „follow-up“ in der randomisierten prospektiven ADIUVO-Studie verglichen (36).

Eine Entscheidungshilfe zur Risikoeinteilung liefert Abbildung 3.

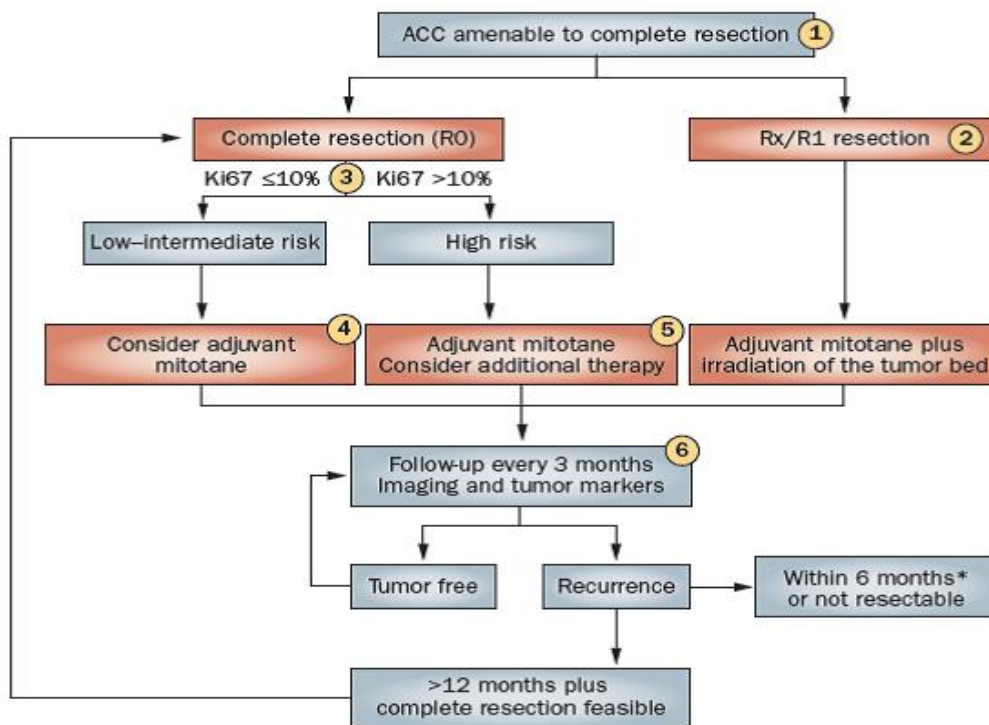


Abbildung 3 Behandlung des NN-Karzinoms bei resezierbarem Tumor

1) Zu den Patienten in dieser Gruppe gehören alle Patienten in Stadium I und II, sowie die meisten Patienten in Stadium III und ausgewählte Patienten in Stadium IV; 2) bei Patienten mit R2-Resektion Re-Operation erwägen, sonst Behandlung wie bei nicht-resezierbaren Tumoren; 3) falls ki67-Bestimmung nicht vorhanden, Risikoklassifizierung anhand Höhe Proliferationsindex; 4) für eine niedrige Rezidivneigung sprechen: Tumorgöße <8cm, keine mikroskopischen Invasionszeichen von Blutgefäßen oder NNR-Kapsel; 5) für eine postoperative Tumorbettbestrahlung sprechen: Mikroskopische Invasionszeichen, ki67-Index $\geq 20\%$. Bei Vena-Cava-Thrombus sollte eine Streptozotocin-Therapie erwogen werden. 6) Nach 2 Jahren können die Nachsorgeintervalle verlängert werden. Abkürzungen: ACC, Adrenocortical carcinoma; R1, mikroskopischer Resttumor; Rx, unbekannter Resektionsstatus. Entnommen von (28).

Bei Auftreten eines Rezidivs innerhalb der ersten 12 Monate nach primärer Operation scheint die erneute Resektion sich günstig auf das Überleben

auszuwirken, wenn dabei eine R0-Resektion erreicht werden kann. Dieser sollte eine adjuvante medikamentöse Therapie und gegebenenfalls eine Radiatio angeschlossen werden.

Im metastasierten Stadium gilt das Medikament Mitotane als Monotherapie oder bei schnell fortschreitendem Tumor in Kombination mit Zytostatika als Therapie der Wahl. Chirurgische Maßnahmen können bei medikamentös nicht unter Kontrolle zu bringendem Hormonexzess erwogen werden. Eine Radiotherapie kann erfolgreich bei symptomatischen Metastasen eingesetzt werden (28).

Durch die Rarität des NNR-Karzinoms liegen nur wenige Daten zur Therapie vor (28). Als erste Initiative zum randomisierten Vergleich der aktuellen Therapieschemata mit Kombinationen aus verschiedenen Zytostatika und Mitotane wurde im Jahr 2003 die FIRM-ACT-Studie ins Leben gerufen. Dabei wurden die beiden, zu diesem Zeitpunkt am erfolgreichsten eingeschätzten Therapieschemata miteinander verglichen: Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin mit Mitotane (EDP-M) vs. Streptozotocin mit Mitotane (Sz-M). Die mit 304 Studienteilnehmern durchgeführte Studie zeigt ein signifikant besseres Ansprechen und eine längere Progressions-freie-Zeit für die EDP-M-Therapie, aber insgesamt keine Unterschiede im Gesamtüberleben (37). Aus diesem Grund gilt die Therapie mit EDP-M inzwischen als anerkannte Erstlinien-Chemotherapie beim fortgeschrittenen NNR-Karzinom (34). Weitere aktuelle Studien beschäftigen sich mit dem Einsatz sogenannter zielgerichteter Therapien (targeted therapies). Die SIRAC-Studie testet den Tyrosin-Kinase-Inhibitor Sunitinib (SUTENT[®]) (38) und die GALACCTIC-Studie ist eine Phase III-Studie, die die Wirkung von OSI-906, einem IGF-Rezeptorantagonisten untersucht. Sein Ligand, der Wachstumsfaktor IGF-II, gehört zu den am stärksten hochregulierten Molekülen beim Nebennierenrindenzellkarzinom. OSI-906 wird gegen Placebo in der Zweit- und Drittlinientherapie getestet (39).

Bei Fortschreiten der Erkrankung trotz sachgemäßer Erstlinientherapie sollten weitere Optionen in Anspruch genommen werden. So konnten Sperone et al. einen Nutzen in der Verwendung von Gemcitabin mit 5-FU oder Capecitabin in der Zweit- bzw. Drittlinientherapie zeigen (40). Zunehmend werden als

Zweitlinientherapie auch lokoregionäre Verfahren wie Chemoembolisation von Lebermetastasen oder Radiofrequenztherapie erfolgreich angewendet (35). Da in der Therapie des Nebennierenrindenzarzinoms stetig neue Erkenntnisse gemacht werden, sollte die Therapie unter Berücksichtigung der neuesten Gesichtspunkte getroffen werden.

1.3.5.2 Mitotane- Basis der medikamentösen Therapie des NNR-Karzinoms

Mitotane ist das einzige nebennierenspezifische Medikament in der Behandlung des NNR-Karzinoms und auch die einzige zugelassene Substanz für diese seltene Erkrankung. Wie sich an den oben aufgeführten Therapieschemata erkennen lässt, ist Mitotane Basis jeder medikamentösen Behandlungsstrategie des NNR-Karzinoms.

Wirkmechanismus

Obwohl Mitotane seit 1960 eingesetzt wird, ist der genaue Wirkmechanismus bis heute weitgehend unverstanden. Mitotane ist ein Abkömmling des Insektenschutzmittels DDT und ist auch unter der Bezeichnung o,p'-DDD (1,1-Dichlor-2-(2-Chlorphenyl)-2-(4-Chlorphenyl)-Ethan) oder dem Handelsnamen Lysodren[®] bekannt (Abbildung 4). O,p'-DDD fiel erstmals 1949 durch die selektive Nekrose der Nebennierenrinde bei Hunden ins Blickfeld der Forschung (41). Weitere Studien zeigten, dass DDD eine Mischung aus drei Isomeren ist (m,p'-DDD, p,p'-DDD und o,p'-DDD), wobei o,p'-DDD die aktivste Form darstellt (42, 43). Interessanterweise zeigt Mitotane als chirales Molekül auch kleine, aber signifikante Unterschiede bezüglich der Zytotoxizität und Cortisolsekretion in seinen Enantiomeren (44). Gegenwärtig ist Mitotane als Racemat mit einem Enantiomeren-Quotienten von 1 als Therapie des Nebennierenrindenzarzinoms als orphan drug von der europäischen Arzneimittelagentur EMA und der amerikanischen Food and Drug Administration zugelassen. Interessanterweise zeigen sich die zytotoxischen Effekte vor allem in der Zona fasciculata und reticularis, wohingegen die Veränderungen in der Zona glomerulosa relativ gering sind (42).

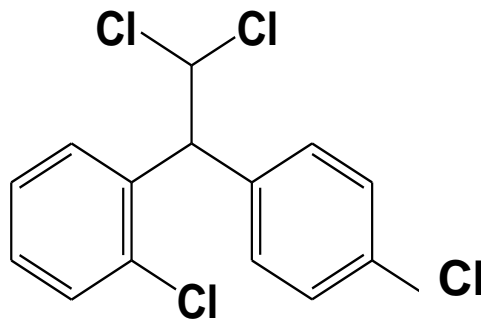


Abbildung 4 Mitotane (o,p'-DDD)

Strukturformel von Mitotane. Eigene Grafik.

Studien aus den 60er-Jahren zeigen, dass 35-40% des o,p'-DDD aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert werden und hauptsächlich in lipophilen Geweben wie Fettgewebe, Gehirn und Leber gespeichert werden. Diese Anreicherung in den fettreichen Geweben ist die Hauptursache für die benötigte hohe Dosierung von 4-6g pro Tag. 25% der absorbierten Dosis werden im Urin ausgeschieden, ein geringer Teil auch im Stuhl (45). Der genaue Mechanismus für die Nebennieren-spezifische Wirkung von Mitotane ist unklar. Jedoch konnte eine Hemmung der Cholesterin-Monooxygenase (P450_{scc}, CYP11A1), auch 20,22-Desmolase genannt, und der 11 β -Hydroxylase (CYP11b1) nachgewiesen werden (46). Auch auf das primär hepatisch aktive Enzym CYP3A4 hat Mitotane entscheidenden Einfluss. Cortisol wird über CYP3A4 zu 6-Beta-Hydroxycortisol metabolisiert. Erhöhte 6-Beta-Hydroxycortisolspiegel lassen sich unter Therapie mit Mitotane feststellen (47). Zusätzlich reduziert sich die gemessene Glucocorticoidmenge durch Induktion von Cortisol-bindendem Globulin (CBG), welches eine Abnahme des freien Serum-Cortisols bedingt (48). Aus diesen Gründen wird bei der Substitutionstherapie mit Hydrocortison eine im Vergleich zur normalen Nebenniereninsuffizienz deutlich höhere Dosis gegeben.

Ferner wurde gezeigt, dass es durch Mitotane in der Nebenniere zur Formierung reaktiver Metabolite und kovalenter Bindung an adrenale Proteine, maßgeblich in den Mitochondrien, kommt (49, 50). Durch enzymatische

Hydroxylierung an der Dichlormethin-Gruppe und anschließender Dehydrohalogenierung wird ein Acylchlorid-Derivat als aktives Zwischenprodukt gebildet (51). Dies scheint auch der Zwischenschritt zur Bildung des Hauptmetaboliten o,p'-DDA (2,4-dichlordiphenyl-Essigsäure) zu sein (52). Diese Reaktion ist abhängig von Sauerstoff und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP), was zur Hypothese führt, dass Mitotane durch ein neuartiges Cytochrom-P450 verstoffwechselt wird (46). Eine oxydative Schädigung der Nebennierenzellen entsteht wahrscheinlich durch freie Radikale und resultiert im anschließenden Zelltod.

Weiterhin wird die Hemmung des MDR-Gens als wichtiger Effekt von Mitotane diskutiert. Als eine Erklärung für die schlechten Ansprechraten auf klassische Chemotherapeutika wurde die hohe Expression von P-Glykoprotein (Pgp), dem Produkt des MDR1-Gens (Multi-Drug-Resistance-Gen), bei Nebennierenrindenzellkarzinom-Patienten vorgeschlagen (53). Wichtig in diesem Zusammenhang scheint auch die weiter oben beschriebene Induktion des Enzyms CYP3A4 zu sein. Es wird vermutet, dass CYP3A4 50% der geläufigen Medikamente metabolisiert (48). Diese Interaktion ist deswegen bei allen gemeinsam mit Mitotane verabreichten Medikamenten zu berücksichtigen.

Klinische Anwendung

Große retrospektive Studien konnten die Wirksamkeit von Mitotane in der adjuvanten Therapie beweisen. So konnte das Rezidiv-freie-Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe von 10-25 Monaten auf 42 Monate erhöht werden (54).

Die Therapie sollte mit einer Mitotanedosis von 1,5g pro Tag begonnen werden und dann auf eine Dosis von 6g/Tag innerhalb von 4-6 Tagen gesteigert werden. Die Maximaldosis liegt bei 12g pro Tag, aber die wenigsten Patienten vertragen eine Dosierung über 8g pro Tag (28).

Mitotane ist zwar der Goldstandard der Nebennierenrindenzellkarzinomtherapie, trotzdem liegt die durchschnittliche Ansprechrate nur bei 25% (18) und die Nebenwirkungen sind vielfältig, ausgeprägt und somit häufig dosislimitierend (25) (Aufzählung der Nebenwirkungen in Tabelle 2). Durch eine geringe

therapeutische Breite werden meist nur Plasmaspiegel unter 20 mg/l gut toleriert. Plasmaspiegel unter 14 mg/l (43,75 µM) sind dagegen in den bisherigen (kleinen) klinischen Studien mit einer deutlich geringeren Ansprechrate assoziiert (55-57). Dies erfordert regelmäßige Plasmaspiegel-Bestimmungen im Abstand von z. B vier Wochen. Allerdings werden die therapeutischen Plasmalevel oft erst nach einigen Wochen bis Monaten erreicht, so dass eine frühzeitige Tumorprogression unter Therapie nicht mit einem Versagen der Mitotanebehandlung gleichgesetzt werden darf.

Nebenwirkungen von o,p'DDD (Mitotane)	
-	Gastrointestinale Nebenwirkungen (Appetitverlust, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö)
-	Zentralnervöse Nebenwirkungen (Schwindel, Ataxie, Müdigkeit, Konzentrationsstörungen, Somnolenz)
-	NNR-Insuffizienz (Morbus Addison)
-	Hypercholesterinämie
-	Gynäkomastie
-	Pathologische Verlängerung der Blutungszeit
-	Leukopenie
-	Exantheme
-	Verschwommenes Sehen
-	Erhöhte Leberenzyme
-	Cholesterin- und Triglycerid-Erhöhung
-	Störung des Schilddrüsenstoffwechsels

Tabelle 2 Nebenwirkungen von o,p'DDD (Mitotane)

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Wie oben aufgeführt, ist Mitotane das am häufigsten eingesetzte Medikament beim NNR-Karzinom und wahrscheinlich auch in der Monotherapie die wirksamste Substanz.

Trotz langjähriger Anwendung von Mitotane sind die spezifischen molekularen Wirkungsmechanismen aber immer noch nicht komplett aufgeklärt. Da ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus Voraussetzung dafür ist, die Substanz möglicherweise effektiver bzw. nebenwirkungsärmer zu machen, ist das Hauptziel dieser Arbeit hier einen entsprechenden Beitrag zu leisten. Für die jeweiligen in-vitro Versuche wird die Steroidhormon-produzierende NNR-Karzinom-Zelllinie NCI-H295 als Modell verwendet.

Im Einzelnen geht es um die Beantwortung folgender Fragen:

- Wie beeinflusst Mitotane die Hormonsynthese und deren Sekretion?
- Wie beeinflusst Mitotane das Zellwachstum der Nebennierenrindenkarzinomzellen?
- Welche Gene werden durch Mitotane signifikant reguliert?
- Kann man aus der veränderten Genexpression schlussfolgern, welche Signaltransduktionswege durch Mitotane beeinflusst werden?

Abschließend stellt sich die Frage, ob sich ausgehend von den gefundenen Wirkmechanismen neue therapeutische Prinzipien für das NNR-Karzinom ableiten lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Auswahl wichtiger Reagenzien, Chemikalien

Produkt	Hersteller
Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Destilliertes Wasser	B.Braun, Melsungen
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Puffer/ Stain Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
FITC Annexin V	BD Biosciences, Heidelberg
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mitotane	ISP Columbus, Wayne, USA
Propidium Iodide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Selenium	Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen
Transferrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 3 Reagenzien und Chemikalien

2.1.2 Auswahl kommerzieller Kits

Produkt	Hersteller
NucleoSpin II	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden,
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Cell Death Detection ELISA-Kit	Roche Applied Science, Mannheim

Gene Chip IVT Express Kit	Affymetrix, High Wycombe, UK
Gene Chip Hybridization wash and stain kit	Affymetrix, High Wycombe, UK
Taq Man Gene Expression Master Mix	AppliedBiosystems, Foster City, USA

Tabelle 4 Kommerzielle Kits

2.1.3 Genexpressionsproben

Produkt	Hersteller
BAX TaqMan Sonden-Primer-Mix Hs99999001_m1	AppliedBiosystems, Foster City, USA
Beta-Aktin TaqMan Sonden-Primer-Mix Hs99999903_m1	AppliedBiosystems, Foster City, USA
CYP3A4 TaqMan Sonden-Primer-Mix Hs00604506_m1	AppliedBiosystems, Foster City, USA
PXR (Taqman NR1/2) Sonden-Primer-Mix Hs00243666_m1	AppliedBiosystems, Foster City, USA
Gene Chip Human Genom U133 2.0	Affymetrix, High Wycombe, UK

Tabelle 5 Genexpressionsproben

2.1.4 Geräte

Produkt	Hersteller
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.OR.	Thermo Scientific
Mikroskop DM IL	Leica, Mannheim
MSC Advantage Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Dreieich
Thermal Cycler C1000,CFX Real-Time-System	BioRAD, München
400SF, Mikrotiterplattenmessgerät	SLT Lab instruments, Grödig, Österreich

Tabelle 6 Geräte

2.2 Methoden

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Experimente erfolgten in mindestens drei unabhängigen Versuchen in Triplikaten.

2.2.1 Zellkultur

Die bei den Versuchen eingesetzten Nebennierenrindentumorzellen NCI-H295 wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Diese ist die erste Nebennierenrindenzelllinie, welche die Fähigkeit besitzt alle adrenokortikalen Hormone zu produzieren. Sie stellen aktuell das einzige valide Modell für die Untersuchung der molekularen und biochemischen Mechanismen des Nebennierenrindenzellkarzinoms dar, bei der gleichzeitig die Steroidogenese betrachtet werden kann (58).

Die Zellen wurden in 175cm³-Zellkulturflaschen in Suspension gehalten und wuchsen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Dem RPMI-1640-Medium

wurden 10% FCS sowie 4µg/ml Selen, 100 µg/ml Transferrin und 1mg/ml Insulin zugegeben (59).

Alle 2 Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums oder die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 gesplittet.

Die untersuchten HepG2-Zellen wurden ebenfalls von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und mit Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Zusatz von 10% FCS und 1% L-Glutamin angesetzt. Zellkultur in 175cm³-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre. Wechsel des Mediums wie oben beschrieben.

2.2.1.1 Zellzählung

Der Anteil lebender Suspensionszellen wurde mit Hilfe eines Trypanblau-Exklusionstests (60) bestimmt. Dem Test liegt das Prinzip zugrunde, dass lebende Zellen mit intakter Zellmembran Farbstoffe wie Trypanblau ausgrenzen, wohingegen tote Zellen den Farbstoff aufnehmen.

Die Zellen wurden für den Test 1:10 mit Trypanblau vermischt und die vitalen Zellen, also jene die nicht gefärbt wurden, in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die Berechnung erfolgte gemäß der Formel:

$$\text{Mittelwert gezählter Zellen /Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

2.2.1.2 Inkubation mit Mitotane

Mitotane lag in Pulverform vor. Mit 100% Ethanol wurde eine 10mM Stammlösung angesetzt.

Um die Wirkung von Mitotane in verschiedenen Konzentrationen zu untersuchen wurden die NCI-H295-Zellen in 6-well-Platten (Falcon, Franklin Lakes, USA) über verschiedene Zeiträume inkubiert. Pro Well wurden 1x10⁶ Zellen ausgesät. Verglichen wurden bei den Genexpressionsanalysen 0µM-Mitotane-Lösungen (Kontrolle) mit 50µM- und 100µM-Mitotane-Lösungen. Für die Vorexperimente wurden zur Dosisfindung zusätzlich weitere

Konzentrationen gewählt (10µM, 25µM, 75µM). Die dafür benötigte Zellmenge wurde in Medium entnommen, bei 900rpm in der Megafuge 1.OR. 7 Minuten lang abzentrifugiert und in 2ml neues Medium mit Zusatz von Mitotane oder Ethanol als Negativkontrolle gegeben und durch einen Vortex gründlich vermischt. Die Einwirkzeit wurde bei Erreichen des festgelegten Zeitpunktes abgebrochen und das nach Zentrifugation (900rpm, 7 Minuten) gewonnene Zellpellet für die RNA-Extraktion verwendet. Das Medium wurde mit entsprechender Etikettierung für die Hormonanalyse asserviert.

2.2.2 Hormonbestimmungen

Um die Wirkung von Mitotane auf die Hormonsekretion zu erfassen, wurden NCI-H295-Zellen über Zeiträume von 2 bis 96 Stunden mit Mitotane (0, 25, 50, 75, 100µM) in 6-well Platten inkubiert. Der Überstand des Mediums wurde nach Zentrifugation in Zentrifugationsröhrchen der Analyse im Routinelabor des Schwerpunkts Endokrinologie/Diabetologie des Universitätsklinikums Würzburg zugeführt. Zur quantitativen Bestimmung von Cortisol, DHEAS und Androstendion wurde ein kompetitiver Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany) verwendet.

2.2.3 Zelltodanalysen

2.2.3.1 Analysen mittels FACS

Apoptose ist charakterisiert durch verschiedene morphologische Vorgänge, wie Verlust der Integrität des Zytoskeletts, Zellmembraninstabilität, Kondensation des Nukleus und DNA-Strangbruch. Der Verlust der Plasmamembran ist eines der frühen Ereignisse bei der Apoptoseeinleitung der Zelle. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer Externalisation von inneren Membranlipiden wie Phosphatidylserin und dabei zu einer Exposition mit der externen Zellumgebung. Annexin V ist ein 35-36 kDa schweres, Phospholipid-bindendes Protein, welches an Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin bindet. Die

Färbung mit Annexin V, gekoppelt an geeignete Fluorophore, kann somit Zellen identifizieren, die sich im Frühstadium der Apoptose befinden. Um einen Unterschied zwischen Früh- und Spätapoptose zu detektieren, wurde als weiteres Fluorophor Propidiumiodid (PI) verwendet. Lebensfähige Zellen mit intakter Zellmembran schließen PI aus, wohingegen geschädigte Zellen permeabel für PI sind. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass vitale Zellen sowohl PI- als auch Annexin V-negativ sind. Zellen in der Spätphase der Apoptose bzw. nekrotische Zellen sind jedoch PI- und Annexin V-positiv. Im Frühstadium der Apoptose zeigen die Zellen eine positive Annexin V-Reaktion, sind jedoch PI-negativ. Bei PI- und Annexin V-positiven Zellen lässt sich nicht schlussfolgern, ob diese durch Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangen sind. Eine Durchwanderung der Zellen von vital zu frühapoptotisch bis spätapoptotisch zeigt allerdings, dass es sich um einen apoptotischen Vorgang handelt.

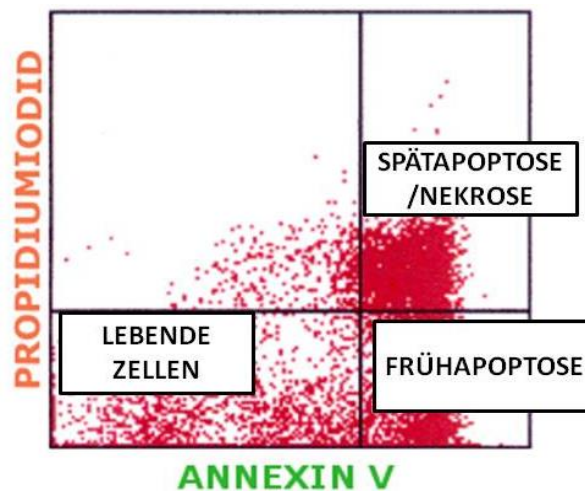


Abbildung 5 Exemplarische FACS-Darstellung mit einer Annexin- und Propidiumiodidfärbung

Die Zellen im unteren linken Quadranten sind sowohl PI- als auch Annexin V-negativ, also handelt es sich um vitale Zellen. Zellen im unteren rechten Quadranten befinden sich in der Frühphase der Apoptose, Zellen die sowohl PI- und Annexin V-positiv sind, befinden sich in der Spätphase der Apoptose oder sind nekrotisch.

Bezogen von

<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie>, 04.10.11 (61)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse genannt, ermöglicht das Zählen, die Sortierung und die Analyse von Zellen, die in hohem Tempo einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbei fließen (62). Um eine Aussage über Früh- und Spätapoptose machen zu können, wurden die vorher mit Mitotane inkubierten Zellen (siehe oben) mit Annexin V und Propidium-Iodid (PI) markiert (63). Pro Durchgang wurden 5×10^5 Zellen analysiert. Nach Zentrifugation bei 900rpm über 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und die Zellen zweifach mit 200µl FACS-Puffer gewaschen. Die Lösung wurde anschließend in 5ml-FACS-Röhrchen übertragen. Nach Zugabe und Vermischung von 5µl FITC-Annexin V und 2µl PI wurden die Zellen 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von neuem FACS-Puffer (200µl) wurde die Lösung dann mit einem FACS-Calibur-Gerät analysiert. Dabei wurden jeweils 1000 Zellen gezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Verarbeitungssoftware CellQuest Pro (BD Biosciences).

2.2.3.2 Analysen mittels ELISA

Als weiteres Verfahren zum Nachweis Mitotane-induzierter-Apoptose wurde ein photometrischer enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) verwendet. Der induzierte Zelltod wird mit Hilfe monoklonaler Maus-Antikörper gegen zytoplasmatische Histon-assozierte-DNA-Fragmente nachgewiesen.

Bei Einleitung der Apoptose entstehen Mono- oder Oligonukleosomen, ausgelöst durch eine aktivierte Endonuklease. Diese spaltet den DNA-Doppelstrang an den leicht zugängigen Stellen zwischen den Nukleosomen und ist so am Abbau der DNA beteiligt. Ein Nukleosom besteht jeweils aus insgesamt acht Kern-Histonen, dabei aus je zwei Histonen der Klassen H2A, H2B, H3 und H4. Durch die Aktivität der Endonuklease sammeln sich im Zytoplasma die Mono- oder Oligonukleosomen an, während die DNA in den Nukleosomen durch die enge Bindung an die Kern-Histone geschützt ist (64, 65). Der Nachweis dieser Histon-assozierten DNA-Fragmente ist ein typisches Kennzeichen für apoptotische Vorgänge.

Für den Zelltod-ELISA wurde die sogenannte „Sandwich“- Technik angewandt. Zunächst werden Anti-Histon-Antikörper adsorptiv an die Mikrotitermodulwand fixiert und mit Inkubationspuffer abgesättigt. Dann folgt die mögliche Bindung der in der Probe enthaltenen Nukleosomen. Im dritten Schritt kann die Anti-DNA-Peroxidase (POD) an den DNA-Teil der Nukleosomen binden und anschließend mit ABTS (2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure) photometrisch bestimmt werden (Siehe Abbildung 6).

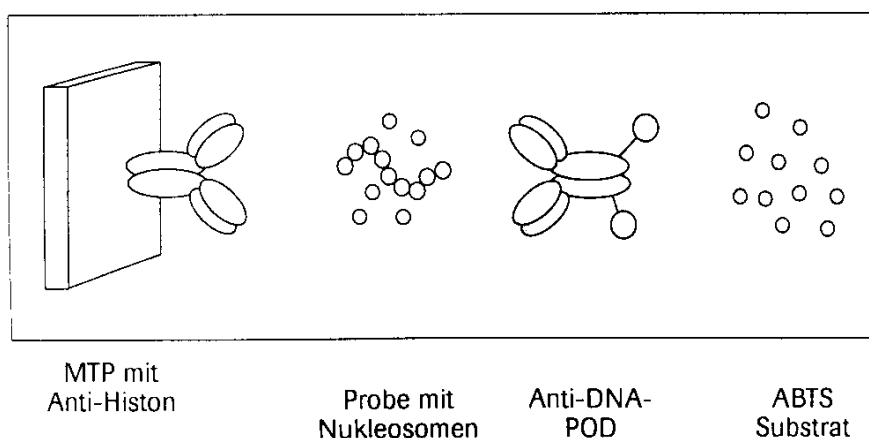


Abbildung 6 Prinzip des Sandwich-ELISAs

Anti-Histon-Antikörper sind an der Mikrotitermodulwand fixiert. In der Probe enthaltene Nukleosomen können an diese Antikörper binden. An den DNA-Teil der Nukleosomen kann die Anti-DNA-Peroxidase (POD) binden und anschließend durch Bindung von ABTS photometrisch bestimmt werden. Aus Roche, Cell Death Detection ELISA Handbook, (66)

Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 0-100µM Mitotane für 48, 72 und 96 Stunden inkubiert und die Experimente in Duplikaten durchgeführt. Zur weiteren Verarbeitung wurde ein Cell Death Detection ELISA-Kit von Roche verwendet. Die NCI-H295-Zellen wurden pelletiert, mit 200µl Inkubationspuffer lysiert und auf eine Konzentration von 1×10^4 Zellenäquivalente pro 1 ml Inkubationspuffer angesetzt. Nach Zentrifugation wurde von dem gewonnenen Zelllysat 20µl entnommen und mit 80µl Immunreagenz gemischt. Diese 100µl wurden in das Mikrotitermodul einer 96-Well-Platte pipettiert und für die Dauer einer Stunde inkubiert. Die Probenlösung wurde dabei in Duplikaten aufgetragen. Es folgten

erneute Waschung und Inkubation mit Anti-DNA-POD-Antikörper, Waschung, sowie nachfolgende Inkubation mit 100µl der Substratlösung.

Die photometrische Auswertung wurde in einem 400SF- Mikrotiterplatten-Messgerät von SLT Lab Instruments bei 405nm durchgeführt.

Dabei wurde die Anreicherungsmenge der Mono- oder Oligonukleosomen anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Anreicherungsmenge} = \frac{\text{Extinktion (10}^{-3}\text{) behandelter Zellen}}{\text{Extinktion (10}^{-3}\text{) unbehandelter Zellen}}$$

2.2.4 Analysen auf transkriptioneller Ebene

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Einer der wichtigsten Aspekte bei der RNA-Isolierung ist die Vermeidung des RNA-Abbaus durch RNAsen, die allgegenwärtig vorhanden sind. Um die RNA frühzeitig von RNAsen zu trennen, wurden die Zellen unverzüglich in einem denaturierenden Guanidin-Thiocyanat-Puffer lysiert, so dass die Inaktivierung der RNAsen und dadurch die Intaktheit der RNA gewährleistet werden konnte. Weiterhin wurde nur mit RNase-freiem Wasser und unter hohen Reinheitsbedingungen gearbeitet.

Zur Homogenisierung wurde das Zellysate auf QIAshredder-Filter geladen und das homogenisierte Lysat mit dem Kit NucleoSpin RNA II oder mit dem RNeasy Mini Kit weiterverarbeitet. Es wurde jeweils nach Herstellerhandbuch gearbeitet. Die Inkubationszeiträume der NCI-H295-Zellen mit Mitotane wurden über 4, 6 und 8 Stunden gewählt (siehe S.- 20 -). Die Mitotane-Konzentrationen lagen bei 0, 50, 75 und 100µM.

Das Prinzip der RNA-Extraktion beruht auf Silica-Membranen, welche RNA bei hohen Salz- und Ethanolkonzentrationen binden und sie bei niedrigen Konzentrationen wieder abgeben. In Gegenwart des salzhaltigen Puffers bindet die RNA an die Membran, durch Waschung mit 70%igem-Ethanol wurden Salze und makromolekulare Substanzen entfernt. Die RNA wurde daraufhin mit RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die

Konzentrationsmessung am Spectrophotometer bei einer Absorption von 260nm (67) (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) und die Reinheitsüberprüfung der RNA über das Absorptionsverhältnis bei 260nm und 280nm (A260/A280). Das Verhältnis gibt Aufschluss bezüglich Kontamination mit Proteinen und sollte für reine RNA ~2,0 betragen (68). Proben, die diese Bedingung nicht erfüllten, wurden verworfen. Die Integrität der Proben wurde auf der Agilent 2100 Bioanalyser-Plattform nachgewiesen. Die RNA wurde unverzüglich weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Für die quantitative Analyse der Transkripte wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hiermit wird der erste Teil des sogenannten Two-Step-Verfahrens der Real-Time-PCR beschrieben. Als zweiter Schritt erfolgte dann die quantitative PCR. Um auf einen gleichmäßigen RNA-Gehalt von 500ng pro Probe zu gelangen, wurden die RNA-Proben mit RNase freiem Wasser verdünnt. Zur Eliminierung genomischer DNA-Reste wurde die RNA-Probe 5 Minuten bei 42°C mit gDNA Wipeout Puffer inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase, des Primer-Mix und des dNTP-haltigen Puffers auf Eis, fand die reverse Transkription bei Inkubation über 15 Minuten bei 42°C statt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben 3 Minuten auf 95°C aufgeheizt und anschließend direkt für die Real-Time-PCR weiterverarbeitet.

2.2.4.3 Real-Time-PCR

Um eine quantitative Aussage über die exprimierte mRNA zu machen, wurde ein Aliquot der transkribierten cDNA mittels Real-Time-PCR amplifiziert.

Die millionenfache Vervielfältigung selbst kleinster DNA Mengen wird mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) erreicht. Die isolierte DNA wird dafür in einen Reaktionsansatz gebracht, der Puffer, Nukleotide, Primer und eine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) enthält. Da die PCR bei unterschiedlichen

Temperaturen abläuft, wird sie in einem programmgesteuerten Heizgerät, einem Thermocycler, durchgeführt.

Ablauf der PCR:

Denaturierung: Durch Hitze von 95° kommt es zur Spaltung der doppelsträngigen cDNA.

Hybridisierung: Nach Abkühlung auf 60°C können sich die Primer komplementär an die einzelsträngigen cDNA-Stücke anlagern.

Polymerisierung: Die Taq-Polymerase ermöglicht bei 72°C die Elongation des cDNA-Strangs, ausgehend von den Primern. Sie läuft immer in 5'-3'-Richtung.

In jedem Zyklus dienen die zuvor neusynthetisierten DNA-Moleküle selbst als Matrizen, an denen sich Primer anlagern können. Durch n-faches zyklisches Durchlaufen dieser Temperaturschritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung der DNA.

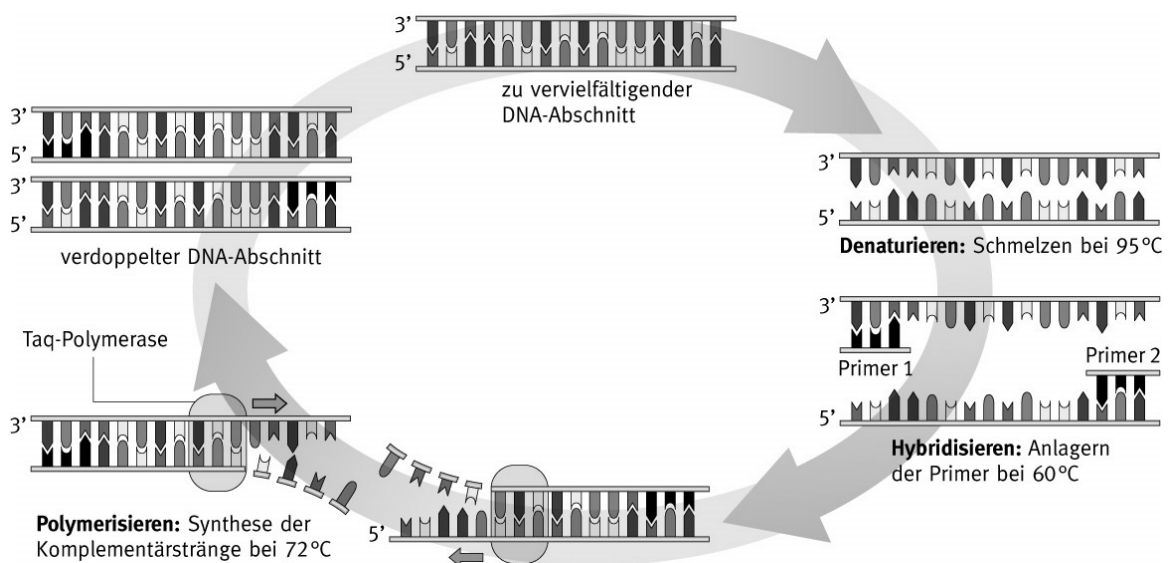


Abbildung 7 PCR-Schema

Aus Grüne Reihe, Schroedel Verlag. Materialien S II, Grafiken, Aufgaben und Praktikumsseiten. Braunschweig; 2000-2008 (69).

Im Gegensatz zur Real-Time-Reverse Transkriptase- (RT) PCR ist die ursprüngliche RT-PCR ein qualitatives Verfahren, das Aufschluss darüber gibt, ob eine durch Reverse Transkription in cDNA transkribierte RNA-Zielsequenz

überhaupt in einer Probe vorhanden ist. Die Real-Time-PCR ermöglicht die Echtzeitüberwachung, während die Polymerasekettenreaktion abläuft. Durch Markierung der Sonden mit Fluoreszenz-Farbstoffen kann der Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem die Amplifikation in ihrer exponentiellen Phase einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die Detektion dieses Wertes ermöglicht die Berechnung des Expressionsniveaus der RNA-Transkripte im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen, einem sogenannten Housekeeping-Gen.

Beta-Aktin als Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt (70)(71), wurde als Haushalts- (engl. Housekeeping) Gen gewählt.

Zur Analyse der Expression der Gene BAX, CYP3A4 und PXR wurde ein Primer-Sonden-Mix der Firma Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays) verwendet. Dieser enthält für die Zielsequenz spezifische Oligonukleotide mit einem 5'-FAM-Reporterfarbstoff, einem Minor-Groove-Binder (bindet an die kleine Furche der DNA), welcher die Schmelztemperatur erniedrigt, und einem 3'-Quencherfarbstoff, der die Fluoreszenz des räumlich benachbarten Reporterfarbstoffs unterdrückt (Abbildung 8.A). Bei Fortschreiten der Taq-Polymerase werden Quencher und Reporterfarbstoff zerteilt, wobei es zu einem Anstieg des Reporter-Fluoreszenzsignals kommt (Abbildung 8.B). Die Lösung der Fragmente vom DNA-Strang ermöglicht ein Weiterschreiten der Polymerisation des Stranges (Abbildung 8.C).

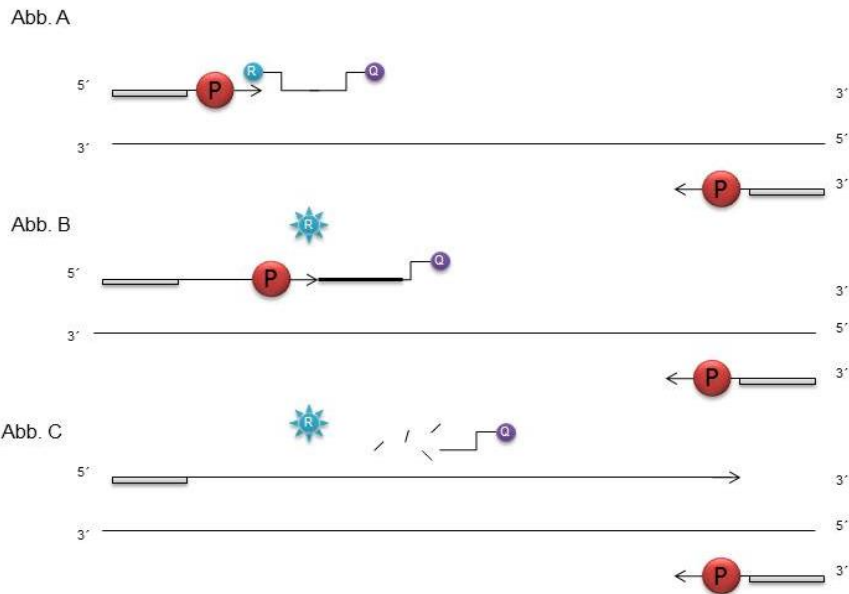


Abbildung 8 Fortschreiten der Polymerisation

Im intakten Zustand wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch Absorption durch den Quencher verdeckt, so dass kein Signal emittiert wird (Abb. A). Trennt die Polymerase während der DNA-Polymerisation den Quencher vom Fluorophorfarbstoff, so setzt der Fluorophor Energie frei, die photometrisch erfasst wird (Abb. B). Abb. C zeigt die Ablösung des Quenchers und die Verlängerung des Komplementärstrangs. Eigene Darstellung.

Die Real-Time-PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von 25µl auf 96-well-Platten durchgeführt.

Der verwendete TaqMan-Mastermix wurde entsprechend mit dem oben genannten Primer-Sonden-Mix angesetzt. Je Ansatz und Well wurden 2µl cDNA mit 23µl Mastermix geladen. Jede Reaktion wurde in dreifachem Ansatz ausgeführt. Im Thermo-Cycler C1000 erfolgte zunächst die Aktivierung der Polymerase 5 min bei 95°C. Die Denaturierung erfolgte 30 Sekunden bei 95°C, die Anlagerung der Primer 30 Sekunden bei 60°C, und die Elongation 30 Sekunden bei 70°C, wobei diese Schritte in 39 Zyklen durchlaufen wurden. Zur Inaktivierung wurde die Temperatur 5 Sekunden auf 50°C gesenkt.

Auswertung:

Drei Phasen kennzeichnen die Real-Time-PCR. In der ersten Phase sind die Bedingungen noch suboptimal, es kommt zu keiner signifikanten Amplifikation. Phase 2 beschreibt das Überschreiten des Schwellenwerts (C_t -Werts) und folgt

einer Exponentialfunktion. In Phase 3 kommt es durch Überproduktion der Kopien und Verbrauch der Substrate wieder zur Stagnation der Kurve. Ein frühzeitiges Überschreiten des C_t -Werts spricht für eine hohe Expression, wohingegen ein später Anstieg eine niedrige Expression signalisiert.

Um eine Aussage über die Expression zu machen, wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. Dabei wird der C_t -Wert des zu untersuchenden Gens vom C_t -Wert des Housekeeping-Gens abgezogen (ΔC_t -Wert) und zur Ermittlung des Genexpressionsunterschieds in die Formel $x = 2^{(\Delta C_t\text{-Wert})}$ eingesetzt.

Somit macht die RT-PCR keine absoluten Angaben über mRNA Mengen, sondern gibt nur eine Einschätzung im Vergleich zu konstitutiv exprimierten Genen.

2.2.5 Genexpressions-Analysen mittels Genchip

2.2.5.1 Beschreibung der Methodik des Genchips

Zur Aufklärung der durch Mitotane induzierten Genexpression wurde ein RNA-Microarray eingesetzt. Die Methode ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung mehrerer tausend Transkripte im Rahmen der humanen Genomanalyse (72). Bei diesem Experimentaufbau wurde ein Human-Genom-U133-Plus-2.0-Genchip von Affymetrix verwendet. Dieser hat 1.300.000 verschiedene Oligonukleotide als Sonden, von denen jeweils mehrere spezifisch für ein Transkript sind und die auf spezifischen Regionen, sogenannten „probe sets“, verteilt sind. An diese Sonden können dann komplementäre Basen, sogenannte „targets“ binden. Jedes „probe set“ besteht dabei aus 10-11 unterschiedlichen Sonden, die so zu 47.000 verschiedenen Transkripten komplementär sind.

Das Prinzip der „target“-Gewinnung für einen Expressionsarray aus Gesamt-RNA basiert auf einer RT-In-Vitro-Transkriptions-Reaktion (IVT), die auch als Eberwine-Reaktion bekannt ist (73). Diese Methode beinhaltet als ersten Schritt die Synthese von cDNA auf Grundlage der aus den Zellen gewonnenen mRNA durch reverse Transkription. Die cDNA dient nun als Template für die IVT, bei der unter Einbau von unmarkierten Nukleotiden und Biotin-markierten-

Nukleotiden cRNA (complementary RNA) hergestellt wird. Die IVT Reaktion stellt eine 30-100fache Amplifikation dar (74).

Daraufhin erfolgt eine Aufreinigung der cRNA zur Beseitigung ungebundener Nucleosidtriphosphate (NTPs), Salze, Enzyme und anorganischen Phosphats. Nach Fragmentierung der cRNA ist diese bereit zur Hybridisierung auf dem Genchip (vgl. Abbildung 9). Nach der Hybridisierung kann die gebundene Biotin-markierte-RNA durch Waschung mit Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin durch Fluoreszenz gemessen werden. Dabei ist das emittierte Licht bei 570nm proportional zu dem gebundenen „target“ an der entsprechenden Position des Arrays.

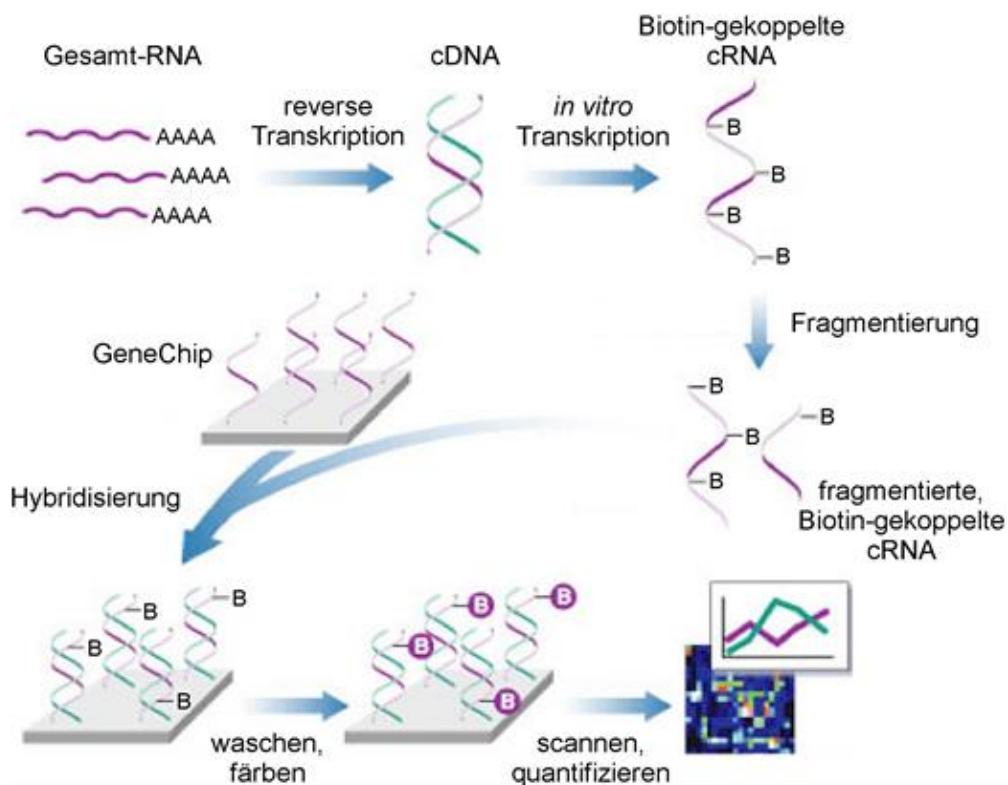


Abbildung 9 Übersicht über den Ablauf der Microarray-Genexpressionsanalyse

Aus Müller, 2007 (75).

NCI-H295-Zellen wurden in 6-well-Zellkulturplatten für 6 Stunden mit 0µM, 50µM und 100µM Mitotane inkubiert. Die RNA-Extraktion erfolgte wie oben beschrieben mit NucleoSpin RNA II von Macherey-Nagel oder mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Die weitere Verarbeitung, sowie die Markierung der Proben und die Hybridisierung auf einen HG-U133-2.0-Genchip-

Expressionsarray erfolgten durch Dr. Ellen Leich aus dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Würzburg als Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Rosenwald.

2.2.5.2 Auswertung des Genchips

Die Auswertung der Hybridisierungsdaten erfolgte durch die Genanalysesoftware Partek Genomics Suite. Die im Folgenden beschriebenen Anpassungen und Analysemöglichkeiten lassen sich im Rahmen des Programms festlegen.

Um ein Maß für die Expression der Menge der korrespondierenden RNA zu definieren, ist es notwendig die Probenintensitäten für jedes Probenaset zusammenzufassen. Dies geschieht durch RMA (robust multi-array analysis). Sie besteht aus Hintergrundanpassung, quantitativer Normalisierung und letztendlich der Summierung (76, 77). Weiterhin wurden die Proben einer „Batch Effect“-Entfernung unterzogen. Unter dem „Batch Effect“ versteht man nicht-biologische Abweichungen, also technische Fehler, wie abweichende Laborbedingungen oder Reagenzmengen. Dieser „Batch Effect“ kann zu falschen Ergebnissen führen, wenn er mit dem erwarteten biologischen Ergebnis korreliert. Durch Entfernung des „Batch Effect“'s kann eine höhere Verlässlichkeit der Daten zu den biologischen Veränderungen erzielt werden (78, 79). Die ermittelten Gendaten wurden einerseits anhand einer Zweistichproben-t-Statistik und andererseits anhand eines FDR (false discovery rate)-Tests statistisch ausgewertet. Die t-Statistik prüft, ob sich zwei untersuchte Gruppen systematisch in ihren Mittelwerten unterscheiden oder nicht. Dabei wird von einer t-Verteilung ausgegangen, d.h. die Daten können zwar normalverteilt sein, deren Varianz ist aber unbekannt. Die Genwerte sollten dabei mindestens eine Veränderung von 1,5 (fold 1,5) erfahren. Die FDR ist ein "nachsichtigerer" Test bei multiplen Hypothesen. Sie wurde von Benjamini et al. (80) entworfen und in den letzten Jahren vermehrt in der Microarraytechnologie angewendet. Die FDR gibt den α -Fehler an, also die falsch-positiven Ergebnisse. Bei dem normalen t-Test erhält man eine große Anzahl falsch-positiver Ergebnisse. Durch die FDR lässt sich dieser Anteil auf

eine bestimmte Prozentzahl festlegen. Um eine Liste regulierter Gene für die Pathway-(Signalwegs-)Analyse zu bestimmen, wurde eine FDR von 20% akzeptiert. Um die am signifikantesten richtig-positiv veränderten Gene zu finden, wurde die Stringenz auf eine FDR von 0,01 erhöht. Das bedeutet, dass in nur 1% der Fälle die Alternativhypothese fälschlicherweise angenommen wird. Dabei gibt die Alternativhypothese H_1 einen Unterschied zwischen den Proben an. Die Nullhypothese H_0 postuliert, dass die Mittelwerte der beiden Gruppen identisch sind. Wenn der wahre Zustand "H₀ trifft zu" ist, trifft man die falsche Entscheidung. Man begeht dann einen sogenannten Fehler 1. Art, dem die Wahrscheinlichkeit p (Signifikanzniveau, Irrtumswahrscheinlichkeit, p-Wert) zugeordnet ist (81).

Die durch die Partek[®]- Software gewonnenen Genlisten wurden dann einer Pathwayanalyse mit dem Genanalyse-Programm Webgestalt[®] (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>) (82) unterzogen. Weitere Prüfung der Ergebnisse geschah durch die Gene Set Enrichment Analysis (GSEA[®]) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) (83, 84), der freien Software Gorilla[®] (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) (85) und der Plattform Genego[®] von Thomson Reuters (<http://www.genego.com>) (86). Die gefundenen Gene wurden auf weitere Einzelverbindungen mit der String[®]-Datenbank (<http://string-db.org>) (87) untersucht und weitere Informationen über das Human Gene Compendium des Weizmann Institute of Science (<http://www.genecards.org>) (88) gewonnen.

2.2.6 Statistische Analysen

Die Resultate sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Mittels Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) wurden die Werte bei der PCR-Auswertung, dem Zelltod-ELISA, der Hormon- und FACS-Analyse miteinander verglichen. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau in allen Fällen mindestens auf p-Werte $< 0,05$ angesetzt. Die statistische Methodik im Rahmen des Partek Genomics Suite-Programms wird im Kapitel Genexpressions-Analysen mittels Genchip (S - 32 -) beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Mitotane auf die adrenokortikale Hormonsekretion und wichtige Steroidogeneseenzyme

Da das Nebennierenrindenzarzinom ein hormonproduzierender Tumor ist, wurde im ersten Schritt die Wirkung von Mitotane auf die Hormonsekretion untersucht.

Bei allen drei getesteten Hormonen (Cortisol, DHEAS, Androstendion) ließ sich eine Abnahme der Hormonsekretion nach 72 Stunden durch die Wirkung von 100µM Mitotane nachweisen (Abbildung 10).

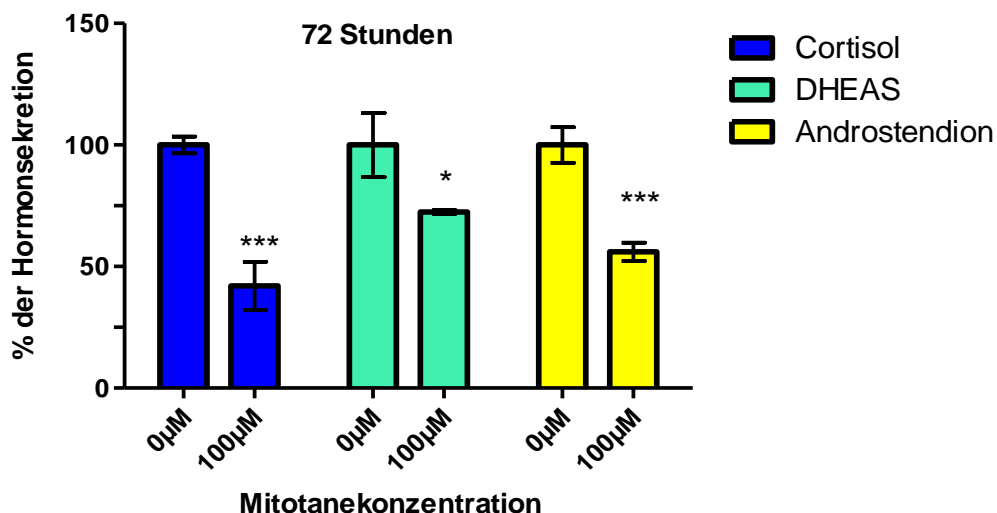


Abbildung 10 Effekt von Mitotane auf die Sekretion von Cortisol, DHEAS und Androstendion

Beeinflussung der Hormonsekretion von Cortisol, DHEAS und Androstendion nach Inkubation von NCI-H295-Zellen mit Mitotane über 72 Stunden. Erkennbar ist eine deutliche Reduktion aller Hormone nach Inkubation mit 100µM Mitotane. Ergebnis in % der Hormonsekretion der nicht behandelten Zellen, angegeben als Mittelwert ± SD.

Im Weiteren wurde besonderes Augenmerk auf die Wirkung von Mitotane auf die Cortisol-Sekretion gelegt.

Den Zeitverlauf betrachtend lässt sich feststellen, dass sich nach 24 Stunden mit der „therapeutischen“ Konzentration von 50µM (16,2 mg/l) eine Suppression der Cortisolsekretion um 33,4% im Vergleich zu nicht behandelten Zellen erzielen lässt. Noch deutlicher wird der Unterschied zwischen nichtbehandelten Zellen und mit Mitotane behandelten Zellen nach 72 Stunden. Im Gegensatz zu dem starken Anstieg im Vergleich zum 6-Stunden-Wert bei den unbehandelten NCI-H295-Zellen zeigt sich bei 100µM eine fast vollständige Suppression der Hormonsekretion (Abbildung 11) ($p < 0,001$).

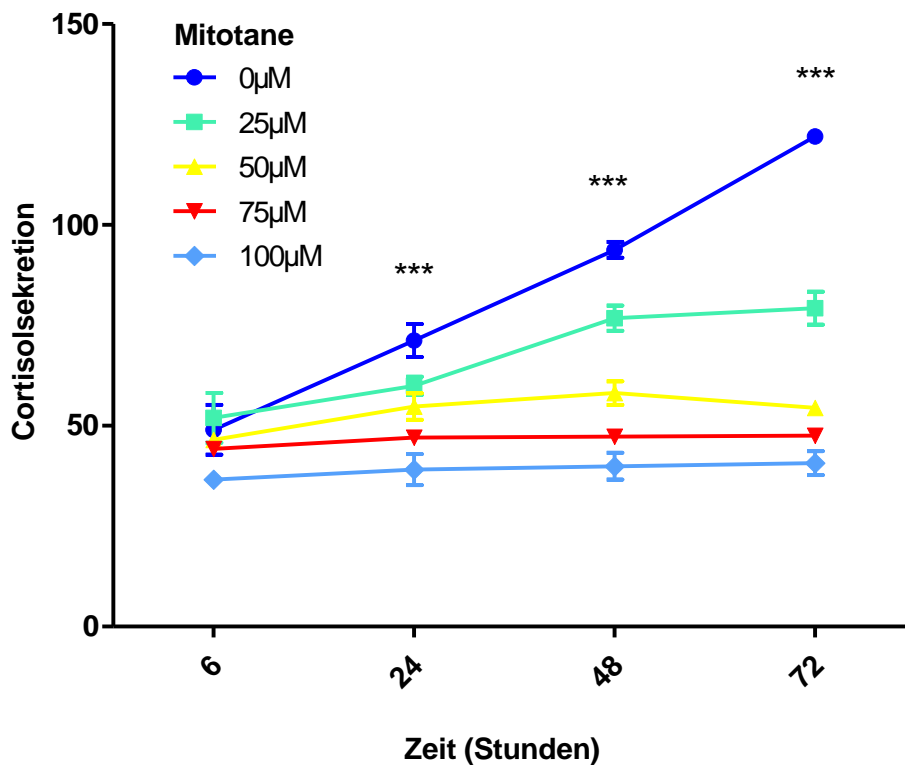


Abbildung 11 Suppression der Cortisolsekretion unter Mitotanetherapie

Die Cortisolsekretion wurde über einen Zeitraum von 6 bis 72 Stunden mit Konzentrationen von 0µM, 25µM, 50µM und 100µM Mitotane gemessen. Erkennbar ist die starke Suppression der Cortisolsekretion unter Mitotanebehandlung. Angegeben als Mittelwert \pm SD.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Hormonsekretion unter 100µM Mitotane auch schon zu früheren Zeitpunkten stattfindet (Abbildung 12). Schon nach 4 Stunden Inkubationszeit mit 100µM Mitotane zeigt sich eine Cortisol-Reduktion von 60,3% im Vergleich zu den nicht

behandelten Zellen. Nach 24 Stunden kam es bei den nicht behandelten NCI-H295-Zellen zu einem 5,7fachen Anstieg der Hormonsekretion im Vergleich zu dem 4-Stunden-Wert. In Relation dazu reduziert sich die Hormonsekretion nach 24 Stunden bei den mit 100µM Mitotane behandelten Zellen um 89% des Ausgangswertes. Auch diese Werte waren mit $p < 0,001$ hochsignifikant.

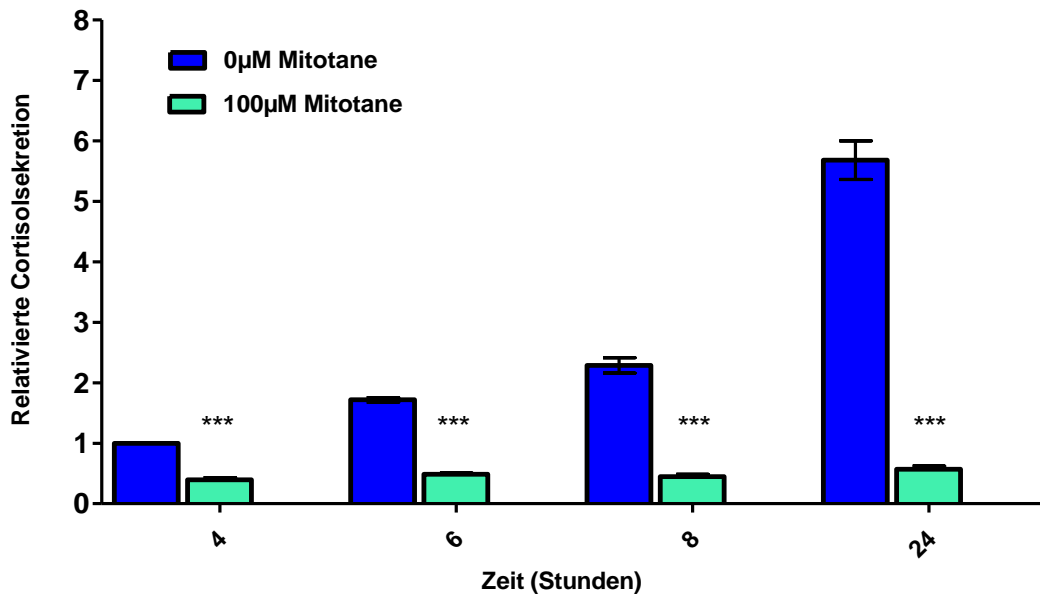


Abbildung 12 Relativierte Cortisolsekretion über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden

NCI-H295-Zellen wurden mit 100µM Mitotane inkubiert und die Hormonsekretion nach 4, 6, 8 und 24 Stunden gemessen. Die Grafik zeigt die mit 100µM Mitotane behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Der 0µM Wert der nicht behandelten Zellen wurde auf 1 relativiert. Werte angegeben als Mittelwert \pm SD.

Zusammenfassend sieht man in den NCI-H295-Zellen eine durch Mitotane induzierte konzentrations- und zeitabhängige Inhibition der Hormonsekretion.

Da es durch, dem Mitotane strukturell verwandten, o,p'-DDT zu einer Induktion von CYP3A4 in der Leber kommt und Cortisol über CYP3A4 zu 6-Beta-Hydroxycortisol metabolisiert wird, lag es nahe, dass auch Mitotane CYP3A4 induzieren könnte, was inzwischen als belegt gilt (48, 89). Entsprechend wurden die Gene CYP3A4 und PXR (Pregnan-X-Rezeptor) genauer betrachtet. CYP3A4 gehört zur Cytochrom P450-Superfamilie und ist wesentlich für die

Verstoffwechslung vieler Medikamente. Mitotane scheint über Bindung an den Pregnan-X-Rezeptor die Induktion von CYP3A4 in hepatischen Zellen zu bewirken (48).

Zunächst wurde zur Überprüfung dieser These die CYP3A4-Expression in mit Mitotane behandelten HepG2-Zellen untersucht. Wie sich Abbildung 13 entnehmen lässt, zeigen die behandelten HepG2-Zellen tatsächlich eine verstärkte CYP3A4-Expression.

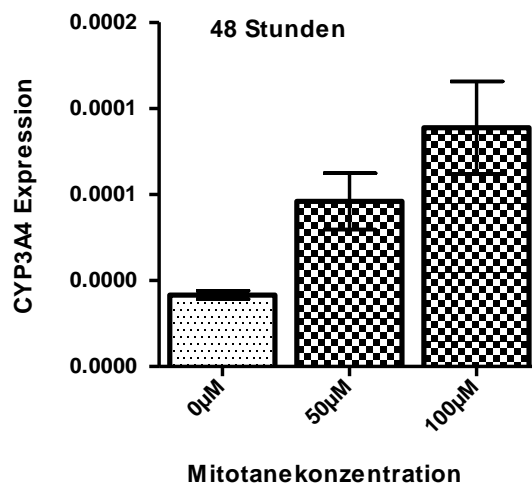


Abbildung 13 Wirkung von Mitotane auf die CYP3A4 Expression in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für 48 Stunden mit 50μM und 100μM Mitotane inkubiert. Im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (0μM) zeigt sich eine verstärkte Induktion von CYP3A4 durch Behandlung mit Mitotane. Werte angegeben als Mittelwert ± SD.

Um festzustellen, ob auch Nebennierenrindenzellen eine Mitotane-abhängige CYP3A4-Expression zeigen, wurde diese in NCI-H295-Zellen untersucht. Dabei wurden die Inkubationszeiträume den Genexpressionsexperimenten angepasst. Bei den Analysen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen mit 50μM Mitotane behandelten und unbehandelten NCI-H295-Zellen festgestellt werden, so dass von keiner maßgeblichen Beeinflussung ausgegangen werden kann. Einschränkend muss allerdings festgehalten werden, dass sowohl CYP3A4 als auch PXR in den NCI-H295-Zellen bei unseren Real-Time-PCR-Analysen nur niedrig exprimiert werden, was Abbildung 14 zu entnehmen ist.

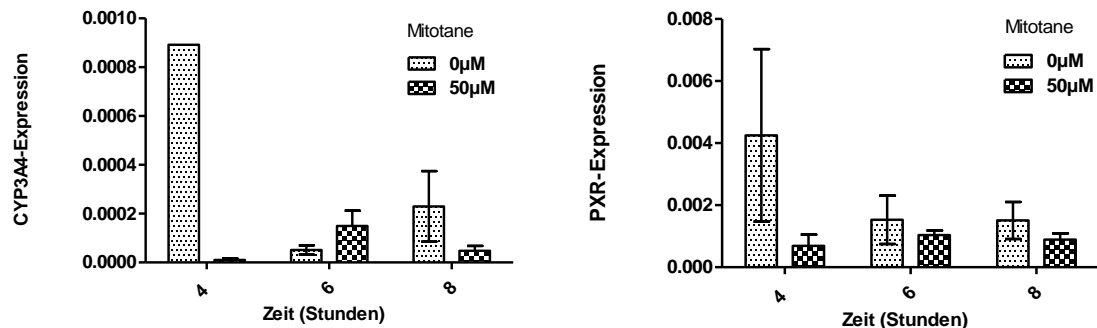


Abbildung 14 Expression von CYP3A4 und PXR unter Mitotaneinfluss

NCI-H295-Zellen wurden mit 50µM Mitotane inkubiert und die Hormonsekretion nach 4, 6 und 8 Stunden gemessen. Vergleich der mit 50µM Mitotane behandelten Zellen zu nicht behandelten Zellen, angegeben als Mittelwert \pm SD.

3.2 Einfluss von Mitotane auf das Zellwachstum der NCI-H295-Zellen

Apoptose gewährleistet im Organismus unter physiologischen Bedingungen die Gewebemöostase, die Funktion des Immunsystems und bildet die Grundlage für eine geregelten Embryogenese (90). Im Gegensatz zu diesen wichtigen biologischen Funktionen steht eine dysfunktionale Apoptose in Zusammenhang mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten. In übermäßiger Form führt sie zu Gewebsuntergang und Atrophie, eine Verringerung resultiert in unkontrollierter Zellproliferation, die typisch für Krebszellen ist (91). Das eingeschränkte Wachstum und der zunehmende Zelluntergang der NCI-H295-Zellen unter Mitotane-Inkubation deuten stark auf dessen zytotoxische Wirkung hin. Die Hypothese, ob Mitotane in den Zellen vor allem den programmierten Zelltod auslöst, wurde durch Durchflusszytometrie und Zelltod-ELISA überprüft.

Der Apoptosenachweis geschah im Durchflusszytometer durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) und Annexin V. Vitale Zellen zeigten sich sowohl PI- als auch Annexin V-negativ, sichtbar in der linken Bildhälfte beider Bilder in Abbildung 15. Im Rechteck im oberen rechten Quadranten sind die apoptotischen Zellen dargestellt.

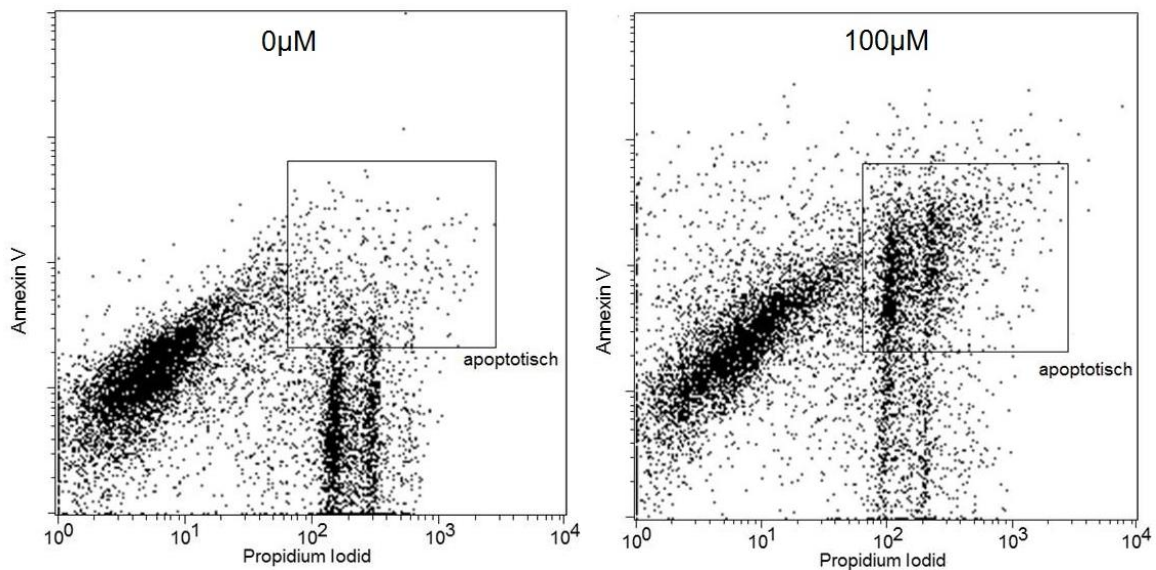


Abbildung 15 FACS-Zählung der Zellen nach Färbung mit Annexin V und PI

Vitale Zellen zeigten sich sowohl PI- als auch Annexin V-negativ, sichtbar in der Wolke in der linken Bildhälfte in beiden Bildern. Im unteren rechten Anteil befinden sich die Zellen im frühen Stadium der Apoptose. Der Anteil ist bei 100µM nur geringfügig. Die im Rechteck markierten Zellen befinden sich in der Spätphase der Apoptose und sind PI- und Annexin V-positiv. Inkubationszeit der NCI-H295-Zellen 24 Stunden mit 100µM Mitotane. Auswertung mit BD CellQuest Pro.

Da auch gesunde Zelllinien immer einen geringen Basiswert an apoptotischen Zellen aufweisen, wurden die Werte auf diesen Basiswert relativiert. Die Experimente zeigen sowohl einen zeitabhängigen als auch einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Apoptose nach Inkubation mit Mitotane. Nach 24 Stunden kommt es zu einer Zunahme der Apoptose um den Faktor 2,13 ($\pm 0,09$), nach 48 Stunden schon um den Faktor 3,22 ($\pm 0,05$, $p < 0,001$). Im Vergleich dazu beläuft sich der 72-Stunden-Wert mit 50µM Mitotane auf 1,92 ($\pm 0,08$) und der Kurvenverlauf ist insgesamt flacher. Bei 25 µM Mitotane ist im Vergleich zur Kontrolle keinerlei Unterschied zu erkennen.

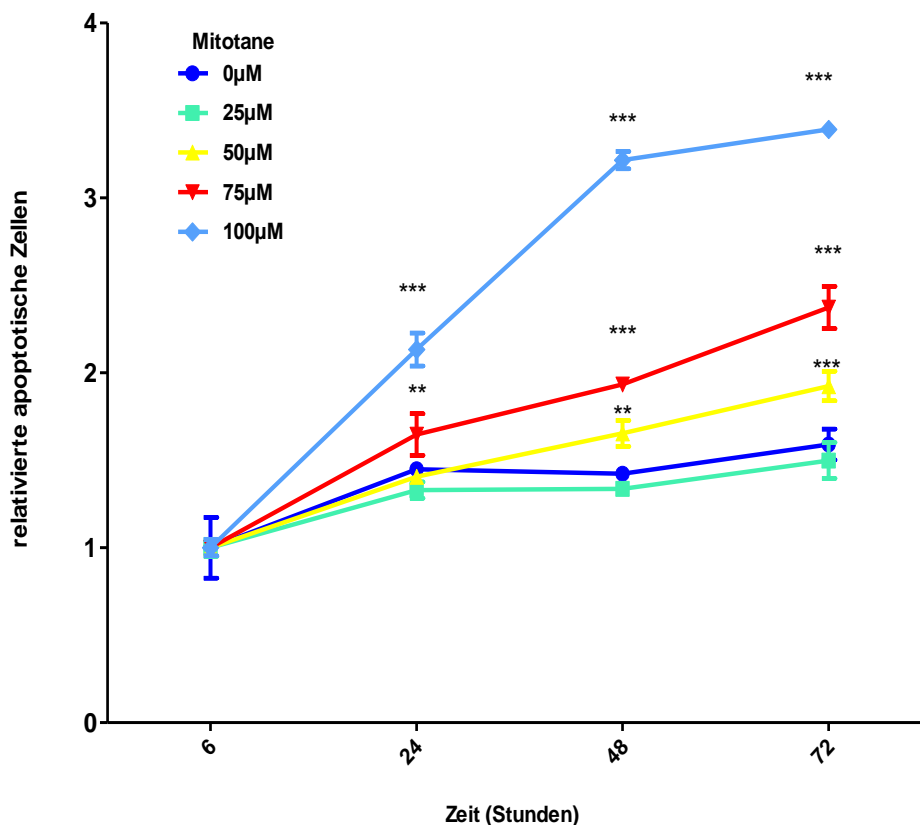


Abbildung 16 Effekt von Mitotane auf NCI-H295-Suspensionszellen im Durchflusszytometer

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Zahl der apoptotischen Zellen von der Mitotane-Konzentration. Im Durchflusszytometer lässt sich mit höherer Konzentration von Mitotane eine starke Zunahme der Apoptose feststellen. Mit niedriger Konzentration und langer Inkubation lassen sich ähnliche Effekte wie mit hohen Konzentrationen bei kurzer Inkubation erreichen. Weiterhin sieht man eine Abflachung der Kurve bei 100 μM nach 48 Stunden, welche den Zeitpunkt der maximalen Apoptose-Rate kennzeichnet. Daten angegeben als Mittelwert \pm SD, relativiert auf apoptotische unbehandelte Zellen.

Im Cell-Death-Detection-ELISA konnte die relativ hohe Apoptose-Induktion durch Mitotane bestätigt werden.

Es zeigen sich höhere Apoptose-Raten mit höherer Konzentration an Mitotane (Abbildung 17). Die höchste Apoptose-Rate wurde bei 100 μM Mitotane und 72 Stunden erreicht. Der Anstieg gegenüber dem 0 μM-Wert betrug das 2,72fache ($\pm 0,10$, $p < 0.001$). Obwohl sich vermuten ließe, dass nach 48 Stunden ein steilerer Anstieg als bei längeren Inkubationszeiten zu beobachten wäre, konnte dies nicht verifiziert werden. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass mit Einwirkzeiten über 72 Stunden bei 100 μM Mitotane keine höheren Apoptose-

Raten mehr erzielt werden können. Somit dürfte auch mit höherer Konzentration keine signifikante Zunahme zu erwarten sein.

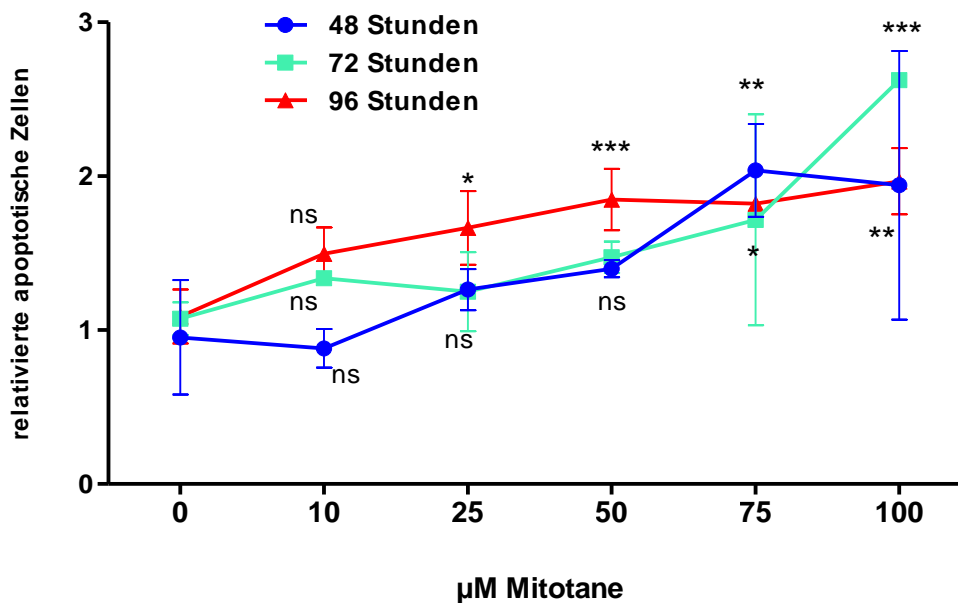


Abbildung 17 Apoptose-Induktion durch Mitotane dargestellt im Zelltod-ELISA

Die NCI-H295-Zellen wurden 48, 72 und 96 Stunden mit jeweils 0µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM und 100µM Mitotane inkubiert. Angaben wurden auf die Anzahl der nicht behandelten Zellen relativiert, welche der Apoptose unterlaufen sind. Wie sich auf der Grafik erkennen lässt, kommt es zu einem Anstieg der Apoptose unter Mitotane-Behandlung. Daten angegeben als Mittelwert \pm SD.

Mittels Real-Time-PCR wurde der mit den oben genannten unabhängigen Methoden gefundene Anstieg der Apoptose genauer untersucht. Dazu wurde das BAX-Gen als Apoptose-Aktivator ausgewählt. Es gehört der BCL-2-Familie an und leitet, durch den Tumorsuppressor p53 induziert, die Apoptose ein (88). Schon bei einer niedrigen Konzentration von 50µM Mitotane zeigten die NCI-H295-Zellen eine deutliche Zunahme der BAX-Expression (Abbildung 18).

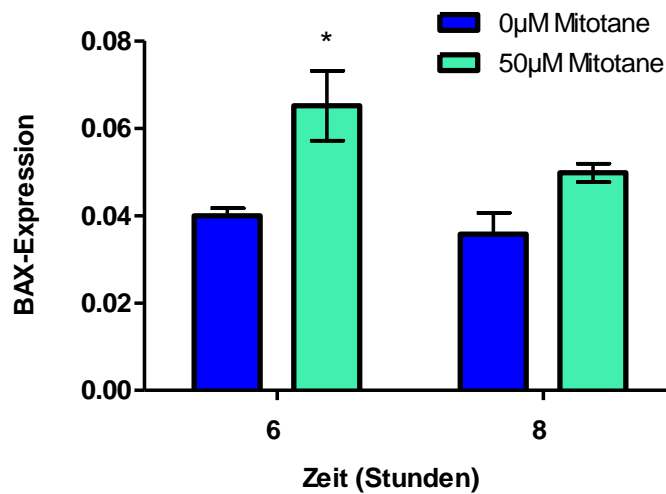


Abbildung 18 Bax-Genexpression unter Behandlung mit 50µM Mitotane

Effekt von Mitotane auf die BAX-Expression der NCI-H295-Zellen.
 Inkubationszeit mit 50µM Mitotane für 6 und 8 Stunden. Daten angegeben als
 Mittelwert ± SD.

Unter Verwendung von 100µM Mitotane kommt es nach 8 Stunden zu einer um 212% verstärkten Expression im Vergleich zum 0µM Wert ($p < 0.01$). Diese Expressionszunahme reduziert sich auf 175% nach 24 Stunden Inkubation ($p < 0.001$) (Abbildung 19).

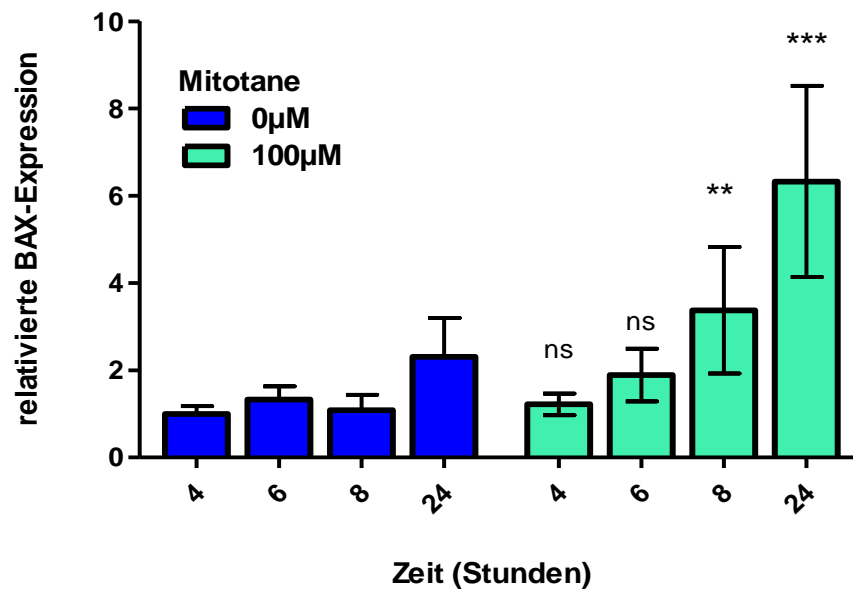


Abbildung 19 BAX-Genexpression unter Behandlung mit 100µM Mitotane

Wie auf der Grafik zu erkennen ist, kommt es zu einer verstärkten Expression des BAX-Gens durch 100µM Mitotane. Inkubationszeiten betragen 4,6,8 und 24 Stunden. Man erkennt eine deutliche zeitabhängige Amplifikationszunahme. Daten angegeben als Mittelwert \pm SD.

3.3 Veränderungen des "Transkriptom" der NCI-H295-Zellen durch Mitotane

Um die molekularen Veränderungen, die durch Mitotane in NNR-Karzinomzellen induziert werden, genauer aufzuklären, wurden nun Genchip-Analysen durchgeführt. Um Veränderungen im gesamten "Transkriptom" zu erfassen, wurden die NCI-H295-Zellen mit und ohne Mitotane behandelt und die Expressionsveränderung mittels HG-U133-plus-2.0-Expressionsarray untersucht.

Qualitätskontrollen

Einen Anhalt für die Qualität der Proben liefert das von der Parteksoftware erstellte Histogramm. Es stellt eine 2D-Ansicht der Verteilung der Daten dar. Jede Linie repräsentiert dabei eine Probe. Auf der x-Achse wird die Intensität der Proben aufgezeichnet, die y-Achse zeigt die Frequenz der Probenintensität. So kann man Ausreißer in den Proben erkennen. Das Datenset im Histogramm der NCI-H295-Proben zeigt eine regelmäßige Verteilung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es keine augenscheinlichen Ausreißer gibt und die Qualität der Proben gut ist.

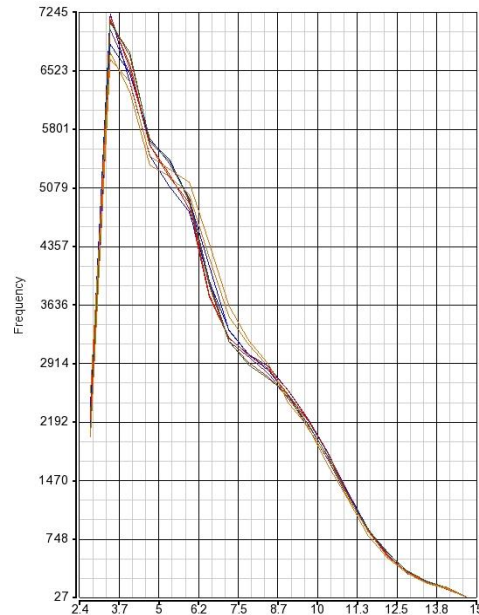


Abbildung 20 Histogramm der NCI-H295-Proben

Darstellung der Intensität der Proben auf der x-Achse, die y-Achse zeigt die Frequenz der Probenintensität. Jede Linie repräsentiert eine Probe. Es finden sich keine auffälligen Ausreißer.

Wie erwartet zeigte sich bei vielen Genen eine unterschiedliche Expression zwischen den mit Mitotane behandelten Nebennierenrindenzellen und den unbehandelten Nebennierenrindenzellen. Wie im Methodenteil beschrieben wurden einerseits Genlisten mit einer Mindestveränderung von 1,5 (fold 1,5) angefertigt, andererseits eine Sortierung mit Hilfe der false discovery rate (FDR) durchgeführt. Die FDR ist eine Signifikanzkorrektur und grenzt den Anteil falsch positiver Ergebnisse in dieser Analyse auf 1% ein. Von den 54.675 veränderten Genen waren durch die Inkubation mit Mitotane 1.975 Gene mindestens um den Faktor 1,5 (fold 1,5) verändert. Bei 50 μ M Mitotane waren dies 567 Gene. 108 dieser Gene zeigten bei beiden Konzentrationen eine veränderte Expression in die gleiche Richtung. Die Veränderungen beziehen sich sowohl auf herauf als auch auf herab regulierte Gene. Bei der zusätzlichen Einstellung der statistischen Methodik auf die FDR reduziert sich die Genliste

auf 1791 Gene bei 100 μ M vs. 0 μ M Mitotane bzw. auf 312 Gene bei 50 μ M vs. 0 μ M Mitotane. Die Zahl der gemeinsamen Gene (100 μ M vs. 0 μ M und 50 μ M vs. 0 μ M) belief sich auf 61 Gene. Erkennbar ist dies im Venn-Diagramm in Abbildung 21.

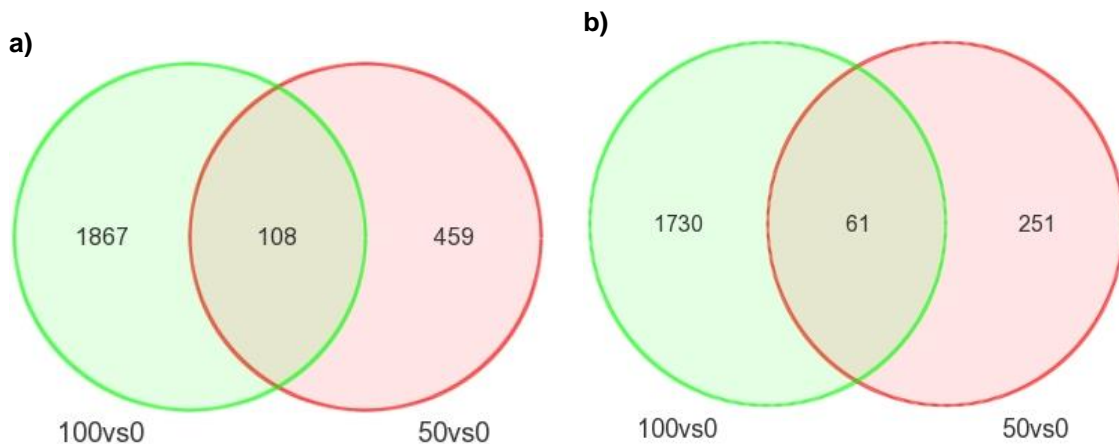


Abbildung 21 In ihrer Expression veränderte Gene bei 50 μ M und 100 μ M Mitotane

- a) **Gene mit 1,5facher Veränderung:** Es finden sich 1975 Gene, die bei 100 μ M vs. 0 μ M verändert sind. Bei 50 μ M vs. 0 μ M finden sich 567 veränderte Gene. 108 Gene sind bei beiden Konzentrationen gemeinsam verändert.
- b) **Zusätzliche Einschränkung auf eine FDR von 0,01:** 1791 Gene sind bei 100 μ M vs. 0 μ M verändert. 312 Gene erfahren eine veränderte Expression bei Behandlung mit 50 μ M Mitotane. 61 Gene sind bei beiden Konzentrationen verändert.

Die Entfernung des sogenannten Batch-Effektes (siehe Methoden, S. - 19 -), erbrachte keine Genlistenveränderung, was die Robustheit der Daten bestätigt. Wegen des großen Umfangs der Genlisten werden exemplarisch die am meisten veränderten Gene und die gemeinsamen Gene tabellarisch im Anhang aufgeführt. Ein Auszug findet sich in der unten dargestellten Tabelle 7. Tabelle 8 zeigt diese Daten mit Einbeziehung der FDR.

Mittels Real-Time-PCR-Analysen wurden ausgewählte Gene (GDF15, DUSP4, TRIB3, CHOP, SQLE, LDLR, SCD, SREBF1 und ABCG1) untersucht und es zeigte sich eine gute Korrelation zu den Genchip-Ergebnissen. Dies geschah unabhängig im Rahmen der Dissertation von Felix Gardill, Doktorand an der Medizinischen Klinik I, Endokrinologie und wird hier daher nicht ausführlich besprochen.

Gen-Symbol	Gen Titel	p-Wert (100µM vs. 0µM)	p-Wert (50µM vs. 0µM)	Änderung 1,5fach (100µM)	Änderung 1,5fach (50µM)
GDF15	growth differentiation factor 15	0.03176	0.20557	7.558	1.540
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	0.00569	0.04564	6.674	1.509
SP8	Sp8 transcription factor	0.08920	0.14168	2.528	1.560
ARG2	arginase, type II	0.07380	0.11811	2.350	1.509
PLEKHG1	pleckstrin homology domain containing, family G	0.01958	0.01144	2.332	2.024
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	0.09482	0.11020	2.120	1.545
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	0.10496	0.11839	2.082	1.540
B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2	0.07013	0.06149	1.865	1.528
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	0.02053	0.01310	1.808	1.602
PAQR9	progesterin and adipoQ receptor family member IX	0.19652	0.04175	1.775	2.462
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	0.00154	0.00091	1.710	1.555
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	0.03832	0.01959	1.676	1.590
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	0.12721	0.03255	1.657	1.980
SESN3	sestrin 3	0.30536	0.21615	1.639	1.505
SQLE	squalene epoxidase	0.06582	0.03330	-1.647	-1.577
PCNX	pecanex homolog (Drosophila)	0.15608	0.12940	-1.838	-1.542
HYMAI	hydantidiform mole associated and imprinted	0.31953	0.16472	-1.850	-1.890
C15orf29	chromosome 15 open reading frame 29	0.17342	0.13633	-2.030	-1.686
RTN4R	reticulon 4 receptor	0.01541	0.01826	-2.135	-1.552
C20orf112	chromosome 20 open reading frame 112	0.00158	0.00151	-2.145	-1.637
TXNIP	thioredoxin interacting protein	0.02324	0.01863	-2.206	-1.752
JAKMIP1	janus kinase and microtubule interacting protein 1	0.10693	0.12198	-2.250	-1.606
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	0.10322	0.14879	-2.279	-1.517
AQP11	aquaporin 11	0.05855	0.08271	-2.300	-1.544
LDLR	low density lipoprotein receptor	0.00963	0.01085	-2.311	-1.646
FOXO6	forkhead box O6	0.09784	0.09507	-2.326	-1.721
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	0.04478	0.04143	-2.534	-1.845
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0.02798	0.04033	-2.615	-1.651
KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	0.07471	0.12173	-2.712	-1.608
MMRN2	multimerin 2	0.09259	0.15007	-2.965	-1.671
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.00058	0.00066	-3.160	-1.977
ELOVL3	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	0.05115	0.11637	-3.387	-1.623
SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	0.05485	0.19236	-5.964	-1.706
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0.003375	0.00353	-7.661	-3.519

Anm.: Herabregulierte Gene sind blau dargestellt, heraufregulierte Gene sind rot dargestellt.

Tabelle 7 Auszug aus der Liste der meist veränderten gemeinsamen Gene von 50µM vs. 0µM und 100µM vs. 0µM, die mindestens eine 1,5fache Veränderung erfahren

Gen-Symbol	Gen Titel	p-Wert (100µM vs. 0µM)	p-Wert (50µM vs. 0µM)	Änderung 1,5fach (100µM)	Änderung 1,5fach (50µM)
GDF15	growth differentiation factor 15 /// similar to growth differentiation factor 15	5.53E-06	0.01850	7.559	1.540
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	3.00E-08	0.00022	6.675	1.509
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	3.06E-05	0.25589	3.970	1.168
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	1.56E-05	0.07680	3.693	1.248
PLEKHG1	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	1.26E-06	3.72E-06	2.332	2.023
B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2	6.54E-05	0.00055	1.865	1.528
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	1.45E-06	5.58E-06	1.808	1.602
PAQR9	progesterin and adipoQ receptor family member IX	0.00196	0.00017	1.775	2.462
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	5.93E-10	1.91E-09	1.710	1.555
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	9.89E-06	1.86E-05	1.676	1.590
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	0.00045	8.41E-05	1.657	1.980
AG2	protein Ag2 homolog	0.00184	0.00014	1.599	2.123
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	0.00281	0.00021	1.542	2.024
ETV1	ets variant 1	0.00024	0.00020	1.505	1.527
MYO10	myosin X	1.46E-05	1.24E-05	-1.511	-1.529
SNORD114-3	small nucleolar RNA, C/D box 114-3	0.00019	3.52E-05	-1.511	-1.760
COL27A1	collagen, type XXVII, alpha 1	0.00021	0.00011	-1.552	-1.642
SQLE	squalene epoxidase	5.35E-05	9.00E-05	-1.647	-1.577
MSI2	Musashi homolog 2 (Drosophila)	4.03E-05	0.00012	-1.760	-1.594
LDLR	low density lipoprotein receptor	4.23E-05	0.00052	-1.994	-1.552
RTN4R	reticulon 4 receptor	6.08E-07	1.50E-05	-2.135	-1.552
C20orf112	chromosome 20 open reading frame 112	6.39E-10	8.75E-09	-2.145	-1.637
TXNIP	thioredoxin interacting protein	2.13E-06	1.60E-05	-2.206	-1.752
LDLR	low density lipoprotein receptor	1.47E-07	3.18E-06	-2.311	-1.646
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	1.60E-05	0.000172	-2.534	-1.845
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	3.75E-06	0.000159	-2.615	-1.651
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	3.20E-11	7.39E-10	-3.160	-1.977
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	6.21E-09	1.10E-07	-7.661	-3.519

Anm.: Herabregulierte Gene sind blau dargestellt, heraufregulierte Gene sind rot dargestellt.

Tabelle 8 Auszug aus der Liste der meist veränderten gemeinsamen Gene von 50µM vs. 0µM und 100µM vs. 0µM, die mindestens eine 1,5fache Veränderung erfahren; mit zusätzlichem Einbezug einer FDR von 0,01

Beim genaueren Betrachten der Genlisten sieht man nicht nur eine hohe Ähnlichkeit im Allgemeinen, sondern speziell auch bei den Genen, die die statistisch signifikantesten Änderungen aufweisen. Auch die Tatsache, dass diese Gene nach der Auswertung mit der FDR konstant blieben, spricht für eine tatsächliche Veränderung dieser Gene. Da die Konstanz der Daten sich bestätigte, wurden sie mehreren Pathway-Analysen unterzogen. Diese ergaben auch beim Einsatz unterschiedlicher Programme die gleiche Kernaussage: starke Überexpression von proapoptotischen Genen (z.B. BAX, GDF15, DUSP4, TRIB3, CHOP) bei gleichzeitiger Suppression von Genen, die eine Rolle in der Steroidbiosynthese (z.B. SQLE, LDLR, SCD, SREBF, ABCG1) spielen. Dabei zeigten sich Änderungen der Apoptose einleitenden Genen maßgeblich in den mit 100µM Mitotane inkubierten Zellen, während die Veränderungen bei 50µM Mitotane weniger ausgeprägt waren. Der Eingriff in den Cholesterintransport und die Steroidbiosynthese ließ sich bei beiden Konzentrationen in ähnlicher Prägnanz feststellen.

Im Rahmen der Analyse wurden besonders die Hauptenzyme der Steroidbiosynthese genauer betrachtet. Dabei zeigte sich unter Behandlung mit 100µM Mitotane eine Suppression der Cholesterin-Monooxygenase (P450_{scc}, CYP11A1) um den Faktor 1,54, der 3βHSD1 um den Faktor 1,71, der Steroid-17alpha-Hydroxylase (CYP17) um den Faktor 1,45, der Steroid-21-Hydroxylase (CYP21) um den Faktor 1,14 und der Steroid-11beta-Hydroxylase 1 (CYP11B1) um den Faktor 1,18. Die Steroid-11beta-Hydroxylase 2 (CYP11B2) zeigte mit einer Expression von -1,05 nahezu keine Änderung bei Mitotanebehandlung.

GSEA[®] Gengruppen-Anreicherungs-Analyse

Die gene set enrichment analysis (GSEA) entscheidet, ob bei einem definierten Genset statistisch übereinstimmende Unterschiede zwischen zwei biologischen Zuständen herrschen. Dabei ordnet das Programm die Gene verschiedenen biologischen Funktionen und Vorgängen zu. So kann eine erste grobe Zuordnung der gefundenen Gene erfolgen. Neben dem Enrichment-Score, der angibt zu welchem Grad ein Gen auf einer aufgereihten Genliste überrepräsentiert ist, erstellt die GSEA auch eine sogenannte „Heat Map“.

Diese „Heat Map“ gibt anhand einer Farbskala an, ob ein Gen stark oder weniger stark exprimiert wird. Rot steht dabei für eine Überexpression, blau für eine verringerte Expression. Die Palette der Farben (rot, hellrot, hellblau, blau) zeigt die Spannbreite der Expression von hoch, moderat, niedrig bis sehr niedrig an.

Beispielhaft sieht man in Abbildung 22 am „Lipid Metabolic Process“ die Gene, welche am Fettstoffwechsel beteiligt sind. Bei Betrachtung des ABCG1-Gens (letzte Zeile in der Abbildung) sind bei 0 μ M (gelbe Sparte) drei rote Kästchen, bei 100 μ M (graue Sparte) drei blaue angezeigt. Dies bedeutet, dass das ABCG1-Gen herunter reguliert wurde. Dass alle drei Proben gleichmäßig verändert sind, spricht für die Probenqualität.

Auch bei Betrachtung von LDLR, also dem LDL-Rezeptor, und SREBF1 lässt sich eine gleichmäßige Suppression erkennen.

Diese drei Gene finden sich alle in der Tabelle der meist veränderten gemeinsamen Gene von 50 μ M vs. 0 μ M und 100 μ M vs. 0 μ M auf S.- 47 - wieder.

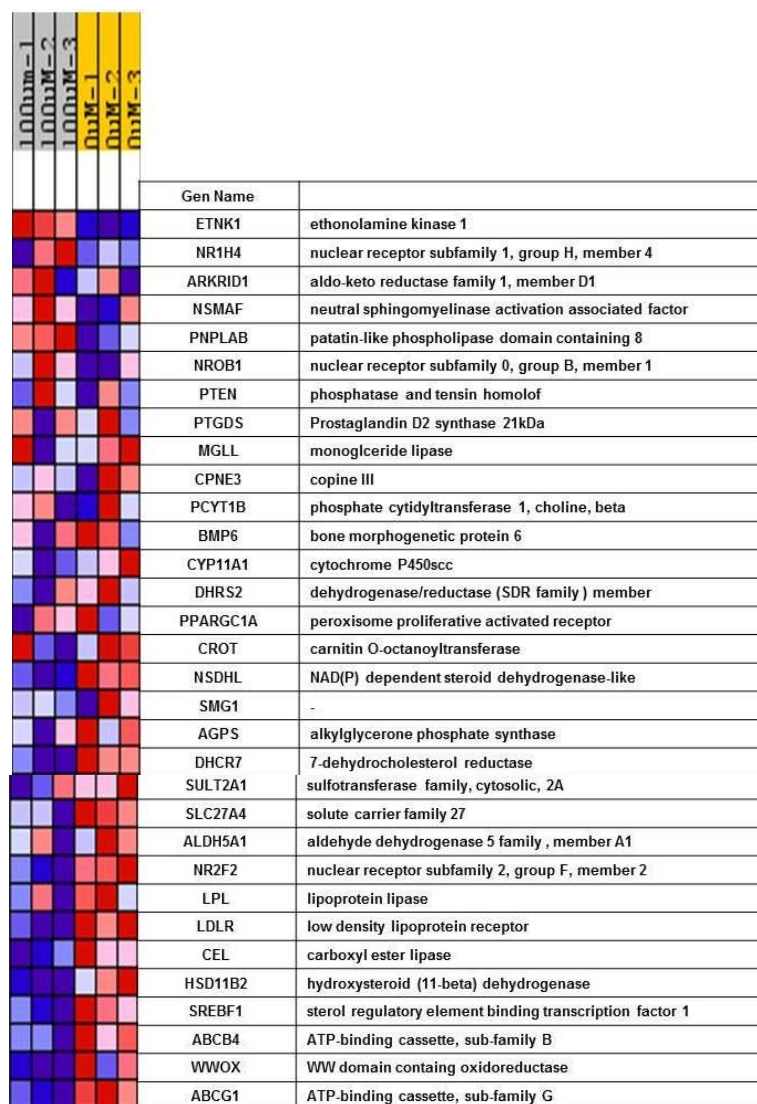


Abbildung 22 GSEA Heat Map: Lipid Metabolic Process

Als Beispiel zeigt hier die Heat Map die am „Lipid Metabolic Process“, also dem Fettstoffwechsel, beteiligten Gene, welche in den Microarray-Analysen bei 100µM Mitotane verändert waren. In einer Heat Map werden die Expressionswerte als Farben wiedergegeben. Die Palette der Farben (rot, hellrot, hellblau, blau) zeigt die Spannbreite der Expression von hoch, moderat, niedrig bis sehr niedrig an. Wenn die Farbe bei einer Konzentration im gleichen Farbschema bleibt, ist dies ein Zeichen für die Reliabilität der Proben. Beispielsweise sieht man beim ABCG1-Gen (unterstes Gen in der Auflistung) bei allen drei 100µM-Proben eine blaue Einfärbung, sprich das Gen wird herab reguliert. Im Gegensatz dazu zeigt die Heat Map der 0µM Triplikate eine rote Färbung. Die Genexpression des ABCG1-Gens im Vergleich zum unbehandelten Zustand zeigt also eine konstante Herabregulierung.

Webgestalt® Gengruppenanalyse

Eine andere, graphisch deutlichere Verarbeitung erlaubt die Webgestalt®-Software. Sie erstellt anhand der eingespeisten Genlisten Baumdiagramme. Diese beginnen mit umfangreichen Einordnungen: in biologische Prozesse, molekulare Funktionen sowie zelluläre Komponenten und gliedern sich dann in immer spezifischere Unterpunkte. Die „Probeset IDs“ der eingespeisten Gene werden u.a. anhand der Gene Ontology, der weltweiten Ontologie-Datenbank, annotiert und sind der Ausgangspunkt der genannten Unterteilungen.

Auch hier wurden jeweils für die verschiedenen Konzentrationen und für die verschiedenen statistischen Mittel Genlisten übermittelt. Diese werden in die Kategorien biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Kompartimente eingeteilt. Die entstandenen Baumdiagramme sind im Anhang abgebildet. Dabei sieht man auf dem Diagramm Abbildung 32 (S.- 93 -) die große Anzahl der durch 100 μ M Mitotane regulierten Gene, die in apoptotische Vorgänge involviert sind. So lassen sich 107 Gene der Untergruppe programmierter Zelltod zu ordnen. Außerdem sind viele Gene assoziiert mit der negativen Regulation von Zellabläufen und einer Hemmung der Transkriptionsaktivität. Weitere 20 Gene sind direkt mit dem Vorgang „Ubiquitin-Protein-Ligase“ verbunden. Diese Enzyme spielen durch Markierung mit Ubiquitin eine wichtige Rolle bei der Proteindegradation zur Instandhaltung der Zelle. Die Genexpression unter 50 μ M Mitotane zeigt eine weniger starke Ausprägung zellhemmender Einflüsse (Abbildung 33, S.- 94 -). Hier sieht man vor allem das Überwiegen metabolischer Prozesse, allem voran des Steroidmetabolismus (10 Gene). Auffällig ist auch der separate Zweig, der mit der Stearoyl-CoA-Desaturase-(SCD)-Aktivität zusammenhängt. Das SCD-Gen, welches für die Stearoyl-CoA-Desaturase codiert, wird später ausführlich beschrieben. Weiterhin sieht man bei der Aufteilung in zelluläre Komponenten allein 18 Gene, die im endoplasmatischen Retikulum wirken, 3 in den Mitochondrien, 22 in der Plasmamembran.

Werden nur die Gene analysiert, die durch 50 μ M und 100 μ M Mitotane konkordant verändert wurden (Abbildung 34, S. - 95 -), zeigen sich 4 Gene, die mit dem Cholesterin-Metabolismus zusammenhängen, 3 weitere mit der

Cholesterin-Homöostase. Auffällig ist auch hier die schon zuvor aufgefallene starke Präsenz des endoplasmatischen Retikulums als wichtiges Organell (hier mit 8 Genen). Weitere wichtige Zellkompartimente scheinen die Plasmamembran und das Mitochondrium zu sein. Diesen Komponenten wurden bei den gemeinsamen Genen 7 und 3 Gene zugeordnet.

Die zugeordneten Gene wurden zur Analyse genauer betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass den zugeordneten Genen auch die am deutlichsten veränderten Gene zugewiesen wurden.

GORilla[®] Gene Ontology Datenbank-Analyse

Weiterhin wurde eine Einordnung der GO- (Gene Ontology) Bezeichnungen mit der freien Software GOrilla[®] (Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool) angefertigt. Auf diese Weise werden GO-Begriffe aufgedeckt, die den am stärksten veränderten Genen zugeordnet werden können. Das Ergebnis der Anreicherungsanalysen wird dabei in eine hierarchische Struktur gebracht und erlaubt eine direkte Übersicht über die Verbindungen der einzelnen GO-Begriffe. Weiterhin können Baumdiagramme, ähnlich denen der Webgestalt[®]-Software, unter folgenden Aspekten erstellt werden: "Zelluläre Komponente", "Biologischer Prozess" und "Molekulare Funktion". Auch hier zeigte sich eine Dominanz der in die Apoptose und in den Steroidmetabolismus involvierten Gene. Beispielhaft wird in Abbildung 23 ein Ausschnitt aus dem Baumdiagramm "Biologischer Prozess" gezeigt. So findet sich, wenn man sich die zugeordneten Gene in der Onlineversion der Plattform ansieht, bei Anklicken des Kästchens „regulation of lipid metabolic process“ wieder das oben genannte Gen ABCG1.

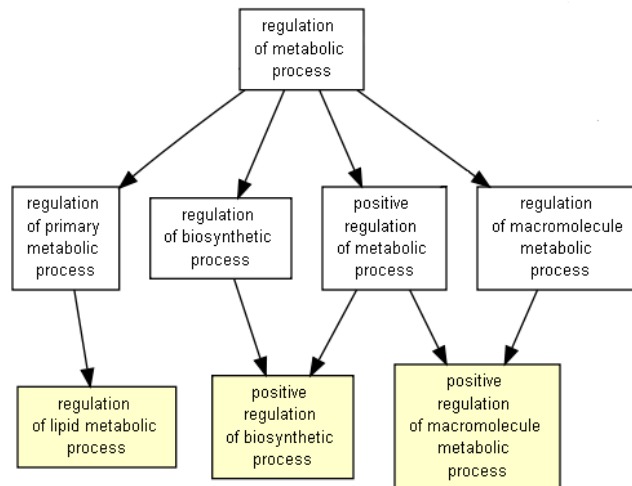


Abbildung 23 Ausschnitt des Baumdiagramms "Biologischer Prozess" der GOrilla[®]-Software

Gezeigt ist ein Ausschnitt des "Biologischer Prozess"-Baumdiagramms, welches die Regulation metabolischer Prozesse anzeigt. Jedes Kästchen kann in der Software angeklickt werden und zeigt dann die eingeordneten Gen-Namen an. So wird bei Betrachtung des Kästchens „regulation of lipid metabolic process“ unter anderen das Gen ABCG1 angezeigt.

String[®] Funktionelle Proteininteraktionen-Analyse

Um die Interaktion der vielen durch Mitotane veränderten Gene zu untersuchen, wurde eine sog. String[®]-Analyse durchgeführt. Hierbei wird bei vorab definierten Genen untersucht, ob sie in einem direkten Zusammenhang zueinander stehen. Dabei ist Interaktion allerdings nicht nur biochemisch (physikalisch bzw. funktionell) definiert, sondern es werden zum Beispiel auch Interaktionen gewertet, die "nur" auf einer gemeinsamen Nennung in einer Publikation beruhen. Abbildung 24 zeigt beispielhaft die Interaktionen zwischen den hoch exprimierten Genen GDF15, DUSP4 und CHOP. Auffällig dabei ist die zu allen drei Genen in Kontakt stehende MAP-Kinase MAPK8 (auch JNK genannt). Der moosgrüne Pfad bedeutet, dass die Gene in gleichen Literaturtexten erwähnt werden.

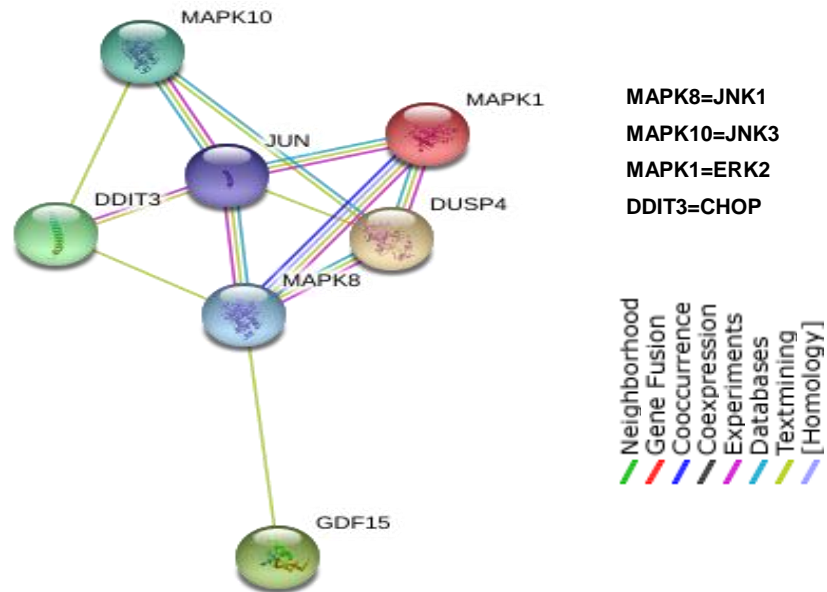


Abbildung 24 GDF15, DUSP4 und CHOP

Die Grafik zeigt die physikalischen und funktionalen Verbindungen zwischen GDF25, CHOPO und DUSP4. Die verschiedenen Farben der Linien stehen jeweils für den Nachweis der Verbindung und sind unten rechts im Bild erklärt. Bezogen von (<http://string-db.org>) am 03.07.11.

Ungleich komplexer wird die Grafik, wenn man die Liste der durch die Webgestalt-Analysen gefundenen Gene zum programmierten Zelltod (Abbildung 25) einspeist.

So sind im Zentrum der Grafik Gene dargestellt, welche besonders viele Interaktionen zeigen. Beispielsweise sind dort GDF15, JUN, MAPK8, MAPK1, DDIT3 und DUSP4 dargestellt. In der Peripherie abgebildete Gene zeigen nur einzelne Verbindungen. Die Darstellung macht die Vielfalt der Verbindungen deutlich und liefert gleichzeitig Ansätze für weitere Literaturrecherchen.

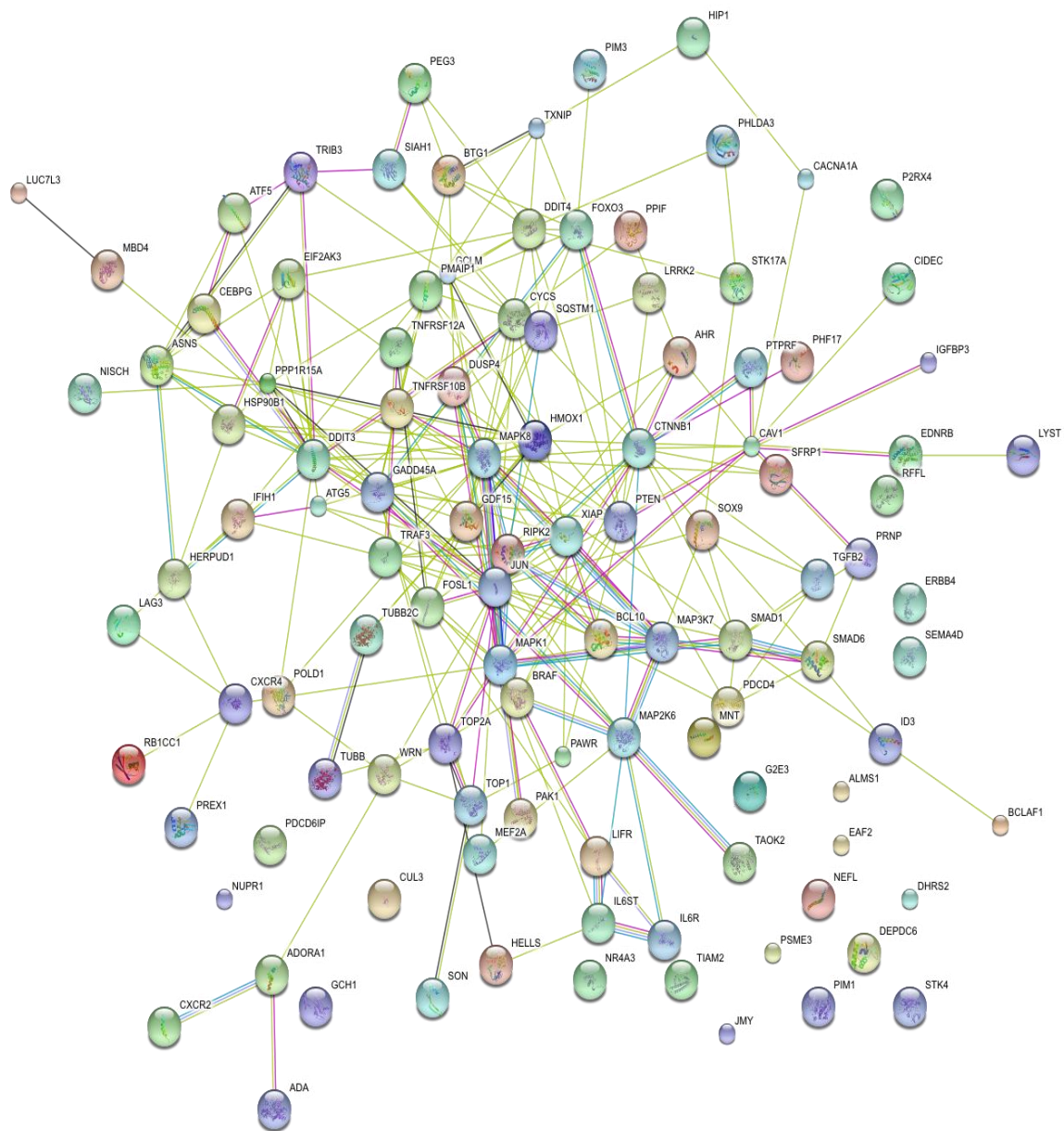


Abbildung 25 Gene des programmierten Zelltods

Die Grafik der String[®]-Datenbank zeigt die bei den webgestalt[®]-Analysen zum programmierten Zelltod zugeordneten Gene. In der Mitte der Grafik sind die Gene abgebildet, welche besonders viele Interaktionen haben. Unter anderem sind dies GDF15, JUN, MAPK8 und 1, DDIT3 und DUSP4. Erklärung der Farbzunordnung siehe Abbildung 24. Bezogen von (<http://string-db.org>) am 03.07.11.

Genego[®] Signalweganalyse

Weiterhin liefert die Genego[®]-Software eine aufschlussreiche Darstellung der bei den Microarray-Experimenten veränderten Gene. Auf diese Weise können die Gene bekannten Signalwegen zugeordnet werden. Die zugrundeliegende

Datenbank wird von Wissenschaftlern manuell aus Volltext-Literatur erstellt. Nur Artikel, die Informationen über Protein-Protein-Interaktionen enthalten, werden für die Datenbank verwendet. Dadurch ist die Aussage der Software begrenzt, aber man erhält einen ersten interessanten Einblick über möglicherweise beeinträchtigte Signalwege.

Die in den Signalkaskaden veränderten Gene sind speziell markiert. Diese Zuordnung ermöglicht einen Überblick darüber, bei welchen Signalwegen besonders viele Gene verändert wurden. Allerdings ist es wichtig zu wissen, dass Genego[®] fehlende Gene ergänzt, wenn diese für die Darstellung der Signalwege wichtig sind (92).

Abbildung 26 zeigt am Beispiel ER-Stress die Eingliederung der bei den Microarray-Analysen besonders stark veränderten Gene in bekannte Signalwege. Dargestellt sind die drei Signalwege des ER-Stress, welche im ersten Schritt durch die Transmembranproteine ATF6, IRE-1 und PERK (nicht in der Grafik gezeigt, Vermittlung über eIF2AK3) vermittelt werden. In den blau hinterlegten Kästchen erkennt man die Endpunkte des ER-Stress: verminderte Proteintranslation und vermehrte Proteinfaltung, was einerseits in Apoptose oder andererseits in Überleben der Zelle enden kann.

Eingespeiste Gene, welche laut der Genego[®]-Plattform in Bezug zum ER-Stress stehen, sind JNK, I-kB, c-Jun, C/EBP zeta, XBP1, GADD34, HERP, Endoplasmin, Cytochrom C und eIF2AK3. Durch eigene Recherche konnten später noch weitere ER-Stress-assoziierte Gene identifiziert werden.

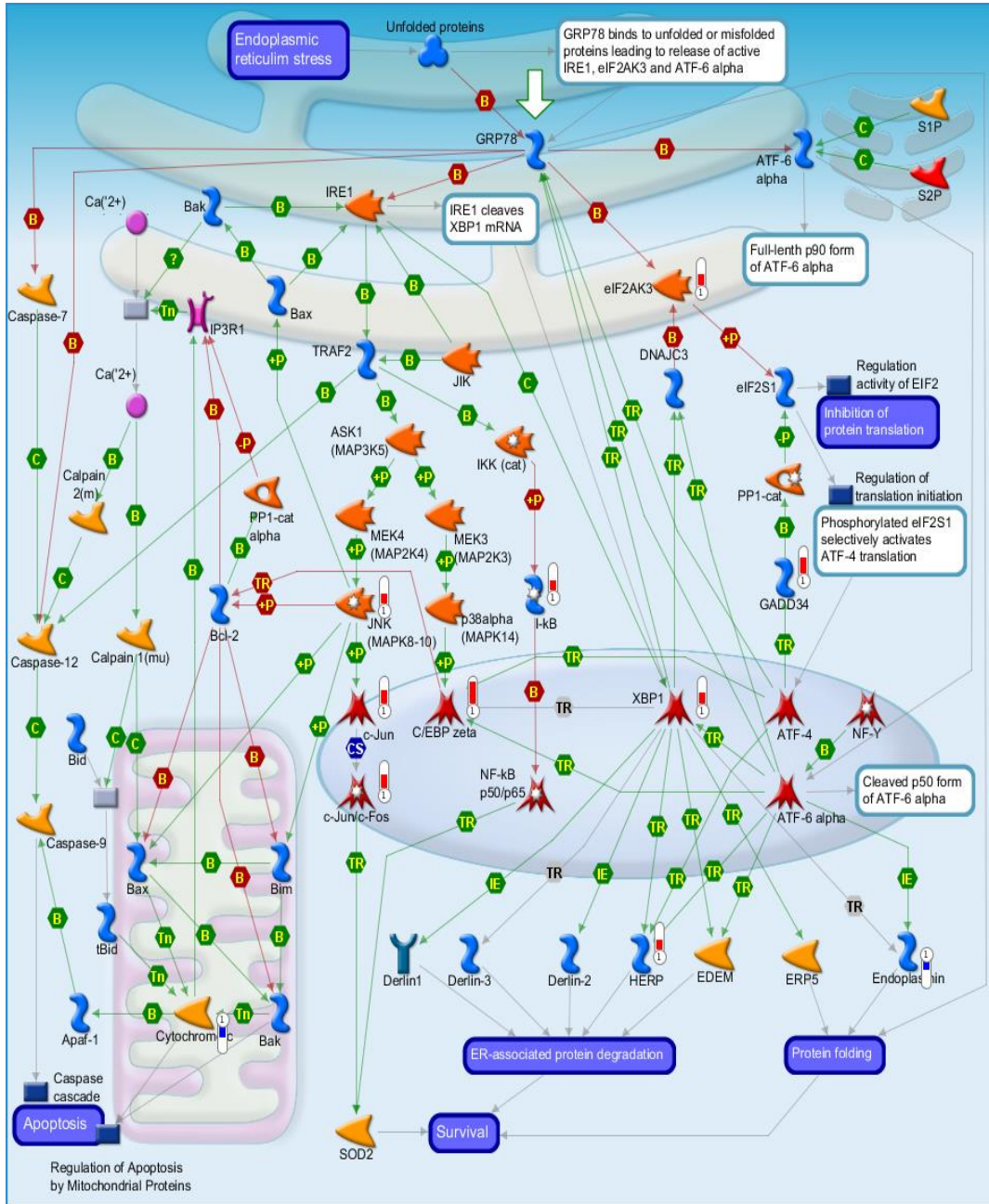


Abbildung 26 Genue Darstellung der beim ER-Stress involvierten Gene

Gene, die bei der Analyse eine Veränderung zeigten, haben neben dem Symbol eine rote Skala, welche die Überexpression anzeigt. Neben Genen mit verminderter Expression ist diese Skala in blau dargestellt. Bezogen von genego.com (86) am 17.08.11.

Resümee der Genanalysen

Durch die Beständigkeit in den verschiedenen Analyseverfahren sind vor allem die in Tabelle 9 aufgeführten Gene aufgefallen.

Das am stärksten exprimierte Gen bei den Analysen ist GDF15. Bei einer Konzentration von 100µM Mitotane kommt es einer 7,6fachen Hochregulation. Unter der gleichen Konzentration wird DUSP4 mit 6,7facher positiver Veränderung fast ebenso stark hochreguliert. Eine fast 4fach verstärkte Expression bei 100µM Mitotane sieht man bei CHOP und TRIB3. Wenn man die am meisten supprimierten Gene betrachtet, fällt die starke Suppression des ABCG1-Gens ins Auge. Mit einer Verminderung von -7,7 bei 100µM gegenüber dem 0µM-Vergleichswert ist es das am stärksten herabregulierte Gen bei der Inkubation der NCI-H295-Zellen mit Mitotane. Ebenfalls stark vermindert ist die SREBF1-Expression mit einer Abnahme um den Faktor 3,2. Weniger stark, aber trotzdem auffallend konstant herunter reguliert sind die Gene SCD, SQLE und LDLR.

Interessant ist vor allem die Veränderung der Genexpression bei erhöhter Dosis. So sieht man beispielsweise bei Behandlung der Zellen mit 50µM Mitotane eine 1,5fache Überexpression von GDF15, bei Behandlung mit 100µM schon eine 7,6fache Überexpression. Auch bei den herabregulierten Genen zeigt sich diese Tendenz. Gene, die bei 50µM Mitotane supprimiert werden, erfahren unter 100µM Mitotane eine noch stärkere Suppression. Beispielsweise sieht man beim ABCG1-Gen eine Verminderung der Genexpression um das 3,5fache bei 50µM. Bei 100µM beträgt diese Verminderung schon das 7,7fache.

Gen Symbol	Gen Titel	p-Wert (Konzentration)	Verhältnis (100µM vs. 0µM)	Verhältnis (50µM vs. 0µM)	Literatur
GDF15	growth differentiation factor 15	0.06248	7.559	1.540	(93-97)
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	0.01135	6.675	1.509	(98-103)
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	0.10518	3.970	1.168	(104)
CHOP/DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	0.08669	3.693	1.249	(105-111)
SQLE	squalene epoxidase	0.05707	-1.648	-1.577	(112-114)
LDLR	low density lipoprotein receptor	0.01085	-2.312	-1.647	(9, 94)
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0.04340	- 2.615	-1.869	(115-117)
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.00081	- 3.161	-1.977	(118-120)
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G	0.00454	- 7.662	-3.519	(121, 122)

Anm.: Herabregulierte Gene sind blau dargestellt, heraufregulierte Gene sind rot dargestellt.

Tabelle 9 Gene, welche durch die Beständigkeit in den Software-Analysen und durch eine hohe Amplifikationsveränderung besonders aufgefallen sind.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Mitotane auf Nebennierenrindenkarzinomzellen untersucht. Seit über 50 Jahren wird dieses Medikament, bei Inkaufnahme vielfältiger Nebenwirkungen, für die Therapie des Nebennierenrindenkarzinoms verwendet. Der genaue Wirkmechanismus blieb jedoch bis heute unklar. Daher wurde in dieser Arbeit die Beeinflussung der Nebennierenrindenkarzinomzellen durch Mitotane auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht.

4.1. Mitotane-induzierte Suppression der adrenokortikalen Hormonsekretion

Dass Mitotane eine Suppression der adrenalen Hormonsynthese bewirkt, ist in der Literatur beschrieben (123). Auch der von uns durchgeführte Immunoassay zeigte eine generalisierte Hormonsuppression, welche bezüglich des Cortisols besonders ausgeprägt war. Das klinische Erscheinungsbild des NNR-Karzinoms zeigt, dass die Cortisolsekretion eine besonders ausgeprägte Rolle einnimmt.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass Mitotane eine konzentrations- und zeitabhängige Inhibition der Cortisolsekretion induziert. Es zeigt sich deutlich, dass der inhibitorische Effekt ab einer Dosis von 50µM Mitotane stark zunimmt. Bei 100µM Mitotane sieht man schon nach einem relativ kurzen Zeitraum von 4 Stunden eine ausgeprägte Suppression. Für die anschließenden Genexpressionsexperimente sollten diese Werte eine Hilfe zur Dosisfindung darstellen. Mit 50µM Mitotane war eine deutliche Veränderung zu sehen, bei einer Dosis von 100µM Mitotane konnte eine maximale Suppression erreicht werden.

Interessante Aspekte ergeben sich auch, wenn man die Genexpression im Zusammenhang mit der Morphologie der Nebenniere betrachtet. Gutierrez und Crooke (42) postulierten 1980, dass die zytotoxischen Effekte von Mitotane vor

allein die Zona fasciculata und reticularis betreffen. Die Veränderungen der Zona glomerulosa seien diskret.

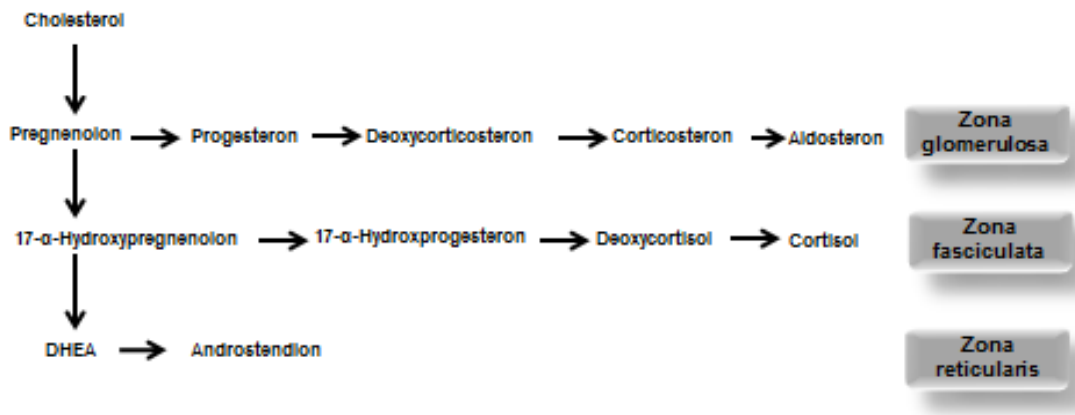


Abbildung 27 Humane Steroidbiosynthese, nach Kompartimenten

Die humane Steroidbiosynthese eingeteilt in die Kompartimente: Zona-glomerulosa,- fasciculata und -reticularis. Eigene Darstellung, abgeändert nach Rainey, 1994 (58).

Zur Klärung der Frage, ob die Hauptwirkungen von Mitotane tatsächlich vor allem die Zona fasciculata und reticularis betreffen, wurden die Hauptenzyme der Steroidbiosynthese genauer betrachtet (siehe Abbildung 28). Tatsächlich erfährt das Enzym CYP11B2, die Aldosteron-Synthase, unter Mitotane-Behandlung kaum eine Veränderung. CYP11B2 katalysiert die Umwandlung von Corticosteron zu Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebenniere. Im Gegensatz dazu erfahren die in der Reaktionskette voran geschalteten Enzyme, die für die Androgen- und Cortisolsynthese notwendig sind, eine maximale Suppression bis auf das 1,71fache. Dies bestätigt den stärkeren Effekt von Mitotane auf die Zona reticularis und Zona fasciculata. Fraglich ist allerdings, ob eine Verbindung der selektiven Zytotoxizität mit der Suppression der Steroidenzyme besteht. Die im Immunoassay festgestellte Abnahme der Hormonsekretion nach Inkubation der NCI-H295-Zellen mit Mitotane lässt sich durch den Microarray bestätigen. Allerdings fällt die Suppression der Steroidogenese-Enzyme mit maximal um das 1,7fache gering aus.

Die verminderte Expression der Hauptenzyme der Steroidbiosynthese alleine kann nicht die starke Reduktion der Hormonsekretion erklären.

Daher wurde Augenmerk auf andere Ursachen gelegt, welche die starke Cortisol-Suppression erklären könnten.

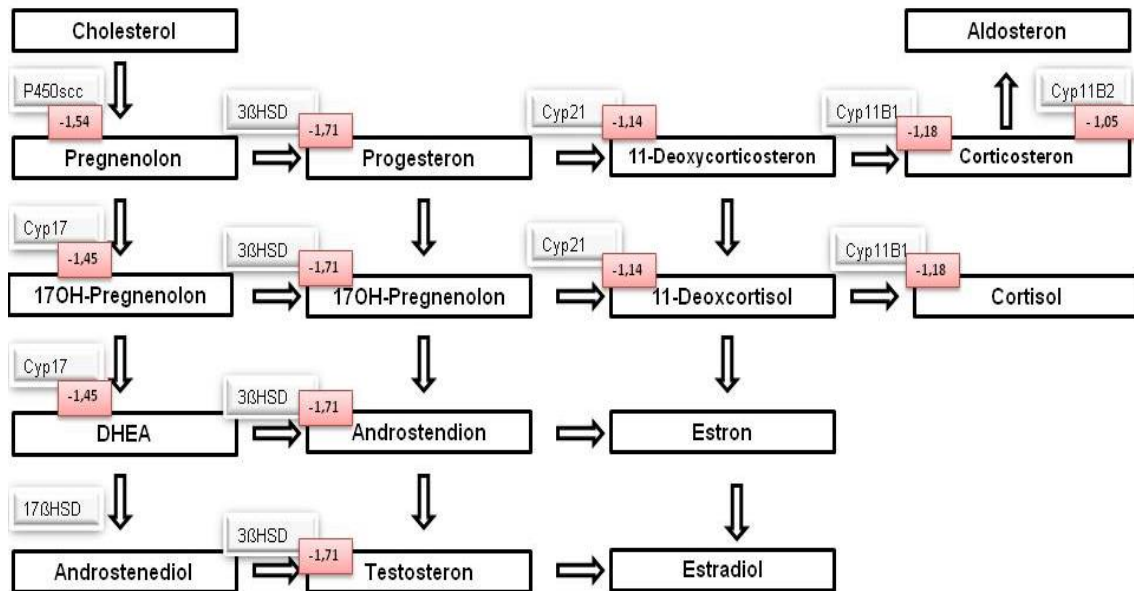


Abbildung 28 Steroidbiosynthese, unter Einbeziehung der veränderten Expression der Hauptenzyme, nach Behandlung mit Mitotane

Die Grafik zeigt die humane Steroidogenese. Die Umwandlung der beteiligten Stoffe geschieht durch Enzyme der P450-Familie oder Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) -Familie, welche neben den Pfeilen gezeigt sind. Die Zahlen in den roten Kästchen daneben geben die veränderte Expression dieser Enzyme bei Behandlung der Nebennierenrindenzellen mit 100µM Mitotane an. Man sieht eine stärkere Suppression der Enzyme, die in der Zona reticularis und Zona fasciculata aktiv sind, als die Suppression des in der Zona glomerulosa aktiven CYP11B2-Enzyms. CYP11B2 katalysiert die Synthese von Aldosteron. Eigene Darstellung, modifiziert nach Miller, 2011 (9).

Am Metabolismus von Cortisol ist unter anderem CYP3A4 beteiligt. Es metabolisiert Cortisol zu 6-Beta-Hydroxycortisol (48). Medina Díaz und Elizondo konnten zeigen, dass es in der Leber durch o,p'-DDT zu einer Induktion des Cytochrom-P450-Enzyms CYP3A4 kommt (89). CYP3A4 gehört zur Cytochrom P450-Superfamilie und ist wesentlich für die Verstoffwechslung vieler Medikamente, wird aber auch für die Aktivierung anderer Stoffe benötigt. Weiterhin kommt es durch Induktion von Cortisol-bindendem Globulin zu einer Abnahme des freien Serum-Cortisols. (48). In der menschlichen Leber macht CYP3A4 60-70% der P450-Familie aus. Da Mitotane (o,p'-DDD) mit o,p'-DDT eng verwandt ist, liegt die Vermutung nahe, dass es auch Auswirkungen auf die CYP3A4-Expression hat. Möglicherweise könnte Mitotane durch eine

Beeinflussung der Expression von CYP3A4 die Wirksamkeit weiterer adjuvanter Therapien beeinträchtigen, aber auch eine Rolle bei den niedrigen Cortisolspiegeln unter Mitotanetherapie spielen.

Weiterhin vermittelt Mitotane seine Wirkungen im menschlichen Körper über Formierung reaktiver Metabolite, vermutlich über Katalyse der Cytochrom P450-Familie (50). Die Frage ist nun, ob CYP3A4 diese Rolle als Katalysator bei der Bildung der aktiven Form von Mitotane spielt.

In unseren Vorexperimenten konnten wir eine Überexpression von CYP3A4 in mit Mitotane behandelten Hep2-Zellen nachweisen. Zur Klärung der Frage, ob es durch Mitotane auch zu einer Induktion in der Nebennierenrinde kommen kann, wurde mittels Real-Time-PCR, die Expression von CYP3A4 und des Pregnan-X-Rezeptors (PXR), welcher über seine DNA-Bindedomäne unter anderem an das Response-Element des CYP3A4-Promoters binden kann, untersucht. Liganden für den PXR sind unter anderem Glucocorticoide. Zwar wird CYP3A4 hauptsächlich in hepatischen Zellen exprimiert, aber es spielt auch in anderen Organen eine wesentliche metabolische Rolle. Da es zu keiner signifikanten Veränderung durch Mitotane in den NCI-H295-Zellen kam, scheint der Effekt durch Mitotane auf CYP3A4 auf die Leber begrenzt zu sein. Allerdings zeigt die CYP3A4-Expression eine individuelle Variabilität, welche bis zu 40fach verschieden ausfallen kann (89).

Dessen ungeachtet könnte die Induktion von CYP3A4 in hepatischen Zellen wesentlich zur Abnahme des messbaren Cortisols beitragen.

4.2 Mitotane hemmt das Zellwachstum der NCI-H295-Zellen - ist es Nekrose oder Apoptose ?

Wie Mitotane seine Zytotoxizität vermittelt, wird aktuell noch kontrovers diskutiert. Mögliche Ursachen könnten in der oxidativen Schädigung der Nebennierenzellen durch freie Radikale oder Einleitung des programmierten Zelltods durch Caspasen liegen (46, 124). Um herauszufinden, ob die zytotoxische Wirkung von Mitotane auf einer akuten Toxizität beruht oder ob ihr die Einleitung apoptotischer Vorgänge zugrunde liegt, wurde eine FACS-Analyse mit Annexin V und Propidiumiodid durchgeführt. Man sieht sowohl früh-

als auch spätapoptische Zellen, mit einer Dominanz der spätapoptischen Zellen. Das Durchwandern der verschiedenen Stadien zeigt, dass es sich um apoptotische Zellen handelt. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass die Wirkung von Mitotane nicht durch eine akute Toxizität auf die Nebennierenrindenzellen erzielt wird, sondern vielmehr den programmierten Zelltod einleitet. Auch die Ergebnisse des Zelltod-ELISA weisen auf Apoptose als Ursache der Zytotoxizität hin.

Dies stimmt mit den Daten der Real-Time-PCR-Analysen überein. In diesen Untersuchungen zeigte sich eine starke Zunahme des BAX-Gens nach Inkubation der NCI-H295-Zellen mit Mitotane. BAX leitet, durch den Tumorsuppressor p53 induziert, die Apoptose ein und wurde daher unselektiv als Apoptosemarker gewählt. Schon bei einer relativ niedrigen Konzentration von 50µM Mitotane konnte nach sechs Stunden eine deutliche Zunahme der BAX-Expression gemessen werden. Die Tatsache, dass diese Zunahme nach acht Stunden wieder abnimmt, legt die Vermutung nahe, dass zu diesem Zeitpunkt die meisten Zellen schon der Apoptose unterlegen waren.

Sowohl FACS, ELISA und Real-Time-PCR als drei unabhängige Methoden deuten somit darauf hin, dass Mitotane seine Wirkung über Apoptose vermittelt. Auch die Genchipdaten weisen in diese Richtung.

Bei den FACS-Analysen und dem Zelltod-ELISA ließen sich die maximalen Apoptose-Raten erst zu wesentlichen späteren Zeitpunkten im Vergleich zu den Real-Time-PCR-Analysen messen. Zwar zeigt die PCR-Analyse eine höhere Sensitivität bezüglich der Anfangspunkte der Apoptose. Ob dies aber die starke Verzögerung der FACS- und ELISA-Daten erklärt, muss kritisch gesehen werden. Da bei diesen Methoden spätere Kontrollzeitpunkte (frühestens 24 Stunden) gewählt wurden, bleibt offen, wie sich die Kurven bei kürzeren Inkubationszeitpunkten verhalten hätten.

Die Zeitpunkte, ab denen sich Veränderungen in der Hormonsynthese und Zellüberleben zeigten, waren ausschlaggebend für die Dosisfindung der anschließenden Genexpressionsexperimente. Der Zeitpunkt der Inkubationszeit für die Genchip-Experimente wurde auf 6 Stunden gesetzt, da man zu diesem Zeitpunkt vermutlich frühzeitigere Ereignisse abbilden kann.

4.3 Mitotane-induzierte Veränderungen des "Transkriptoms" der NCI-H295-Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Gen-Expressions-Array-Experimente dienten dazu, die molekulare Wirkweise von Mitotane besser zu verstehen. Insgesamt zeigte sich bei 1975 Genen der NCI-H295-Zellen eine veränderte Expression unter Behandlung mit 100µM Mitotane. Unter Behandlung mit 50µM Mitotane erfuhren 567 Gene eine Expressionsveränderung (mindestens um den 1,5fachen Wert). Nicht nur die Anzahl der veränderten Gene erhöhte sich durch die höhere Mitotane-Dosis, sondern es kam zudem zu einer stärkeren Expressionsveränderung in beide Richtungen. Exemplarisch ist die Expression von GDF15: Unter 50µM kam es zu einer 1,54fachen Überexpression, mit 100µM zu einer Vervielfältigung um das 7,56fache. Diese Veränderungen zeigen, dass Mitotane mit höherer Dosis seine Wirkung auf die Genexpression verstärkt. Gleichzeitig lässt sich eine erhöhte Apoptose-Rate nachweisen. Es stellt sich die Frage, ob man bei der hohen Dosierung allgemeine und späte Zelluntergangssignale erfasst, wobei eventuell die frühe Apoptosephase nicht wiedergegeben wird. Oder ob es nur eine genügend hohe Dosierung braucht, um in den Karzinomzellen Apoptose hervorzurufen.

Auffällig war eine Reihe von Genen, die einerseits eine besonders starke Expressionsveränderung und andererseits eine besondere Stabilität in den Analysen aufzeigten. Zu diesen zählten die in Tabelle 9 genannten Gene GDF15, DUSP4, TRIB3, CHOP, SQLE, LDLR, SCD, SREBF1 und ABCG1. Diese Gene werden im Folgenden detailliert beschrieben. Die Expressionsveränderungen dieser Gene wurden unabhängig im Rahmen der Dissertation von Felix Gardill, Doktorand an der Medizinischen Klinik I, Endokrinologie mittels Real-Time-PCR-Analysen validiert.

Bei den in unseren Analysen supprimierten Genen zeigt sich, dass die am stärksten supprimierten Gene direkt oder entfernter mit der Cortisolsynthese in Verbindung stehen. Hier zu nennen sind unter anderem SQLE, LDLR, SCD, SREBF1 und ABCG1. Wie erwartet wirken viele der gefundenen Gene proapoptotisch, so z.B. GDF15, DUSP4, TRIB3 und CHOP.

4.3.1 Diskussion einzelner relevanter Gene mit Einfluss auf den Apoptose-Signalweg

CHOP

Ein durch Mitotane auffällig hoch exprimiertes Gen ist CHOP. CHOP ist auch unter den Namen growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153), DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3) and C/EBP-homologous protein 10 bekannt. Erstmals zu der CCAAT/Enhancer-Binding-Protein-Familie (C/EBP-Familie) zugeordnet, wirkt es als dominant negativer Inhibitor der C/EBP-Familie. Die C/EBPs bestehen aus Transkriptionsfaktoren, welche eine weite Spanne an Genen regulieren. Unter anderem spielen diese Gene eine Rolle bei physiologischen Prozessen wie der Immunantwort oder Zelldifferenzierung und -proliferation (108). Weiterhin besitzt das CHOP-Protein Seitenketten, durch die es als Substrat der p38-MAP-Kinase fungieren kann. Auch die Januskinase-2 steigert, in Abhängigkeit von p38, die CHOP-Induktion. Dies wird durch Wachstumshormone induziert (110). In physiologischen Zuständen wird CHOP ubiquitär in geringen Maßen exprimiert und befindet sich im Zytosol der Zelle. Bei Stress und Störung der Homöostase wird es im Zellkern akkumuliert.

Microarrayexperimente legen nahe, dass CHOP das am höchsten induzierte Gen bei Auslösung von ER-Stress ist (125). Die Rolle des ER-Stress in Bezug auf die Mitotanetherapie wird im folgenden Kapitel „Die Rolle des ER-Stress“ auf Seite- 78 - ausführlich diskutiert.

Einschub Kurzerklärung ER-Stress

ER-Stress wird durch die im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindende unfolded protein response (UPR), also miss- oder aufgefaltete Proteine, die sich im ER akkumulieren, ausgelöst. Über die ER-Transmembranproteine IRE1 (inositol requiring protein-1), ATF6 (activating transcription factor-6) und PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) wird dann die Proteintranslation gestoppt und es kommt zur vermehrten Synthese von Proteinchaperonen. Reicht dieser Schutzmechanismus nicht aus oder wird der ER-Stress chronisch, wird die Zelle apoptotisch (126).

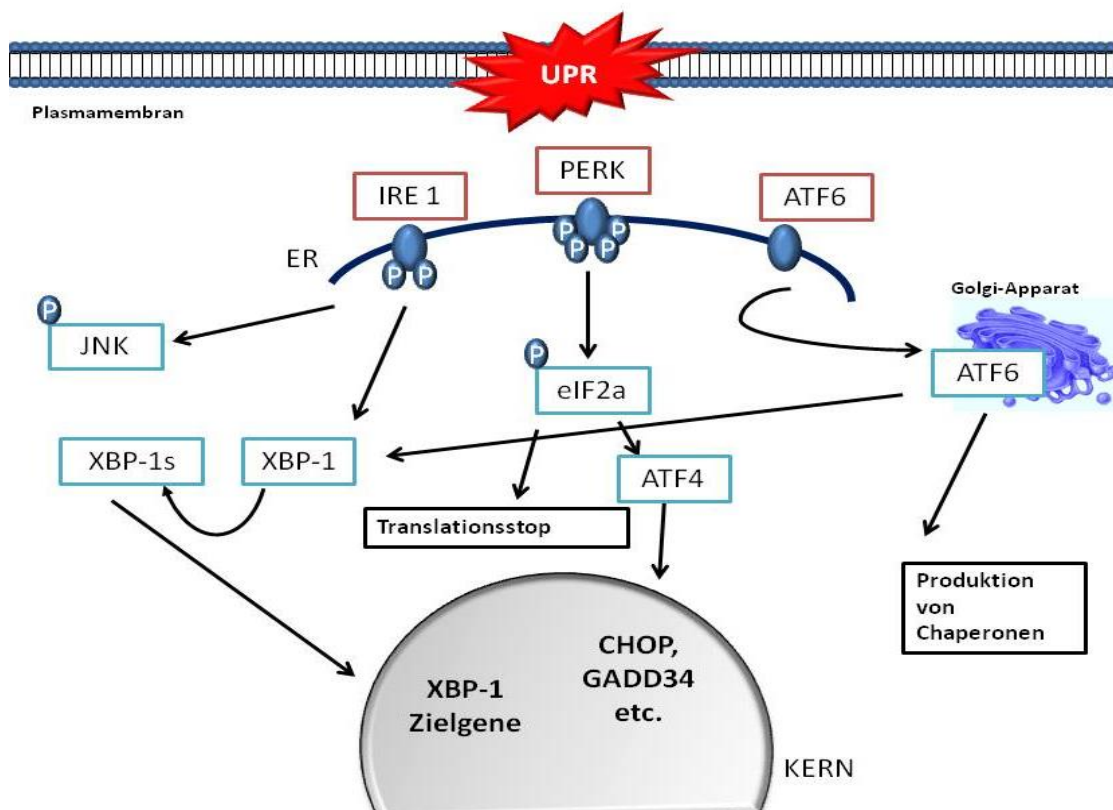


Abbildung 29 ER-Stress: Prinzip der UPR

Die unfolded protein response (UPR) bewirkt eine Hemmung der Translation, eine Produktion von Protein-Chaperonen und beeinflusst eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Diese Vorgänge werden über die Transmembranproteine IRE-1, PERK und ATF-6 reguliert. Eigene Darstellung.

Im Anhang befindet sich eine ausführliche Beschreibung der allgemein während des ER-Stress stattfindenden Mechanismen.

Aktiviertes ATF6, ATF4 und XBP-1 sind dafür bekannt, dass sie die Transkription von CHOP in Gang setzen (105). ATF4 wird dabei über PERK, XBP-1 durch IRE1 aktiviert (siehe Abbildung 29). Man sieht also eine Beeinflussung der transkriptionellen Aktivierung von CHOP über alle drei Hauptwege der ausgelösten UPR. Neben der transkriptionellen Regulation wird die CHOP-Expression auch durch mRNA-Stabilität beeinflusst. So kommt es unter ER-Stress zu einer Phosphorylierung des CHOP-Proteins durch die p38 MAPK, welches einen maximal apoptotischen Effekt von CHOP zur Folge hat (105).

CHOP fördert im Rahmen des ER-Stresses die Calcium-Freisetzung aus dem ER. Dieses freigesetzte zytosolische Calcium triggert die Aktivierung der CaM-abhängigen Kinase II (CaMKII), welche wiederum eine Reihe proapoptischer Signalwege, wie die JNK-abhängige Fas-Induktion, die mitochondriale Depolarisation, die STAT-1- und NADPH-Oxidase-Aktivierung induziert. Die durch die NADPH-Oxidase entstehenden Sauerstoffradikale hemmen die durch AKT vermittelten Zellüberlebenssignale und beeinflussen die Calcium-Freisetzung im Sinne eines positiven Feedbacks (106). Ein weiteres wichtiges transkriptionelles Ziel von CHOP ist GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34). Die GADD-Genfamilie umfasst Gene, die vor allem bei genotoxischem Stress und Wachstumsstop-Signalen induziert werden (105). GADD34 begünstigt die Dephosphorylierung des phosphorylierten eIF2 α und stellt so die durch die UPR geblockte Translation wieder her, was eine Exazerbation des ER-Stress zur Folge hat (127).

Der Hauptmechanismus von CHOP im ER-Stress ist aber wahrscheinlich die Suppression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Hierfür spricht auch, dass eine Bcl-2 Überexpression die CHOP-induzierte Apoptose hemmt und es in vivo eine Korrelation zwischen CHOP-vermittelter Apoptose und erniedrigtem Bcl-2 Level gibt. Der Mechanismus involviert die Fähigkeit von CHOP mit einem oder mehreren transkriptionellen Unterdrückern von Bcl-2 zu interagieren. Bcl-2 wiederum hemmt die durch Bax- und Bak-vermittelte Apoptose (127). Es handelt sich also um eine Hemmung der Hemmung und dies spielt so eine wichtige Rolle in der Induktion des programmierten Zelltods.

GDF15

GDF 15, auch bekannt als MIC-1, PLAP, PTGFB, NAG-1 oder PDF, gehört zur TGF- β - (transforming growth factor beta) Superfamilie und wurde ursprünglich durch erhöhte mRNA-Expression bei Makrophagen-Aktivierung entdeckt. In unseren Analysen ist GDF15 das am höchsten exprimierte Gen unter Behandlung mit 100 μ M Mitotane. In verletzten Geweben und bei bestimmten Krankheitsvorgängen reguliert GDF15 inflammatorische und apoptotische Signalwege. Es kann als Biomarker des eingeleiteten p53-Signalwegs gesehen werden (128), aber es wird auch unabhängig davon induziert. Die GDF15-Promotorregion hat zwei p53-Bindestellen und kann so durch p53 aktiviert werden.

Interessant ist die Verbindung zwischen GDF15 und p53 auch, da es beim Li-Fraumeni-Syndrom, mit einer Keimbahnmutation des p53-Tumorsuppressorgens, vermehrt zu Nebennierenrindentumoren kommt. Normale Zellen zeigen, bedingt durch das Proto-Onkogen MDM2, welches die Aktivität der Transkription von p53 hemmt und dessen Ubiquititierung einleitet, ein niedriges p53 Level. Durch Stresssignale wird p53 phosphoryliert und entweicht der MDM2-Bindung. Das p53-Tumorsuppressorgen spielt eine große Rolle beim Zellarrest nach DNA-Schädigung und führt zum Wachstumsstillstand. Nach erfolgloser DNA-Reparatur führt es zur Einleitung des programmierten Zelltods (128). Der Zellzyklusarrest lässt sich auf die direkte Induktion des Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitors p21 zurückführen. Dies bewirkt einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und eine Aktivierung von Genen (GADD45, 14-3-3 s, B99), die in der G2-Phase Kontrollpunkte darstellen. Obwohl die p53-abhängige Apoptose noch nicht vollständig verstanden ist, beeinflusst p53 als Transkriptionsfaktor Gene wie Bax, Fas/APO1, DR5 (Death Cell Receptor), PIGs (p53 induced genes), IGF-BP3 und PAG608. Beispielsweise führt eine Erhöhung von Bax zu einem Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien, was wiederum zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9 und zur Einleitung der apoptotischen Caspase-Kaskade führt (129). GDF15 stellt in diesem Zusammenhang eine neue Wirkweise und

eine Alternative zum klassischen Weg über p21 dar. Vermutlich vermittelt es die Wachstumsinhibition und Apoptose-Induktion über einen parakrinen Mechanismus (129). Aber auch andere Transkriptionsfaktoren wie JNK oder EGR-1 und NF- κ B stehen in Zusammenhang mit der Regulation der GDF15-Expression (130, 131). Auch im Rahmen des oben genannten ER-Stress scheint GDF15 über JNK aktiviert zu werden.

In verschiedenen Krebsarten wirkt GDF15 als proapoptotischer Faktor. So reduziert es in Prostatakrebszellen die Zelladhäsion und induziert Apoptose. Weiterhin wirkt es auch als Tumorsuppressor beim Glioblastom und bei Ovar-, Mamma- und Magenkarzinomen (94, 97, 129, 132-135). Auch als antihypertrophisch wirkender Faktor bei Herzhypertrophie spielt GDF15 eine Rolle (136). Konträr zu den vorher beschriebenen antitumorösen Wirkungen wird in einiger Literatur darauf hingewiesen, dass GDF15 potentiell Tumorwachstum und Invasionstiefe vorantreiben kann. Dieser in späteren Tumorstadien beschriebene Weg würde über eine Transaktivierung von ErbB2 zur Aktivierung von ERK1/2 sowie der Proteinkinase B führen (95, 96, 137). Die starke Überexpression bei NN-Ca-Zelllinien nach Behandlung mit Mitotane legt jedoch nahe, dass GDF15 für die ER-Stress-induzierte Apoptose eine besondere Bedeutung hat.

DUSP4

Das oben genannte ERK spielt auch bei anderen, in unseren Experimenten überexprimierten, Genen eine zentrale Rolle. So zeigt das, bei Behandlung mit 100 μ M Mitotane um den 6,67fachen Faktor erhöht vorliegende, Gen DUSP4 eine starke Substratspezifität zum aktivierten ERK. Die Wirkung besteht in einer Dephosphorylierung der Threonin- und Tyrosin- Reste von ERK 1 und 2 (138). Die dadurch bewirkte Inaktivierung der MAP-Kinase könnte so indirekt proapoptotisch wirken. Drei große Gruppen von MAPK wurden bislang in Säugetierzellen charakterisiert. Dazu gehören ERK1/2, entsprechend p42- und p44-MAPK, die c-Jun-N-terminalen-Kinasen JNK1-3 und die p38-MAPK (α , β , δ , γ) (100). Dabei wird der ERK-Signalweg mit der Fähigkeit von Tumorzellen unabhängig von Proliferationssignalen zu wachsen assoziiert. Eine

Deregulierung von ERK findet sich in ungefähr 30% aller humanen Tumore (101). Zur Aktivierung von ERK bedarf es einer zweifachen Phosphorylierung an beiden Tyrosin- und Threonin-Seitenketten. Im gesunden Organismus spielt dies eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Wachstumssignalen, Zellproliferation und Differenzierung (102).

Das DUSP4-Gen codiert für das nukleare Protein DUSP4 und kann sehr schnell als Antwort auf mitogene- oder Stress-Stimuli induziert werden. Neben ERK besitzt die DUSP4-Phosphatase auch Affinität zu JNK und p38. Die katalytische Aktivität von DUSP4 kann durch JNK im Rahmen einer Protein-Protein-Interaktion stark positiv beeinflusst werden, obwohl die Substratbindung wesentlich schwächer als die von ERK und p38 ausfällt. Andererseits scheint die katalytische Aktivität von DUSP4, trotz hoher Affinität, nur minimal durch p38 verändert zu werden. Daraus lässt sich schließen, dass p38 eine günstigere Bindungsstelle besitzt, ihm gleichzeitig aber eine effektive Aktivierungsdomäne fehlt. JNK, auf der anderen Seite, verfügt über diese Domäne, es fehlt jedoch die starke Bindungs-Affinität zu DUSP4 (139). Sieben et al. berichten weiterhin, dass DUSP4 das Schlüsselgen für das benigne Verhalten von ovariellen Borderline-Tumoren ist und auch bei Brustkrebs scheint es als Tumorsuppressor-Gen zu fungieren (140, 141). Die stark erhöhte Expression bei unseren Analysen legt nahe, dass die Zellproliferations-hemmende Wirkung von DUSP4 mit der Wirkung von Mitotane einhergeht.

TRIP 3

TRIP 3 (tribbles homolog 3), ein weiteres hochexprimiertes Gen, gehört zu den durch ER-Stress induzierbaren Genen und wird durch NF-kappaB aktiviert und ist gleichzeitig dessen negativer Regulator. Polymorphismen von TRIB3 scheinen einen Zusammenhang mit Insulinresistenz und Diabetes mellitus zu haben (142). Weiterhin sensibilisiert es Zellen auf die TNF- und TRAIL-induzierte Apoptose und hemmt die im Zellüberleben wichtige Serin-Threonin Kinase AKT1. Obwohl TRIB3 ein Zielgen des oben beschriebenen CHOP darstellt, gilt es auch als dessen Suppressor (126). Es bindet an das N-Terminale-Ende von CHOP und blockiert so die Interaktion zwischen CHOP

und dessen Coaktivator p300. Die N-terminale Region von CHOP ist notwendig für seine Degradation und gleichzeitig essentiell für die Bindung mit p300. Daher könnte p300 möglicherweise die Degradation von CHOP regulieren. Zwar hemmt TRIB3 die Aktivierung von CHOP, aber es wirkt sich nicht auf die Dimerisierung von CHOP oder seine DNA-Bindungsaktivität aus. Wahrscheinlich blockiert es eine nötige Modifikation zur Transaktivierung von CHOP. Weiterhin hemmt TRIB3 die transkriptionelle Aktivität von ATF4. Daher ist anzunehmen, dass TRIB3 als intrazellulärer Antagonist der p300-Bindungsstelle von CHOP und auch ATF4 fungiert und dessen N-terminale-Region den Regulationspunkt im Rahmen des eingeleiteten ER-Stress spielt (104). Sowohl TRIB3 als auch CHOP sind in unseren Analysen überexprimiert. Beide induzieren im Rahmen des ER-Stresses Apoptose. Jedoch scheint TRIB3 ein Repressor von CHOP zu sein. Ob dies im Anfangsstadium des ER-Stresses bedeutend ist und im späteren Verlauf an Bedeutung verliert, bleibt unklar. Möglicherweise hemmt TRIB3 bei vorübergehendem ER-Stress CHOP und dessen proapoptotische Funktion. Bei andauerndem ER-Stress ist die TRIB3-Induktion robuster und es könnte als Akt-Inhibitor fungieren und so die Zelle in den programmierten Zelltod treiben.

Gemeinsame Interaktion mit der C-Jun-N-terminalen-Kinase

Auffällig in den von CHOP, DUSP4 und GDF15 beeinflussten Signalwegen ist die gemeinsame Interaktion mit JNK (C-Jun-N-terminale-Kinase). So fördert CHOP die JNK-abhängige Fas-Aktivierung (106). Der Fas-Rezeptor agiert als Todesrezeptor an der Zelloberfläche und führt die Zelle in den programmierten Zelltod. JNK seinerseits vermag die katalytische Aktivität von DUSP4 zu beschleunigen und, über GDF15 vermittelt, Apoptose auslösen (131, 139). Möglicherweise nimmt daher diese Kinase, die auch als MAPK8 bekannt ist, eine zentrale Rolle bei den ausgelösten Signalkaskaden ein. JNK wird im Rahmen des ER-Stresses IRE-1- und TRAF-2- abhängig aktiv und trägt wesentlich zum mitochondrial-vermittelten Zelltod bei. Außerdem scheint die JNK-Aktivierung essentiell für die Bildung und Translokation des Bax-Proteins zu sein. Aktivierung von JNK ist eine übliche Antwort auf viele verschiedene

Stress-Signale und trägt wesentlich zur Einleitung der Apoptose bei, indem es, wie auch das im ER-Stress involvierte Gen CHOP, Einfluss auf die Bcl-2-Proteinfamilie nimmt (126, 143). Im Gegensatz zu den beschriebenen proapoptotischen Wirkungen hat JNK über Peptidhormone positive Effekte auf Nebennierenrindenwachstum und –differenzierung (6).

Interaktionen mit P38

Auch p38 zählt wie JNK zu den sogenannten Stress-aktivierten Proteinkinasen. DeVries-Seimon et al. konnten zeigen, dass die p38-MAPK unter ER-Stress aktiviert wird. P38 hat je nach Stimulus pro- und/oder antiapoptotische Funktionen (144). Ein p38 α -Mangel in Makrophagen führt beispielsweise über Hemmung des Akt-Überlebenssignalwegs zur Apoptose. P38 spielt also eine Rolle beim Zellüberleben. Andererseits wird p38 bei Belastung mit freiem Cholesterin zur Induktion von CHOP benötigt, steigert dessen Aktivität und hat eine Apoptose-Induktion zur Folge. Die Rolle von p38 im Zellüberleben liegt demnach in der Balance zwischen dem p38-CHOP-proapoptotischen Signalweg und dem p38-Akt-Überlebenssignalweg. Da die molekularen Vorgänge beim ER-Stress auch immer eine Aktivierung von Zellüberlebenssignalen zur Folge haben, käme eine Blockade von Akt durch p38-Inhibition einem „second hit“ auf dem Weg zur Apoptose gleich. So könnten Zellen mit subapoptotischen Dosen von ER-Stressoren durch Inhibition von p38 auf den apoptotischen Weg gebracht werden (145). Wie weiter oben schon beschrieben hat DUSP4 eine starke Affinität zu p38 und kann zu dessen Inaktivierung führen (139). Außerdem ist p38 Substrat von ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1). ASK1 wird wiederum vom IRE1-TRAF2-Komplex zur JNK-Aktivierung hinzugezogen und schafft eine Verbindung zwischen der p38- und der JNK-Aktivierung.

4.3.2 Diskussion einzelner relevanter Gene mit Einfluss auf die Steroid-Homöostase

Die durch die Microarrayanalyse identifizierten Gene, welche herunter reguliert wurden, scheinen besonders mit dem Cholesterinmetabolismus und der

Cortisolsynthese in Zusammenhang zu stehen. Dies bestätigt die Ergebnisse unserer Vorversuche, welche eine verminderte Hormonsekretion zeigten. Siehe Kapitel 3.1.

LDLR

Die Genexpressionsanalysen ergaben eine verminderte Expression des LDL-Rezeptors, welcher als Zelloberflächenprotein Cholesterin in die Zelle aufnimmt und so eine wesentliche Funktion für die Cortisolsynthese ist. Da der Hauptteil des Cholesterinbestands von low-density lipoproteins (LDLs) im Plasma stammt, ist dies besonders bedeutend. Durch LDL-Rezeptor-vermittelte-Endozytose kann der LDL-Cholesterinester gespeichert oder direkt, nach Umwandlung in freies Cholesterin, der Steroidhormon-Synthese zugeführt werden. Als Ligand für die Aufnahme dient dabei der Proteinanteil ApoB-100 auf den LDLs (9).

SQLE

Auch die Squalenepoxidase/-monooxygenase (SQLE) zeigt in unseren Analysen eine verminderte Expression. SQLE katalysiert die erste Oxygenierung in der Sterolbiosynthese und stellt damit wahrscheinlich einen limitierenden Schritt bei diesem Mechanismus dar (114). Eine Suppression von SQLE würde also zu einer intrazellulären Cholesterinabnahme führen. Darüber hinaus scheint SQLE aber auch als Onkogen beim Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs und beim Pankreas-Karzinom zu fungieren (112, 113).

SCD

Das humane SCD1 (Stearoyl-CoA-Desaturase1) -Gen wird ubiquitär exprimiert, findet sich jedoch in besonders hohem Maße in Krebszellen. Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass SCD1 durch posttranskriptionale Mechanismen moduliert werden kann, scheinen die SCD1-Level grundsätzlich durch die Transkriptionsrate bestimmt zu sein.

Die SCD1-Promotorregion hat vielfältige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, unter anderem für SREBF (sterol regulatory element binding transcription factor

1), welches eine entscheidende Rolle in der Steroidbiosynthese spielt. Auch für Wachstumsfaktoren und Hormone ist SCD1 ein Hauptziel. Weitergehend zeigen Studien, dass die Mitogen-induzierte verstärkte Expression von SCD1 parallel zu einer Aktivierung der Cholesterin- und Phospholipidsynthese läuft. Igal (116) deutet auf eine weitere interessante Rolle der SCD in der Tumorgenese hin. Krebszellen zeigen eine hohe Glykolyserate, deren Metabolite unter anderem zur de novo-Synthese von gesättigten Fettsäuren führt. Trotzdem lassen sich auch überdurchschnittlich hohe Werte von einfach-ungesättigten Fettsäuren in Tumorzellen nachweisen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Glykolyse und Fettsäuresynthese mit der Umwandlung gesättigter Fettsäuren zu einfach-ungesättigten Fettsäuren gekoppelt ist. Falls dies so wäre, müsste die Stearoyl-CoA-Desaturase in Krebszellen konstant aktiv sein, um die reibungslose Umwandlung zu gewährleisten. Tatsächlich lassen sich in Lungen- und Mammakarzinomzellen erhöhte SCD-Level nachweisen. Wahrscheinlich hat SCD durch seinen Einfluss auf den Krebszellmetabolismus auch Wirkung auf krebstypische Eigenheiten wie längere Überlebensdauer und kontinuierliche Zellreplikation. Diese These wird dadurch untermauert, dass eine SCD-Suppression zur langsameren Zellproliferation und zu vermindertem Überleben der Zellen führt. Darüber hinaus scheint diese negative Wirkung nicht krebszellspezifisch zu sein, da die Proliferationsabnahme auch in einer Reihe neoplastischer Zellen nachgewiesen werden konnte. Ferner zeigen Studien eine Zunahme der Apoptose in SCD-defizienten Zellen (116). Die bei unseren Forschungen entdeckte Herabregulation von SCD könnte folgerichtig eine Einleitung der Apoptose zur Folge haben.

SREBF-1

Ein weiterer Einflussfaktor auf eine erhöhte Cholesterinkonzentration in der Zelle ist SREBF-1. Dieser, schon als Transkriptionsfaktor von SCD genannte, sterol response element binding factor bildet eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich Einfluss auf Gene nehmen, die in der Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese involviert sind. Die SREBF-

Familienmitglieder werden als Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Dort bilden sie einen Komplex mit einem weiteren Membranprotein, dem SCAP-Protein (SREBF- cleavage activating protein). Bei einer erhöhten Cholesterinkonzentration ändert SCAP, durch direkte Cholesterinbindung, seine Konformation und bindet mit einem weiteren Membranprotein, dem Insig. Bei niedrigen Cholesterinkonzentrationen wird dieser Verbund gelöst und der SCAP-SREBF-Komplex kann in den Golgi-Apparat wandern. Durch proteolytische Spaltung durch S1P und S2P (site-1/2 protease), welche auch essentiell für die Aktivierung von ATF6 sind, erreicht SREBF dort seine aktive Form als nukleärer Transkriptionsfaktor. Während die Aktivierung von SCREBF-1 hauptsächlich unter der Kontrolle von Hormonen und Signaltransduktionssystemen steht, ist die SCREBF-2-Aktivierung vor allem abhängig von den ER-Cholesterinkonzentrationen (119). Eine Suppression von SCREBF-1 würde folglich zu einer erniedrigten intrazellulären Cholesterinkonzentration führen und damit auch zu einer Suppression der Hormonsekretion. Horton et al. konnten mit Microarray-Analysen direkte SCREBF-Zielgene feststellen. Interessanterweise stellte dabei die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) eines der höchst induzierten Gene dar. Weiterhin werden durch eine SREBF-Überexpression endogene Liganden für den LX-Rezeptor gebildet (118). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass die SCREBF-1-Aktivierung mit ER-Stress in Beziehung steht. In β -Zellen des Pankreas besteht eine enge Verbindung zwischen Induktion von SREBF-1, ER-Stress und Glucolipotoxizität. Dabei bleibt aber unklar, ob SREBF induzierte Apoptose durch Lipidakkumulation oder unabhängig davon ausgelöst wird. Fest steht jedoch, dass hohe Glucoselevel mit hohen SREBF-1-Leveln korrelieren und im weiteren zu einer Lipidakkumulation und Apoptose führen (120). In Versuchen von Colgan et al. erfuhr auch SREBF-2 eine Hochregulation durch ER-Stress und Apoptose (146). Im Gegensatz dazu zeigen andere Experimente, dass SREBF-2 durch den klassischen ER-Stress-Signalweg über PERK, eine verminderte Expression erfährt, was wiederum zu einer verminderten Genexpression der SCREBF-2-kontrollierten-Gene führen würde (147). Wie genau die SCREBF-Familie mit ER-Stress und Apoptose

zusammenhängt, ist aktuell noch unklar. Dass eine enge Beziehung besteht, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

ABCG1

Das ABCG1-Gen codiert für einen Transporter, der für das Ausschleusen von Cholesterin aus der Zelle verantwortlich ist. Auch andere zu der ABC-Superfamilie gehörende Transporter wurden herunterreguliert. Dies müsste demnach einen intrazellulären Cholesterinanstieg zur Folge haben.

Die ATP-binding cassette (ABC)-Superfamilie besteht aus 50 verschiedenen Transmembranproteinen. Sie sind für den Membran-Transport von Aminosäuren, Lipiden, Lipopolysacchariden, anorganischen Ionen, Peptiden, Metallen, Medikamenten und Proteinen zuständig. Die Substratspezifität wird dabei durch die Aminosäuresequenz in der Transmembrandomäne bestimmt. Unter Verbrauch von zwei ATP kann der Transporter ein Substrat über die Membran transportieren. Der Subtyp ABCG1 ist vor allem für den Transport von Cholesterin und Phospholipiden verantwortlich und zeigt Ähnlichkeit in der Sterol-Abhängigkeit und Differenzierung zum ABCA1-Transporter. Immunoblot-Analysen lassen eine ubiquitäre Expression des ABCG1-Transporters erkennen. Vor allem in Makrophagen hemmt er vermutlich die übermäßige Aufnahme von Cholesterin und schützt so vor Arteriosklerose (122).

ABCA1 transportiert Cholesterin und Phospholipide zu Apolipoproteinen, die an der Zelloberfläche gebunden sind. Polymorphismen des ABCA1-Gens könnten Einfluss auf das allgemeine Plasma-Lipidlevel haben (121). Auch das ABCA1-Gen wird bei unseren Analysen herunterreguliert. So zeigt sich bei der Behandlung mit 100µM Mitotane eine Suppression um den Faktor 1,7. Das ABCG1-Gen ist mit -7,7 sogar das am meisten supprimierte Gen. Ein intrazellulärer Cholesterinanstieg wäre die Folge dieser Suppression.

Veränderungen der intrazellulären Cholesterinkonzentration

SCREBF-1, SQLE, SCD und LDLR haben alle erheblichen Einfluss auf die intrazelluläre Cholesterinkonzentration. Eine verminderte Genexpression würde in einer Abnahme des Cholesterins in der Zelle resultieren. Dadurch würde der

Grundbaustein der Cortisolbiosynthese fehlen und es käme zu einer Abnahme der Hormonsekretion. Dieser Effekt könnte zu dem stark geminderten Hormonlevel in den durchgeführten Hormonanalysen (siehe S.- 34 -) beitragen. Der Reduzierung der Cholesterinkonzentration steht die besonders starke Suppression von ABCG1 gegenüber, welche einen intrazellulären Cholesterinanstieg zur Folge hätte.

4.3.3 Die Rolle des ER-Stress

Im Rahmen der Literaturrecherche hinsichtlich der markanten Gene fiel immer wieder der Bezug zu dem oben beschriebenen ER-Stress auf. Die beschriebenen Mechanismen des ER-Stresses sind bei der unfolded protein response am besten untersucht. Jedoch nicht nur Proteine können ER-Stress in der Zelle hervorrufen. Auch der Lipidmetabolismus hängt mit diesen ER-Stress-abhängigen-Mechanismen zusammen. Interessanterweise kann zellulärer Stress durch exzessive intrazelluläre Konzentrationen von sogenannten toxischen Lipiden hervorgerufen werden (106). Die meiste Literatur zu diesem Thema findet sich in der Arteriosklerose-Forschung und bezieht sich vor allem auf Makrophagen. So führt hier ein Lipidexzess zu ER-Stress. In in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein Übermaß an freiem Cholesterin in Makrophagen ER-Stress und Apoptose als Folge hat (148, 149). Jedoch ist diese Auswirkung nicht nur auf Makrophagen begrenzt. Nachgewiesen wurde dieser metabolisch bewirkte ER-Stress auch schon in anderen Zellarten (150-152). In arteriosklerotischen Vorgängen und bei Adipositas führen hohe Konzentrationen toxischer Lipide, wie beispielsweise gesättigter Fettsäuren oder von freiem intrazellulärem Cholesterin, zur UPR. Mit welchen Mechanismen genau die Einleitung des ER-Stresses durch Akkumulation toxischer Lipide erfolgt, bleibt bis dato unklar. Fest steht jedoch, dass es eine direkte Verbindung durch die räumliche Nähe zum ER gibt. Viele Lipid-Schlüsselwege finden im ER statt. So spielt auch das im ER-Stress involvierte XBP-1 eine wichtige Rolle bei der Phosphatidylcholin-Synthese und der Endomembransynthese. Weiterhin hat es Einfluss auf die Transkription vieler, für die Lipidsynthese verantwortlichen, Gene der Leber (153). ER-Stress kann

zu einer vermehrten Fettsäuresynthese und einer Steatosis hepatis führen. Im Gegensatz dazu führt eine Hemmung der Phospholipidsynthese oder eine erhöhte Phospholipaseaktivität zu vermehrtem ER-Stress. Außerdem können auch bestimmte Sphingolipidlevel die Funktion des ER beeinträchtigen (154, 155). Diese Entdeckungen legen nahe, dass das ER sensitiv auf Veränderungen des Lipidstatus reagiert. Der Lipidmetabolismus der Zelle und die beteiligten Signalwege werden von Lipidchaperonen im Zytosol reguliert. In Makrophagen und Adipozyten spielt das Lipidchaperon aP2 (adipocyte fatty acid binding protein) dabei eine maßgebliche Rolle. Dieses Lipid-bindende Protein ist verantwortlich für den Fettsäuretransport durch die Zelle und hat eine regulierende Funktion im Rahmen von metabolischen Dysfunktionen wie Adipositas, Diabetes Typ 2 und Arteriosklerose (117). Interessanterweise scheint ein aP2-Defizit in Makrophagen vor Arteriosklerose zu schützen. Abschwächung von Lipid-induziertem ER-Stress führt zu einer Suppression von aP2. Eine Inhibition oder Gendeletion von aP2 bewirkt eine Milderung des ER-Stresses (148). Demzufolge scheint aP2 ein wichtiges Bindeglied zwischen toxischen Lipiden und ER-Stress zu sein. Eine Induktion von aP2 durch Palmitinsäure kann durch das chemische Chaperon PBA (4-phenyl butyric acid) verhindert werden. PBA an sich schwächt den durch toxische Lipide induzierten ER-Stress ab. Auch dies bestätigt die direkte Verbindung des Lipid-Chaperons aP2 mit ER-Stress (153). AP2 wirkt als Lipidchaperon auf den LX α - (liver X α) Rezeptor. Dessen Hemmung bewirkt eine weitere Suppression der Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD). SCD katalysiert den limitierenden Schritt in der Synthese mono-ungesättigter Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren und mildert so die ER-Stress induzierte Apoptose ab (117). Dieser Mechanismus stellt also einen potentiell neuen Signalweg in dem Komplex des ER-induzierten-Stresses dar. Und dieser Weg müsste nicht nur auf Makrophagen begrenzt sein. Auch andere Zellen, so wie die NNR-Zelllinie, könnten über toxische Lipide und Lipidchaperone ER-Stress-induzierter-Apoptose unterlaufen. SCD-Aktivität bei vermehrter Konzentration an toxischen Lipiden könnte in diesen Fällen dem Lipid-induzierten Zelltod vorbeugen (115).

Interessant ist dies vor allem, da SCD bei unseren Analysen stark herunter reguliert wurde. Dies bestätigt die Annahme, dass Mitotane über toxische Lipide Einfluss auf die ER-Funktion nimmt. Eine Akkumulation von freiem Cholesterin in der Zelle aktiviert weitergehend p38-MAPK- und JNK-Signalwege, was eine Verbindung zwischen Apoptose, UPR und der MAPK-Aktivierung nahelegt (144).

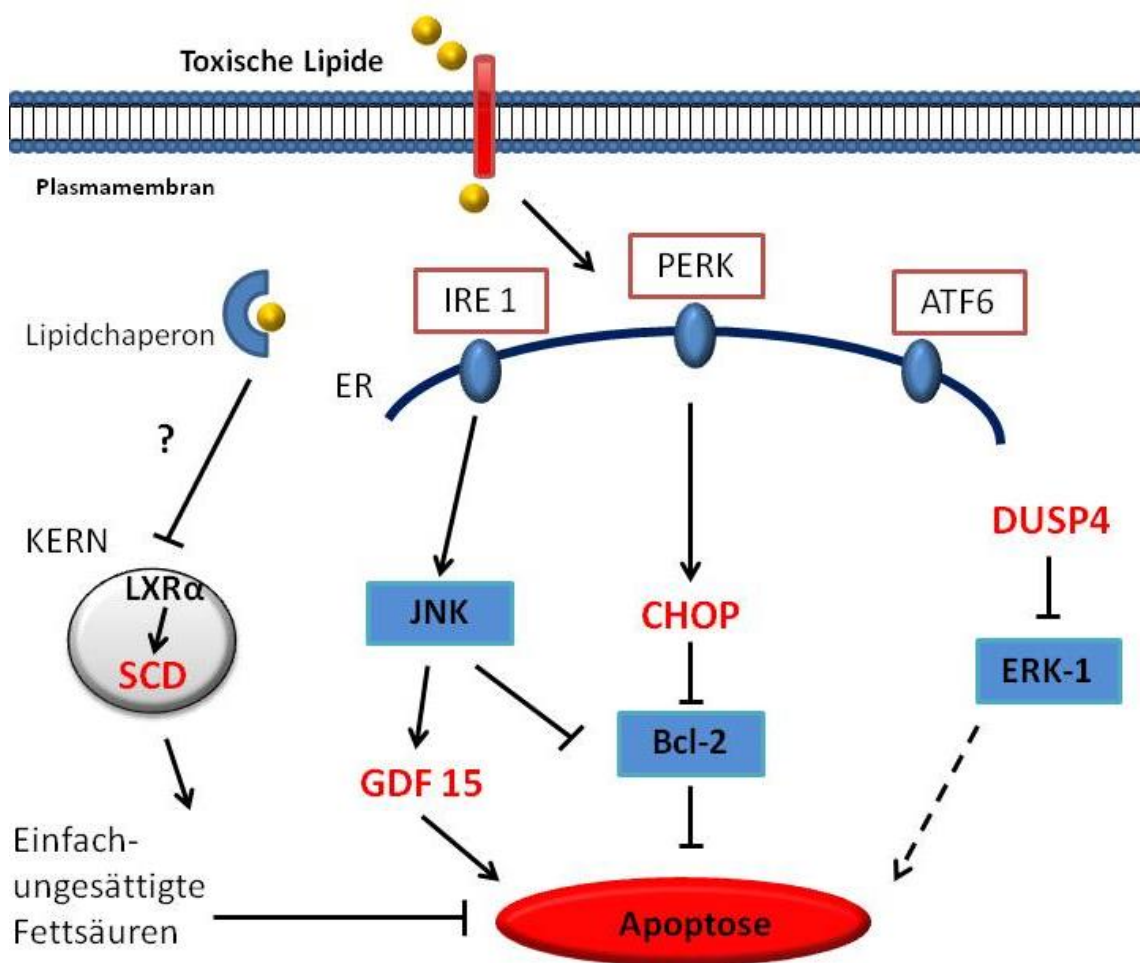


Abbildung 30 Modell der Induktion von ER-Stress durch toxische Lipide

Die Gene GDF15, CHOP und DUSP4 spielen eine Rolle beim Endoplasmatischen Reticulum-Stress, der durch die unfolded protein response oder, wie hier gezeigt, durch toxische Lipide ausgelöst werden kann. Über IRE1, PERK und ATF6 werden die folgenden Wirkungen vermittelt: GDF15 wirkt im direkten Endweg der Apoptose. CHOP hemmt Bcl-2, welches wiederum Apoptose verhindert. Diese Hemmung der Hemmung wirkt folglich proapoptotisch. DUSP-4 könnte indirekt durch Hemmung von ERK-1 Apoptose induzieren. Herabregulation des Anti-ER-Stress-Gens SCD ist ein weiterer möglicher Hinweis auf einen Mitotane-induzierten ER-Stress mit nachfolgender Apoptose. Eigene Darstellung.

Multifaktorielle Genese des ER-Stress

Obwohl nur freies Cholesterin als Induktor von ER-Stress induzierter Apoptose über CHOP in vitro nachgewiesen wurde, geht Tabas (106) von einer multifaktoriellen Genese in vivo aus. ER-Stress allein wäre vermutlich nicht in der Lage Apoptose auszulösen. Erst das Zusammenspiel mehrerer toxischer Stimuli würde zu einem irreparablen Schaden führen. In dieser Hinsicht spielen kompensatorische Überlebensmechanismen über Akt, ERK, NF- κ B und p38 α eine Rolle. Diese werden im Ablauf des ER-Stresses aktiviert. Erst eine Kombination von ER-Stress und Suppression dieser Ausweichmechanismen würde in vivo zum Zelltod führen (106). Daher ist es besonders interessant, dass auch diese Überlebensmechanismen durch Mitotane beeinträchtigt scheinen. Das bei uns, schon weiter oben beschriebene, stark überexprimierte DUSP4 wirkt in der Zelle durch eine Inhibition von ERK. ERK wiederum wirkt mitogen. Es hat eine positive Wirkung auf Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung und es spielt eine Rolle bei oben genannten Überlebensmechanismen. Ein weiterer Faktor, der auf die Apoptose einen Einfluss ausüben könnte, ist die Suppression von SCD. Dies hat, wie schon weiter oben beschrieben, die Blockierung der ER-Stress-Milderung zur Folge und stellt so eine weitere Säule in der Induktion der Apoptose dar.

4.3.4 Diskussion limitierender Faktoren der Arbeit

Es gibt momentan zwei humane Zelllinien aus Nebennierentumoren auf dem Markt: SW13 und NCI-H295. Alle durchgeführten Versuche basieren nur auf NCI-H295-Zellen. Diese wurden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Hormonproduktion ausgewählt. Unterschiede in der Reaktion der Zelllinien auf die Mitotane-Behandlung können demnach in dieser Arbeit nicht beurteilt werden.

Weiterhin wurden aus Praktikabilitätsgründen nur begrenzte Zeitpunkte und Konzentrationen an Mitotane ausgewählt. Für die Genchipanalysen betrug die Inkubationszeit 6 Stunden, da sich zu diesem Zeitpunkt eine Änderung der Expressionrate von BAX in den Real-Time-PCR-Analysen feststellen ließ. Beabsichtigt wurde damit eine Abbildung früh einsetzender Änderungen in der Genexpression.

Allerdings wurden für die FACS-Analysen und den Zelltod-ELISA längere Inkubationszeiten gewählt und die maximalen Apoptose-Raten ließen sich erst bei wesentlichen späteren Zeitpunkten messen.

Ob dies allein an der Erfassung früherer Ereignisse durch die Real-Time-PCR liegt, bleibt offen.

Limitierend bei sämtlichen Apoptosetests war zusätzlich die relativ hohe basale Apoptose-Rate der NCI-H295-Zellen, welche durch Relativierung der Daten auf diese Basisrate herausgerechnet wurde.

Für die Qualität und Konstanz der Proben sprechen die gleichmäßige Verteilung im Histogramm der Partek[®]-Genanalysesoftware sowie die Berücksichtigung des „Batch-effekts“. Die ermittelten Gendaten wurden einerseits anhand einer Zweistichproben-t-Statistik und andererseits anhand eines FDR (false discovery rate)-Tests statistisch ausgewertet. Beide Resultate zeigten nur wenige Abweichungen, was die statistische Sicherheit erhöht.

Für diese Arbeit wurden verschiedene Methoden gewählt, welche sich gegenseitig in ihren Ergebnissen bestätigen. So kann die Beeinflussung der Steroidogenese sowohl im Immunoassay als auch auf molekularer Ebene im Microarray gefunden werden. Der Apoptosenachweis gelang mittels Zelltod-ELISA, Durchflusszytologie, Real-Time-PCR und Genchip-Analysen.

4.3.5 Vorschlag zu einem möglichen Wirkmechanismus von Mitotane

Die gefundenen Genexpressionsmuster führen zu der Frage, ob Mitotane zunächst eine direkte Suppression der Hormonsekretion und erst dann eine sich daran anschließende Apoptose auslöst (Abb.31a), oder ob Mitotane durch Bildung toxischer Lipide direkt zu ER-Stress führt (Abb.31b). Abbildung 31a verdeutlicht die Hypothese, dass Mitotane zunächst SREBF1, den LDL-Transporter und SCD hemmt. All diese Proteine führen normalerweise zu einer intrazellulären Cholesterinzunahme. Ihre Hemmung hätte folglich eine verminderte Cholesterinkonzentration und damit auch eine verminderte Cortisolsynthese zur Folge. Um einen weiteren Cholesterinverlust zu vermeiden, würde die Zelle das ABCG1- und ABCA1-Gen, welche beide für ABC-Transporter codieren, herunterregulieren.

Jedoch könnte die Regulation durch Mitotane auch vice versa aussehen. Dafür spricht, dass das ABCG1-Gen das am meisten supprimierte Gen in unseren Analysen ist. Daraus würde eine Akkumulation von Cholesterin in der Zelle resultieren. Das erhöhte Cholesterin könnte dann als potentiell toxisches Lipid die Zelle in den programmierten Zelltod treiben. Die Zelle könnte dem durch die Blockierung von SREBF1, LDLR und SCD entgegensteuern (dargestellt in Abb.31.b).

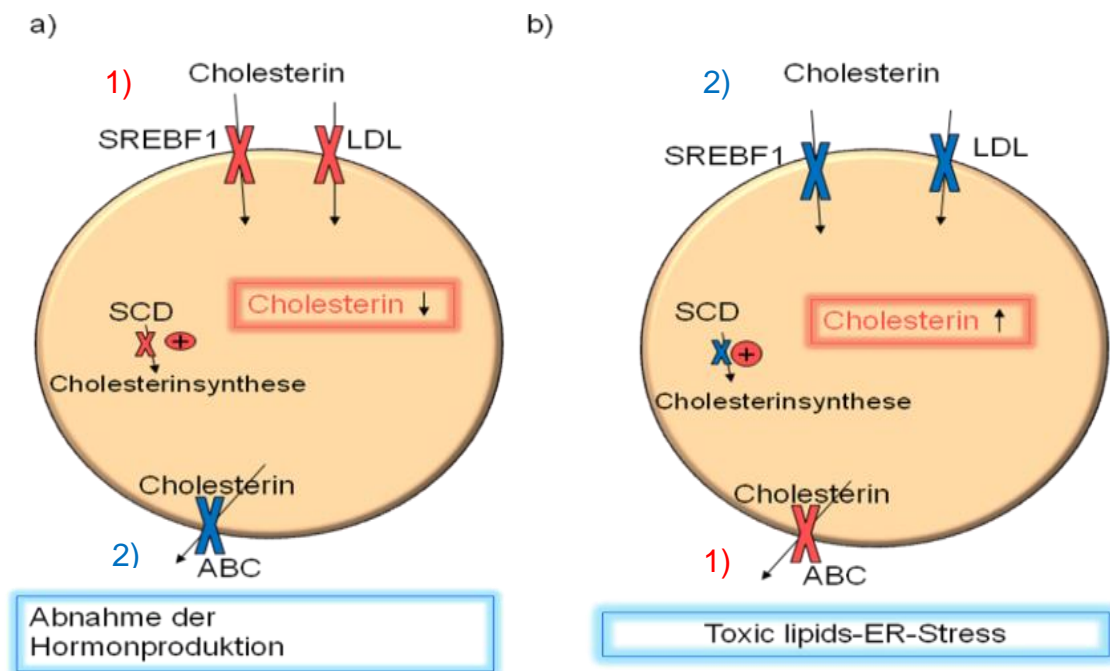


Abbildung 31 Schema der möglichen Wirkungsweisen von Mitotane

Aufgrund der gefundenen Genexpressionsmuster lassen sich zwei Hypothesen erstellen. Die in a) dargestellte Illustration geht von der Annahme aus, dass SREBF1, der LDL-Transporter und SCD zuerst durch die Wirkung von Mitotane supprimiert werden (rot dargestellt). Daraufhin kommt es durch die niedrige intrazelluläre Cholesterinkonzentration zu einer Abnahme der Hormonsekretion. Um weiterem Cholesterinverlust entgegenzusteuern, hemmt die Zelle die ABC-Transporter (in blau dargestellt). Abbildung b) verdeutlicht die Vermutung, dass Mitotane zunächst die ABC-Transporter hemmt, wodurch es zu einer Kumulation von Cholesterin in der Zelle kommt. Dieses führt als toxisches Lipid zu ER-Stress. Kompensatorisch hemmt die Zelle daraufhin den Cholesterineinstrom (in blau dargestellt). Eigene Darstellung.

Welcher Mechanismus der Richtige ist, bleibt zu klären. Möglicherweise gibt es auch ein gemeinsames Gen, welches die beiden Wege vereint. Dieses könnte einerseits zu einer verminderten Hormonsekretion führen und gleichzeitig ER-Stress mit folgender Apoptose in der Zelle auslösen. Auch hinsichtlich der

Apoptose, im Rahmen des ER-Stresses, sind nicht alle Fragen geklärt. Möglich wäre ein proapoptotisches Anfangssignal, welches die Signalkaskade auslöst. Andererseits könnten auch viele apoptotische Signalwege einander bedingen und verstärken. Weiterhin bleibt unklar, an welchem Zeitpunkt die Zelle den Schalter von Überleben auf Apoptose umlegt und welcher der finale Weg in den programmierten Zelltod ist.

Obwohl die genaue molekulare Wirkung von Mitotane noch offen bleibt, scheinen zwei Hauptwirkungen in den Vordergrund zu rücken: zunächst die starke Suppression der Hormonsynthese und zum anderen die starke Beeinflussung von apoptotischen Vorgängen im Zusammenhang mit ER-Stress. Interessant ist weiterhin die Einteilung der in den Genexpressionsanalysen veränderten Gene in zelluläre Komponenten. Dabei zeigte sich eine Überrepräsentanz der Gene des endoplasmatischen Retikulums. Weitere stark vertretene zelluläre Komponenten waren Mitochondrien und die Zellmembran.

5. Zusammenfassung

Das Nebennierenrindenzellkarzinom ist eine hochmaligne Erkrankung und hat eine schlechte Prognose. Mitotane ist bis heute die einzige hierfür zugelassene Therapie. Um die molekularen Mechanismen der Mitotanetherapie besser zu verstehen, wurde die Nebennierenkarzinom-Zelllinie NCI-H295 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitotane inkubiert und die Wirkung auf mehreren Ebenen untersucht. Dabei kam der Untersuchung der Steroidogenese und apoptotischer Vorgänge ein besonderer Fokus zu. In den Hormonanalysen via Immunoassay zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der adrenalen Steroidsekretion. So kam es unter 24-stündiger Inkubation mit 100µM Mitotane zu einer Reduktion der Cortisolsekretion um 89%. Diese Hormonsuppression geht einher mit einer Herabregulation von steroidogenen Enzymen in den durchgeführten Microarray-basierten Genexpressionsanalysen. So konnte gezeigt werden, dass vor allem Steroidbiosynthese-Enzyme der Zona fasciculata und reticularis betroffen sind. Als weitere wichtige Gene im Zusammenhang mit der Beeinflussung des Steroidhaushalts unter Mitotanetherapie konnten SQLE, LDLR, SCD, SREBF1 und ABCG1 identifiziert werden.

Gleichzeitig konnte durch Durchflusszytometrie und Zelltod-ELISA die proapoptische Wirkung von Mitotane gezeigt werden (FACS: 100µM Mitotane, 24 Stunden; Zunahme der Apoptose um den Faktor 2,13). Dies bestätigte sich beispielsweise auch in der Überexpression des Apoptosegens BAX in der Real-Time-PCR. Weiterhin zeigte der RNA-Microarray eine starke Expressionszunahme bei Genen, die mit dem programmierten Zelltod zusammenhängen wie GDF15, DUSP4, TRIB3 und CHOP.

Ausgehend von den klinischen Effekten und bestätigt durch die oben genannten in vitro Ergebnisse bewirkt Mitotane auch molekular folgende Änderungen in Nebennierenrindenzellen: Hemmung der Steroidogenese und Induktion von Apoptose. Es stellt sich damit die Frage, ob diese Mechanismen parallel und separat voneinander ablaufen oder ob es einen gemeinsamen Nenner gibt.

Interessanterweise ergab die Analyse der Genexpressionsdaten, dass viele der proapoptischen Gene mit dem sogenannten ER-Stress zusammenhängen. Einerseits könnte Mitotane durch direkte Inhibition der Hormonsekretion wirken, andererseits könnte ER-Stress durch Mitotane-induzierte-Bildung toxischer Lipide, wie Cholesterol, ausgelöst werden. Um den genauen Wirkmechanismus endgültig zu klären, werden weitere Experimente benötigt.

Mitotane-induzierter ER-Stress liefert einen vollständig neuen Blickwinkel auf die molekulare Wirkweise von Mitotane auf Nebennierenrindenzellen. Gerade da die Mediatoren des ER-Stresses gut definiert und ER-Stress spezifisch sind, könnten sie sinnvolle Ziele in der Therapie darstellen. Die Beobachtung, dass Mitotane ER-Stress hervorruft, könnte in Zukunft somit zur Entwicklung wirksamerer und spezifischerer Therapien des Nebennierenrindenzellkarzinoms führen und so die infauste Prognose dieser malignen Krankheit verbessern.

6. Anhang

6.1 Microarray Genexpressionslisten

Gen-Symbol	Gen Titel	p-Wert (100µM vs.. 0µM)	Veränderung
GDF15	growth differentiation factor 15	0.03186	7.559
FGF21	fibroblast growth factor 21	0.00352	7.144
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	0.00569	6.675
TRIB3	tribbles homolog 3	0.05511	3.970
STC2	stanniocalcin 2	0.03682	3.856
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	0.04443	3.693
ATF3	activating transcription factor 3	0.03001	3.634
STC2	stanniocalcin 2	0.07777	3.617
SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport)	0.05636	3.359
BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	0.08452	3.296
KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	0.08238	3.129
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F	0.00563	3.081
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	0.02211	3.077
TAC1	tachykinin, precursor 1	0.01952	2.984
SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	0.07306	2.943
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	0.02267	2.925
FIBIN	fin bud initiation factor homolog (zebrafish)	0.00897	2.907
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	0.10515	2.881
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	0.06317	2.859
LOC644242	Hypothetical protein LOC644242	0.02792	2.817
PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	0.00836	2.638
AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	0.12778	2.631
JMY	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor	0.06593	2.615
MKX	mohawk homeobox	0.13296	2.601
INHBE	inhibin, beta E	0.12338	2.598
LDLR	low density lipoprotein receptor	0.00963	-2.312
SIGLEC11	sialic acid binding Ig-like lectin 11	0.02289	-2.317
S1PR5	sphingosine-1-phosphate receptor 5	0.04455	-2.317
FOXO6	forkhead box O6	0.09784	-2.326
SCARA5	Scavenger receptor class A, member 5 (putative)	0.01215	-2.349

GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	0.03836	-2.506
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1	0.04478	-2.534
NRP1	neuropilin 1	0.06593	-2.543
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0.02798	-2.615
TPM3	tropomyosin 3	0.10890	-2.666
SYT11	synaptotagmin XI	0.00941	-2.711
KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	0.07471	-2.712
HDAC4	histone deacetylase 4	0.00145	-2.714
FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	0.12413	-2.755
TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	0.12474	-2.772
MMRN2	multimerin 2	0.09259	-2.965
SFRS3	splicing factor, arginine/serine-rich 3	0.09557	-2.976
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.00058	-3.160
ELOVL3	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	0.05115	-3.387
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0.03310	-3.537
CA2	carbonic anhydrase II	0.08842	-3.67
NDP	Norrie disease (pseudoglioma)	0.05114	-4.434
SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	0.05485	-5.965
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0.00337	-7.662

Anm.: Herabregulierte Gene sind blau dargestellt, heraufregulierte Gene sind rot dargestellt.

Tabelle 10 Genexpressionsveränderung der 50 meistveränderten Gene nach Inkubation mit 100µM Mitotane; Gene mit mindestens 1,5facher Veränderung

Gen-Symbol	Gen Titel	p-Wert (50µM vs.. 0µM)	Veränderung
RFX6	regulatory factor X, 6	0.06344	2.946
PAQR9	progesterin and adipoQ receptor family member IX	0.04175	2.463
SCG2	secretogranin II	0.13357	2.441
RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	0.14621	2.427
LRRN1	leucine rich repeat neuronal 1	0.02795	2.374
PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	0.11232	2.286
PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	0.04234	2.245
RND3	Rho family GTPase 3	0.05525	2.239
KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	0.08061	2.162
PRKCH	protein kinase C, eta	0.07922	2.153
AG2	protein Ag2 homolog	0.03925	2.123
MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	0.04779	2.120
PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	0.12219	2.117

NKX2-3	NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	0.04168	2.052
FOXD3	forkhead box D3	0.00307	2.052
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	0.04464	2.024
PLEKHG1	pleckstrin homology domain containing, family G	0.01144	2.023
PPP1R16B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	0.11553	1.989
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	0.03255	1.980
PGM2L1	phosphoglucomutase 2-like 1	0.04045	1.979
PPP1R16B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	0.11969	1.973
RGS4	regulator of G-protein signaling 4	0.13199	1.950
KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	0.02396	1.946
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	0.07542	1.926
DACT1	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 (Xenopus laevis)	0.08704	1.914
ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	0.06296	-1.740
TXNIP	thioredoxin interacting protein	0.01863	-1.752
LOC649305	hypothetical LOC649305	0.06851	-1.760
SNORD114-3	small nucleolar RNA, C/D box 114-3	0.02429	-1.760
RASEF	RAS and EF-hand domain containing	0.01483	-1.767
PRDX2	peroxiredoxin 2	0.02567	-1.770
KIAA1245 ///	KIAA1245 /// neuroblastoma breakpoint family	0.01330	-1.778
DLGAP4	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4	0.02892	-1.799
LOC727820	hypothetical protein LOC727820	0.00273	-1.799
RARA	retinoic acid receptor, alpha	0.34982	-1.803
MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	0.20471	-1.803
HCG2P7	HLA complex group 2 pseudogene 7	0.00819	-1.81
SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	0.00190	-1.828
RASEF	RAS and EF-hand domain containing	0.00404	-1.832
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	0.04143	-1.845
ZFYVE16	zinc finger, FYVE domain containing 16	0.03775	-1.854
ZNF638	zinc finger protein 638	0.13848	-1.867
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0.03895	-1.869
HYMAI	hydatidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)	0.16472	-1.890
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1	0.09639	-1.890
LOC100288332	similar to acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2	0.13071	-1.909
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0.00066	-1.977
TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A	0.03185	-2.100
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0.00353	-3.519

Anm.: Herabregulierte Gene sind blau dargestellt, heraufregulierte Gene sind rot dargestellt.

Tabelle 11 Genexpressionsveränderung der 50 meist veränderten Gene nach Inkubation mit 50µM Mitotane; Gene mit mindestens 1,5facher Veränderung

6.2 Ausführliche Erläuterung des ER-Stress

Im Rahmen der Literaturrecherche ließ sich feststellen, dass eine Vielzahl der proapoptotischen Gene durch die im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindende unfolded protein response (UPR) hochreguliert werden. Diese besondere Situation, der sogenannte ER-Stress, kann in einer Vielzahl pathologischer Zustände beobachtet werden, so unter anderem bei kardiovaskulären Erkrankungen, bei Morbus Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen oder bei Chorea Huntington (126).

In der gesunden Zelle wird ER-Stress durch eine gestörte Calcium-Homöostase oder eine Akkumulation ungefalteter oder missgefalteter Proteine im ER ausgelöst. Diese Proteine bedrohen potentiell das Überleben der Zelle. Als Reaktion auf diese Überforderung im ER wird die UPR hervorgerufen, die über die drei Transmembranproteine PERK, ATF6 und IRE-1 vermittelt wird. Diese, normalerweise auf der luminalen Seite des ERs durch das Chaperon BiP/GRP 78 gebundenen, Proteine leiten einen Translationsstopp der normalen Proteinbiosynthese ein und bewirken weitergehend eine vermehrte Synthese von Proteinchaperonen (156). Proteinchaperone versuchen durch Faltung der angesammelten Proteine dem ER-Stress entgegenzuwirken. Die oben genannten Transmembranproteine vermitteln die UPR über bekannte Mechanismen.

IRE-1 (inositol requiring protein-1) ist eine kombinierte Endoribonuklease und Kinase. Aktivierung durch Autophosphorylierung und Oligomerisierung von IRE-1 führt über verschiedene Signalmoleküle zur Inflammation. Seine RNase- (Nuklease)-Tätigkeit bewirkt das Schneiden einer mRNA an zwei definierten Positionen mit Entfernung eines Introns und damit, nach Ligatur der verbleibenden Exonenden, Synthese des aktiven Transkriptionsfaktors X-box binding protein-1^s (XBP-1^s) (Das hochgestellte s indiziert, dass XBP-1 ein Produkt einer gesplittenen mRNA ist.). Dieser wiederum induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in der UPR involviert sind. Vermehrte Produktion von Protein-Chaperonen und Einleitung des „ER-associated degradation (ERAD) process“ ist das Resultat. ERAD beinhaltet unter anderem die

Translokation ungefalteter Proteine vom ER-Lumen ins Zytosol für den weiteren Abbau im Proteasom. Dadurch unterstützt und erleichtert ERAD die Arbeit der Proteinchaperone und kann den ER-Stress mildern (157). Weiterhin scheint XBP-1^s eine spezielle Rolle in der Regulation von Lipid-spezifischen Enzymen zu haben (158). Ein weiteres Zielprotein von IRE1 stellt das HSP40-Familienmitglied p58^{ipk} dar. Die Hochregulation von p58^{ipk} passiert allerdings erst einige Stunden nach der Phosphorylierung von PERK und eIF2 α . Zu diesem Zeitpunkt könnte der ER-Stress bereits gelöst sein und durch die Aufhebung der Translationshemmung könnte p58^{ipk} den Endpunkt des ER-Stress darstellen oder bei persistierendem Stress die Translation proapoptotischer Proteine zulassen. Phosphoryliertes IRE1 interagiert auch mit dem Adapterprotein TRAF2 (tumor necrosis factor receptor 2). Der IRE1-TRAF2-Komplex fördert eine Kaskade phosphorylierender Ereignisse, unter anderem über ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1), die letztendlich in der Aktivierung der C-Jun-N-terminalen-Kinase (JNK) münden (126). Man sieht also, dass IRE1 pro- und antiapoptotische Wirkungen haben kann. Wann welcher Weg eingeschlagen wird, könnte auch mit zwei IRE1-interagierenden Proteinen zusammenhängen: JIK (c-Jun N-terminal inhibitory kinase) und JAB1 (Jun activation domain-binding protein1). JAB1 bindet an IRE1 in Phasen von mildem oder ohne ER-Stress, bei starkem ER-Stress nimmt die Bindung ab. JIK hat die Fähigkeit an TRAF2 und IRE1 zu binden. Diese Interaktion legt die Vermutung nahe, dass JIK über TRAF2 zur Apoptose führen kann. Mit diesen Funktionen könnten JIK und JAB1 als Schalter zwischen dem pro- und antiapoptotischen Signalweg von IRE1 fungieren (126).

Ein weiterer Weg des ER-Stresses geht über PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), welches ähnlich wie IRE-1 durch Autophosphorylierung und Oligomerisierung in den aktiven Zustand tritt. PERK phosphoryliert die α -Einheit des eukaryotischen Initiationsfaktors α (eIF2a), was zu einer verminderten Proteintranslation führt. Interessanterweise werden manche mRNAs, nämlich jene, welche einen open reading frame an ihrem 5' untranslatiertem Bereich besitzen, vorzugsweise translatiert, wenn sich eIF2a im phosphorylierten

Zustand befindet. So induziert die Minderung von eIF2a selektiv die Translation von ATF4 (activating transcription factor-4). ATF 4 wiederum induziert die Transkription von HERP (homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible protein), BiP/GRP78, CHOP (C/EBP-homologous protein) und GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34). GADD34 wirkt daraufhin der Phosphorylierung von eIF2a entgegen und schützt die Zelle so vor verlängertem ER-Stress.

Der dritte Mechanismus involviert ATF6 (activating transcription factor -6). Dieser transloziert in den Golgi-Apparat, wo er proteolytisch durch S1P und S2P (site-1 und site-2 Protease) verarbeitet wird, um in seine aktive Form überzugehen (158). Diese aktive Form wandert in den Nukleus und induziert Gene mit einem ER stress response element (ERSE) in ihrer Promotorregion (126). ATF 6 spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von Proteinchaperonen, kann aber auch zur Expression von CHOP und XBP-1 führen (159, 160). Trotz dieser CHOP-Induktion gibt es keine Berichte über eine Verbindung von ATF6 und ER-Stress induzierter Apoptose. Daher scheint es so zu sein, dass ATF6 nur Überlebenssignale vermittelt, um dem ER-Stress entgegenzuwirken.

Alle genannten Mechanismen helfen der Zelle sich in Stresssituationen zu adaptieren. Sollten diese genannten Schutzmechanismen jedoch nicht ausreichen oder wird der ER-Stress chronisch, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (127). CHOP als Endweg der UPR weist eine besonders hohe Assoziation mit dem programmierten Zelltod auf. Zwar spielt CHOP bei kurzfristiger Induktion eine protektive Rolle in der UPR, eine verlängerte Expression dagegen führt zur Apoptose der Zelle. Aber auch die anderen Äste der UPR, wie der Weg über IRE1 oder ATF6, können bei langfristiger Stimulation proapoptotisch wirken (106).

6.3 Abbildungen der Webgestaltsoftware

Siehe nächste Seiten.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Steran	- 3 -
Abbildung 2	Steroidbiosynthese	- 4 -
Abbildung 3	Behandlung des NN-Karzinoms bei reserzierbarem Tumor	- 10 -
Abbildung 4	Mitotane (o,p´-DDD)	- 13 -
Abbildung 5	Exemplarische FACS-Darstellung mit einer Annexin- und Propidiumiodidfärbung	- 22 -
Abbildung 6	Prinzip des Sandwich-ELISAs	- 24 -
Abbildung 7	PCR-Schema	- 27 -
Abbildung 8	Fortschreiten der Polymerisation	- 29 -
Abbildung 9	Übersicht über den Ablauf der Microarray- Genexpressionsanalyse	- 31 -
Abbildung 10	Effekt von Mitotane auf die Sekretion von Cortisol, DHEAS und Androstendion	- 34 -
Abbildung 11	Suppression der Cortisolsekretion unter Mitotanetherapie	- 35 -
Abbildung 12	Relativierte Cortisolsekretion über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden	- 36 -
Abbildung 13	Wirkung von Mitotane auf die CYP3A4 Expression in HepG2-Zellen	- 37 -

Abbildung 14	Expression von CYP3A4 und PXR unter Mitotaneinfluss	- 38 -
Abbildung 15	FACS-Zählung der Zellen nach Färbung mit Annexin V und PI	- 39 -
Abbildung 16	Effekt von Mitotane auf NCI-H295-Suspensionszellen im Durchflusszytometer	- 40 -
Abbildung 17	Apoptose-Induktion durch Mitotane dargestellt im Zelltod-ELISA	- 41 -
Abbildung 18	Bax-Genexpression unter Behandlung 50µM Mitotane	- 42 -
Abbildung 19	BAX-Genexpression unter Behandlung mit 100µM Mitotane	- 43 -
Abbildung 20	Histogramm der NCI-H295-Proben	- 44 -
Abbildung 21	In ihrer Expression veränderte Gene bei 50µM und 100µM Mitotane	- 45 -
Abbildung 22	GSEA Heat Map: Lipid Metabolic Process	- 50 -
Abbildung 23	Ausschnitt des Baumdiagramms "Biologischer Prozess" der GOrilla [®] -Software	- 53 -
Abbildung 24	GDF15, DUSP4 und CHOP	- 54 -
Abbildung 25	Gene des programmierten Zelltods	- 55 -
Abbildung 26	Genaue Darstellung der beim ER-Stress involvierten Gene	- 57 -

Abbildung 27	Humane Steroidbiosynthese, nach Kompartimenten	- 61 -
Abbildung 28	Steroidbiosynthese, unter Einbeziehung der veränderten Expression der Hauptenzyme, nach Behandlung mit Mitotane	- 62 -
Abbildung 29	ER-Stress: Prinzip der UPR	- 67 -
Abbildung 30	Modell der Induktion von ER-Stress durch toxische Lipide	- 80 -
Abbildung 31	Schema der möglichen Wirkungsweisen von Mitotane	- 83 -
Abbildung 32	Webgestalt-Baumdiagramm Genveränderung 1,5fach; 100 μ M vs. 0 μ M Mitotane	- 93 -
Abbildung 33	Webgestalt-Baumdiagramm Genveränderung 1,5fach; 50 μ M vs. 0 μ M Mitotane	- 94 -
Abbildung 34	Webgestalt-Baumdiagramm Genveränderung 1,5fach; gemeinsam veränderte Gene 50 μ M/100 μ M-Mitotane	- 95 -

8. Literaturverzeichnis

1. Greten H, Rinninger F, Greten T. *Innere Medizin*. 13 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.
2. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
3. Kasper DL, Harrison TR. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.
4. Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin*. 6 ed. München: Urban&Fischer; 2009.
5. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2000;59 Suppl 2:II/12-7.
6. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine reviews*. 1998;19(2):101-43.
7. Meng W, Ziegler R. *Endokrinologie, Grundlagen-Klinik-Praxis*. Jena: Gustav Fischer 1997.
8. DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2006.
9. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*. 2011;32(1):81-151.
10. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jr., Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International journal of biological sciences*. 2009;5(5):474-88.
11. Capponi AM. Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2002;13(3):118-21.
12. Püschel, Kühn, Kietzmann, Höhne, Christ, Doenecke, et al. *Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.

13. Christenson LK, Strauss JF, 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Archives of medical research*. 2001;32(6):576-86.
14. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2008.
15. Richfield D, Häggström M. 28 März 2009.
16. Kebebew E, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress? *World journal of surgery*. 2006;30(5):872-8.
17. Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):1853-78.
18. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(6):2027-37.
19. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9330-5.
20. Schulick RD, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma. *World journal of urology*. 1999;17(1):26-34.
21. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2650-5.
22. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *The New England journal of medicine*. 1990;322(17):1195-201.
23. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(3):667-80.

24. Allolio B, Fassnacht M. Deutsches Nebennierenkarzinom-Register;abgerufen am 08.09.2011
25. Allolio B, Fassnacht M, Arlt W. Maligne Tumoren der Nebennierenrinde. *Der Internist*. 2002;2:186–95.
26. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *The Journal of urology*. 1978;120(6):660-5.
27. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucszy P, Willenberg HS, Beuschlein F, 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):243-50.
28. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nature reviews. Endocrinology*. 2011;7(6):323-35.
29. Fottner C, Hoefflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2004;36(6):397-405.
30. Logie A, Boulle N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, et al. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *Journal of molecular endocrinology*. 1999;23(1):23-32.
31. van Ditzhuijsen CI, van de Weijer R, Haak HR. Adrenocortical carcinoma. *The Netherlands journal of medicine*. 2007;65(2):55-60.
32. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1989;13(3):202-6.
33. Brix D, Allolio B, Fenske W, Agha A, Dralle H, Jurowich C, et al. Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients. *Eur Urol*. 2010;58(4):609-15.
34. Berruti A, Baudin E, Gelderblom H, Haak HR, Porpiglia F, Fassnacht M, et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 7:vii131-8.

35. Baudin E, Leboulleux S, Al Ghuzlan A, Chougnet C, Young J, Deandreis D, et al. Therapeutic management of advanced adrenocortical carcinoma: what do we know in 2011? *Horm Cancer*. 2011;2(6):363-71.
36. University of Turin I. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00777244>. abgerufen am 21.05.2012
37. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2012;366(23):2189-97.
38. Kroiss M, Reuss M, Kuhner D, Johanssen S, Beyer M, Zink M, et al. Sunitinib Inhibits Cell Proliferation and Alters Steroidogenesis by Down-Regulation of HSD3B2 in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Frontiers in endocrinology*. 2011;2:27.
39. Industry API. Astellas Pharma Inc Industry; <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00924989>. abgerufen am 22.07.2012
40. Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, 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):445-53.
41. Nelson AA, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Archives of pathology*. 1949;48(5):387-94.
42. Gutierrez ML, Crooke ST. Mitotane (o,p'-DDD). *Cancer treatment reviews*. 1980;7(1):49-55.
43. Cai W, Benitez R, Counsell RE, Djanegara T, Schteingart DE, Sinsheimer JE, et al. Bovine adrenal cortex transformations of mitotane [1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane; o,p'-DDD] and its p,p'- and m,p'-isomers. *Biochemical pharmacology*. 1995;49(10):1483-9.
44. Asp V, Cantillana T, Bergman A, Brandt I. Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2010;40(3):177-83.
45. Moy RH. Studies of the pharmacology of o,p'DDD in man. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1961;58:296-304.

46. Veytsman I, Nieman L, Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(27):4619-29.
47. Joellenbeck L, Qian Z, Zarba A, Groopman JD. Urinary 6 beta-hydroxycortisol/cortisol ratios measured by high-performance liquid chromatography for use as a biomarker for the human cytochrome P-450 3A4. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992;1(7):567-72.
48. Kroiss M, Quinkler M, Lutz WK, Allolio B, Fassnacht M. Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(5):585-91.
49. Martz F, Straw JA. The in vitro metabolism of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'-DDD) by dog adrenal mitochondria and metabolite covalent binding to mitochondrial macromolecules: a possible mechanism for the adrenocorticolytic effect. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1977;5(5):482-6.
50. Martz F, Straw JA. Metabolism and covalent binding of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p,'-DDD). Correlation between adrenocorticolytic activity and metabolic activation by adrenocortical mitochondria. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1980;8(3):127-30.
51. Cai W, Counsell RE, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Vaz AD, Wotring LL. Adrenal proteins bound by a reactive intermediate of mitotane. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1997;39(6):537-40.
52. Cai W, Counsell RE, Djanegara T, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Wotring LL. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1995;84(2):134-8.
53. Abraham J, Bakke S, Rutt A, Meadows B, Merino M, Alexander R, et al. A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma: continuous infusion doxorubicin, vincristine, and etoposide with daily mitotane as a P-glycoprotein antagonist. *Cancer*. 2002;94(9):2333-43.
54. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, et al. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical

- carcinoma. The New England journal of medicine. 2007;356(23):2372-80.
55. Stigliano A, Cerquetti L, Borro M, Gentile G, Bucci B, Misiti S, et al. Modulation of proteomic profile in H295R adrenocortical cell line induced by mitotane. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(1):1-10.
 56. Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, et al. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer*. 2001;92(6):1385-92.
 57. Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, et al. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer*. 1994;69(5):947-51.
 58. Rainey WE, Bird IM, Mason JI. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Molecular and cellular endocrinology*. 1994;100(1-2):45-50.
 59. Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B. New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest*. 2000;30 Suppl 3:76-82.
 60. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan[et al.]*. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
 61. <http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie>. abgerufen am 04.10.11
 62. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*. 2002;48(10):1819-27.
 63. Sandstrom K, Hakansson L, Lukinius A, Venge P. A method to study apoptosis in eosinophils by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2000;240(1-2):55-68.
 64. Duke RC, Cohen JJ. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine research*. 1986;5(4):289-99.
 65. Suganuma T, Workman JL. Crosstalk among Histone Modifications. *Cell*. 2008;135(4):604-7.

66. Cell Death Detection ELISA Handbook: Roche; 1999.
67. Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*. 2011;Appendix 1:Appendix 1K.
68. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques*. 1995;19(2):208-10.
69. Grüne Reihe: Materialien S II, Grafiken, Aufgaben und Praktikumsseiten. Braunschweig: Schroedel Verlag; 2000-2008.
70. Alle Gendaten wurden aus der Onlineplattform genecards.org bezogen.
71. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature*. 1990;347(6288):44-9.
72. Müller H-J, Röder T, eds. *Microarrays*. Heidelberg: Elsevier GmbH; 2004.
73. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(5):1663-7.
74. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics*. 1999;21(1 Suppl):20-4.
75. Müller V. *Candida albicans-induzierte Genexpression in primären humanen Endothelzellen - Mechanismen der Signaltransduktion und Möglichkeiten der Intervention [Dissertation]*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2007.
76. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
77. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research*. 2003;31(4):e15.
78. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 2007;8(1):118-27.

79. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature reviews. Genetics*. 2010;11(10):733-9.
80. Klipper-Aurbach Y, Wasserman M, Braunspiegel-Weintrob N, Borstein D, Peleg S, Assa S, et al. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Medical hypotheses*. 1995;45(5):486-90.
81. Bley Müller, Gehlert, Gülicher. *Statistik für Wirtschaftswissenschaftler*. Vahlen Franz GmbH; 2004.
82. Zhang B, Kirov S, Schmoyer D, Snoddy J. Vanderbilt University; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>. abgerufen im Mai 2011
83. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*. 2003;34(3):267-73.
84. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(43):15545-50.
85. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC bioinformatics*. 2009;10:48.
86. Genego. Thomson Reuters; <http://www.genego.com>. abgerufen ab Mai 2011
87. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D561-8.
88. Weizmann Institute of Science; www.genecards.org. abgerufen am 01.11.2011
89. Medina-Diaz IM, Elizondo G. Transcriptional induction of CYP3A4 by o,p'-DDT in HepG2 cells. *Toxicology letters*. 2005;157(1):41-7.
90. Gruyter d, ed. *Pschyrembel*. Berlin; 2002.

91. Zhivotovsky B, Orrenius S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*. 2006;27(10):1939-45.
92. Bogner V, Leidel BA, Kanz KG, Mutschler W, Neugebauer EA, Biberthaler P. Pathway analysis in microarray data: a comparison of two different pathway analysis devices in the same data set. *Shock*. 2011;35(3):245-51.
93. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang HP, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*. 1999;65(1):2-5.
94. Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF, et al. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene*. 2002;21(27):4212-9.
95. Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, et al. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer research*. 2006;66(10):4983-6.
96. Kim KK, Lee JJ, Yang Y, You KH, Lee JH. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(4):704-12.
97. Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankhurst S, Russell PJ, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer research*. 2003;63(16):5034-40.
98. Bai L, Yoon SO, King PD, Merchant JL. ZBP-89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK. *Cell death and differentiation*. 2004;11(6):663-73.
99. Berasi SP, Huard C, Li D, Shih HH, Sun Y, Zhong W, et al. Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(37):27167-77.
100. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2008;60(3):261-310.
101. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2008;27(2):253-61.

102. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):153-83.
103. Teng CH, Huang WN, Meng TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(39):28395-407.
104. Ohoka N, Hattori T, Kitagawa M, Onozaki K, Hayashi H. Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(49):35687-94.
105. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*. 2004;11(4):381-9.
106. Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(9):2333-9.
107. Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(4):1479-89.
108. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Molecular and cellular biology*. 1996;16(8):4273-80.
109. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*. 1996;272(5266):1347-9.
110. Zhu T, Lobie PE. Janus kinase 2-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase by growth hormone. Resultant transcriptional activation of ATF-2 and CHOP, cytoskeletal reorganization and mitogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(3):2103-14.
111. Zou W, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Coupling of endoplasmic reticulum stress to CDDO-Me-induced up-regulation of death receptor 5 via a CHOP-dependent mechanism involving JNK activation. *Cancer research*. 2008;68(18):7484-92.
112. Harada T, Chelala C, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR. Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based

- techniques. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 2009;9(1-2):13-24.
113. Helms MW, Kemming D, Pospisil H, Vogt U, Buerger H, Korsching E, et al. Squalene epoxidase, located on chromosome 8q24.1, is upregulated in 8q+ breast cancer and indicates poor clinical outcome in stage I and II disease. *British journal of cancer*. 2008;99(5):774-80.
 114. Nagai M, Sakakibara J, Wakui K, Fukushima Y, Igarashi S, Tsuji S, et al. Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24.1. *Genomics*. 1997;44(1):141-3.
 115. Flowers MT, Miyazaki M, Liu X, Ntambi JM. Probing the role of stearyl-CoA desaturase-1 in hepatic insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(6):1478-81.
 116. Igal RA. Stearyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(9):1509-15.
 117. Liu X, Ntambi JM. Atherosclerosis: keep your macrophages in shape. *Nature medicine*. 2009;15(12):1357-8.
 118. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12027-32.
 119. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;501(2):177-81.
 120. Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 17):3905-15.
 121. Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2004;53(3):235-43.
 122. Velamakanni S, Wei SL, Janvilisri T, van Veen HW. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2007;39(5-6):465-71.
 123. Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Current opinion in investigational drugs*. 2005;6(4):386-94.

124. Lehmann TP, Wrzesinski T, Jagodzinski PP. The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCIH295R adrenocortical cells. *Mol Med Rep.* 2013;7(3):893-900.
125. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *The Biochemical journal.* 2002;366(Pt 2):585-94.
126. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports.* 2006;7(9):880-5.
127. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology.* 2011;13(3):184-90.
128. Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Molecular cancer therapeutics.* 2003;2(10):1023-9.
129. Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, et al. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(26):20127-35.
130. Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Molecular pharmacology.* 2005;67(2):356-64.
131. Chiu SC, Wang MJ, Yang HH, Chen SP, Huang SY, Chen YL, et al. Activation of NAG-1 via JNK signaling revealed an isochaiulactone-triggered cell death in human LNCaP prostate cancer cells. *BMC cancer.* 2011;11:146.
132. Baek KE, Yoon SR, Kim JT, Kim KS, Kang SH, Yang Y, et al. Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2009;401(1-2):128-33.
133. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Molecular pharmacology.* 2001;59(4):901-8.

134. Graichen R, Liu D, Sun Y, Lee KO, Lobie PE. Autocrine human growth hormone inhibits placental transforming growth factor-beta gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(29):26662-72.
135. Appierto V, Tiberio P, Villani MG, Cavadini E, Formelli F. PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. *Carcinogenesis*. 2009;30(5):824-31.
136. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circulation research*. 2006;98(3):342-50.
137. Breit SN, Johnen H, Cook AD, Tsai VW, Mohammad MG, Kuffner T, et al. The TGF-beta superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: A pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth factors*. 2011.
138. Guan KL, Butch E. Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(13):7197-203.
139. Chen P, Hutter D, Yang X, Gorospe M, Davis RJ, Liu Y. Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(31):29440-9.
140. Sieben NL, Oosting J, Flanagan AM, Prat J, Roemen GM, Kolkman-Uljee SM, et al. Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7257-64.
141. Armes JE, Hammet F, de Silva M, Ciciulla J, Ramus SJ, Soo WK, et al. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene*. 2004;23(33):5697-702.
142. Prudente S, Morini E, V. T. Insulin signaling regulating genes: effect on T2DM and cardiovascular risk. *Nature reviews. Endocrinology*. 2009.

143. Lee H, Park MT, Choi BH, Oh ET, Song MJ, Lee J, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced JNK activation is a critical event leading to mitochondria-mediated cell death caused by beta-lapachone treatment. *PloS one*. 2011;6(6):e21533.
144. Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, et al. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *The Journal of cell biology*. 2005;171(1):61-73.
145. Seimon TA, Wang Y, Han S, Senokuchi T, Schrijvers DM, Kuriakose G, et al. Macrophage deficiency of p38alpha MAPK promotes apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(4):886-98.
146. Colgan SM, Tang D, Werstuck GH, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(10):1843-51.
147. Harding HP, Zhang Y, Khersonsky S, Marciniak S, Scheuner D, Kaufman RJ, et al. Bioactive small molecules reveal antagonism between the integrated stress response and sterol-regulated gene expression. *Cell metabolism*. 2005;2(6):361-71.
148. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nature medicine*. 2010;16(4):396-9.
149. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature cell biology*. 2003;5(9):781-92.
150. Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, Stoeckert CJ, Jr., Davies PF. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circulation research*. 2009;105(5):453-61.
151. Kedi X, Ming Y, Yongping W, Yi Y, Xiaoxiang Z. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):123-30.
152. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005;111(14):1814-21.

153. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature medicine*. 2009;15(12):1383-91.
154. Tessitore A, del PMM, Sano R, Ma Y, Mann L, Ingrassia A, et al. GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Molecular cell*. 2004;15(5):753-66.
155. Ramanadham S, Hsu FF, Zhang S, Jin C, Bohrer A, Song H, et al. Apoptosis of insulin-secreting cells induced by endoplasmic reticulum stress is amplified by overexpression of group VIA calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 beta) and suppressed by inhibition of iPLA2 beta. *Biochemistry*. 2004;43(4):918-30.
156. Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, et al. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*. 1993;75(4):717-28.
157. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007;8(7):519-29.
158. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
159. Hetz CA, Soto C. Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Current molecular medicine*. 2006;6(1):37-43.
160. Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(8):2296-307.

9. Danksagung

Bei folgenden Personen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken:

Professor Dr. Martin Fassnacht für die Bereitstellung des Themas und ganz besonders für die vielen Anregungen und die Unterstützung in der Endphase der Arbeit.

Dr. Dr. Matthias Kroiss für die sehr gute Betreuung und den steten Rat.

Dr. rer. nat. Silviu Sbiera, dafür, dass er immer Zeit für mich gefunden hat und mir stets bei Fragen zur Seite stand.

Dr. Ellen Leich und der Arbeitsgruppe von Professor Rosenwald für die Anfertigung des Microarrays und die gute Zusammenarbeit. Professor Rosenwald möchte ich darüber hinaus für die Übernahme des Koreferates herzlich danken.

Ohne das Team des endokrinologischen Labors wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich herzlich bei Melanie Beyer, Katharina Henzel und Martina Zink für die Einführung in die Laborarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Für die Anfertigung des Immunoassays gebührt dem Team des Routinelabors der Endokrinologie/Diabetologie Dank.

Friederike Hittler für das offene Ohr, wenn es einmal nicht so gut gelaufen ist und die Motivation, die sie mir immer wieder schenken konnte.

Meiner Schwester, Nora Hoffend, die mir, nicht nur bei Fragen zur Formatierung, zur Seite stand.

Meinen Eltern für die jahrelange bedingungslose Unterstützung und das Interesse, das sie immer wieder an meiner Arbeit gezeigt haben. Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Margret Wiemer, für die mentale Stütze und die Mühe, die sie sich beim Korrekturlesen gemacht hat.