

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

Leiter: Professor Dr. med. M. Fassnacht

Etablierung und Charakterisierung einer humanen adrenokortikalen Zelllinie

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jochen Josef Schreiner

aus Roding

Würzburg, Juni 2021

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias Kroiss

Koreferent: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Berichterstattung: Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 2023

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Grundlagen	1
1.1. Anatomie und Histologie der Nebenniere	1
1.2. Funktion und Regulation der Steroidhormone	1
1.3. Das Nebennierenrindenzkarzinom.....	3
1.3.1. Klinische Präsentation.....	3
1.3.2. Histologische Diagnosestellung.....	4
1.3.3. Molekulare Pathogenese.....	5
1.3.4. Staging und Prognose.....	6
1.3.5. Therapie des lokal begrenzten Nebennierenkarzinoms	7
1.3.6. Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms.....	7
1.3.7. Keimbahnmutationen	9
1.3.8. <i>MUTYH1</i> -Mutation.....	10
1.4. Überblick über vorhandene Zellkulturmodelle des	10
1.5. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Patientenkollektiv und Ethik	12
2.2. Material	12
2.2.1. Verbrauchsmaterialien	12
2.2.2. Geräte	13
2.2.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer	14
2.2.4. Kits	15
2.2.5. TaqMan Sonden für qPCR und Antikörper.....	15
2.3. Methoden.....	16
2.3.1. Herstellung des Kulturmediums.....	16
2.3.2. Verarbeitung von Gewebeprobe.....	17
2.3.3. Pflege der Primärkultur.....	18

2.3.4.	Entfernung von Fibroblasten aus der Primärkultur	19
2.3.5.	Generierung einer stabilen Zelllinie	21
2.3.6.	Testung der Primärkultur auf Mykoplasmen	22
2.3.7.	Einbettung von Zellpellets	23
2.3.8.	Immunhistochemie	23
2.3.9.	Immunfluoreszenz-Färbung von 8-Oxoguanin	24
2.3.10.	Mikroskopie	25
2.3.11.	Extraktion von DNA und RNA, qPCR	25
2.3.12.	Short Tandem Repeat (STR) Analyse	26
2.3.13.	Proliferationsassay und Behandlung mit Mitotan.....	26
2.3.14.	LC-MS/MS Messung der Hormonproduktion.....	28
2.3.15.	Whole Exome Sequenzierung (WES)	28
3.	Ergebnisse.....	29
3.1.	Klinische Präsentation des Patienten.....	29
3.2.	Etablierung der JIL-2266 ACC Zelllinie	29
3.3.	Die Immunhistochemie zeigt Parallelen zwischen JIL-2266 und Primärtumor auf	32
3.4.	mRNA Expression Nebennieren-spezifischer Marker	33
3.5.	Proliferationsrate der JIL-2266 und Sensitivität gegenüber Mitotan.....	36
3.6.	Steroidhormonbildung der JIL-2266.....	37
3.7.	WES zeigt eine Keimbahnmutation in der mutY DNA Glykosylase.....	40
3.8.	Funktionelle Konsequenzen der loss-of function Mutation im MutY DNA Glykosylase Gen	41
4.	Diskussion	44
4.1.	Bestätigung der Authentizität der JIL-2266 Zelllinie	44
4.2.	Überprüfung des adrenalen Ursprungs der JIL-2266 Zelllinie.....	45
4.3.	Genetische Signatur der JIL-2266 Zelllinie	46
4.4.	Schlussfolgerung und zukünftige Schritte.....	48

5. Zusammenfassung	49
6. Literaturverzeichnis.....	50

Appendix

- I. Abkürzungsverzeichnis
- II. Abbildungsverzeichnis
- III. Tabellenverzeichnis
- IV. Danksagung

1. Einleitung und Grundlagen

1.1. Anatomie und Histologie der Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig angelegte Drüsen, welche retroperitoneal gelegen, dem Oberpol der Nieren aufsitzen. Sie sind jeweils von einer Fettkapsel umgeben. Entwicklungsgeschichtlich ist die Nebenniere aus zwei Anteilen aufgebaut, der Nebennierenrinde, welches mesodermalen Ursprungs ist und dem Nebennierenmark, bei dem es sich um ein modifiziertes sympathisches Ganglion handelt. Funktionell unterscheiden sich Mark und Rinde insofern, als dass im Nebennierenmark Katecholamine und in der Nebennierenrinde Steroidhormone gebildet werden (1).

Die Blutversorgung erfolgt dabei aus drei Hauptarterien, der Arteria phrenica inferior entspringt die Arteria suprarenalis, die Arteria suprarenalis media entspringt der Aorta abdominalis und die Arteria suprarenalis der Arteria renalis. Durch die Nebennierenrinde ziehen diese als sinusoide Kapillaren, welche in Sinusoiden des Marks münden. Durch diesen Gefäßverlauf wird das Mark durch die Steroidhormone der Rinde mit beeinflusst. Der Blutabfluss wird meist durch jeweils durch eine Vena suprarenalis gewährleistet. Diese mündet rechts direkt in der Vena cava inferior und links in der Vena renalis (2).

Histologisch ist die Nebennierenrinde aus drei Zonen aufgebaut, was sich in ihrer Funktion widerspiegelt. In der *Zona glomerulosa*, der unmittelbar unterhalb der Kapsel liegenden äußersten Schicht, werden Mineralokortikoide gebildet. Daran schließt sich die *Zona fasciculata* an, in der Glukokortikoide synthetisiert werden. Die *Zona reticularis* ist die innerste Schicht und grenzt an das Nebennierenmark. Hier werden überwiegend Androgene, sowie ein geringer Anteil an Glukokortikoiden produziert (2).

1.2. Funktion und Regulation der Steroidhormone

Die Glukokortikoidsynthese unterliegt einer übergeordneten Steuerung durch die Freisetzung von ACTH (Adrenocorticotropin) in der Adenohypophyse und diese wiederum einer Regulation durch CRH (Corticotropin Releasing Hormon). Die hypothalamische CRH Freisetzung führt in der Adenohypophyse zu einer

Freisetzung von Prä-POMC (Proopiomelanocortin), welches dort in Peptidhormone gespalten wird. Eines dieser Spaltprodukte ist das ACTH, welches in die Blutbahn abgegeben wird und an den Zellen der *Zona fasciculata* der Nebennieren die Cortisolsynthese nach Bindung an den MC2- (Melanocortin 2) Rezeptor stimuliert. Freies Cortisol wiederum führt zu einer negativen Rückkopplung auf die Hypothalamus-Hypophysenachse und zu einer reduzierten Freisetzung von CRH und ACTH. In diesem Regelkreis unterliegt die Cortisolsekretion einer zirkadianen Rhythmik und wird vorwiegend vormittags ausgeschüttet mit einem Abfall der Sekretion zur Nacht. Im Blut liegt das Cortisol zum größten Teil gebunden an das Protein Transcortin (CBG, corticosteroid binding globulin) vor (3). Cortisol wird von den Zellen des Zielorganes aufgenommen und bindet dort an den intrazellulär gelegenen Glukokortikoidrezeptor. Dieser wiederum bindet im Zellkern an DNA-Sequenzen zur Steuerung der Transkription. Je nach Zielorgan werden überwiegend katabole Stoffwechselprozesse in Gang gesetzt. So wird zum Beispiel im Muskel- und Fettgewebe die Proteinolyse gesteigert und die Lipogenese gehemmt. In der Leber führt die Cortisolwirkung zu Steigerung der Gluconeogenese und somit einem höheren Blutglucosespiegel im Organismus (3). An den Zellen der humoralen Immunabwehr wirkt Cortisol supprimierend und entfaltet antiinflammatorische Effekte (4). Eine pathologische Übersekretion von Cortisol kann durch eine autonome ACTH-Sekretion der Hypophyse oder einer autonomen Cortisolsekretion der Nebennieren entstehen. Meist geschieht dies aufgrund gutartiger Mikroadenome der Hypophyse oder Adenome der Nebenniere. Jedoch kann dies auch im Rahmen maligner Tumore wie dem Nebennierenrindencarcinom (adrenocortical carcinoma, ACC) auftreten (5).

Die Regulation der Synthese der Mineralokortikoide wird durch das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) gesteuert. Infolge eines erniedrigten systemischen Blutdrucks und einhergehender Abnahme des Perfusionsdrucks der Nierenarterien wird Renin von juxtaglomerulären Nierenzellen ausgeschüttet. Renin bewirkt eine enzymatische Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Dieses wird durch das Enzym ACE (Angiotensin-converting-Enzyme) in das aktive Hormon Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II bewirkt einerseits eine

Vasokonstriktion und dadurch Steigerung Blutdrucks, andererseits regt es die Synthese von Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebenniere (6). Aldosteron als wesentlichstes Mineralocorticoid bewirkt an den Zielorganen wie den Tubuli der Nieren, den Schweißdrüsen und Darmschleimhaut eine Natriumretention und Kaliumsekretion. Dies erfolgt durch die Bindung von Aldosteron an den intrazellulären Mineralocorticosteroidrezeptor. So führt Aldosteron an den distalen Tubuli der Nieren zu einem Einbau von epithelialen Natriumkanälen (ENaC), was zu einer gesteigerten Rückresorption von Natrium und folglich zu einer gesteigerten Wasserretention führt, wodurch der systemische Blutdruck angehoben wird.

In der *Zona reticularis* der Nebenniere werden überwiegend Androgene in Abhängigkeit eines ACTH-Stimulus gebildet. Der Großteil der Androgene entstammt jedoch den primären Geschlechtsorganen, den Leydig- Zellen des Hodens und dem Ovar. Ihre Sekretion wird die hypothalamisch-hypophysäre Achse durch Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) reguliert (7).

1.3. Das Nebennierenrindenzarzinom

Das Nebennierenrindenzarzinom (adrenocortical carcinoma, ACC) ist eine sehr seltene maligne Erkrankung, die ihren histogenetischen Ursprung in Zellen der Nebennierenrinde hat. Die Inzidenz liegt bei 0,5-2 pro Millionen (8). Der Altersgipfel liegt dabei in der ersten und vierten Lebensdekade, bei einem Median von 46 Jahren (9), wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (10). Die Prognose des ACC ist heterogen, jedoch in den meisten Fällen ungünstig mit einem medianen Gesamtüberleben von 15 Monaten (5, 11).

1.3.1. Klinische Präsentation

Etwa 60-80% der Patienten mit ACC fallen durch einen Hormonüberschuss auf. Dabei prägen unterschiedliche Steroidhormone das klinische Bild. So können durch einen Überschuss durch Glukokortikoide ein Cushing Syndrom hervorgerufen werden (5, 11, 12). In seltenen Fällen (unter 10%) zeigt sich eine Überproduktion von Mineralokortikoiden. Nahezu diagnostisch für einen malignen Nebennierentumor ist der Nachweis eines Sexualhormonexzesses. Bei

Frauen führt ein Androgenexzess zur Virilisierung mit den klinischen Zeichen des Hirsutismus mit maskulinem Haarwuchs, bei Männern eine tumorale Östrogenproduktion zu Feminisierung wie z.B. Gynäkomastie.

Insgesamt besteht häufig auch ein Mischbild der Hormonüberproduktion. 20-40% der ACC Patienten zeigen keine erhöhte Hormonproduktion und die Tumore werden daher als klinisch hormoninaktiv bezeichnet. Diese wachsen häufig unbemerkt und werden häufig als Zufallsbefund diagnostiziert oder machen sich aufgrund der zunehmenden Tumormasse durch Schmerzen bemerkbar. Das Fehlen typischer Symptome und die Seltenheit der Erkrankung führen häufig zu einer verspäteten Diagnosestellung. Bei Diagnosestellung wird initial eine Hormondiagnostik empfohlen. Da eine Hormondiagnostik der reinen Effektorhormone eine Differenzierung zu den gutartigen hormonproduzierenden Adenomen nicht scharf abgrenzen, werden seit einigen Jahren charakteristische Steroidvorläufer im Urin gemessen (13, 14). Der Nachweis einer pathologischen Synthese von Steroidvorläufern gelingt auch in Fällen, in denen klinisch kein Hormonexzess nachweisbar ist.

Zeitgleich erfolgt bei Verdacht auf ein Nebennierenkarzinom eine bildgebende Staging-Untersuchung von Thorax und Abdomen mittels MRT und/oder CT. Umgekehrt erlaubt der Nachweis von Hounsfield-Units <10 in der nativen Computertomographie bzw. eines Signalabfalls in der opposed phase der MRT die Diagnose eines gutartigen Nebennierentumors (15).

Bei Verdacht auf ein Nebennierenkarzinom ist die offene Adrenaektomie. Hormonexzess oder bei in der Bildgebung auffallenden malignen Kriterien, werden die Patienten, je nach Tumorgöße, einer laparoskopischen oder offenen Resektion der Raumforderung zugeführt (16).

1.3.2. Histologische Diagnosestellung

Sicher lässt sich die Diagnose Nebennierenkarzinom nur über eine histologische Untersuchung des Resektates stellen. Die Diagnose ist aber insgesamt schwierig, weshalb kürzlich standardisierte Berichtsempfehlungen veröffentlicht wurden (17). Daher wird zur Dignitätseinschätzung der Weiss-Score (Tabelle 1)

herangezogen der neun Kriterien berücksichtigt (18). Tumore, die mehr als drei Kriterien erfüllen gelten als maligne.

Tabelle 1 Histologische Malignitätskriterien des Weiss Systems bei adrenokortikalen Neoplasien

HPF: Hohe Vergrößerung in der Mikroskopie (400fach)

Histologische Malignitätskriterien	
Hoher Grad an Kernatypien	(ja/nein)
Anzahl der Mitosefiguren >5 Mitosen per 50 HPFs	(ja/nein)
Anwesenheit atypischer Mitosefiguren	(ja/nein)
Weniger als 25% lipidreiche Zellen	(ja/nein)
Anwesenheit einer diffusen Zellarchitektur	(ja/nein)
Anwesenheit von Tumor-Nekrosen	(ja/nein)
Anwesenheit einer venösen Gefäßinvasion	(ja/nein)
Anwesenheit einer lymphatischen Invasion	(ja/nein)
Anwesenheit einer Kapselinvasion	(ja/nein)

Zusätzlich wird SF1 (steroidogenic factor 1) als spezifischer Nebennierenmarker eingesetzt, um ein ACC von einer Metastase eines anderen Tumors zu unterscheiden (19). Als klinisch relevantester Prognosemarker dient der Ki67% Index, der eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben aufweist (20, 21).

1.3.3. Molekulare Pathogenese

Im ACC finden sich rekurrent verschiedene somatischer Mutationen. Diese sind in etwa 60 % aller ACC detektierbar und somit nicht allein obligat für die maligne Transformation (22). So sind Mutationen im „Wnt/ β -Catenin-Pathway“ in etwa 40% aller Tumore zu finden (23) mit einer Mutation im *CTNNB1* Gen in 25 % aller Fälle (24). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung der Nebennierenrinde (25). Beim ACC führen einerseits Mutationen in β -Catenin selbst zur Aktivierung dieses Signalwegs (26, 27). Weiter finden sich in 21 % aller untersuchten ACC eine *ZNRF3* Mutation, die ebenfalls

diesen Signalweg beeinflusst. Eine Überexpression von IGF 2 (Insulin like growth factor 2) findet sich in bis zu 90 % aller untersuchten ACC (28, 29). Es ist bekannt, dass IGF-2 über den IGF-1-Rezeptor wachstumsstimulierend wirkt (30). Dieser Befund war die Rationale für eine klinische Phase-III-Studie mit dem selektiven IGF-1-Rezeptor-Inhibitor Linsitinib. Inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* sind bei 20% aller sporadischen ACC anzutreffen (23). Keimbahnmutationen im *TP53* Gen sind charakterisierend für das Li Fraumeni Syndrom und können für die Entwicklung eines ACC prädisponieren (31, 32).

1.3.4. Staging und Prognose

Im Jahr 2009 wurde von dem „European Network for the Study of Adrenal Tumours“ (ENSAT) eine neue Klassifikation des ACC eingeführt (33), welche die Prognose widerspiegelt. Dabei wird je nach Tumorgöße, Lokalisation und Metastasierung in vier ENSAT Stadien (Tabelle 2) eingeteilt (34).

Tabelle 2 Stadieneinteilung des Nebennierenrindenzinoms nach der ENSAT-Klassifikation

T1: Tumor ≤ 5 cm, T2: Tumor > 5 cm, T3: Tumordinfiltration in umgebendes Gewebe, T4: Tumordinvasion in angrenzende Organe oder venöser Tumorthrombus in V. cava/ V. renalis, N1: Lymphknotenbefall, M1: Fernmetastase(n)

ENSAT-Stadium	TNM
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1-T2, N1, M0 T3-T4, N0-N1, M0
IV	T1-T4, N0-N1, M1

Wenngleich generell die Prognose des ACC ungünstig ist, liegt im ENSAT Stadium I eine 5-Jahresüberlebensrate von 81% im Vergleich zu 13% im ENSAT Stadium IV. Zusätzlich spielt der Resektionsstatus eine entscheidende prognostische Rolle, da eine komplette R0 Resektion mit einer besseren Prognose korreliert ist (35). Daneben ist der Proliferationsmarker Ki67 von

entscheidender prognostischer Bedeutung sowohl beim lokalisierten (20) als auch beim fortgeschrittenen ACC (21).

1.3.5. Therapie des lokal begrenzten Nebennierenkarzinoms

Primär stellt die chirurgische vollständige Entfernung des Tumors den einzigen kurativen Ansatz dar. Bei hohem Rezidivrisiko (ENSAT Stadium III, Ki-67>10%) wird eine adjuvante Therapie zumindest mit Mitotan von den meisten europäischen Zentren empfohlen (5, 11).

Mitotan ist das einzige für das ACC zugelassene Therapeutikum, welches sowohl antihormonelle als auch antiproliferative Eigenschaften besitzt. Es wird adjuvant, aber auch im palliativen Stadium eingesetzt (36). Häufig treten schwere Nebenwirkungen, wie Störung des Gastrointestinaltraktes oder neurologische Störungen in Erscheinung, die mitunter zum Therapieabbruch führen. Weiterhin richtet sich die Dosierung von Mitotan nach der Plasmakonzentration. Die aufgrund retrospektiver Studien etablierte Konzentration von >14 mg/l wird jedoch trotz hoher Dosierung (bis 6 g täglich) nur in etwa 70% der Patienten mit einem Blutspiegel erreicht (36).

Bislang ist nicht verstanden, weshalb manche Patienten keine ausreichend hohen Blutspiegel entwickeln. Dabei korreliert das Erreichen des Wirkspiegels mit dem Ansprechen des Medikamentes. Obwohl Mitotan bereits seit Jahrzehnten klinisch eingesetzt wird, ist sein genauer Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt. Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Mitotan die mitochondriale Atmungskette beeinflusst (37, 38) und die Sterol-O-Acyltransferase 1 (SOAT1) inhibiert (39). Darauf basierend wurde SOAT1 als potentiell Zielmolekül untersucht, jedoch konnte in einer Phase I Studie mit einem spezifischen SOAT1-Inhibitor (Nevanimibe) kein objektives Therapieansprechen erzielt werden (40). Unsere Arbeitsgruppe konnten zudem keinen Zusammenhang zwischen SOAT1 Expression und dem Ansprechen auf die Mitotantherapie zeigen (41).

1.3.6. Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms

In fortgeschrittenen Stadien ist Mitotan das Rückgrat der Therapie in den meisten Fällen. Retrospektive Studien zeigen jedoch ein objektives Ansprechen in nur

circa 20% der Patienten (36). Klinisch ist daher eine intensiviertere Therapie in vielen Fällen indiziert.

In der ersten randomisierten Phase III-Studie beim fortgeschrittenen Nebennierenkarzinom wurde eine Therapie mit Streptozotocin plus Mitotan (Sz-M; (42)) mit einer Therapie aus Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin, ebenfalls in Kombination mit Mitotan (EDP-M), verglichen.

Hierbei zeigte sich unter Sz-M verglichen mit EDP-M ein kürzeres progressionsfreies Überleben von lediglich 2,1 vs. 5,0 Monaten (43).

Das Gesamtüberleben war mit 12,0 und 14,8 Monaten nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,07$) und somit insgesamt unbefriedigend.

In der Zweit- bzw.- Drittlinien-Therapie kann Gemcitabine in einer Kombinationstherapie mit Capecitabin (44, 45) und einer Monotherapie mit Streptozotocin (42) eingesetzt werden. In einer retrospektiven Kohortenstudie konnte 2019 gezeigt werden, dass eine Therapie mit Thalidomid keine valide Therapieoption des ACC im fortgeschrittenem Stadium darstellt (46). Weiter können zielgerichtete Therapien, sogenannte „targeted therapies“, als tumorspezifische Therapien eingesetzt werden. Dies wurde in den letzten Jahren bereits bei vielen anderen Tumorentitäten, wie bei dem Leber- oder Nierenzellkarzinom erfolgreich angewandt (47, 48). Da beim Nebennierenrindenzellkarzinom häufig eine Überexpression des *IGF2*-Gens vorliegt, erschien dies als potenzielles Ziel für eine „targeted therapy“. In einer klinischen Phase-III-Studie mit einer Therapie des IGF1-Rezeptorantagonisten Linsitinib konnte jedoch keine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gesehen werden (49), allerdings zeigten sich in zwei bemerkenswerten Einzelfällen partielle Remissionen, eine der Patientinnen befindet sich bis heute in Komplettremission. Ein weiterer Therapieansatz mit einem VEGFR- (vascular endothelial growth factor receptor) Inhibitor Sunitinib, welcher in einer klinischen Phase II-Studie eingesetzt wurde, führte zu keinem objektiven Ansprechen (50), vergleichbar mit den Ergebnissen einer weiteren Studie, in der eine Kombination aus Sorafenib und Paclitaxel eingesetzt wurde (51).

Supportiv Medikamente können zur Kontrolle des Glucocorticoidexzesses eingesetzt werden. Hierfür dienen Medikamente wie Ketokonazol, Metyrapone und Mifeprestone der Symptomkontrolle bei Hypercortisolismus (52-56). Allerdings zeigte sich, dass Mitotan durch Induktion des Medikamentenmetabolisierenden Enzyms CYP3A4 zum beschleunigten Abbau bestimmter antitumoral wirksamer Substanzen führt (57, 58).

In einer 2020 erschienen retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass der Multi-Thyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib eine mögliche Therapieoption in fortgeschrittenen Stadien darstellt (59). Anders als den zuvor genannten Studien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden nur Patienten nach Absetzen von Mitotan mit einem effektiven Mitotan-Plasmaspiegel $< 2\text{mg/l}$ eingeschlossen um mögliche Medikamenten-Interaktion zu umgehen. Hier konnte ein objektives Tumoransprechen vergleichbar mit den Zweitlinien-Therapien mit Gemcitabine/Capecitabine (44) und Streptozotocin (42) gesehen werden. Ebenfalls zeigte sich eine gute Verträglichkeit der, sodass nun eine prospektive klinische Phase-II-Studie durchgeführt wird (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03612232).

Ein weiterer Therapieansatz im fortgeschrittenen Stadium sind Immuntherapien. Insgesamt war das Therapieansprechen in klinischen Studien jedoch sehr heterogen und unbefriedigend (60) (61). In einer klinischen Phase-II-Studie mit dem programmed cell death-ligand 1 (PDL 1) Inhibitor Pembrolizumab fand sich ein Therapieansprechen bei zwei von neun Patienten (62). In einem Mausmodell mit Lynch Syndrom assoziiertem ACC konnte gezeigt werden, dass eine PDL1 Inhibition zu einer erhöhten Anzahl von tumorinfiltrierenden antitumoralen Immunzellen im ACC führt, was als Therapieansprechen gewertet wurde.

1.3.7. Keimbahnmutationen

Eine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines ACC ist bei dem Li-Fraumeni Syndrom bekannt. Dies ist bedingt durch eine Keimbahnmutation in dem Tumorsuppressor-Gen *TP53*. Etwa 3 – 7 % aller Patienten mit ACC sind von dieser Mutation betroffen (31, 32). Das Lynch Syndrom ist durch Mutationen im DNA „mismatch“ Reparatursystem (MMR) charakterisiert. Dabei können die

Mutationen in den Genen *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* und *PMS2* vorliegen, welche in etwa 3 % aller ACC Patienten gefunden wurde (63) (64). Eine Beeinträchtigung des MMR führt zu einer hohen Mutationslast, die mit einem Ansprechen auf Immuncheckpointinhibitoren assoziiert ist (65, 66) (22, 23).

1.3.8. *MUTYH1*-Mutation

Ähnlich der defekten DNA Reparaturmechanismen beim Lynch Syndrom führen inaktivierende Mutationen im *MUTYH* Gen, welches an der Reparatur oxidativer DNA Schäden beteiligt ist, zu einer erblichen Tumorprädisposition. Allerdings handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung und die *MUTYH*-assoziierte Polyposetritt nur bei inaktivierenden Mutationen beider *MUTYH*-Allele auf. Tumore mit *MUTYH* Genmutationen zeigten eine hohe Mutationslast und ein besseres Ansprechen auf Immuntherapien (67). In zwei Studien konnten heterozygote *MUTYH* Keimbahnmutationen in vier Patienten mit ACC und hoher Mutationslast nachgewiesen werden (68).

1.3.9. Überblick über vorhandene Zellkulturmodelle des Nebennierenkarzinoms

Zellkulturmodelle sind eine wichtige Ressource zur präklinischen Testung und Etablierung neuer Therapieansätze. Die Zelllinie H295R (69) war die erste verfügbare ACC Zelllinie und wurde erstmals 1990 charakterisiert. Die erste pädiatrische ACC Zelllinie entstand durch Passage der humanen Zellen in einem immundefizientem Mausmodell (patient-derived xenograft, PDX) und wurde von Pinto et al. als SJ-ACC3 publiziert (70, 71), ist aber weiterhin nur in der Maus zu passagieren. 2016 konnten Hantel *et al.* die erste Zelllinie eines ACC eines erwachsenen Patienten, ebenfalls als PDX-Modell etablieren und MUC-1 benannt (72). Zwei weitere PDX ACC Zelllinien erschienen 2018. Dabei entstand eine dieser Zelllinien aus Tumormaterial eines Patienten mit Lynch Syndrom (73). Die Etablierung neuer Zelllinien erlaubte einen besseren Einblick in die genetische Heterogenität des ACC zu gewinnen (32, 63, 68, 74).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Zelllinien sind ein wichtiger Bestandteil in der Tumorforschung und präklinischen Testung neuer Medikamente. 2018 gelang zuletzt die Anzucht einer ACC Zelllinie über ein PDX Modell. Die Kultur von Primärzellen aus ACC Tumoren erweist sich dabei als komplex. Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die Zellkulturprotokolle für primäre adrenale Zellkulturen optimiert werden. Dabei sollte anhand der verfügbaren Literatur ein neues Zellkulturprotokoll zur Kultivierung von primären ACC Zellen, welche aus Tumormaterial gewonnen werden, getestet werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist es, eine stabile Zelllinie aus der Primärkultur zu generieren und diese zu charakterisieren. Die humane Zelllinie soll dabei in standardisierter Zellkultur und nicht durch ein Mausmodell entstehen. Eine stabil proliferierende Zelllinie muss genetisch authentifiziert und phänotypisiert werden. Dabei sollen folgende Aspekte berücksichtigt werden.

1. Stimmt die genetische Signatur der Zelllinie mit der des primären Tumors überein?
2. Ist die Zelllinie adrenalen Ursprungs und verhält sie sich funktionell wie bereits etablierte adrenale Zelllinien?
3. Sind die Zellen unter den Kulturbedingungen in der Lage Steroidhormone zu bilden?
4. Zeigt die Zelllinie eine Sensitivität gegenüber Mitotan als bekanntes Therapeutikum im ACC?

Schließlich soll durch Sequenzierungsarbeiten mögliche Mutationen, die der Tumorgenese zugrunde liegen, beschrieben werden. Eine neue Zelllinie kann die Heterogenität dieser seltenen Erkrankung besser widerspiegeln.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und Ethik

Patienten mit Nebennierenkarzinom, bei denen eine Tumorsektion am Universitätsklinikum Würzburg geplant war, wurden in das Register des Europäischen Netzwerks für die Untersuchung von Nebennierentumoren (European Network for the Study of Adrenal Tumors, ENSAT) eingeschlossen, das von der Ethikkommission Würzburg unter der Nummer 88/11 genehmigt worden war. In dieses Projekt wurden sowohl Patienten, die sich einer Resektion des Primärtumors bei Erstdiagnose unterzogen, als auch Patienten mit Patienten mit Lokalrezidiv nach Chemotherapie, oder mit Indikation zur Metastasenchirurgie ausgewählt. Alle Teilnehmer hatten ausführlicher Aufklärung in die Studienteilnahme eingewilligt. Tumormaterial, das nicht zur routinemäßigen histopathologischen Untersuchung benötigt wurde, wurde im Schnellschnittlabor der Pathologie abgetrennt und zur weiteren Bearbeitung an das endokrinologische Labor weitergegeben.

2.2. Material

2.2.1. Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Save Seal Micro Tubes	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
PCR Soft Tubes	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
50 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
T-75 Zellkulturflaschen Primaria™	Corning, New York, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

2.2.2. Geräte

Die genutzten Geräte sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4 Geräte

Bezeichnung	Firma
Zentrifuge MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kamera AxioCam	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Countess Zählkammer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator C150	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Maxwell RSC	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Axiovert Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Mikrotom HN-40	Reichert-Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mini Rotator	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Plattenleser Wallac Victor3	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Scientific, Waltham, USA
PH-Meter	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
C1000™, qPCR Cycler	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.2.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer

Die benötigten Reagenzien sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Firma
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth GmbH & Co.KG Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Citronensäuremonohydratpuffer 10mM Citronensäuremonohydrat, pH 6,5	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
AB Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ProLong™ Gold Antifade Mountant	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM/F12 (1:1)	Gibco, Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM	Gibco, Thermo Scientific, Waltham, USA
Nu-Serum	Corning, New York, USA
Mitotan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGF, epidermal growth factor	Invitrogen, Carlsbad, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ROCK-Inhibitor Y-27632	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Accutase™	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2.4. Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
Advance™ HRP Link & Enzyme	Dako, Carpinteria, USA
MassChrom™ Steroide im Plasma-Kit	Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Fibroblast MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Venor®GeM Classic Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
CellTiter-Glo® 3D Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Maxwell® RSC Blood Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Maxwell® RSC Simply RNA Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

2.2.5. TaqMan Sonden für qPCR und Antikörper

Es wurden vorgefertigte TaqMan Sonden zur Bestimmung der Genexpression verwendet. Alle Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland bezogen, die in Tabelle 7 aufgeführt sind.

Tabelle 7 Verwendete TaqMan Sonden

TaqMan Sonde
<i>PINK1</i> (Hs00260868)
<i>BUB1B</i> (Hs01084828)
<i>CTNNB1</i> (Hs00355049)
<i>MC2R</i> (Hs00300820)
<i>STAR</i> (Hs00264912)
<i>SREBP1</i> (Hs01088691)

CYP17A1 (HS00164375)

CYP11B1 (Hs01596404)

CYP11B2 (Hs01597732)

ACTB (Hs99999903)

In dieser Arbeit benutzte Antikörper sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8 Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller
SF-1	N1665	1:200	R&D Systems, Minneapolis, USA
Ki-67	MIB-1	1:800	Dako, Carpinteria, USA
Inhibin α	R1	1:200	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TP53	Do-7	1:200	Dako, Carpinteria, USA
8-oxo-dG	15A3	1:250	Trevigen, Gaithersburg, USA
Goat anti-Mouse, Alexa Fluor 488		1:200	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.3. Methoden

Die Methodik zur Kultivierung primärer Nebennierentumorzellen war nicht etabliert. Im Folgenden wird die schließlich erfolgreiche Methodik berichtet, die ich im Labor etabliert habe.

2.3.1. Herstellung des Kulturmediums

Zur Herstellung des in der Zellkultur eingesetzten Kulturmediums werden 375 ml eines F12 Nutrient ham Mediums (Gibco, life technologies) mit 125 ml DMEM – high glucose, pyruvate Medium (Gibco, life technologies) vermischt. Dem Kulturmedium wurden weiter 4ml Hydrocortison (50 μ g/ml), 500 μ l Insulin (5 mg/ml), 42 μ l Choleratoxin (0,1 mg/ml), 600 ml Adenin (20 mg/ml), 50 μ l EGF (epidermal growth factor, 0,1 mg/ml), sowie 50 ml FBS (fetal bovine serum) hinzugefügt und durch leichtes Schwenken der Mediumflasche vermengt.

Anschließend wurde das Primärkulturmedium im Kühlschrank bei 4°C gelagert (73).

2.3.2. Verarbeitung von Gewebeproben

Nach Eingang des Probenmaterials wurde das Tumorgewebe zunächst vermessen und gewogen. Von dem Gewebe wurde ca. 1 g Probenmaterial unter sterilen Kautelen entnommen und der Primärkultur zugeführt. Übriges Material wurde nativ, nach vorheriger Schockfrostung in flüssigem Stickstoff, bei -80°C eingefroren. Die Primärkulturprobe wurde an der sterilen Werkbank in eine 10ml Petrischale mit 5 ml sterilem PBS aufgenommen und mit Pinzette und Skalpell von Fettgewebsanteilen und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde die Probe in 3 mm kleine Fragmente mit dem Skalpell zerkleinert und im weiteren Verlauf mit dem Gentle MACS Dissociator™ der Firma Miltenyi Biotec und dem dazugehörigen Enzym-Kit mechanisch und enzymatisch zur einer Einzellzellsuspension verarbeitet. Das Gentle MACS Dissociator™ System verwendet herstellereigene Gefäße mit einer Einlassung im Verschlussdeckel, mithilfe derer die Gefäße in die Probeneinheit des Gewebezerkleinerungsgerätes eingerastet werden können. In eines dieser Gefäße (Gentle MACS™ C Tube) wurden 4,7 ml Primärkulturnährmedium vorgelegt. Anschließend wurden in das Medium 200 µl Enzym H, 100 µl Enzym R und 25 µl Enzym A des Herstellerkits zum enzymatischen Verdau von Gewebe pipettiert. Die Tumorfragmente wurden in die fertige Enzymmischung überführt, steril verschlossen und in das Gewebezerkleinerungsgerät eingespannt.

Entsprechend den Herstellervorgaben erfolgte zunächst eine mechanische Zerkleinerung für 35 s durch Rotation der Reaktionsgefäße, wodurch Scherkräfte auf die Tumorproben ausgeübt wurden. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 37° C im Brutschrank enzymatisch verdaut. Der Vorgang der mechanischen Zerkleinerung und des enzymatischen Verdau wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die entstandene Zellsuspension wurde nun vorsichtig mit einer 1 ml Pipette dreimal vorsichtig auf- und abpipettiert. In ein 50 ml Falcon wurde ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm eingelegt und die Zellsuspension auf das Sieb pipettiert und so eine Suspension von vereinzelt

Tumorzellen im Falcon Gefäß aufgefangen. Die dem Sieb noch anhaftenden Gewebsfragmente wurden mit 5 ml Kulturmedium abgespült. Anschließend wurde das Zellsieb verworfen und die Zellsuspension mit 40 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgefüllt und für 7 min bei 400 x g zentrifugiert, wodurch noch enthaltene Erythrozyten zersetzt wurden. Nach der Zentrifugation zeigte sich im Konus des Falcon Gefäßes ein Zellpellet. Der Überstand aus Kulturmedium und Erythrozyten-Lysepuffer wurde vollständig abpipettiert und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde in eine T75 Kulturflasche mit filterlosem Deckel überführt und mit weiteren 15 ml Kulturmedium auf insgesamt 20 ml Medium aufgefüllt und die fertige Primärkultur bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Kultur wurden 5 µmol/l Rho-associated kinase (ROCK) Inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich), 10 µl/ml Penicillin G/Streptomycin und 250 µg/ml Amphotericin B hinzugefügt [37]. Zur Zellzählung wurden von der Primärkultursuspension 10 µl entnommen und in ein 1 ml Eppendorf Gefäß gegeben. Hinzu wurden 10 µl Trypanblau pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Trypanblau besitzt die Eigenschaft die Zellmembran von toten Zellen zu durchdringen und tote Zellen im Durchlichtmikroskop blau anzufärben. Die Zellzählung erfolgte maschinell in einem Zellzähler der Firma Life Technologies (Countess® Automated Cell Counter). Hierfür wurde das 1:1 Gemisch aus Zellsuspension und Trypanblau auf eine firmeneigene Zählkammer des Systems pipettiert und anschließend die Kammer in den Einschub der Maschine gesteckt. Nach Durchlauf des Zählprogrammes konnte die Zellzahl quantifiziert und die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Diese Information wurde für jede neuangelegte Primärkultur erhoben und dokumentiert. Die auf diese Weise angelegten Primärkulturen wurde im weiteren Verlauf bis zu 12 Monate weiter kultiviert.

2.3.3. Pflege der Primärkultur

Bei der angelegten Primärkultur wurde alle 7 Tage eine Auffrischung des Kulturmedium durchgeführt. Zunächst wurden die Kulturflaschen unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop der Firma Zeiss inspiziert. Es wurde die Zellmorphologie beurteilt und nach adhärennten Zellen am Flaschenboden gesucht. Anschließend wurde unter der sterilen Werkbank die luftdichte Flasche

geöffnet und 10 ml Zellsuspension in Kulturmedium abpipettiert und in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt. Dieses wurde bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, bis sich ein Zellpellet bildete. Das zellfreie Medium über dem Pellet wurde mit einer Glaspipette und Pipettierhilfe abgenommen. Hiervon wurde 1 ml in einem 1 ml Eppendorf Gefäß bei -20°C im Gefrierschrank eingefroren und zur späteren Hormonanalyse asserviert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in die Kulturflasche zurückgegeben. Somit wurden 50% des gesamten Kulturmediums in der Flasche erneuert.

2.3.4. Entfernung von Fibroblasten aus der Primärkultur

Da es sich bei den Primärkulturen um ein inhomogenes Zellgemisch des Tumorsektates handelt, kann es zu einer Vermehrung von Fibroblasten in den Kulturflaschen kommen. Diese verbrauchen im Kulturmedium Nährstoffe und können das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen beeinträchtigen. Zur Entfernung der Fibroblasten aus Primärkulturen wurde ein System der MACS™ Zellseparation der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die MACS™ Zellseparation beruht auf dem Prinzip der ferromagnetischen Isolation von gewünschten Zellen in einem magnetischen Feld. Die gesuchten Zellen werden an einem für sie charakteristischen Antigen mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper, an dem ferromagnetischer Partikel gekoppelt ist, markiert. Hierdurch kommt es durch Bindung des Antikörpers zu einer Beladung der Zellen mit magnetischen Partikeln. Zellen, die auf diese Weise markiert wurden, können in einem magnetischen Feld detektiert und separiert werden. Hierfür wird in dem MACS™ System eine Säule, welche selbst mit magnetischen Partikeln beladen ist, in einen starken Magneten eingespannt. Wird eine Zellsuspension auf diese Säule gegeben, werden Zellen, die mit magnetischen Partikeln beladen sind, gebunden und somit positiv selektioniert (Abbildung 1).

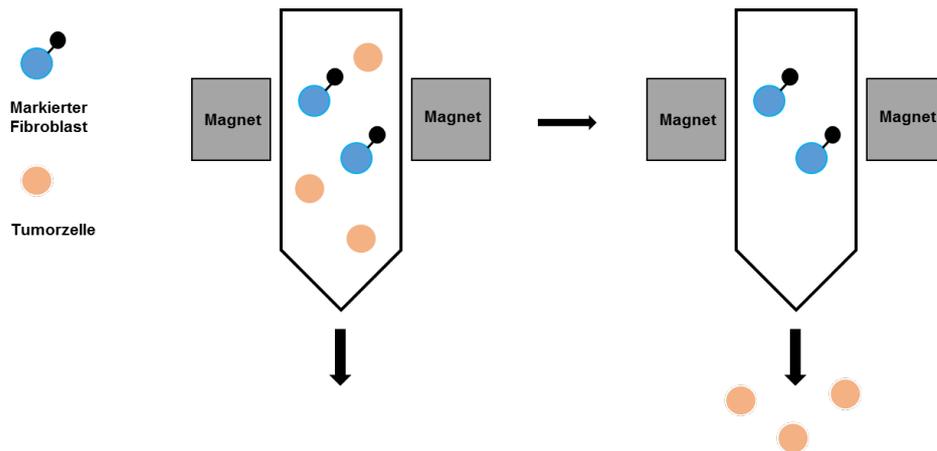


Abbildung 1: Schematische Darstellung der magnetischen Separation ferromagnetisch markierter Fibroblasten

Zur Vorbereitung zur Entfernung der Fibroblasten wurde zunächst das gesamte Kulturmedium der Primärkultur in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Um die adhärennten Zellen auf dem Flaschenboden zu lösen, wurden 5 ml Accutase™, einem Enzymgemisch aus Kollagenasen und Proteasen in die Flasche gegeben und die Flasche leicht geschwenkt bis der Boden mit Accutase™ beschichtet war. Durch den enzymatischen Verdau der Ankerproteine kam es nach einer Einwirkzeit von 5 min unter Zimmertemperatur zu einem Ablösen der adhärennten Zellen. In ein neues 50 ml Falconröhrchen wurde ein 70 µm Zellsieb eingelegt und die 5 ml Accutase™ aus der Kulturflasche auf das Sieb pipettiert. Der Flaschenboden wurde mit 5 ml Kulturmedium gespült, das Medium anschließend ebenfalls auf das Zellsieb gegeben, danach wurde das Zellsieb verworfen und das Medium im Falconröhrchen zu der zuvor abgenommenen Zellsuspension im Medium der Kulturflasche hinzugegeben. Danach wurden die Zellen gezählt und bei 400 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet entsprechend der Zellzahl in 80 µl MACS Puffer je 10⁷ Zellen resuspendiert. Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurde in den weiteren Schritten das Anti-Fibroblast Microbeads Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Bei den Anti-Fibroblast Microbeads handelt es sich eine fertige Antikörpermischung, welche mit ferromagnetischen Partikeln beladen und gegen Epitope mesenchymaler Stromazellen gerichtet sind. Von den Anti-Fibroblast Microbeads wurden jeweils 20 µl je 10⁷ Zellen zu dem MACS Puffer gegeben. Die Zellen und Antikörper-Beads wurden vorsichtig mit der Pipette gemischt und 30 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurden MACS-MS™ Säulen vorbereitet. Diese mit ferromagnetischen Perlen beladenen und durchlässigen Säulen wurden in die Haltevorrichtung eines starken Magneten der Firma Miltenyi Biotec eingespannt und mit 500 µl MACS Puffer gespült. Zu der Zellsuspension wurden nach der Inkubationszeit in 2 ml MACS Puffer gegeben um die Reaktion zu stoppen und anschließend wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert. Unter dem Auslass der MACS-MS™ Säulen wurde ein 15 ml Falcon Röhrchen eingespannt, die Zellsuspension langsam auf die Säule pipettiert und der Durchfluss in dem Falcon Röhrchen aufgefangen. Es folgten zwei Waschschriffe, in welchen jeweils 500 µl MACS Puffer auf die Säule gegeben wurden. Durch diese Elution der Zellsuspension verblieben die magnetisch markierten Fibroblasten in der Säule und die reine Tumorzellsuspension wurde im Röhrchen aufgefangen. Nach Zentrifugation des Falcon Röhrchens bei 400 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, die Zellen gezählt, die Zellsuspension zurück in die Kulturflasche gegeben, mit weiteren 15 ml Medium aufgefüllt und weiter bei 37° C im Brutschrank kultiviert.

2.3.5. Generierung einer stabilen Zelllinie

Bei der Primärkultur der späteren JIL-2266 Zelllinie zeigte sich unter den genannten Kulturbedingungen eine fortbestehende Proliferation des adhärenen Zellrasens, sodass in regelmäßigen Abständen eine Aufteilung und Passagierung notwendig war. Sobald der Zellrasen aus Einzelzellen konfluent wurde, erfolgte die Aufteilung in eine neue Passage. Hierfür wurde das Kulturmedium in den Flaschen vorsichtig mit einer Glaspipette aufgenommen ohne den Boden der Flasche zu berühren. Anschließend wurden 5 ml Accutase™ auf den Flaschenboden pipettiert und die Flasche wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch leichtes Beklopfen der Flaschen wurden alle Zellen gelöst. Die gelösten Zellen wurden gezählt, das Volumen auf zwei 50 ml Falcon Röhrchen aufgeteilt und die enzymatische Wirkung der Accutase™ durch Hinzugabe von jeweils 5 ml Kulturmedium gestoppt. Die Röhrchen wurden bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun wurden

entweder die Zellen in beiden Röhrchen in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und als neue Passage weiter kultiviert, oder ein Teil der Zellen wurde für weitere Experimente verwendet.

2.3.6. Testung der Primärkultur auf Mykoplasmen

Um eine Kontamination der Primärkultur mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde eine Polymerase Chain Reaktion (PCR) Testung durchgeführt. Hierfür wurde das Venor®GeM Classic Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs) verwendet, welches hoch konservierte Areale im Genom der Mykoplasmen amplifiziert und detektiert. In dem Kit sind Reaktionspuffer, ein vorgemischtes Aliquot aus Primern und Nukleotiden, Positivkontroll-DNA, eine interne Amplifikationskontrolle und steriles DNA-freies Wasser enthalten. Getestet wurde der Überstand der Zellkultur. Entsprechend der Anweisungen des Herstellers wurden 100 µl Kulturmedium aus der Primärkultur entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Dieses wurde auf einem Heizblock bei 95°C für 10 min erhitzt. Anschließend wurde das Medium in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 15 s abzentrifugiert und der Überstand über dem Pellet aus Zellfragmenten in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde das Reaktionsgemisch vorbereitet indem in ein PCR Reaktionsgefäß 14,5 µl Wasser, 2,5 µl Reaktionspuffer, 2,5 µl Primer/Nukleotidmischung, 2,5 µl interne Amplifikationskontrolle und 1 µl einer Taq Polymerase mit 1 U/µl gegeben und kurz im Vortexer gemischt. Dieser Ansatz wurde in dreifachem Volumen als Mastermix für drei Reaktionen angesetzt und jeweils 23 µl in ein PCR Reaktionsgefäß überführt. Zu jeweils einem Reaktionsansatz wurden entweder 2 µl Positivkontroll-DNA, 2 µl Wasser als Negativkontrolle, oder 2 µl des Kulturüberstandes gegeben und die Ansätze kurz gemischt. Zu Beginn der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße in einen Cyler gegeben und das Programm zur Amplifikation entsprechend der Herstellerempfehlung begonnen. Nach dem Durchlaufen der 40 Zyklen wurde die Agarose Gel Elektrophorese vorbereitet. Die Taschen eines kommerziell erhältlichen 2% Agarosegel wurden von links nach rechts mit 5 µl PCR-1kb-Leitermarkierung, jeweils 5 µl PCR Produkt in jeweils eine Tasche. Zu jeder Tasche mit PCR Produkt werden 10 µl Ladepuffer gegeben und die Gelelektrophorese im Tris-Puffer bei 100V gestartet.

Nach etwa 20min waren die Banden aufgetrennt und konnten im UV Licht detektiert und fotodokumentiert werden.

2.3.7. Einbettung von Zellpellets

Es wurden 2×10^7 JIL-2266 (Passage 25) und NCI-H295R Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und 2 x in 5 ml PBS durch Zentrifugation bei 400 x g gewaschen. Zur Induktion von oxidativen Schäden in den NCI-H295R Zellen, wurden diese mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 für 20 min bei 4°C behandelt und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 2 ml Paraformaldehyd (4 %) resuspendiert und über Nacht bei 4°C fixiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 5 min in einer Mikrozentrifuge pelletiert. Die Zellpellets wurden in 2 ml 70 % Ethanol für 20 min inkubiert und bei 800 x g für 5 min abzentrifugiert. Dies wurde mit 85 %- und 96 % Ethanol und schließlich 100 % Isopropanol wiederholt und die Pellets dadurch dehydriert. Das Isopropanol wurde abgenommen und 1 ml flüssiges Paraffin auf die Pellets gegeben. Der ausgehärtete Paraffinkonus wurde aus dem Röhrchen herausgenommen, in eine Paraffin-Gewebeschale gelegt und für einen Paraffintank für 1 h bei 60°C gegeben. Die eingebetteten Pellets konnten nun am Mikrotom geschnitten und mit einer Schichtdicke von $4 \mu\text{m}$ auf Objektträger überführt werden.

2.3.8. Immunhistochemie

Paraffinschnitte von Zellpellets der JIL-2266 und Patienten-Tumorgewebe wurden in einer Küvette mit Xylol für zweimal 12 min deparaffiniert und im Anschluss für jeweils 5 min in einer Ethanolreihe rehydriert (90%, 80%, 70%). Schließlich wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einem Schnellkochtopf in Citratpuffer (pH 6,5) für 15 min bei 120°C aufgekocht. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser und vorsichtigem Abklopfen der Objektträger wurden die Proben mit einem Fettstift umrandet. Durch Inkubation in 3% H_2O_2 in Methanol für 10 min wurde die endogene Peroxidaseaktivität gehemmt. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ 20 % humanes AB-Serum (Invitrogen) in PBS für eine Stunde bei

Raumtemperatur gegeben und dadurch unspezifische Antikörper-Bindungsstellen blockiert. Nun wurden die für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Antikörpern (Tabelle 9) in der angegebenen Verdünnung inkubiert und anschließend fünfmal in PBS gespült. Ein Schnitt wurde als Negativkontrolle mit N-Universal Negative Control (Dako) Anti-Rabbit/Rat/Mouse inkubiert.

Tabelle 9 Primärantikörper in der Immunhistochemie

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller
SF-1	N1665	1:200	R&D Systems
Ki-67	MIB-1	1:800	Dako
Inhibin α	R1	1:200	Serotec
TP53	Do-7	1:200	Dako

Eine Signalamplifikation wurde durch eine Behandlung mit dem Advance HRP Link-Kit (Dako) für 40 min erreicht. Schließlich wurde die Färbung mit dem DAB+ Liquid Kit (Dako) für 10min nach Vorgaben des Herstellers entwickelt. Die Zellkerne wurden 10 min in Mayer`s Hämatoxylin gegengefärbt und die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Schließlich erfolgte die Trocknung bei 56 °C für 20 min.

2.3.9. Immunfluoreszenz-Färbung von 8-Oxoguanin

Paraffinschnitte von Zellpellets der JIL-2266, mit H₂O₂ vorbehandelten Pellets der NCI-H295R und Patienten-Tumorgewebe wurden entsprechend der Immunhistochemie-Färbung in Xylol gewaschen und in einer Alkoholreihe rehydriert. Die Schnitte wurden in 100 μ l Proteinkinase K für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100 μ l RNase A für eine Stunde bei 37°C behandelt. Die DNA wurde durch 2 N HCL für 5 min denaturiert und mit 1 M Tris-Base neutralisiert. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 10 % Ziegenerum für eine Stunde blockiert. Der Primärantikörper (8-oxoG, Trevigen) wurden in einer Verdünnung von 1:250 in PBS mit 0,1 % BSA auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Sekundärantikörper (goat-anti-mouse Alexa Fluor488, ThermoFisher) wurde

für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:200 in PBS inkubiert. Nach Waschen in PBS erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI 1:1000 in PBS für 3 min im Dunkeln. Die Schnitten wurden erneut in PBS gewaschen und schließlich mit einem Eindeckmedium (ProLong Gold Antifade, ThermoFisher) und einem Deckglas eingedeckt. Die fertigen Schnitte wurden bei 4°C gelagert.

2.3.10. Mikroskopie

Immunhistochemische Färbungen wurden an Mikroskop Leica Aperio ausgewertet und Bilder in zwanzigfacher Vergrößerung mit dem Leica Aperio Schnitte-scanner aufgenommen. Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung wurden an dem Zeiss Axioscope.A1 (40 x Objektiv) mit einer Zeiss AxioCam 503 Kamera aufgenommen.

2.3.11. Extraktion von DNA und RNA, qPCR

Genomische DNA wurde aus schockgefrorenem ACC-Tumorgewebe, aus der JIL-2266 Zelllinie (Passage 6, 8, 13, 29) und Leukozyten des Patienten durch das Maxwell RSC Blood DNA Kit (Promega) entsprechend der Vorgaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der DNA wurde im Nanodrop Spektrophotometer (ThermoFisher) gemessen.

RNA wurde aus schockgefrorenem Gewebe und der JIL-2266 Zelllinie (Passage 6, 8, 13, 29) durch Anwendung des Maxwell RSC Simply RNA Kit (Promega) gewonnen und die RNA Konzentration mit Nanodrop Spektrophotometer (ThermoFisher) bestimmt. 1000 ng RNA wurden revers transkribiert mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen. Quantitative reverse Transkriptase PCR (RT-qPCR) wurde durch Verwendung der TaqMan gene expression Proben (ThermoFisher) für MC2R (Hs00300820), PINK1 (Hs00260868), BUB1B (Hs01084828), CTNNB1 (Hs00355049), SREBP1 (Hs01088691), SREBP2 (Hs01081784), CYP11B1 (Hs01596404), CYP11B2 (Hs01597732) und STAR (Hs00264912) durchgeführt. Endogen exprimiertes β -Actin (Hs99999903) wurde als Gen zur Normalisierung herangezogen. Für jede RT-qPCR wurden 5 ng cDNA verwendet und jede Probe wurde in technischen Duplikaten analysiert. Alle Transkripte wurden unter Verwendung des TaqMan

Gene Expression Master Mix (ThermoFisher), eines Thermocyclers (Bio-rad) und der Biorad CFX Manager 2.0 Software amplifiziert. Das Programm des Thermocyclers wurde auf 95°C für 3 min, gefolgt von 39 Zyklen bei 95°C für 30 sec, 60°C für 30 sec und 72°C für 30 sec. Die Rückrechnung der Amplifikate erfolgte durch Normalisierung auf β -Actin mittels der Δ CT Methode. Dies wurde von Frau Dr. Isabel Weigand, endokrinologisches Forschungslabor der Universitätsklinik Würzburg, durchgeführt. Ein statistischer Vergleich der Expression der Marker in den verschiedenen Proben wurde mit dem Wilcoxon-Test und der Software GraphPad Prism, Version 8 durchgeführt.

2.3.12. Short Tandem Repeat (STR) Analyse

Es wurde DNA aus JIL-2266 Zellen (Passage 5, 8, 13, 29) und Leukozyten des korrespondierenden Patienten mit dem Maxwell RSC Blood DNA Kit (Promega) extrahiert. Die STR Analyse erfolgte in der molekularbiologischen Abteilung des Zentrallabors des Universitätsklinikums Würzburg (Dr. Sabine Herterich). Die Typisierung wurde anhand der STR-loci VWA, THO1, TPOX, CSF1PO, D16S539, D13S317, D7S820, D5S818 and the amelogenin sex-determining Marker (AMEL-locus) durchgeführt um eine genetische Übereinstimmung der Zellen mit dem Patienten aufzuzeigen. Weiter diene dieser Nachweis dem Ausschluss einer Kontamination der Zelllinie über die Zeit der Passagen und somit die Originalität der JIL 2266 als Zelllinie zu bestätigen. Die Gen-Loci würden durch Mitarbeiter des Zentrallabors amplifiziert und eine elektrophoretische Analyse mit dem GeXP-Instrument (AB Sciex) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden schließlich mit der GeXP Fragment Analyse Software durch Frau Dr. Sabine Herterich ausgewertet.

2.3.13. Proliferationsassay und Behandlung mit Mitotan

Jeweils 1×10^5 JIL-2266 (Passage 30, 32, 33) und NCI-H295R Zellen wurden auf einer 12-well-Platte ausgesät. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C jeweils für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die Zellen wurden an den jeweiligen Zeitpunkten abgelöst und in Duplikaten in der automatisierten Zählkammer Countess® Automated Cell Counter (ThermoFisher) ausgezählt. Die Verdopplungszeit der Zellen wurde mittels der exponentiellen

Wachstumsfunktion $Y=Y_0 \times e^{(K \times t)}$ des GraphPad Prism 8 Programmes berechnet. Diese Gleichung definiert das Wachstum mit einer konstanten Verdopplungszeit. Y_0 beschreibt dabei die Ausgangspopulation mit einer absoluten Zellzahl nach der Zeit (24 h, 48 h, 72 h). Während t eine Konstante in Stunden darstellt, ist K die Wachstumsrate. Die Verdopplungszeit in Stunden wurde über $\ln(2)/K$ berechnet. (Motulsky HJ. Confidence intervals of parameters, GraphPad Curve Fitting Guide 2016)

Um die Sensitivität der der JIL-2266 gegenüber Mitotan zu bestimmen wurde eine Behandlung der Zellen mit Mitotan durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 5×10^4 JIL-2266 in 50 μ l Kulturmedium in jedes well einer 96-Well-Platte aus schwarzem lichtundurchlässigem Kunststoff ausgesät. Dieser Ansatz wurde ebenfalls für 5×10^4 NCI-H295R Zellen durchgeführt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden in jeweils acht Wells der Platte mit einer definierten Konzentration von Mitotan gelöst in Ethanol behandelt. Dabei wurde eine Konzentrationsreihe von Mitotan mit 1 μ M, 5 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M angesetzt. Als Kontrolle wurden acht Wells mit 1 % Ethanol behandelt. Die Behandlungsdauer mit Mitotan betrug 24h. Anschließend erfolgte die Messung der Vitalität mittels CellTiter-Glo-Kit der Firma Promega. Dabei wurden nach Vorgaben des Herstellers 50 μ l des CellTiter-Glo-Reagenz in jedes Well pipettiert. Hierdurch wurden die Zellen lysiert und intrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt. Das Reagenz beinhaltet das Enzym Luciferase und dessen Substrat Luciferin. Durch seine katalytische Aktivität setzt Luciferase das Luciferin, Sauerstoff und ATP in Oxyluciferin, Kohlenstoffdioxid und Adenosindiphosphat um. Durch diesen oxidativen Prozess wird Licht emittiert (75). Die abgegebene Lichtintensität jedes Wells wurde mit dem Plattenlesegerät Wallac Victor3 detektiert. Die Lumineszenz wurde aus den jeweiligen acht Wells einer Mitotankonzentration gemittelt. Insgesamt wurde dies in drei Replikaten durchgeführt und wiederum das Mittel der Replikate berechnet. Die gemessene Lumineszenz spiegelte die relativ die Menge des intrazelluläre ATP und somit die Zellzahl, bzw. die Vitalität der Zellen wider. Aus diesem Ergebnis wurde die mittlere effektive

Wirkkonzentration (EC₅₀) von Mitotan an den jeweiligen Zelllinien mittels der EC-Funktion des Programmes GraphPad PRISM berechnet.

2.3.14. LC-MS/MS Messung der Hormonproduktion

Zur Bestimmung der Hormonproduktion wurden jeweils 2×10^6 JIL-2266 Zellen in einer 6-well-Platte in 2 ml DMEM/F12 Medium mit 5 % FCS ausgesät. Ein Ansatz wurde dabei mit 10 µM Forskolin (Santa Cruz Biotechnology) behandelt. Forskolin stimuliert unspezifisch Isoenzyme der Adenylatcyclasen und regt *in vitro* die Produktion von Steroidhormonen an. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit 10 ng/ml EGF (Invitrogen), 5 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich) and 24 µg/ml Adenin (Sigma-Aldrich) versetzt. Die drei Ansätze wurden für 48 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und die Kulturüberstände abgenommen. Aus den Überständen wurden durch Herrn Dr. Max Kurlbaum, endokrinologisches Routinelabor der Universitätsklinik Würzburg, massenspektrometisch bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte an einem Qtrap 6500+ (Sciex) Massenspektrometer verbunden mit einem 1290 Infinity HPLC System (Agilent). Hierfür wurde das MassChrom steroids Kit (Chromsystems) nach Angaben des Herstellers verwendet (Kurlbaum et al Exp Clin Endocrinol Metab 2019). Das Signal wurde mit der Analyst Software 1.6.3 (Sciex) ausgewertet.

2.3.15. Whole Exome Sequenzierung (WES)

Zur Durchführung der WES-Sequenzierungsarbeiten an der Zelllinie JIL-2266 wurde die Firma CeGaT (Tübingen) beauftragt. Die bioinformatische Auswertung der Sequenzierdaten wurde schließlich in Kooperation mit dem bioinformatischen Zentrum des CCC Mainfranken von Frau Dr. Silke Appenzeller durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Präsentation des Patienten

Die Gewebeproben wurden von einer 50-jährigen Patientin gespendet, die sich initial mit einem floriden Cushing Syndrom vorstellte. Dies äußerte sich klinisch in einem schwer einstellbaren Hypertonus, einer Myopathie, Hypokaliämie und Lymphopenie. In der biochemischen Abklärung entsprechend der aktuellen Leitlinien (4) zeigte sich ein Androgen- und Cortisolexzess. In der computertomographischen Bildgebung fand sich ein Nebennierentumor mit einem maximalen Durchmesser von 9 cm, sowie pulmonale Metastasen. Es wurde eine adrenolytische Therapie mit Mitotan und Metyrapon zur Linderung der Symptome des Cushing Syndroms eingeleitet und anschließend eine Adrenalektomie links durchgeführt. In der histopathologischen Begutachtung konnte die Diagnose eines fortgeschrittenen ACC bei einem Weiss score von 9 und hohem Ki67 Proliferationsindex von 60 % gestellt werden. In der Immunhistochemie der Pathologie zeigte sich der Tumor positiv für den steroidogenic factor-1 (SF-1) und teilweise positiv für Inhibin α . Der programmed cell death-ligand 1 (PDL 1) war in unter 1 % der Tumorzellen (tumor proportional score, TPS) exprimiert. Postoperativ wurde eine Chemotherapie nach EDP Schema in Kombination mit Mitotan eingeleitet. Bereits nach zwei Therapiezyklen fand sich ein rascher Progress der pulmonalen Metastasen, sowie neue intrahepatische Metastasen. Die Patientin verstarb noch bevor ein Therapiewechsel erfolgen konnte.

3.2. Etablierung der JIL-2266 ACC Zelllinie

Das Tumormaterial wurde postoperativ mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut. Die Tumorzellen wurden in chemisch modifizierten Polystyren-Kulturflaschen (Primaria, Corning) kultiviert, um die Adhäsion der Zellen zu fördern. Zu den Zellen wurde initial ein Rho-associated kinase (ROCK) Inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich) hinzugegeben um die Immortalisierung humaner Tumorzellen zu fördern (39). Unter diesen Kulturbedingungen wuchsen die Zellen in kleinen Kolonien auf dem Flaschenboden. Durch wöchentliches

Erneuern der Hälfte des Kulturmediums begannen die Zellen zu proliferieren und konnten schließlich nach 180 Tagen erstmalig passagiert werden.

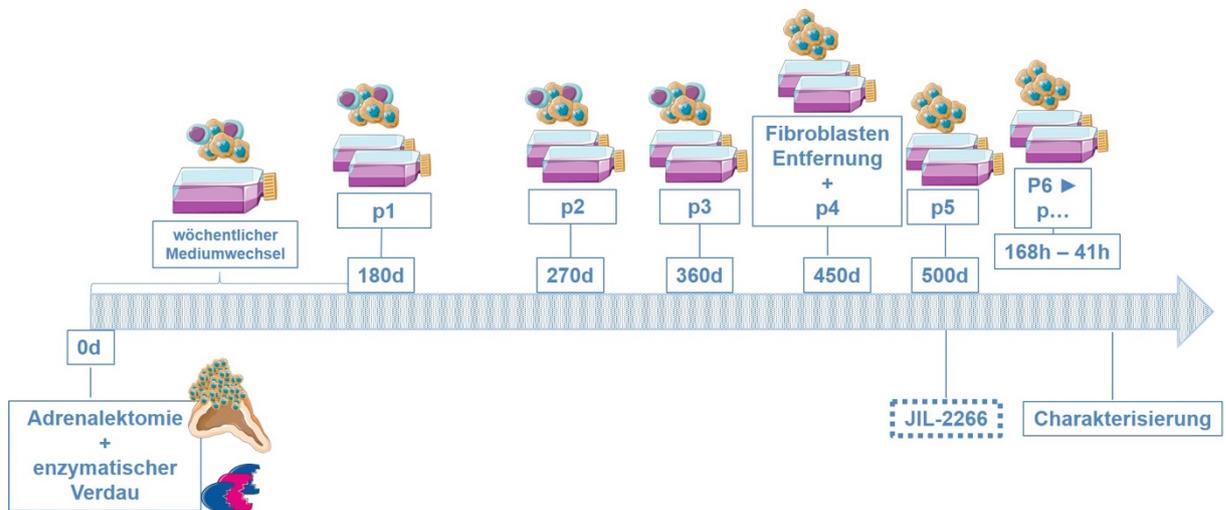


Abbildung 2: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Etablierung der Zelllinie JIL-2266

d: Tag, h: Stunde, p: Passage

Das Zeitintervall der Passagierungen verkürzte sich auf 90 Tage bis zu Passage 4 nach weiteren 270 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Entfernung der Fibroblasten (Abbildung 2). Morphologisch zeigten die Tumorzellen ein konstantes, spindelförmiges Erscheinungsbild (Abbildung 3) und benötigten weitere 50 Tage um konfluent zu proliferieren. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zelllinie JIL-2266 genannt. Die Zelllinie wurde weiter passagiert und schließlich charakterisiert. Die adhärenenten JIL-2266 zeigten in den fortlaufenden Passagen eine morphologische Integrität.



Abbildung 3: Morphologische Darstellung der Passagen der JIL-2266

Fotodokumentation der Passagen der JIL-2266 unter 40 facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop. A: Passage 8, B: Passage 14, C: Passage 30. p: Passage. Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

Um die genomische Übereinstimmung der JIL-2266 mit einer Blutprobe des Patienten zu überprüfen, wurde eine STR-Analyse durch Frau Dr. Sabine Herterich im molekularbiologischen Routinelabor des Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Die JIL-2266 wiesen lediglich Allele auf, welche auch in der Keimbahn-DNA vorhanden waren (Tabelle 10). Dies bestätigte die genetische Übereinstimmung der JIL-2266 Zelllinie mit der Patientin. In drei Genloci, THO1 (Chromosomenlokalisierung: 11p15.5; Intron 1 Tyrosin-Hydroxylase Gen), D16S539 (Chromosomenlokalisierung: 16q24.1) und TPOX (Chromosomenlokalisierung: 2p25.3; Intron 10 Thyroid-Peroxidase Gen), zeigte die JIL-2266 einen Verlust der Heterozygotie.

Tabelle 10 STR-Analyse

Vergleich der STR-Profile in Patienten Leukozyten und JIL-2266. Verlust der Heterozygotie in den Genloci D16S539, THO1 und TPOX.

Probe	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	THO1	TPOX	VWA
Patienten Leukozyten	X	12	9	11, 13	11, 13	9, 12	8, 9,3	10, 12	18
JIL-2266	X	12	9	13	11, 13	9, 12	8	12	18

Schließlich wurde das STR-Profil der JIL-2266 mit frei zugänglichen Datenbank von STR-Profilen bekannter Zelllinien abgeglichen (DMSZ online STR analysis). Hierbei ließ sich mit dem STR-Profil kein Treffer erzielen. Somit war der Beleg

erbracht, dass es sich bei den JIL-2266 um eine neue Zelllinie mit einzigartiger genetischer Identität handelte und eine Kontamination der Kultur mit anderweitigen Zellen konnte ausgeschlossen werden.

3.3. Die Immunhistochemie zeigt Parallelen zwischen JIL-2266 und Primärtumor auf

Um zu bestätigen, dass es sich bei den JIL-2266 um Zellen adrenalen Ursprungs handelte, wurden Zellpellets der JIL-2266 mit der Standardzelllinie NCI-H295R und Tumorgewebe immunhistochemisch verglichen. Als Marker des adrenalen Ursprungs wurde SF1 eingesetzt und mit der H295R Zelllinie verglichen. Es zeigte sich eine starke Expression von SF1 in H295R Zellen, während es nur moderat in JIL-2266 Zellen und dem Tumorgewebe exprimiert wurde (Abbildung 4 A). Der Primärtumor zeigte nur eine partielle Expression von Inhibin α in sehr lokalisierten Gewebearealen. Die JIL-2266 Zelllinie war negativ für Inhibin α , die H295R jedoch stark positiv (Abbildung 4 B). In allen Proben fand sich eine starke Expression von Ki-67 und TP53 (Abbildung 4 C und D). Synaptophysin war ebenfalls nur in wenigen Arealen des Primärtumors positiv, negativ in JIL-2266 und schwach positiv in NCI-H295R (Abbildung 4 E).

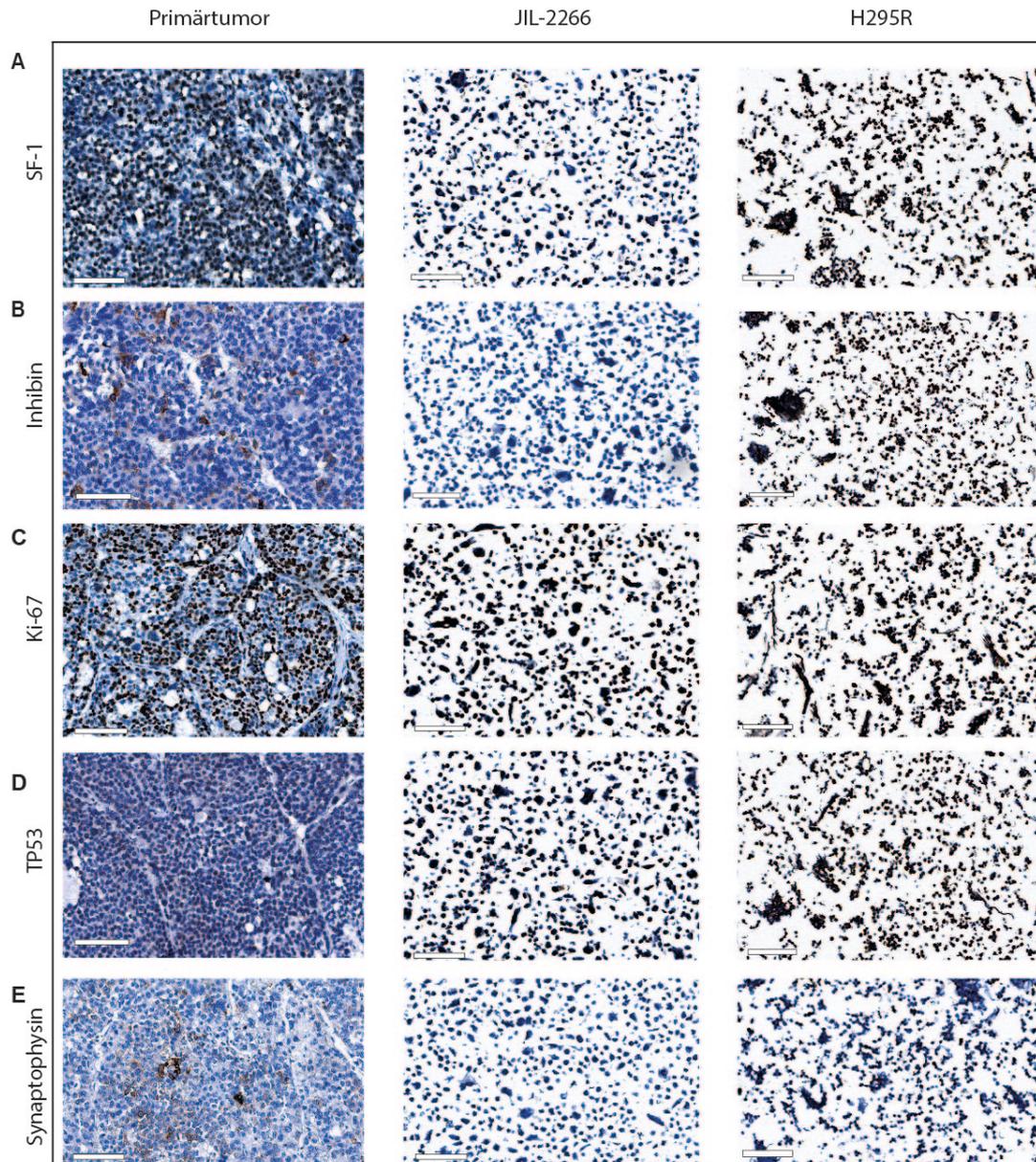


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbung des Primärtumors, der JIL-2266- und H295R-Zellen. Färbung von SF-1: steroidogenic factor 1 (A), Inhibin (B), Proliferationsmarker Ki-67 (C), TP53: Tumor Protein 53 (D) und Synaptophysin (E). Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

3.4. mRNA Expression Nebennieren-spezifischer Marker

Zur weiteren Analyse des adrenalen Ursprungs der JIL-2266 erfolgte der Vergleich von adrenalen Marken von JIL-2266, H295R und Primärtumor auf mRNA Ebene mittels qPCR. Es fand sich eine ähnliche Expression von *PINK1*, *BUB1B* und *CTNNB1* in den JIL-2266 Zellen und dem korrespondierenden Tumorgewebe. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen

den einzelnen Passagen. *BUB1B* war in ACC Proben im Vergleich zur gesunden Nebenniere überexprimiert. Die Expression von Markern der Nebennierenrinde war zwischen den Proben sehr variabel (Abbildung 5) und insgesamt niedriger in allen ACC Proben verglichen mit der gesunden Nebenniere. Der Steroidogenesemarker *CYP17A1* zeigte sich generell in allen Gewebeproben höher exprimiert als in den Zelllinien. Der ACTH-Rezeptor MC2R war in den JIL-2266 nicht nachweisbar.

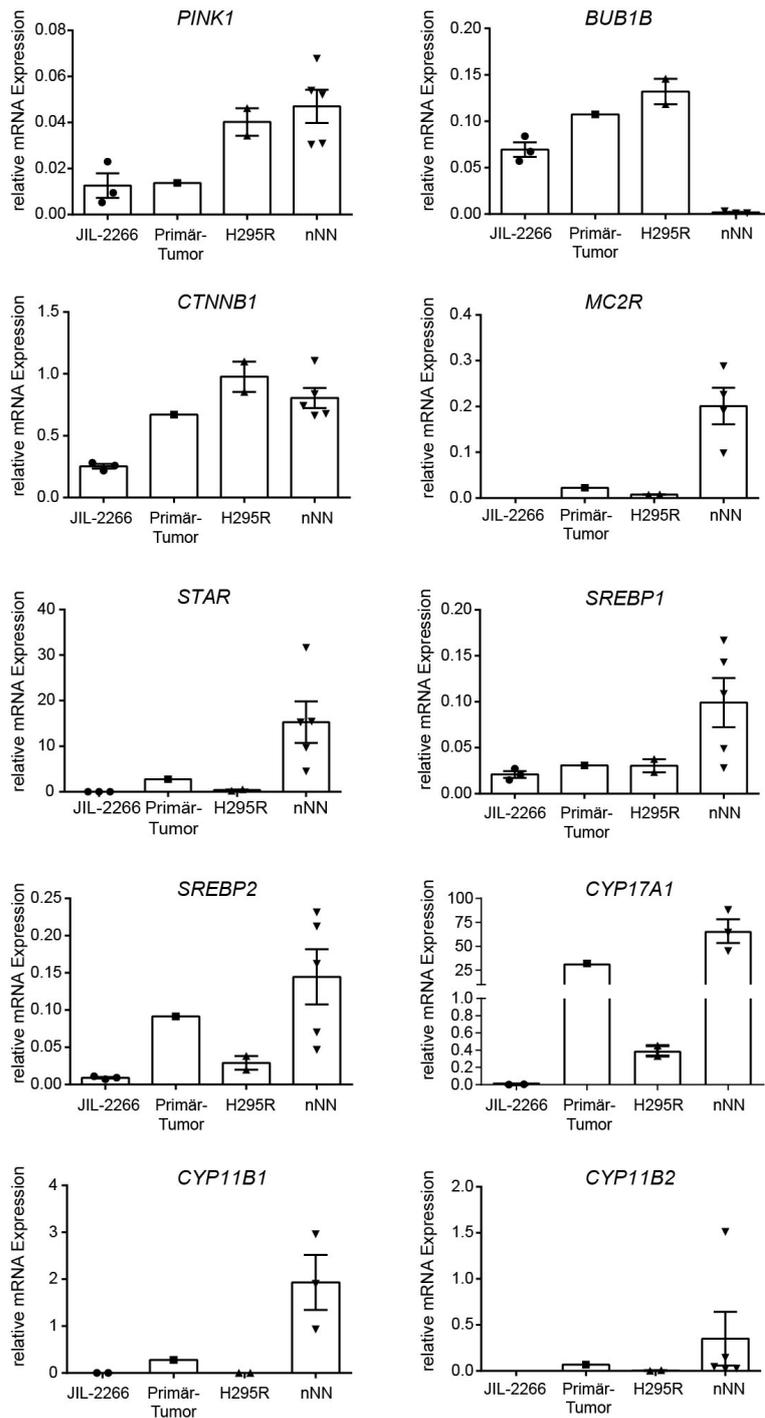


Abbildung 5: Expression von adrenalen und steroidogenen Markern

Relative Expression der mRNA von *PINK1*: *PTEN Induced Kinase 1*, *BUB1B*: *BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B*, *CTNNB1*: *Catenin Beta 1*, *MC2R*: *Melanocortin-2-receptor*, *STAR*: *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*, *SREBP1*: *sterol regulatory element binding transcription factor 1*, *SREBP2*: *sterol regulatory element binding transcription factor 2*, *CYP17A1*: *Steroid-17-alpha-Hydroxylase*, *CYP11B1*: *steroid-11-beta-hydroxylase* und *CYP11B2*: *steroid-18-hydroxylase* in JIL-2266, Primärtumor, H295R-Zellen und normaler Nebenniere (nNN). Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

3.5. Proliferationsrate der JIL-2266 und Sensitivität gegenüber Mitotan

Die Berechnung der Proliferationsrate erfolgte anhand der Zellzahl der JIL-2266 und H295R nach 24 h, 48 h, 72 h unter standardisierten Kulturbedingungen. Die Proliferationsrate lag bei den NCI-H295R bei 36 ± 15 Stunden, bei den JIL-2266 bei $41 \pm 13,6$ Stunden (Abbildung 6).

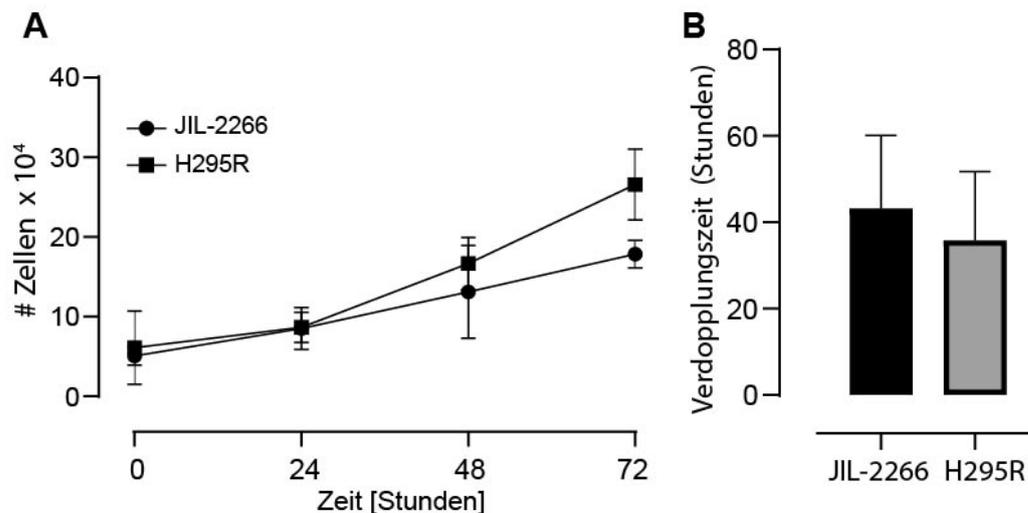


Abbildung 6: Proliferationsrate der JIL-2266-Zellen

Darstellung der Zunahme der Zellzahl in Abhängigkeit von der Kulturdauer (A) und Verdopplungszeit der JIL-2266- und H295R-Zellen (B). Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

Die Sensitivität der JIL-2266-Zellen gegenüber Mitotan wurde mittels CellTiter-Glo-Kit der Firma Promega bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit definierten Konzentrationen von Mitotan für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen anhand der emittierten Lumineszenz der Zelllysate durch ein Plattenlesegerät bestimmt. Dies wurde in drei Replikaten durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurde mit dem Programm GraphPad PRISM der EC_{50} -Wert als mittlere effektive Wirkkonzentration berechnet. Der EC_{50} -Wert lag bei den JIL-2266-Zellen mit $8,3 \times 10^{-5}$ M deutlich höher im Vergleich zu H295R Zellen mit einem Wert von $1,8 \times 10^{-5}$ M (Abbildung 7) (71).

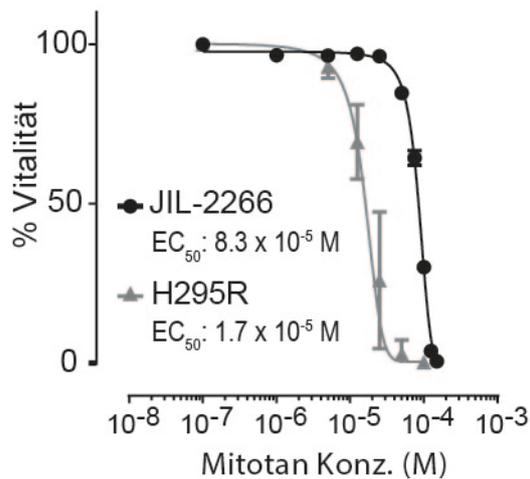


Abbildung 7: Sensitivität der JIL-2266-Zellen für Mitotan-induzierte Zytotoxizität

Halblogarithmische Darstellung der Zellvitalität in Abhängigkeit der Mitotankonzentration. M: Molar Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

3.6. Steroidhormonbildung der JIL-2266

Das Steroidhormonprofil wurde in Zellkulturüberständen verschiedener Passagen der JIL-2266 in der LC-MS/MS Analyse bestimmt. Dabei waren, unabhängig von der Passage der JIL-2266, unter Kulturbedingungen mit DMEM/F12 Medium mit 5 % FBS keine Steroidhormone detektierbar.

Tabelle 11 Produktion von Steroidhormonen mit Stimulation durch Forskolin

Auflistung der in der LC-MS/MS gemessenen Steroidhormone in Zellkulturüberständen in Passage 14 und Passage 40 der JIL-2266-Zellen mit und ohne Stimulation durch Forskolin. 17-OH-P: 17-Hydroxyprogesteron, DHEA: Dehydroepiandrosteron, DHEAS: Dehydroepiandrosteronsulfat DHT: Dihydrotestosteron.

Steroidhormone	Einheit	JIL-2266 P14	JIL-2266 P14 + Forskolin	JIL-2266 P40	JIL-2266 P40 + Forskolin
Aldosteron	ng/l	<10	<10	<10	<10
Cortisol	µg/dl	<0,152	<0,152	<0,152	<0,152
Cortison	µg/l	<0,148	<0,148	<0,148	<0,148
Corticosteron	µg/l	<0,175	<0,175	<0,175	<0,175
11-Deoxycortisol	µg/l	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
21-Deoxycortisol	µg/l	<0,027	<0,027	<0,027	<0,027

DHEAS	µg/dl	<2,44	<2,44	<2,44	<2,44
Estradiol	ng/l	<30	<30	<30	<30
Testosteron	µg/l	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Androstendion	µg/l	<0,022	<0,022	<0,022	<0,022
DHEA	µg/l	<0,229	<0,229	<0,229	<0,229
DHT	ng/l	<42	<42	<42	<42
17-OH-P	µg/l	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
11-Deoxycorticosteron	µg/l	<0,023	<0,023	<0,023	<0,023
Progesteron	µg/l	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03

Tabelle 12 Produktion von Steroidhormonen in Primärkulturmedium

Auflistung der in der LC-MS/MS gemessenen Steroidhormone in Zellkulturüberständen in Passage 8, 13 und 29 der JIL-2266 und H295R-Zellen im Vergleich in Kultur mit Primärkulturmedium. 17-OH-P: 17-Hydroxyprogesteron, DHEA: Dehydroepiandrosteron, DHEAS: Dehydro-epiandrosteronsulfat DHT: Dihydrotestosteron., EGF: epidermal growth factor, P: Passage.

Steroidhormone	Einheit	JIL-2266 P8 + Adenin, Insulin, EGF und Choleratoxin	JIL-2266 P13 + Adenin, Insulin, EGF und Choleratoxin	JIL-2266 P29 + Adenin, Insulin, EGF und Choleratoxin	H295R
Aldosteron	ng/l	<10	<10	<10	<10
Cortisol	µg/dl	<0,152	<0,152	<0,152	0,70
Cortison	µg/l	<0,148	<0,148	<0,148	1,58
Corticosteron	µg/l	<0,175	<0,175	<0,175	<0,175
11-Deoxycortisol	µg/l	0,37	0,09	<0,03	280
21-Deoxycortisol	µg/l	<0,027	<0,028	<0,029	<0,029
DHEAS	µg/dl	<2,44	<2,44	<2,44	62,8
Estradiol	ng/l	<30	<30	<30	<30
Testosteron	µg/l	0,07	0,02	<0,005	9,66
Androstendion	µg/l	2,77	0,65	0,014	130
DHEA	µg/l	1,5	0,9	<0,229	20,7
DHT	ng/l	<42	<42	<42	1190

17-OH-P	µg/l	15,5	3,01	<0,04	26,6
11-Deoxycorticosteron	µg/l	0,16	0,04	<0,023	4
Progesteron	µg/l	4,14	1,07	<0,03	0,68

Zur Induktion der Steroidogenese wurden JIL-2266 48 h mit Forskolin behandelt. Trotz Stimulation waren nach 48 h keine Steroidhormone in den Kulturüberständen der JIL-2266 messbar (Tabelle 11).

Wurden die JIL-2266 Zellen in dem Primärkulturmedium kultiviert, welches Adenin, Insulin, EGF und Choleratoxin beinhaltet, so konnten geringe Konzentrationen der Androgene Androstendion, Testosteron, DHEA und des Vorläuferhormons 17-OH-Progesteron gemessen werden (Tabelle 12). Die Menge der Hormonproduktion nahm ab, je höher die Passage der Zellen war. Diese Hormonproduktion in den Überständen war übereinstimmend mit dem Steroidhormonprofil der Spenderpatientin, bei der in den Plasmaproben ein erhöhtes Androstendion, Testosteron und 17-OH-Progesteron detektierbar waren (Abbildung 8).

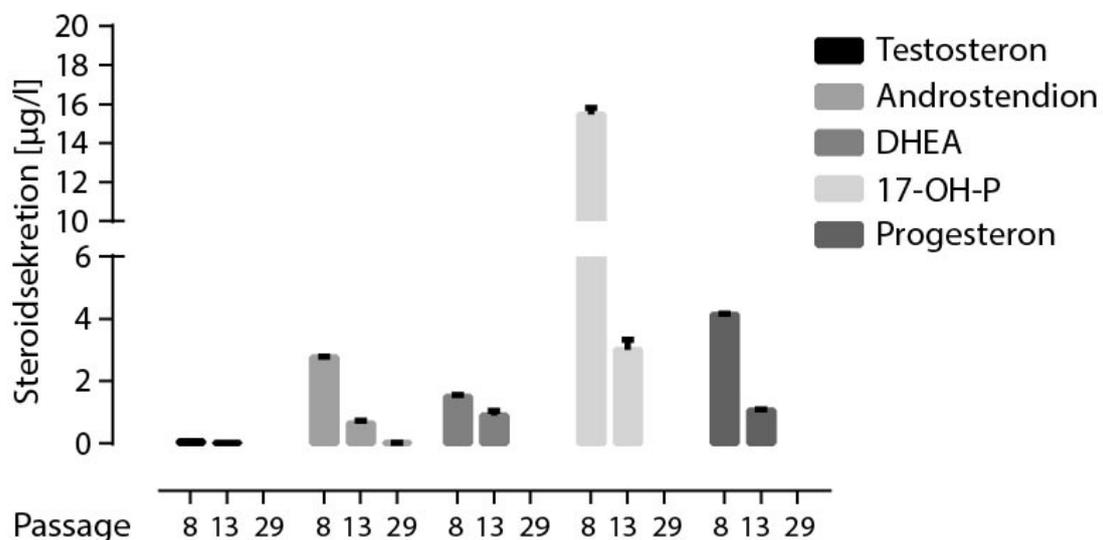


Abbildung 8: Steroidhormonproduktion der JIL-2266-Zellen

Steroidsekretion in µg/l in Passage 8, 13 und 29 der JIL-2266, die in Primärkulturmedium, welches Adenin, Insulin, EGF und Choleratoxin beinhaltet. Gemessen wurde in drei Replikaten des Ansatzes. 17-OH-P: 17-Hydroxyprogesteron, DHEA: Dehydroepiandrosteron. Modifiziert nach (76) mit Genehmigung

3.7. Whole exome sequencing zeigt eine Keimbahnmutation in der mutY DNA Glykosylase

Die Sequenzierungsarbeiten JIL-2266 wurden von der Firma CeGaT (Tübingen) durchgeführt und die bioinformatische Auswertung in Kooperation mit dem bioinformatischen Zentrum des CCC Mainfranken von Frau Dr. Silke Appenzeller durchgeführt. Die Exomsequenzierung zeigte das Vorliegen einer Keimbahnmutation in dem *MUTYH* Gen (MUTYH: NM_012222.2:exon3:c.316C>T:p.R106W), welches die mutY DNA Glykosylase kodiert. Die Daten der Sequenzierung der JIL-2266 Zelllinie wurden mit denen des Primärtumors und DNA des Patientenblutes als Referenz verglichen. In dem Primärtumor fanden sich insgesamt 556 somatische genetische Varianten, Varianten einzelner Nukleotide (single nucleotide variant, SNV) und kleinere Insertionen/Deletionen (InDels) verglichen mit insgesamt 683 dieser genetischen Variationen in den JIL-2266 (Abbildung 9 A), die somit zu einer hohen Tumormutationslast (tumour mutational burden, TMB) beitrugen. Das *TP53* Gen zeigte sich hemizygot für eine „stop gain“ Mutation (TP53: NM_000546.5:exon8:c.859G>T:p.E287X) sowohl in dem Primärtumor des Patienten, als auch in den JIL-2266. Es zeigte sich ein Verlust der Heterozygotie in dem *MUTYH* Gen im Primärtumor und in den JIL-2266 Zellen, verglichen mit der heterozygoten Keimbahnmutation in der DNA des Patientenblutes (Abbildung 9 B). Primärtumor und JIL-2266 wiesen Wildtypallele für *CTNNB1* auf, beinhalteten jedoch eine pathogene Mutation im *ZNRF3* Gen (ZNRF3: NM_001206998.2:exon8:c.2569G>T:p.G857W). Durch eine bioinformatische Analyse der genetischen Signatur anhand der Signaturrendatenbank „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (COSMIC) database (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures_v2.tt) fand sich gehäuft die Substitution von Einzelbasen Cytosin > Adenin. Diese Signatur entspricht der COSMIC 18 Signatur, übereinstimmend mit einer *MUTYH* Defizienz.

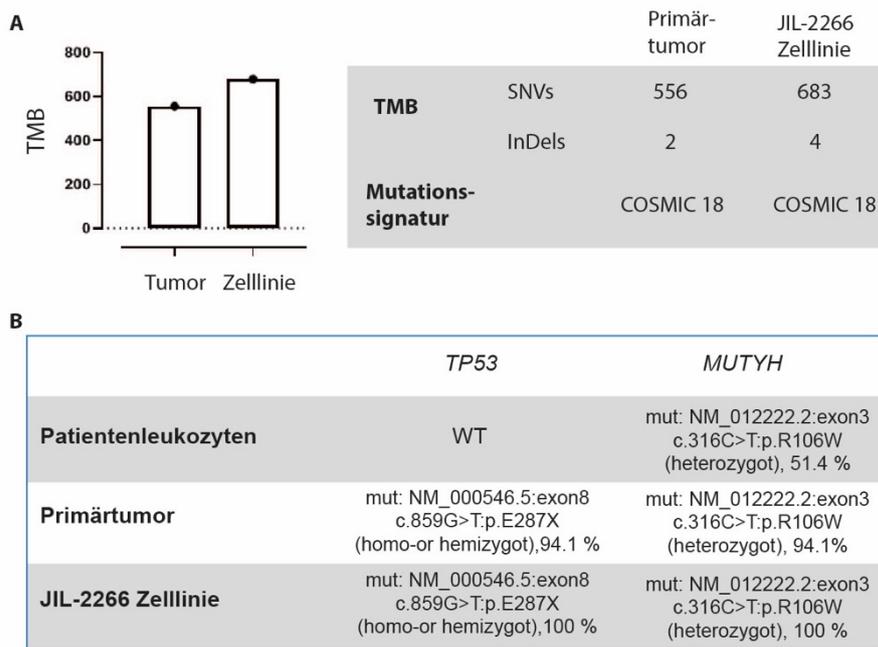


Abbildung 9: Ergebnisse der Exomsequenzierung

Darstellung des tumour mutational burden (TMB) im Primärtumor und der JIL-2266-Zelllinie (A). Auflistung der Mutationen in den Genen *TP53* und *MUTYH* in Patientenleukozyten, dem Primärtumor und der JIL-2266-Zelllinie (B). COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, InDel: insertion and deletion, SNV: single nucleotide variant, WT: Wildtyp. Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

3.8. Funktionelle Konsequenzen der loss-of function Mutation im MutY DNA Glykosylase Gen

Die Bildung von 8-Oxoguanin (8-oxoG) ist eine der häufigsten Formen der oxidativen DNA Schädigung. Das in die DNA eingebaute 8-oxoG führt zu einer fehlerhaften Bindung mit der Base Adenin während der Replikation der DNA (49). Dies wird durch den Basenexzisions-Reparaturmechanismus (BER), welcher durch einen Komplex der MutY beinhaltet und 8-oxoG herausschneidet, verhindert. Mutationen, welche die Funktionalität von MutY beeinträchtigen, führen daher zu einer Akkumulation von 8-oxoG in der DNA und folglich zu einer erhöhten Transversion von G:C > T:A, da 8-oxoG fälschlicherweise mit A paart. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf 8-oxoG in Zellpellets von JIL-2266, H295R und H295R Pellets, die mit H₂O₂ zur Induktion eines oxidativen DNA Schadens vorbehandelt wurden, durchgeführt. Parallel erfolgte vergleichend die Färbung an Paraffinschnitten des Primärtumors und Schnitten eines ACC Tumors mit wildtypischen *MUTYH* Genotyp. Unbehandelte H295R Zellen waren

negativ für 8-oxoG (Abbildung 10 A). Wurden diese jedoch zuvor mit H₂O₂ einem oxidativen Stress ausgesetzt, führte dies zu einer Akkumulation von 8-oxoG (Abbildung 10 B). Unbehandelte JIL-2266 (Abbildung 10 C) und korrespondierendes Tumorgewebe der Patientin (Abbildung 10 D) waren stark positiv für 8-oxoG. Die ACC Tumorprobe mit *MUTYH*-Wildtyp Allel zeigte sich vollständig negativ für 8-oxoG (Abbildung 10 E). Dies entsprach der Annahme, dass eine Akkumulation von 8-oxoG, aufgrund eines fehlerhaften BER, bedingt durch eine Mutation im Gen welches die MutY DNA Glycosylase kodiert, auftritt.

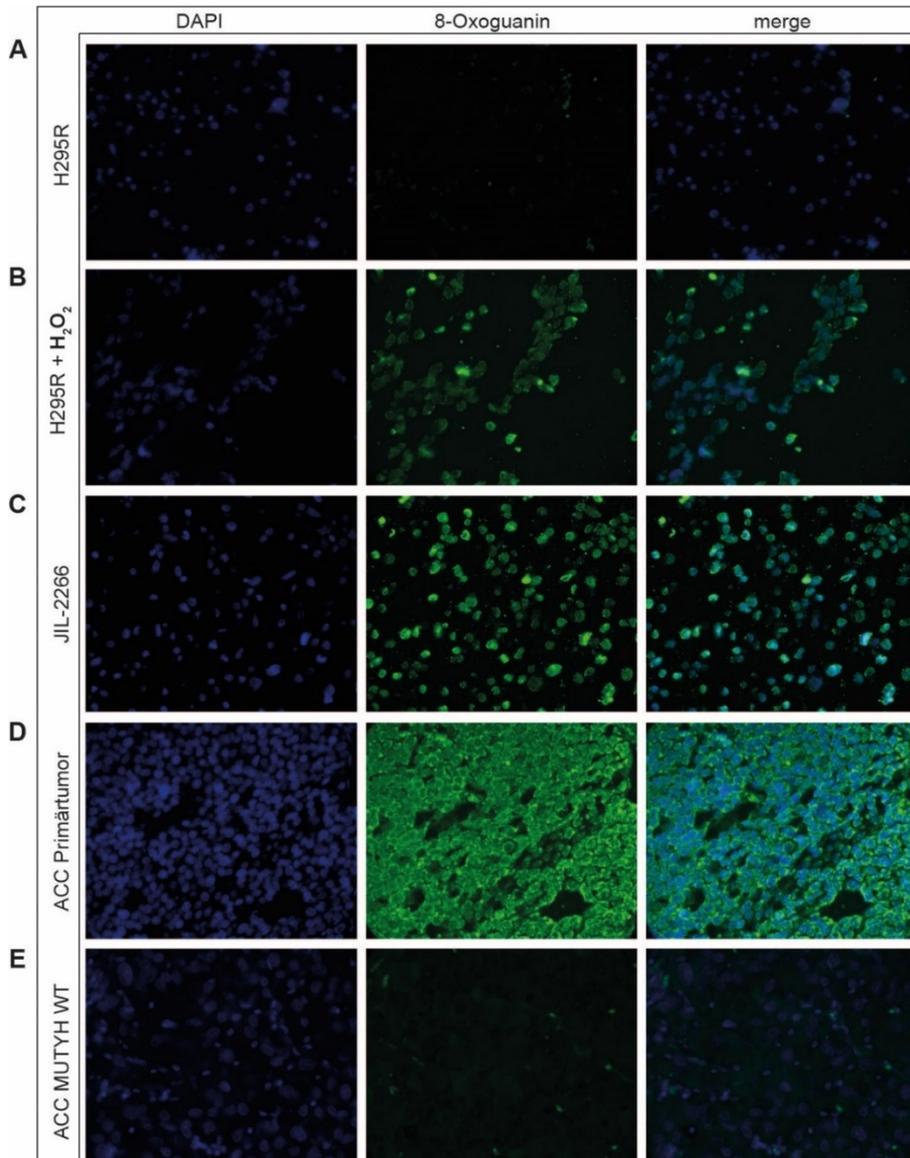


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von 8-Oxoguanin

Immunfluoreszenzfärbung von 8-Oxoguanin H295R-Zellen (A), H295R-Zellen, welche mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden (B), JIL-2266-Zellen (C), dem korrespondierenden Primärtumor (D) und einer Kontrolle eines ACC-Tumors mit *MUTYH* Wildtyp (E). Modifiziert nach (76) mit Genehmigung.

4. Diskussion

Das Nebennierenkarzinom ist eine sehr seltene und heterogene maligne Erkrankung. Dabei ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen von entscheidender Bedeutung. Jedoch fehlen präklinische Testmodelle, die die Heterogenität dieser Erkrankung widerspiegeln können, wodurch die Entwicklung neuer Therapieoptionen ausgebremst wird. Durch direkten Transfer von patienteneigenem Tumormaterial in routinierte Zellkulturverfahren konnte die Zelllinie JIL-2266 etabliert werden.

4.1. Bestätigung der Authentizität der JIL-2266 Zelllinie

Zur Bestätigung der Authentizität der Zelllinie wurde eine STR-Analyse angefertigt. Hier konnte die genetische Übereinstimmung der JIL-2266 Zelllinie mit der DNA des Patienten gezeigt werden. Im Vergleich zu der Patientenprobe fanden sich in den JIL-2266 Zellen jedoch in drei Genloci, THO1 (Chromosomenlokalisierung: 11p15.5; Intron 1 Tyrosin-Hydroxylase Gen), D16S539 (Chromosomenlokalisierung: 16q24.1) und TPOX (Chromosomenlokalisierung: 2p25.3; Intron 10 Thyroid-Peroxidase Gen) ein Verlust der Heterozygotie. Dies sprach für fortlaufende Mutationen und genetische Alterationen der Zelllinie im Rahmen der stetigen Passagierung und Vermehrung der Zellen unter den genannten Kulturbedingungen. Durch Passagierung der Zelllinie wurden ebenso zwangsläufig Zellen, welche am besten an die gegebenen Kulturbedingungen angepasst waren, selektiert. Die Annahme der fortwährenden Veränderungen und Anpassung der Zelllinie an Kulturbedingungen bestätigte sich auch anhand der steten Steigerung der Proliferationsrate der Primärzellen bis zuletzt bei $41 \pm 13,6$ Stunden in den JIL-2266. Die morphologische Integrität der Zelllinie blieb dabei erhalten. Weiter konnte durch das erstellte STR-Profil durch Abgleich der JIL-2266 mit anderen Profilen bekannter Zelllinie mittels freizugänglichen Online-Datenbanken eine Kontamination der Zelllinie ausgeschlossen werden. Demnach handelt es sich bei der JIL-2266-Zelllinie um eine neue Zelllinie mit einzigartiger genetischer Signatur (73).

Ein häufiges Problem in der Arbeit mit Zellkulturen sind mikrobielle Kontaminationen. Aufgrund der Kontaminationen von Zelllinien mit intrazellulären Mykoplasmen, welche über Jahre unerkant persistieren können, ist eine besondere Sorgfalt im Umgang mit Zelllinien und regelmäßige Kontrolle notwendig (77). Durch Testung der Zellen konnte eine Infektion mit intrazellulären Mycoplasmen ausgeschlossen werden, welche Zellkulturbedingungen übertragen werden können und Ergebnisse von Zellkulturexperimenten verfälschen können.

4.2. Überprüfung des adrenalen Ursprungs der JIL-2266 Zelllinie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei den JIL-2266 um eine neue Zelllinie handelt, musste auch der adrenale Ursprung dieser Zellen bestätigt werden. Dabei ist die Expression des Transskriptionsfaktors SF-1 ein essentieller Marker des adrenokortikalen Ursprungs (19). Sowohl die JIL-2266-Zellen, als auch das Gewebe des zugehörigen Primärtumors zeigten eine moderate Expression von SF-1. Im Vergleich zu der Standard-Zelllinie H295R mit bekannter hoher Expression von SF-1 war die Expression in den JIL-2266 Zellen geringer, aber dennoch als positiv für diesen Marker zu werten. Die JIL-2266-Zellen exprimierten außerdem Gene, welche an der Produktion von Steroidhormonen beteiligt sind. Die Expression dieser Gene war jedoch deutlich geringer in der JIL-2266-Zelllinie im Vergleich zu den H295R-Zellen und ebenfalls geringer im Vergleich zum Primärtumor. Die höchste Expression war in Proben einer gesunden Nebenniere zu finden. Diese Ergebnisse deckten sich mit der fehlenden Fähigkeit der JIL-2266 unter Standard-Kulturbedingungen Hormone zu produzieren. Im Gegensatz dazu wies die Patientin präoperativ pathologisch erhöhte Steroidhormonkonzentrationen im Blut auf und zeigte klinisch das Bild eines floriden Cushing-Syndroms. Diese fehlende Kapazität der Zellen Steroidhormone zu produzieren könnte als Folge der hohen Mutationslast gesehen werden. Durch Kultivierung der Zellen in dem Primärkulturmedium war eine geringe Steroidsekretion der Zellen im Kulturüberstand messbar. Dabei war eine niedrigere Hormonsekretion mit der Höhe der Passage der Zellen assoziiert. Es erschien denkbar, dass durch die Akkumulation von Mutationen und

Zellselektion durch Passagierung Kapazität der Zellen zur Steroidhormonproduktion verloren ging. Allerdings muss betont werden, dass beim ACC generell die Steroidogenese weniger effizient als in benignen Tumoren oder der normalen Nebenniere verläuft. Mithin ist das bei Patienten auftretende Cushing-Syndrom und der oft begleitende Exzess an Vorläuferhormonen in erster Linie Ausdruck der Tumormasse.

Die Expression von mRNA-Markern des ACC wie *PINK1*, *BUB1B* und *CTNNB1* war in den JIL-2266-Zellen niedriger, als in den H295R- Zellen. Jedoch deckte sich die Expression dieser Marker mit dem Primärtumor. Die differentielle Expression dieser Marker spiegelt die Heterogenität der Erkrankung wieder.

4.3. Genetische Signatur der JIL-2266 Zelllinie

Innerhalb der letzten Jahre konnten drei neue ACC Zelllinien (72, 73) entwickelt werden. Die Standardzelllinie H295R wurde seit ihrer Etablierung vor knapp 30 Jahren (78) umfangreich untersucht. Alle verfügbaren Zelllinien weisen Mutationen in den Genen *TP53* (MUC-1, CU-ACC2), *CTNNB1* (CU-ACC1) oder in beiden (NCI-H295R) auf (70, 72, 73). Die JIL-2266-Zelllinie stellen hier keine Ausnahme dar, da sie ebenfalls eine hemizygote *TP53* Mutation aufweisen (NM_000546.5:exon8:c.859G>T: p.E287X).

Mutationen, welche DNA Reparaturmechanismen betreffen, wurden in einer kleinen Fallzahl im ACC beschrieben und betreffen überwiegend MMR-Gene. Das Gen *MUTYH* kodiert eine MutY DNA Glykosylase und ist Teil des Basenexzisions-Reparaturmechanismus (BER). Das BER ist beteiligt an der Erkennung und Behebung von fehlerhaft in der DNA vorkommenden 8-oxoG-Adenin-Fehlpaarungen, indem das falsch gepaarte Adenin herausgeschnitten wird. Es wurden sporadische Fälle von ACC Tumoren dokumentiert, welche eine *MUTYH* Mutation beinhalteten (22, 68). Pilati et al. beschrieben zwei hypermutierte ACC Tumore, die durch eine C>A Tansversion und einer Keimbahnmutation im *MUTYH* Gen charakterisiert waren (22, 68). Zusätzlich durch die Analyse einer TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) Kohorte von 91 ACC-Patienten wurden zwei Tumore mit einer C>A Tansversion Signatur, COSMIC 18 und ursächlicher *MUTYH* Mutation gefunden (23, 68).

In der JIL-2266-Zelllinie und der ACC-Patientin, die das Tumorgebewebe spendete, konnte ebenfalls eine *MUTYH* Mutation nachgewiesen werden (NM_012222.2:exon3:c.316C>T: p.R106W) (83). Diese Mutation war zuvor noch nicht in ACC Tumoren beschrieben, aber wurde bereits in kolorektalen Karzinomen gesehen (79). Diese Mutation lag bei dem Patienten heterozygot vor und wurde hemizygot im ACC Tumor nachgewiesen im Sinne eines loss of heterozygosity. Es konnte eine hohe Akkumulation von 8-oxoG in dem Primärtumor und den JIL-2266-Zellen aufgezeigt werden. Dabei war diese ähnlich hoch, wie in H295R-Zellen, welche einem oxidativen Stress durch eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid ausgesetzt wurden. Dies implizierte eine deutliche funktionale Beeinträchtigung der MutY DNA Glykosylase, aufgrund der in der Zelllinie gefundenen Mutation. Durch die Sequenzierung der JIL-2266-Zelllinie wurde gezeigt, dass bedingt durch die Beeinträchtigung der DNA Reparaturmechanismen, es zu einem Anstieg der TMB in der Zelllinie kam. Durch fortlaufende Passagierung und Replikation der Zelllinie war die Mutationslast in den JIL-2266-Zellen im Vergleich zu dem Primärtumor höher. Weiter zeigte die Zelllinie eine charakteristische COSMIC 18 Mutationssignatur, die mit oxidativen DNA Schäden assoziiert und durch eine Anreicherung von C>A Transversionen charakterisiert ist. Diese ist sehr wahrscheinlich bedingt durch Mutationen im *MUTYH* Gen ist (68, 80). Eine COSMIC 18 Signatur wurde nur sehr selten in ACC Tumoren beschrieben, jedoch weisen alle gezeigten Tumore eine *MUTYH* Mutation auf (68,79).

Eine Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren könnte besonders bei Patienten mit Beeinträchtigung der DNA Reparaturmechanismen hilfreich sein. Der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab ist für alle soliden Tumore zugelassen, die eine Mikrosatelliten-Instabilität oder Störung der DNA Mismatchrepair (MMR) aufweisen. Bei ACC Tumoren ist bekannt, dass es eine Assoziation zu Keimbahnmutationen in DNA MMR gibt und somit als Lynch-Syndrom-assoziierte Tumore gelten (63, 81). Obwohl das Ansprechen von ACC Patienten auf Immuntherapien sehr heterogen ist (61, 65), gibt es vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien und Fallberichten über erfolgreiche Therapien mit PD-1 Inhibitoren, bei Patienten mit Beeinträchtigung des MMR (61, 82). Die

JIL-2266-Zelllinie weist ebenfalls eine hohe Mutationslast mit allerdings Fehlen eines MMR-Defekts auf und könnte als Modell herangezogen werden, um *in vitro* den antitumoralen Effekt von Immuntherapien zu untersuchen. In dem CU-ACC2 PDX Modell, welches auch eine Beeinträchtigung der MMR aufweist, wurde gezeigt, dass eine Therapie mit PD-1 Inhibitoren zu einer signifikant erhöhten Infiltration des Tumors mit Immunzellen und zu einem besseren Therapieansprechen führt (83).

Die JIL-2266 zeigten eine deutlich reduzierte Sensitivität gegenüber Mitotan. Dies war übereinstimmend mit dem Therapieversagen des Patienten unter Mitotantherapie (39). Aufgrund des raschen Krankheitsprogresses konnte kein therapeutischer Versuch mit einer Immuntherapie durchgeführt werden. Da für *MUTYH* mutierte Tumore eine potentielle Wirksamkeit von Immuntherapien gezeigt werden konnte (83), bleibt die Frage, ob die Patientin auf eine solche Therapie angesprochen hätte, unbeantwortet.

4.4. Schlussfolgerung und zukünftige Schritte

Die neu etablierte ACC Zelllinie JIL-2266 stellt ein zusätzliches Instrument dar, um die genetische Heterogenität des ACC zu betrachten. Die JIL-2266-Zelllinie kann dabei helfen ein besseres Verständnis über die Funktion der mutY DNA Glykosylase im ACC zu erhalten. Ebenso erlaubt sie Resistenzmechanismen *in vitro* gegenüber Mitotan zu untersuchen. Auch weist die Zelllinie eine hohe Mutationslast und eine COSMIC 18 Signatur auf und wird in der Forschung zur Sensitivität des ACC gegenüber Immuntherapien von Nutzen sein. Eine Untersuchung der ACC Patienten auf das Vorliegen einer *MUTYH* Mutation könnte eine Strategie darstellen um Patienten zu identifizieren, welche potentiell auf eine Immuntherapie ansprechen könnten (81-84).

5. Zusammenfassung

Das Nebennierenkarzinom (ACC) ist eine sehr seltene und heterogene Erkrankung mit einer schlechten Prognose in fortgeschrittenen Stadien. Trotz intensiver Forschung konnten in den letzten beiden Jahrzehnten keine neuen medikamentösen Therapien etabliert werden. Ein wichtiger Bestandteil für die präklinische Testung neuer Medikamente sind Zelllinien. Nach der Publikation des heutigen Standard ACC Zellkulturmodells H295R im Jahre 1990 vergingen fast 30 Jahre bis 2016 die zweite ACC Zelllinie (MUC-1) etabliert werden konnte. Zu Beginn dieser Arbeit existierten vier ACC Zelllinien, welche die genetische Heterogenität der Erkrankung besser widerspiegeln, jedoch nicht die gesamte genetische Landschaft des ACCs abdeckten.

In dieser Arbeit konnte eine neue stabile ACC Zelllinie etabliert werden, welche auf Plastik Kulturschalen adhärert und in Kulturmedium proliferiert. Zum ersten Mal seit der Etablierung der H295R Zelllinie gelang dies unter Verzicht auf das Passagieren in Mäusen. Die Charakterisierung der neu etablierten Zelllinie, JIL-2266, bestätigte die Übereinstimmung mit dem Primärtumor der Patienten über eine STR Analyse. Eine Positivität für den Marker SF-1 bei den JIL-2266 Zellen erlaubte den sicheren Nachweis des adrenokortikalen Ursprungs. Mittels LC-MS/MS Messungen konnten geringe Mengen an Androgenen und deren Vorläufern im Zellkulturüberstand gemessen werden, welches für eine vorhandene Steroidhormon-Enzymmaschinerie dieser Zelllinie spricht. Ferner konnte mittels Exomsequenzierung eine Keimbahnmutation im *MUTYH* Gen festgestellt werden. Dieses kodiert für die MutY DNA Glykosylase und ist an der Reparatur von oxidativen DNA Schäden beteiligt. Durch den Nachweis von oxidativen DNA Schäden in der Zelllinie und im Primärtumor kann die hier identifizierte Mutation als Funktionsverlustmutation eingestuft werden, welche sehr wahrscheinlich für die beobachtete hohe Mutationslast in Tumor und Zelllinie ursächlich ist. Da eine hohe Tumormutationslast mit dem Ansprechen auf Immuntherapien in Verbindung gebracht werden konnte, erweitert das JIL-2266 Zellkulturmodell nicht nur das Repertoire an verfügbaren ACC Zelllinien, sondern könnte zukünftig eine Möglichkeit bieten, Immuntherapien im ACC *in vitro* zu testen.

6. Literaturverzeichnis

1. Silverman ML, Lee AK. Anatomy and pathology of the adrenal glands. *Urologic Clinics of North America*. 1989;16(3):417-32.
2. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microscopy Research and Technique*. 1997;36(6):520-33.
3. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A. *Taschenlehrbuch Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2010.
4. Adcock IM, Mumby S. Glucocorticoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;237:171-96.
5. Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, Baudin E, Berruti A, de Krijger R, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *European journal of endocrinology*. 2018;179(4):G1-G46.
6. Busse LW, Wang XS, Chalikonda DM, Finkel KW, Khanna AK, Szerlip HM, et al. Clinical Experience With IV Angiotensin II Administration: A Systematic Review of Safety. *Critical Care Medicine*. 2017;45(8):1285-94.
7. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*. 2018;99(1):101-11.
8. Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, Dieleman J, Kerstens MN, Links TP, et al. Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. *European Journal of Cancer*. 2013;49(11):2579-86.
9. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, et al. Adrenocortical carcinoma. *Endocrine reviews*. 2014;35(2):282-326.
10. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(12):4551-64.
11. Fassnacht M, Assie G, Baudin E, Eisenhofer G, de la Fouchardiere C, Haak HR, et al. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2020;31(11):1476-90.
12. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(12):4551-64.
13. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libe R, Hughes BA, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(12):3775-84.
14. Bancos I, Taylor AE, Chortis V, Sitch AJ, Jenkinson C, Davidge-Pitts CJ, et al. Urine steroid metabolomics for the differential diagnosis of adrenal incidentalomas in the EURINE-ACT study: a prospective test validation study. *Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2020;8(9):773-81.
15. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *European journal of endocrinology*. 2016;175(2):G1-g34.
16. Johanssen S, Hahner S, Saeger W, Quinkler M, Beuschlein F, Dralle H, et al. Defizite in der klinischen Betreuung von Patienten mit Nebennierenkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2010;107(50):885-91.
17. Giordano TJ, Berney D, de Krijger RR, Erickson L, Fassnacht M, Mete O, et al. Data set for reporting of carcinoma of the adrenal cortex: explanations and recommendations of the guidelines from the International Collaboration on Cancer Reporting. *Human Pathology*. 2021;110:50-61.

18. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Human pathology*. 2009;40(6):757-68.
19. Sbiera S, Schmall S, Assie G, Voelker HU, Kraus L, Beyer M, et al. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(10):E161-71.
20. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, et al. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(3):841-9.
21. Libé R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Annals of Oncology*. 2015;26(10):2119-25.
22. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(6):607-12.
23. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;30(2):363.
24. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2005;65(17):7622-7.
25. Little DW, 3rd, Dumontet T, LaPensee CR, Hammer GD. β -catenin in adrenal zonation and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2021;522:111120.
26. Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libe R, Ragazzon B, Launay P, et al. Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(10):4135-40.
27. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(2):E419-26.
28. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):668-76.
29. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *The American Journal of Pathology*. 2003;162(2):521-31.
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. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M, Willenberg HS, Quinkler M, Reisch N, et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(3):E476-85.
32. Raymond VM, Else T, Everett JN, Long JM, Gruber SB, Hammer GD. Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(1):E119-25.
33. Martin F, Sarah J, Marcus Q, Peter B, S. WH, Felix B, et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma. *Cancer*. 2009;115(2):243-50.

34. Libe R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3:45.
35. Kastelan D, Muzurovic E, Dusek T. Approach to patients with European Network for the Study of Adrenal Tumor stages I and II adrenocortical carcinomas. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2021;28(3):265-70.
36. Megerle F, Herrmann W, Schloetelburg W, Ronchi CL, Pulzer A, Quinkler M, et al. Mitotane Monotherapy in Patients With Advanced Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(4):1686-95.
37. Hescot S, Amazit L, Lhomme M, Travers S, DuBow A, Battini S, et al. Identifying mitotane-induced mitochondria-associated membranes dysfunctions: metabolomic and lipidomic approaches. *Oncotarget*. 2017;8(66):109924-40.
38. Hescot S, Slama A, Lombès A, Paci A, Remy H, Leboulleux S, et al. Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(3):371-81.
39. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, et al. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology*. 2015;156(11):3895-908.
40. Smith DC, Kroiss M, Kebebew E, Habra MA, Chugh R, Schneider BJ, et al. A phase 1 study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma. *Investigational new drugs*. 2020;38(5):1421-9.
41. Weigand I, Altieri B, Lacombe AMF, Basile V, Kircher S, Landwehr LS, et al. Expression of SOAT1 in Adrenocortical Carcinoma and Response to Mitotane Monotherapy: An ENSAT Multicenter Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2020;105(8).
42. Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, et al. Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Annals of Oncology*. 2000;11(10):1281-7.
43. 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.
44. 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. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(2):445-53.
45. Henning JEK, Deutschbein T, Altieri B, Steinhauer S, Kircher S, Sbiera S, et al. Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2017;102(11):4323-32.
46. Kroiss M, Deutschbein T, Schlötelburg W, Ronchi CL, Hescot S, Körbl D, et al. Treatment of Refractory Adrenocortical Carcinoma with Thalidomide: Analysis of 27 Patients from the European Network for the Study of Adrenal Tumours Registry. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2019;127(9):578-84.
47. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):115-24.
48. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2008;359(4):378-90.
49. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2015;16(4):426-35.

50. Kroiss M, Quinkler M, Johanssen S, van Erp NP, Lankheet N, Pöllinger A, et al. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(10):3495-503.
51. Berruti A, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, et al. Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *European journal of endocrinology*. 2012;166(3):451-8.
52. Miller JW, Crapo L. The medical treatment of Cushing's syndrome. *Endocrine reviews*. 1993;14(4):443-58.
53. Schulte HM, Benker G, Reinwein D, Sippell WG, Allolio B. Infusion of low dose etomidate: correction of hypercortisolemia in patients with Cushing's syndrome and dose-response relationship in normal subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1990;70(5):1426-30.
54. Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B. New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *European journal of clinical investigation*. 2000;30 Suppl 3:76-82.
55. Johanssen S, Allolio B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*. 2007;157(5):561-9.
56. Castinetti F, Fassnacht M, Johanssen S, Terzolo M, Bouchard P, Chanson P, et al. Merits and pitfalls of mifepristone in Cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*. 2009;160(6):1003-10.
57. van Erp NP, Guchelaar HJ, Ploeger BA, Romijn JA, Hartigh J, Gelderblom H. Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity. *European journal of endocrinology*. 2011;164(4):621-6.
58. 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. *Clinical Endocrinology*. 2011;75(5):585-91.
59. Kroiss M, Megerle F, Kurlbaum M, Zimmermann S, Wendler J, Jimenez C, et al. Objective Response and Prolonged Disease Control of Advanced Adrenocortical Carcinoma with Cabozantinib. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2020;105(5):1461-8.
60. Carneiro BA, Konda B, Costa RB, Costa RLB, Sagar V, Gursel DB, et al. Nivolumab in Metastatic Adrenocortical Carcinoma: Results of a Phase 2 Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2019;104(12):6193-200.
61. Raj N, Zheng Y, Kelly V, Katz SS, Chou J, Do RKG, et al. PD-1 Blockade in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(1):71-80.
62. Lang J, Capasso A, Jordan KR, French JD, Kar A, Bagby SM, et al. Development of an Adrenocortical Cancer Humanized Mouse Model to Characterize Anti-PD1 Effects on Tumor Microenvironment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2020;105(1).
63. Raymond VM, Everett JN, Furtado LV, Gustafson SL, Jungbluth CR, Gruber SB, et al. Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(24):3012-8.
64. Else T, Rodriguez-Galindo C. 5th International ACC Symposium: Hereditary Predisposition to Childhood ACC and the Associated Molecular Phenotype: 5th International ACC Symposium Session: Not Just for Kids! Hormones and Cancer. 2016;7(1):36-9.
65. Le Tourneau C, Hoimes C, Zarwan C, Wong DJ, Bauer S, Claus R, et al. Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the JAVELIN solid tumor trial. *The Journal of Immunotherapy of Cancer*. 2018;6(1):111.
66. Habra MA, Stephen B, Campbell M, Hess K, Tapia C, Xu M, et al. Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma. *The Journal of Immunotherapy of Cancer*. 2019;7(1):253.

67. Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, Hes FJ. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 2011;79(1):1-16.
68. Pilati C, Shinde J, Alexandrov LB, Assie G, Andre T, Helias-Rodzewicz Z, et al. Mutational signature analysis identifies MUTYH deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas. *The Journal of Pathology*. 2017;242(1):10-5.
69. Bird IM, Mason JI, Rainey WE. Hormonal regulation of angiotensin II type 1 receptor expression and AT1-R mRNA levels in human adrenocortical cells. *Endocrine research*. 1995;21(1-2):169-82.
70. Pinto EM, Morton C, Rodriguez-Galindo C, McGregor L, Davidoff AM, Mercer K, et al. Establishment and characterization of the first pediatric adrenocortical carcinoma xenograft model identifies topotecan as a potential chemotherapeutic agent. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(7):1740-7.
71. Pinto EM, Kiseljak-Vassiliades K, Hantel C. Contemporary preclinical human models of adrenocortical carcinoma. *Current Opinion in Endocrine Metabolic Research*. 2019;8:139-44.
72. Hantel C, Shapiro I, Poli G, Chiapponi C, Bidlingmaier M, Reincke M, et al. Targeting heterogeneity of adrenocortical carcinoma: Evaluation and extension of preclinical tumor models to improve clinical translation. *Oncotarget*. 2016;7(48):79292-304.
73. Kiseljak-Vassiliades K, Zhang Y, Bagby SM, Kar A, Pozdeyev N, Xu M, et al. Development of new preclinical models to advance adrenocortical carcinoma research. *Endocrine-related cancer*. 2018;25(4):437-51.
74. Liang R, Weigand I, Lippert J, Kircher S, Altieri B, Steinhauer S, et al. Targeted Gene Expression Profile Reveals CDK4 as Therapeutic Target for Selected Patients With Adrenocortical Carcinoma. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2020;11:219.
75. Conti E, Franks NP, Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*. 1996;4(3):287-98.
76. Landwehr LS, Schreiner J, Appenzeller S, Kircher S, Herterich S, Sbierra S, et al. A novel patient-derived cell line of adrenocortical carcinoma shows a pathogenic role of germline MUTYH mutation and high tumour mutational burden. *European journal of endocrinology*. 2021;184(6):823-35.
77. Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;731:93-103.
78. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Research*. 1990;50(17):5488-96.
79. AlDubayan SH, Giannakis M, Moore ND, Han GC, Reardon B, Hamada T, et al. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 2018;102(3):401-14.
80. Viel A, Bruselles A, Meccia E, Fornasarig M, Quaia M, Canzonieri V, et al. A Specific Mutational Signature Associated with DNA 8-Oxoguanine Persistence in MUTYH-defective Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. 2017;20:39-49.
81. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-13.
82. Mota JM, Sousa LG, Braghiroli MI, Siqueira LT, Neto JEB, Chapchap P, et al. Pembrolizumab for metastatic adrenocortical carcinoma with high mutational burden Two case reports. *Medicine*. 2018;97(52).
83. Volkov NM, Yanus GA, Ivantsov AO, Moiseenko FV, Matorina OG, Bizin IV, et al. Efficacy of immune checkpoint blockade in MUTYH-associated hereditary colorectal cancer. *Investigational new drugs*. 2020;38(3):894-8.

84. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierto PA, Atmaca A, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(5):853-61 e4.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	8-Oxoguanin
ACC	Nebennierenrindenzarzinom
ACE	Angiotensin-converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin
BER	Basenexzisions-Reparaturmechanismus
CBG	Transcortin
cDNA	complementary DNA
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Del	Deletion
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Mittlere effektive Wirkkonzentration
EDP	Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin
EGF	Epidermal growth factor
ENaC	Epitheliale Natriumkanäle
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
FBS	Fetal bovine serum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
IGF 2	Insulin like growth factor 2

In	Insertion
LC-MS/MS	liquid chromatography -mass spectrometry/mass spectrometry
LH	Luteinisierendes Hormon
MC2	Melanocortin 2
min	Minute
ml	Milliliter
nNN	normale Nebenniere
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PBS	phosphate buffered saline
PDL 1	Programmed cell death-ligand 1
PDX	Patient-derived xenograft
Prä-POMC	Proopiomelanocortin
qPCR	quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROCK	Rho-associated kinase
Rpm	revolutions per minute
SF1	Steroidogenic factor 1
SNV	Single nucleotide variant
SOAT1	Sterol-O-Acyltransferase 1
STR	Short tandem repeats
Sz-M	Streptozotocin plus Mitotan
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TPS	Tumor proportional score
V.	Vena

VEGF

Vascular endothelial growth factor

II. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der magnetischen Separation ferromagnetisch markierter Fibroblasten	20
Abbildung 2: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Etablierung der Zelllinie JIL-2266	30
Abbildung 3: Morphologische Darstellung der Passagen der JIL-2266	31
Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung	33
Abbildung 5: Expression von adrenalen und steroidogenen Markern	35
Abbildung 6: Proliferationsrate der JIL-2266-Zellen	36
Abbildung 7: Sensitivität der JIL-2266-Zellen für Mitotan-induzierte Zytotoxizität	37
Abbildung 8: Steroidhormonproduktion der JIL-2266-Zellen	39
Abbildung 9: Ergebnisse der Exomsequenzierung	41
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von 8-Oxoguanin	43

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Histologische Malignitätskriterien des Weiss Systems bei adrenokortikalen Neoplasien	5
Tabelle 2 Stadieneinteilung des Nebennierenrindenzinoms nach der ENSAT-Klassifikation.....	6
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 4 Geräte	13
Tabelle 5 Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	14
Tabelle 6 Verwendete Kits.....	15
Tabelle 7 Verwendete TaqMan Sonden	15
Tabelle 8 Verwendete Antikörper.....	16
Tabelle 9 Primärantikörper in der Immunhistochemie.....	24
Tabelle 10 STR-Analyse	31
Tabelle 11 Produktion von Steroidhormonen mit Stimulation durch Forskolin..	37
Tabelle 12 Produktion von Steroidhormonen in Primärkulturmedium	38

IV. Danksagung

Mein großer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. M. Kroiß. Ich bedanke mich dafür, die Möglichkeit zur Erstellung einer Doktorarbeit in dem spannenden Fachgebiet der endokrinen Onkologie erhalten zu haben. Weiter möchte ich mich bei ihm für die exzellente Betreuung, intensive Förderung und seine Vorbildfunktion bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine beiden Kollegen und engen Freunde Frau Dr. I. Weigand und Frau L. Landwehr, die mich immer fachlich und freundschaftlich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützten.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. M. Faßnacht und Herrn Prof. M. Reincke für ihren herausragenden Führungsstil und stete Motivation, die sie mir gaben.

Abschließend möchte ich bei meinen Eltern für deren bedingungslose Beistand bei all meinen Vorhaben bedanken.