

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie

Leiter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott

Griseofulvin inhibiert das Wachstum der
Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie NCI-H295R
in vitro

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Eva Louise Bramann
2018

Ich möchte diese Arbeit vor allem Frau Ruth Heyng und meinem Großvater, Heinrich Otto Bramann, widmen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bramann, E. L., Willenberg, H. S., Hildebrandt, B., Müller-Mattheis, V., Schott, M., Scherbaum, W. A., Haase, M., 2013, Griseofulvin inhibits the growth of adrenocortical cancer cells in vitro, *Hormone and Metabolic Research*, (45) 297-300.

Abstract

Adrenocortical cancer is a rare, malignant tumor with a poor prognosis. It is often associated with atypical mitoses and supernumerary spindles.

Atypical mitoses represent a risk to cancer cells as they can lead up to a division into more than two cells and unevenly distributed chromosomes. This may result in non-viable daughter cells. Atypical mitoses can be caused by centrosomal clustering. Centrosomal clustering is a mechanism used by cancer cells with supernumerary centrosomes to solve the threatening problem of multipolar spindles.

Griseofulvin is an antifungal substance that interferes with the microtubule apparatus and inhibits centrosomal clustering. It has also been demonstrated that griseofulvin inhibits the growth of tumor cells in vitro and in vivo. However, it is not yet known whether treatment with griseofulvin inhibits growth of adrenocortical tumor cells.

We studied the viability and antiproliferative effects of griseofulvin on cultured NCI-H295R adrenocortical carcinoma cells using Wst-1-, BrdUrd- and [3H]-thymidine assays. For the detection of apoptosis we used a caspase 3/7 cleavage assay and light microscopy techniques. We observed that incubation with griseofulvin for 24 – 48 h leads to a decrease in the viability and proliferation of NCI-H295R cells in a dose-dependent manner. Significant effects could be observed after incubation with griseofulvin as measured by Wst-1-, BrdUrd-, and [3H] dT- uptake assays. Apoptosis of NCI-H295R cells was increased in a dose-dependent manner up to 4.5-fold after incubation with griseofulvin 40 M for 24 h as shown by caspase 3/7 cleavage assay and light microscopy.

With regard to new treatment strategies for adrenocortical cancer, griseofulvin, and possibly other agents, which interfere with the microtubule apparatus and inhibit centrosomal clustering, may turn out to be interesting targets for further research.

Zusammenfassung

Das Adrenokortikale Karzinom (ACC) ist ein seltener, maligner endokriner Tumor mit einer schlechten Prognose. Histopathologisch finden sich im Adrenokortikalen Karzinom häufig atypische Mitosen mit erhöhter Spindelanzahl.

Diese atypischen Mitosen stellen ein Risiko für Krebszellen dar, da sie zu einer Teilung in mehr als zwei Zellen führen und Chromosomen ungleichmäßig verteilt werden. Dies kann in nicht lebensfähigen Tochterzellen resultieren. Atypische Mitosen können durch eine zentrosomale Amplifikation verursacht sein. Das Zentrosomale Clustering ist ein Mechanismus, den eine betroffene Tumorzelle entwickeln kann, um überzählige Zentrosomen zu zwei Spindelpolen zusammen zufassen und so ihre genetische Integrität zu schützen.

Griseofulvin – ein bereits bekanntes Antimykotikum – blockiert diesen Mechanismus. Ob Griseofulvin wachstumshemmend auf adrenokortikalen Zellen wirkt, ist bislang nicht bekannt.

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Effekte von Griseofulvin in der ACC-Zelllinie NCI-H295R hinsichtlich von Wachstums- und Stoffwechseleigenschaften mittels Water-soluble-tetrazoliumsolt-1-Assay (Wst-1-Assay), Bromdesoxyuridin-Assay (BrdUrd-Assay) und [³H]-Thymidin Assay. Die Apoptoserate wurde durch einen Caspase 3/7-Assay und Lichtmikroskopie bestimmt. Nach 24 h Inkubation mit Griseofulvin konnte eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation auf bis zu 57 %, sowie eine Reduktion der Stoffwechselaktivität auf bis zu 69 % im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Lichtmikroskopisch ergab sich das typische Bild apoptotischer Zellen. Im Caspase-Assay konnte eine dosisabhängige Steigerung der Caspase-Aktivität um 425 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

In der Zusammenschau stellen Griseofulvin oder seine Derivate einen interessanten Ansatz für die Therapieforschung beim ACC dar.

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Adrenokortikales Karzinom, Nebennierenrindenzarzinom
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
BrdUrd	Bromdesoxyuridin
CDK 1	Cyclin abhängige Kinase 1
CDK 2	Cyclin abhängige Kinase 2
CIN	Chromosomale Instabilität
CT	Computertomografie
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
IGF	Insulin Growth Factor
FDG	Fluordesoxyglukose
MEN Typ 1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1
M-Phase	Mitose-Phase
MRT	Magnetresonanztomografie
MTOC	Mikrotubuli organisierenden Zentren der Zellen
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
PCM	Perizentrioläre Matrix
PDGFR-R	Platelet Derived Growth Factor Receptor
SAC	Spindle Assembly Checkpoints
SF1	Steroidogenic Factor 1
S-Phase	Synthese-Phase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WST	water soluble tetrazolium salt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Das Zentrosom und das Zentrosomale Clustering	8
1.1.1 Das Zentrosom	8
1.1.2 Das Zentrosom und der Zellzyklus	10
1.1.3 Die Zentrosomale Amplifikation	12
1.1.4 Das Zentrosomale Clustering	13
1.2. Das Nebennierenkarzinom	16
1.2.1 Allgemein	16
1.2.2 Bildgebung	18
1.2.3 Histologie und Stadieneinteilung	21
1.3. Therapie	25
1.4. Griseofulvin	26
1.5. Die NCI-H295-R-Zelllinie	30
2. Ziele der Arbeit	33
3. Publizierte Originalarbeit	34
4. Diskussion	38
5. Schlussfolgerung	45
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	46
7. Danksagung	58

1. Einleitung

1.1 Das Zentrosom und das Zentrosomale Clustering

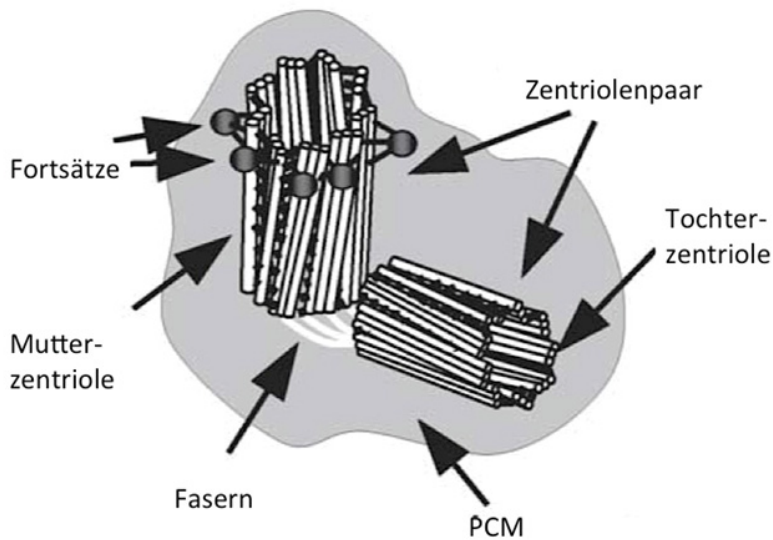
Vor Kurzem konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass das Antimykotikum Griseofulvin einen Tumormechanismus verhindert, welcher trotz überzähliger Zentrosomen eine erfolgreiche Proliferation ermöglicht: Das Zentrosomale Clustering (Quintyne *et al.*, Science, 2005; Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007; Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011).

1.1.1. Das Zentrosom

Bereits in den 1880er Jahren beschrieb Theodor Boveri erstmals kleine, subzelluläre Organellen mit einem Volumen von 1 - 2 μm^3 . Aufgrund ihrer Lage in der Nähe der Zellmitte und des Zellkerns nannte er diese Zentrosom (Doxsey, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001; Krämer *et al.*, Leukemia, 2002; Bettencourt-Dias *et al.*, BMC Biology, 2013; Debec *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2010). Es handelte sich um die tragenden Mikrotubuli-organisierenden Zentren der Zellen (MTOC) (Anderhub *et al.*, Cancer Letters, 2012; E. B. Wilson, Cell in Development And Heredity, 1925; Doxsey, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001; Ogden *et al.*, Cell Death and Differentiation, 2012). Ihr Aufgabenbereich umfasst die Regulation der Zellmotilität, der Zelladhäsion, der Zellkommunikation und der Zellpolarität, sowie den intrazellulären Vesikeltransport (Bettencourt-Dias, BMC Biology, 2013). Insbesondere ist das Zentrosom jedoch für die Bildung eines bipolaren Spindelapparats während der Zellteilung mitverantwortlich (Debec *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2010; Hinchcliffe *et al.*, Genes and Development, 2001). Dies ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche, gleichmäßige

Duplikation bestimmter, vor allem tierischer Zellen (Debec *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2010; Bettencourt-Dias, BMC Biology, 2013; Chen *et al.*, Developmental Cell, 2014).

Abbildung 1, Darstellung des Zentrosoms



Diese Skizze eines Zentrosoms zeigt die rechtwinklig zueinander angeordnete Mutter- und Tochterzentriole, umgeben von perizentriolärer Matrix (PCM). Nach Fukasawa, Cancer Letters, 2005.

In den meisten Zellen von Säugetieren liegt, außer zum Zeitpunkt der Zellteilung, nur ein Zentrosom vor. Dieses besteht aus zwei rechtwinklig zueinander angeordneten zylinderförmigen Zentriolen und ist in einer elektronendichten, amorphen perizentriolären Matrix (PCM) eingebettet (Nigg *et al.*, Nature Cell Biology, 2011). Die PCM enthält notwendige Proteine zur Mikrotubulushaftung und Zellbildung wie zum Beispiel gamma-Tubulin, Calcium sensitive Fasern, Sfi1p und Perizentrin (Doxsey *et al.*, Cell, 1994; Chan, International Journal of Biological Sciences, 2011; Salisbury, Current Biology, 2004).

Zentriolen bestehen aus neun hohlzylinderartig angeordneten Mikrotubulitripletts, welche Tubulin-Isoformen und Strukturproteine enthalten (Debec *et al.*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2010;

Bettencourt-Dias *et al.*, Nature reviews Molecular Cell Biology, 2007). Diese neun Mikrotubulitriplets sind radähnlich über durch Proteine gebildete Speichen miteinander verbunden (Carvalho-Santos *et al.*, The Journal of Cell Biology, 2011; Jordan *et al.*, Nature reviews Cancer, 2004).

1.1.2 Das Zentrosom und der Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus Interphase und Mitose-Phase (M-Phase), wobei letztere die Ereignisse der Mitose und Zytokinese einschließt. Die Interphase umfasst die Gap-1-Phase, das Zwischenspiel zwischen abgeschlossener M-Phase und Synthese-Phase (S-Phase), die S-Phase selbst (in welcher die DNA-Replikation stattfindet) und die Gap-2-Phase (Zeitabschnitt zwischen abgeschlossener Duplikation und dem Beginn der Kernteilung) (Avidor-Reiss *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 2013).

Der gleichzeitig intrazellulär stattfindende zentrosomale Zyklus, also die Duplikation der Zentriole, ist streng reguliert, in fünf Phasen unterteilt und auf den Chromosomen-Duplikationszyklus abgestimmt:

Zu Beginn des Zellzyklus (Gap-1-Phase) besteht das Zentrosom noch aus zwei Zentriolen, die über sogenannte Linkerproteine miteinander verbunden sind (Bahe *et al.*, Journal of Cell Biology, 2005; Graser *et al.*, Journal of Cell Science, 2007). Während des Übergangs der Gap-1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus entfernen sich die Zentriolen voneinander (Nigg, International Journal of Cancer, 2006). In der S-Phase entsteht am proximalen Zentriolenende jeweils eine neue, Prozentriole genannte Zentriole. Der genaue Verdopplungsprozess ist noch unklar. Insgesamt ist er jedoch semikonservativ. Dies bedeutet, dass die Hälfte einer Mutterzentriole als Matrize für die Tochterzentriole dient (Nigg, Nature reviews Cancer, 2002; Chen *et al.*, Developmental Cell, 2014). Die Prozentriole reift nachfolgend in der Elongationsphase zur Tochterzentriole heran. Nachfolgend liegen in der Zelle zwei funktionsfähige Zentrosome,

bestehend aus festverbundenen Mutter- und Tochterzentriolen vor (Nigg, Trends in Cell Biology, 2007). In der Gap-2-Phase wird der Linker zwischen den zwei Mutterzentriolen durch Phosphorylierung und Kinase-Proteine durchtrennt (Separation) (Nigg, International Journal of Cancer, 2006). Gleichzeitig vergrößert sich die PCM. Diese Reifung scheint wichtig für die Ausbildung der mitotischen Spindel zu sein (Barr *et al.*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004; Zyss *et al.*, Trends in Cell Biology, 2009). Die zwei nun vorliegenden Zentrosome entwickeln während der nachfolgenden Mitose je einen entgegengesetzten Spindelpol. Damit sorgen sie für eine gleichmäßige Segregation der Chromatiden in die jetzt entstehenden Tochterzellen über eine Anheftung an Kinetochore (Raab *et al.*, Cancer Research, 2012; Doxsey, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001; Krämer *et al.*, Leukemia, 2002).

Abbildung 2, Darstellung des Zentrosomalen Zyklus

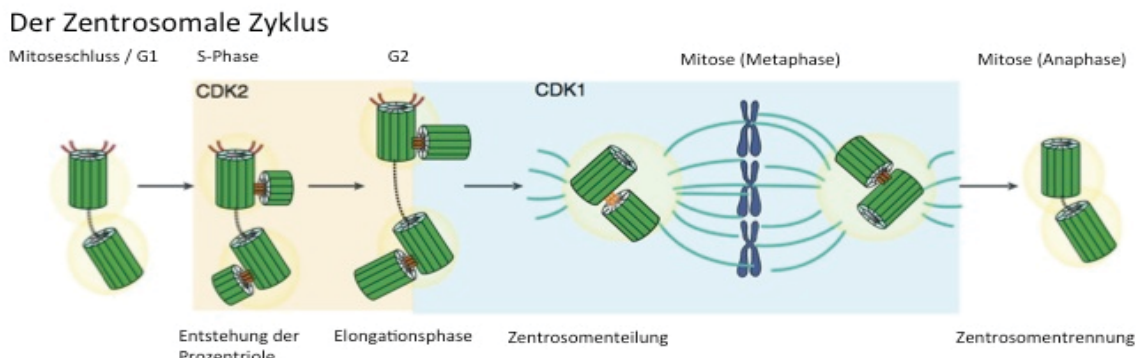


Abbildung 2 zeigt den zentrosomalen Ablauf in bildlicher Form. Man sieht die Entwicklung des initial über ein Linker-Protein verbundenen, aus zwei Zentriolen bestehenden Zentrosoms über die verschiedenen Zyklusphasen bis zur Verdopplung (Abbildung mit Genehmigung abgewandelt aus Bettencourt-Dias, BMC Biology, 2013; Abkürzungen: CDK 1= Cyclin abhängige Kinase 1, CDK 2 = Cyclin abhängige Kinase 2, beides Proteinkinasen, die den Zellzyklus regulieren).

Dieser Verdopplungsprozess unterliegt ähnlichen Kontrollmechanismen wie die RNA-Replikation (Anderhub *et al.*, Cancer Letters, 2012). Grundsätzlich zu nennen sind hier die zeitliche Koordinierung

über die sogenannten Checkpoints mit ihren entsprechenden Signalmechanismen (Gap-1/S-, Gap-2/M-, Metaphase/Anaphase-Checkpoint (auch Spindle-Assembly-Checkpoint)) und die Cyclin-abhängigen Kinasen. Wichtig ist außerdem die räumliche Restriktion dieser Prozesse auf unterschiedliche subzelluläre Kompartimente. Hier spielen die Zentrosomen als Strukturgeber eine große Rolle (Takizawa *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 2000).

1.1.3 Die zentrosomale Amplifikation

Die Amplifikation von Zentrosomen ist ein häufiges und spezifisches Merkmal von Krebszellen (Castiel *et al.*, Journal of Visualized Experiments, 2013) und findet sich nur selten in normalen Zellen (Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011; Raab *et al.*, Cancer Research, 2012; Pawar *et al.*, Journal of Ovarian Research, 2014). Sie geht mit genetischer und chromosomaler Instabilität einher (Kwon *et al.*, Genes & Development, 2008; Pihan *et al.*, Cancer Research, 1998; Krämer *et al.*, Leukemia, 2011; Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009). Außerdem gibt es in aus Tumorzellen gewonnenen Zelllinien, Mausmodellen und im Menschen einen starken Zusammenhang zwischen überzähligen Zentrosomen, Chromosomenaberrationen und Tumoraggressivität (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009). Die zentrosomale Amplifikation ist einerseits mit Aneuploidie und typischen Merkmalen maligne transformierter Zellen vergesellschaftet. Andererseits gefährdet sie das Wachstum von teilungsfähigen Tumorzellen. Häufig entstehen nicht überlebensfähige Tochterzellen aus den resultierenden multipolaren Mitosen (Kwon *et al.*, Genes & Development, 2008; Krämer *et al.*, Leukemia, 2002). Es wird vermutet, dass eine hohe chromosomale Instabilität (CIN) und multipolaren Mitosen mit einer besseren Prognose für den Patienten assoziiert sind, als eine mittlere CIN und weniger multipolare Mitosen. Die zentrosomale Amplifikation scheint also

schädlich für das Tumorwachstum zu sein (Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011; Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009).

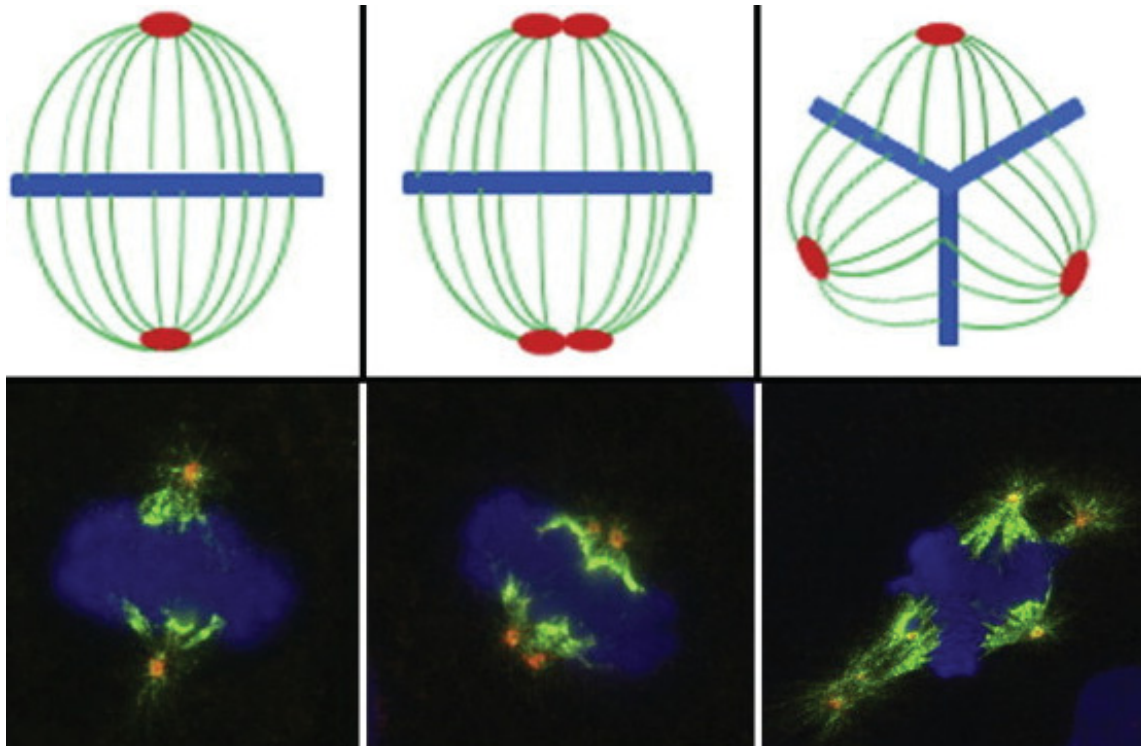
Es gibt viele Entstehungsmechanismen für die oben genannte Amplifikation von Zentrosomen, zum Beispiel Zellfusion, zentrosomale Mehrfachduplikation, sowie *de novo*-Synthese von Zentrosomen. Jedoch ist die Häufigkeit und Bedeutung der einzelnen Entstehungsmechanismen in menschlichen Tumorzellen noch weitestgehend unerforscht (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009; Anderhub *et al.*, Cancer Letters, 2012; Ganem *et al.*, Nature, 2009; Ogden *et al.*, Cell Death & Differentiation, 2012).

1.1.4 Das Zentrosomale Clustering

Das Zentrosomale Clustering beschreibt die Bündelung überzähliger Zentrosome zu je zwei Spindelpolen. Diesen Mechanismus entwickeln manche betroffene Zellen um multipolare Mitosen (und das damit verbundene Risiko für eine reduzierte Lebensfähigkeit der Tochterzellen) zu verringern (Krämer *et al.*, Leukemia, 2011; Raab *et al.*, Cancer Research, 2012; Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007; Quintye *et al.*, Science, 2005).

Die Bündelung überzähliger Zentralkörperchen involviert viele zelluläre Systeme (Krämer *et al.*, Leukemia, 2011). Trotz der wahrscheinlich großen Bedeutung des Zellmechanismus in der Tumorentstehung sind die einzelnen Prozesse und Details des Zentrosomalen Clusterings noch nicht ausreichend erforscht und verstanden (Chen *et al.*, Developmental Cell, 2014).

Abbildung 3, Darstellung des Zentrosomalen Clusterings



Die oben gezeigte Darstellung des Zentrosomalen Clusterings beschreibt den Effekt des Zellmechanismus in der oberen Reihe in graphischer, unten in zellmikroskopischer Form. Das linke Bild zeigt eine normale bipolare Mitosespindel. Im rechten Bildteil sieht man dagegen eine multipolare Spindel mit mehreren Zentrosomen. Es fällt leicht, sich vorzustellen, dass die entstehenden Tochterzellen durch die ungleichmäßige und vielleicht unzureichende Verteilung von Chromosomen möglicherweise nicht lebensfähig sind. Das mittlere Bild zeigt dagegen eine aus mehreren Zentrosomen bestehende bipolare Spindel: Das Ergebnis des Zentrosomalen Clusterings.

(Abbildung mit Genehmigung von Prof. A. Krämer aus Krämer *et al.*, Leukemia, 2011)

Um die überzähligen Zentrosome zu bündeln, müssen räumliche Distanzen verringert und die zeitliche Voraussetzung im Zellzyklus geschaffen werden. Prinzipiell handelt es sich um eine Kombination von Mitosespindel assoziierten und Mikrotubuli bindenden Kräften, sowie von Aktin regulierenden Kräften des Zellkortex (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009). Verschiedene Studien zeigen, dass überzählige

Zentrosome in einigen Zelltypen über die Aktivierung des Spindelkontrollproteins MAD2 und die dadurch initiierte Aktivierung des *Spindle Assembly Checkpoints* (SAC) eine Verzögerung der Anaphase auslösen. Dies geschieht via nicht regelhafter oder ordnungsgemäßer Befestigung der Kinetochore am Spindelapparat. In der dadurch zusätzlich zur Verfügung stehenden Zeit kann nun der Mehraufwand des Zentrosomenbündelns geleistet werden. Diese Verzögerung scheint eine notwendige Voraussetzung für das Zentrosomale Clustering zu sein (Krämer *et al.*, Leukemia, 2011; Basto *et al.*, Cell, 2008; Kwon *et al.*, Genes & Development, 2008; Ogden *et al.*, Nature, 2012). Gleichzeitig ist sie aber unter anderem auch für die in der histopathologischen Einschätzung von malignen Tumoren oft beschriebenen erhöhten Mitoseindex von Tumorzellen verantwortlich. Es befinden sich durch die längere Mitosephase mehr Zellen zum gleichen Zeitpunkt in der Verdopplung (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009; Gergely *et al.*, Genes & Development, 2008).

Das zentrosomale Clustering ist möglicherweise vor allem ein Zusammenspiel zwischen Mikrotubulus (MT) basierten Motorproteinen und Mikrotubulus-Bindungs-Proteinen, die für die Spindelpolbildung verantwortlich sind (Hinchcliffe *et al.*, Genes & Development, 2001; Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007).

Wichtig scheinen zunächst MT-basierte Motorproteine wie zum Beispiel Dynein, ein nach dem Minus-Ende ausgerichteter Motor, zu sein. Dieser ist eigentlich vor allem aus dem azentrosomalen, meiotischen Zellspindelapparat bekannt, gewinnt jedoch in Zellen mit überzähligen Zentrosomen erneut an Relevanz (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009; Doxsey, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001). Außerdem von Bedeutung ist das Aktin enthaltende Zytoskelett. In seiner das Zellgeschehen entscheidend beeinflussenden Rolle kann es über vier

verschiedene Wege multipolare Spindelpole unterbinden: Zunächst über die Zellform, dann über die Kontrolle der Zellhülleneigenschaften wie Rigidität und Kontraktilität, über seine Rolle in der Zelladhäsion und *retraction fibers*, sowie letztlich über die direkte Beteiligung in der Organisation des Spindelapparates und der Zentrosomen (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009; Kwon *et al.*, Genes & Development, 2008). Zusammen schaffen sie die räumlichen Rahmen und Möglichkeiten, die die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Mitose und für das Zentrosomale Clustering stellen (Godinho *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 2009).

1.2. Das Nebennierenrindenzarzinom

Das Nebennierenrindenzarzinom (ACC) ist ein seltener, bösartiger und aggressiver Tumor mit einer schlechten Prognose, trotz teils etablierter Therapieverfahren wie Operation, Pharmakotherapie und Strahlentherapie (L. S. Kirschner, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006; Libè *et al.*, Endocrine-related Cancer, 2007; Schteingart *et al.*, Endocrine-related Cancer, 2005; M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013; Else *et al.*, Endocrine Reviews, 2014; Erickson *et al.*, Advances in Anatomic Pathology, 2014).

1.2.1. Allgemein

Die Inzidenz liegt bei 0,5 bis 2 Erkrankten pro Jahr pro 1 Million Einwohner, das ACC ist für 0,02 - 0,2 % aller Krebstode verantwortlich (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013; Brennan, CA: A Cancer journal for Clinicians, 1987; Erickson *et al.*, Advances in Anatomic Pathology, 2014). Es kann in jedem Lebensalter auftreten. Es gibt jedoch einen Altersgipfel zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Außerdem scheinen Frauen insgesamt häufiger

betroffen zu sein. Sie machen etwa 55 - 60 % der Erkrankten aus (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013). Besonders zu erwähnen ist, dass in Südbrasilien 2,9 bis 4,2 Kinder pro Millionen pro Jahr erkranken. Im weltweiten Vergleich dazu erkranken nur 0,2 - 0,3 pro Millionen Kinder pro Jahr. Zugrunde liegt wahrscheinlich das hohe lokale Vorkommen von p.R337H-Allel-Varianten von TP53 (Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014). Ob es eine bimodale Häufigkeitsverteilung mit einem weiteren Altersgipfel im Kindesalter gibt, ist nicht abschließend geklärt (Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014). Auch nach radikaler Operation entwickelt die Mehrzahl der Patienten innerhalb von 6 - 24 Monaten Metastasen (Ozcan Kara *et al.*, *Nuclear Medicine Communications*, 2011). Die Überlebenswahrscheinlichkeit verringert sich je nach Tumorstadium von über 10 Jahren im frühen Stadium auf bis zu weniger als sechs Monate im fortgeschrittenen Stadium (Halperin *et al.*, *BMC Biology*, 2014).

Häufig sind die Tumore bei Erstdiagnose bereits sehr groß und etwa 30 - 50 % aller Patienten haben bei Diagnosestellung Metastasen (L. S. Kirschner, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006; Ng & Libertino, *The Journal of Urology*, 2003; Zini *et al.*, *European Urology*, 2011). Durch die fortgeschrittene Tumorgroße finden sich oft unspezifische Beschwerden im Rahmen der Verdrängungs- oder Infiltrationssymptomatik. Patienten leiden zum Beispiel unter unklarem abdominellen Druck oder Rückenschmerzen als führendes Symptom (Zini *et al.*, *European Urology*, 2011; Dworakowska *et al.*, *Endokrynologia Polska*, 2014).

Bis zu 70 % der ACC produzieren übermäßig Hormone, hiervon 30 % isoliert Glukokortikosteroide (Berruti *et al.*, *European Journal of Endocrinology*, 2014; Dworakowska *et al.*, *Endokrynologia Polska*, 2014). Jedoch präsentiert nur ein Teil der Patienten eindeutig hormonbedingte

Symptome (Libè, Endocrine-related Cancer, 2015). Im Rahmen der Abklärung wird eine ausführliche präoperative Labordiagnostik zur Analyse eines möglichen Hormonexzesses empfohlen, nicht zuletzt um postoperative Komplikationen wie zum Beispiel eine Addison-Krise zu verhindern (Libè, Endocrine-related Cancer, 2015). Empfohlen wird hier eine extensive Untersuchung: Unter anderem ein Dexamethason-Hemmtest, die Analyse des freien Kortisol im 24 h-Sammelurin, sowie die Bestimmung der adrenalen Androgene und der Mineralokortikoide. Auch der differentialdiagnostische Ausschluss eines Phäochromozytoms ist anzuraten (Stigliano *et al.*, Journal of Endocrinological Investigation, 2015). Da gezeigt werden konnte, dass durch ACC typischerweise auch intermediäre Steroide produziert werden, wird außerdem noch zu einer Urinsteroidprofilanalyse geraten (Arlt *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011; Libè, Endocrine-related Cancer, 2015).

1.2.2 Bildgebung

Durch die verbesserte und heutzutage insgesamt häufiger durchgeführte abdominelle Bildgebung kommt es wiederholt auch zur nebenbefundlichen Detektion eines Inzidentaloms (Gruschwitz, World Journal of Urology, 2010). Zur weiteren diagnostischen Abklärung eignen sich sowohl die Computertomografie (CT), als auch die Magnetresonanztomografie (MRT) (Allolio *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006; Else *et al.*, Endocrine Reviews, 2014; Zini *et al.*, European Urology, 2011). Während die klassischen radiologischen Karzinomeigenschaften wie zum Beispiel Inhomogenität von Geweben vor allem bei größeren Tumoren zu finden sind, können Karzinome im Frühstadium bzw. von kleinerem Ausmaß in einigen Fällen nur schwer von gutartigen Läsionen unterschieden werden (Gruschwitz, World Journal of Urology, 2010).

Neben der Größenbestimmung ist die Bestimmung der Dichte des Gewebes in Form der in der CT-Diagnostik üblichen Hounsfield Units (HU) von besonderer Bedeutung. Ein Wert von bis zu 10 HU in der nativen CT weist mit einer Sensitivität von 71 % und Spezifität von 98 % auf eine benigne Struktur hin. Ein Wert über 10 HU ist als zumindest verdächtig einzustufen (Zini *et al.*, European Urology, 2011). Maligne Tumoren zeigen meist Dichtewerte > 30 HU. Bisher wurde in der Literatur von keinem ACC berichtet, welches eine Dichte von unter 13 HU aufwies, was insgesamt für einen niedrigen Fettgehalt der Tumore spricht (Zini *et al.*, European Urology, 2011; M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013). Jedoch haben 29 % der gefundenen Inzidentalome eine Dichte von > 10 HU in der nativen CT-Untersuchung, was die genaue diagnostische Einordnung erschweren kann (Haider *et al.*, Radiology, 2004). Mit einem Kontrastmittel-CT mit verschiedenen Kontrastmittelphasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten können über die Analyse der Kontrastmitteldynamik lipidreiche und lipidarme, also eher Malignom verdächtige Strukturen unterschieden werden (Kebapci *et al.*, Abdominal Imaging, 2003; Stigliano *et al.*, Journal of Endocrinological Investigation, 2015; Szolar *et al.*, Radiology, 2005). Die Sensitivität und Spezifität dieses CT-Verfahrens liegt bei 100 % und respektive 98 % (Park *et al.*, Radiology, 2007). Jedoch ist dieses Verfahren noch stärker als das native CT mit einer Strahlenbelastung und einem erheblichen radiologischen Aufwand verbunden (Park *et al.*, Radiology, 2007). Bei der MRT steht vor allem die Gadolinium-Kontrastmitteluntersuchung, unter anderem durch die besonders gute Darstellung von Gefäßeinbrüchen, im Vordergrund (Zini *et al.*, European Urology, 2011). Nach Kontrastmittelgabe kommt es insbesondere in der Peripherie der ACC zu einem inhomogenen Enhancement. Bei unklaren, gerade auch kleineren Läsionen, kommt in der MRT-Bildgebung der „Chemical-Shift-Technik“ eine besondere Bedeutung zu. Mit ihrer Hilfe kann das bei Adenomen typische

intrazelluläre Fett über die Ausnutzung der unterschiedlichen Resonanzeigenschaften von Wasser und Fett sichtbar gemacht werden (Stigliano *et al.*, Journal of Endocrinological Investigation, 2015). Insgesamt bietet die MRT keinen signifikanten diagnostischen Vorteil gegenüber dem CT. Die MRT-Untersuchung ist im Vergleich mit komplexen dynamischen CT-Untersuchungen einfacher und prinzipiell ohne Strahlenbelastung für den Patienten (Park *et al.*, Radiology, 2007). Die in der Onkologie weit verbreitete Positronen-Emissions-Tomografie mit F-18 Fluordesoxyglukose (FDG), bei der Tumore durch die erhöhte Aufnahme von der radioaktiv markierten Glukose gekennzeichnet werden, kann gemeinsam mit der CT mit einer Sensitivität von 74 - 100 % und einer Spezifität von 66 - 100 % ein Karzinom erkennen (Stigliano *et al.*, Journal of Endocrinological Investigation, 2015).

Die Größe des Tumors bei zufällig entdeckten Raumforderungen der Nebenniere ist von hoher klinischer Bedeutung, da neben den bildmorphologischen Charakteristika (Dichtewerte der Läsion und Auswaschverhalten von Kontrastmittel) die Tumorgöße hinweisend auf die Dignität der Raumforderung ist (Allolio *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006; Else *et al.*, Endocrine Reviews, 2014). Die übliche Tumorgöße bei Diagnosestellung beträgt beim ACC 10 - 11,5 cm (Spannweite: 2 - 40 cm). Die meisten gutartigen Läsionen liegen bei < 4 cm (Allolio *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006; Zini *et al.*, European Urology, 2011). Vor dem beschriebenen Hintergrund wird empfohlen, jede Läsion über 6 cm unabhängig von der hormonellen Aktivität und der Bildmorphologie operativ zu entfernen. Kleinere Befunde im Graubereich zwischen 4 - 6 cm werden bei suspekter Bildmorphologie exzidiert und sollten, sofern nicht behandelt, zumindest im Verlauf kontrolliert werden (Allolio *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006).

1.2.3 Histologie und Stadieneinteilung

Die postoperative histopathologische Untersuchung basiert in der Regel auf dem Weiss-Score, dem bekanntesten und etabliertesten Diagnosescore (Libè, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015; Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014).

Der Weiss-Score umfasst folgende Kriterien:

- Kernatypien
- Atypische Mitosespindeln
- Mitoserate > % in 50 in *High-Power-Fields*
- Zytoplasmaeigenschaften (< 25 % klare Zellen)
- Tumorzellarchitektur (diffuse Veränderungen in $\geq 1/3$)
- Invasion der venösen Gefäße
- Invasion der sinusuidalen Strukturen
- Invasion der Tumorkapsel
- Tumornekrosen

Diese werden graduiert und zu einem Score addiert, der nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle ($> = 3$ Punkte) zur Klassifikation eines malignen Tumors führt (Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014). Der wichtigste Dignitätsfaktor ist die Invasion angrenzender Strukturen. In Einzelfällen kann dies sogar die Ausdehnung in die Hohlvene und Beteiligung des rechten Herzens bedeuten (Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014).

Das ACC kann jeden Differenzierungsgrad von hoch differenziert bis sehr niedrig differenziert aufweisen. Die histopathologische Aufarbeitung ist schwierig (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; S. K. Lau *et al.*, *Human Pathology*, 2009). Hier können möglicherweise neue Marker, wie zum Beispiel das miR-483, zur

sicheren Diagnosefindung beitragen (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; Erickson *et al.*, *Advances in Anatomic Pathology*, 2014; Papotti *et al.*, *Hormones & Cancer*, 2011).

Einige Studien konnten zeigen, dass die immunhistochemischen Marker Ki67 und Topoisomerase 2 alpha zur Bestimmung der Proliferationsaktivität und konsekutiv zur Unterscheidung von gutartigen und bösartigen Läsion beim ACC beitragen können (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; Erickson *et al.*, *Advances in Anatomic Pathology*, 2014; Papotti *et al.*, *Hormones & Cancer*, 2011).

Eine einheitliche Klassifikation und Staging des ACC war wie bei vielen seltenen Tumorerkrankungen schwierig zu etablieren und zu validieren. 2003 hat die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) erstmals einen Vorschlag im Rahmen des bekannten TNM-Systems gemacht. Dabei zeigte sich, dass die UICC-Klassifikation erhebliche Schwächen mit zum Teil nicht zutreffenden Prognoseeinschätzungen aufwies, sodass Fassnacht und Kollegen einen entsprechenden Verbesserungsvorschlag für die Tumorstadieneinteilung erarbeiteten: Die sogenannten ENSAT-Kriterien (European Network for the Study of Adrenal Tumors, siehe Tabelle unten) (P. Fassnacht *et al.*, *Der Pathologe*, 2010; Dworakowska *et al.*, *Endokrynologia polska*, 2014).

Tabelle 1, Tumorstadieneinteilungen für das ACC

Stadium	UICC/WHO 2004	ENSAT 2008
I	T1 N0 M0	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0	T2 N0 M0
III	T1-2 N1 M0 / T3 N0 M0	T1-2 N1 M0 / T3-4 N0-1 M0
IV	T1-4 N0-1 M1/T3 N1 M0 / T4 N0-1 M0	T1-4 N0-1 M1

T1 = Tumor ≤ 5 cm; T2 = Tumor > 5 cm; T3 = Tumordinfiltration in Nachbarorgane; T4 = Invasion in Nachbarorgane, N0 = Keine positiven Lymphknoten; N1 = positive Lymphknoten, M0 = Keine Fernmetastasen; M1 = Fernmetastasen vorhanden (ENSAT:

auch bei Tumorthrombus in V. cava oder V. renalis). Aus P. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2010.

Die Prognose hängt vor allem vom Stadium der Tumorerkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. In einer Europäischen Studie lag das 5-Jahres-Überleben bei Stadium I bei 60 %, Stadium II 58 %, 24 % für Stadium III und bei Stadium IV lag die Überlebensdauer bei weniger als einem Jahr (Abiven *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013; Ayala-Ramirez *et al.*, European Journal of Endocrinology, 2013; Fay *et al.*, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2014).

Durch die Entwicklung neuer histologischer Bewertungskriterien, wie z.B. dem Helsinki Score, könnte die Wahrscheinlichkeit eine entdeckte Läsion in ihrem Schweregrad richtig einzuschätzen weiter verbessert werden um somit bestenfalls früher eine adäquate Therapie einzuleiten (Pennanen *et al.*, Human Pathology, 2015). Zwei größere Studien konnten zeigen, dass der Proliferationsmarker Ki-67 der wichtigste Prognosefaktor sowohl des noch lokal begrenzten, als auch des bereits metastasierten ACCs ist. Seine Bestimmung gewinnt zunehmend an Bedeutung (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013; Kerkhofs *et al.*, Endocrine-Related Cancer, 2015). Eine signifikant erhöhte Expression von Ki-67 korreliert mit einer schlechteren Prognose und kann so helfen, frühzeitig Patienten mit einem gegebenenfalls aggressiveren Therapiebedarf zu identifizieren (Dworakowska *et al.*, Endokrynologia polska, 2014; Babinska, Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 2008).

Die meisten ACC treten sporadisch auf, jedoch wird ein gehäuftes Auftreten beim Li-Fraumeni- sowie Beckwith-Wiedemann-Syndrom und bei der MEN 1 beobachtet (Halperin *et al.*, BMC Cancer, 2014; Dworakowska *et al.*, Endokrynologia polska, 2014).

Die Entstehungsmechanismen des ACCs sind noch weitestgehend unklar. Bekannt ist, dass die konstitutive Aktivierung des *wnt/beta-catenin pathway*, die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 und die Überexpression des *insulin-like growth factor-2* (IGF) häufig veränderte Eigenschaften des ACC darstellen. Studien zeigen jedoch, dass diese Veränderung allein nicht zur Entartung ausreichen (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; Erickson *et al.*, *Advances in Anatomic Pathology*, 2014; Bielinska *et al.*, *Veterinary Pathology*, 2009; Guillaud-Bataille *et al.*, *PLoS ONE*, 2014). In weiteren Studien konnten Mutationen des Tumorsuppressors TP53-Gens und des beta-Catenin-Gens (CTNNB1), sowohl in Adenomen als auch Karzinomen der Nebenniere, nachgewiesen werden (Juhlin *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2014). Aber auch neue, häufig veränderte Genloci wie z.B. Neurofibromin 2 (Merlin) oder des Telomerase Reverse Transkriptase-Gens wurden beschrieben (Assié *et al.*, *Nature Genetics*, 2014; Juhlin *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2014). Allerdings scheint eine beta-Catenin-Aktivierung mit einem schlechteren Gesamtüberleben einherzugehen, was es in Zukunft zu einem wichtigen klinischen Prognosefaktor machen könnte (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013). Ähnliche Bedeutung hat der *steroidogenic factor 1* (SF1). Er spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Nebenniere und wird häufig auch in adrenalen Tumoren deutlich übermäßig exprimiert (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013). Interessant ist hier, dass SF1 eventuell einen neuen Angriffspunkt in der Therapie des ACC darstellen könnte: Eine *in-vitro*-Studie konnte zeigen, dass SF1-inhibierende Substanzen Nebennierenzellen in ihrer Proliferation hemmen können (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013). Auch die Untersuchung der unterschiedlichen Genexpressionsmuster hat viel zum Verständnis des ACC beigetragen. Außerdem kann man mittlerweile Tumoruntergruppen

mit unterschiedlichen Prognoseprofilen identifizieren (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; Else *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2014).

1.3. Therapie

Die operative, möglichst vollständige Entfernung des ACC scheint der wichtigste Therapiebaustein zu sein. Ein nur teilweise resezierter Tumor resultiert in einer deutlich reduzierten Lebenserwartung (Fay *et al.*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014; Stigliano *et al.*, *Journal of Endocrinological Investigation*, 2015). Jedoch stellt auch das prä- und vor allem postoperative pharmakologische, wie gegebenenfalls radiologische Management, einen unverzichtbaren Teil einer erfolgreichen Therapie dar (M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; Stigliano *et al.*, *Journal of Endocrinological Investigation*, 2015). Nur sehr wenige Substanzen haben bisher zu eingeschränkten Therapieerfolgen führen können, darunter Platin basierte zytotoxische Chemotherapie, Streptozocin und Mitotane (Berruti *et al.*, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2008; Khan *et al.*, *Annals of Oncology*, 2000; M. Fassnacht *et al.*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013). Mitotane ist die einzige, spezifisch adrenotoxische Substanz und wurde bereits vor über fünfzig Jahren als Wirkstoff eingeführt, nachdem 1966 gezeigt werden konnte, dass Mitotane die Steroidkonzentration in Serum und Urin reduziert (Halperin *et al.*, *BMC Cancer*, 2014; Terzolo *et al.*, *New England Journal of Medicine*, 2014). Mitotane ist seit 2004 auch offiziell in Deutschland und Europa zur Therapie des ACCs zugelassen. Der genaue Wirkmechanismus von Mitotane ist weiterhin unbekannt und auch der interindividuelle Metabolismus ist sehr unterschiedlich, so dass die Dosis anhand des Konzentrationsspiegels im Blut anpasst wird (dieser sollte zwischen 14-20

mg/l liegen) (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013; Else *et al.*, Endocrine Reviews, 2014; Terzolo *et al.*, New England Journal of Medicine, 2014; Kerkhoff *et al.*, Therapeutic Drug Monitoring, 2015). Das derzeit etablierte Therapieregime bei fortgeschrittenem ACC ist die kombinierte Chemotherapie von Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin mit Mitotane (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013, FIRM-ACT trial). Die oben genannten Kombinationen unterscheiden sich bezüglich der Überlebensrate nicht deutlich. Jedoch war Letztgenannte im Vergleich im Bereich des progressionsfreien Überlebens überlegen. Außerdem zeigte sich eine erhöhte objektive Ansprechrates gegenüber der Therapie mit Streptozocin und Mitotane (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013).

Die meisten Patienten werden mit einer adjuvanten Therapie versorgt. Lediglich bei einem geringen Prozent der Erkrankungen im Rahmen einer „low risk“-Situation wird darauf verzichtet (M. Fassnacht *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013).

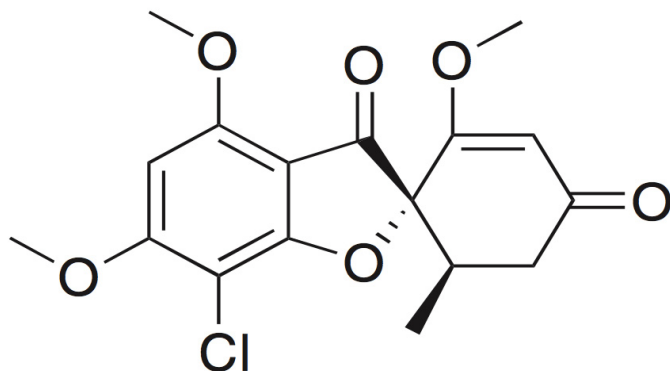
1.4. Griseofulvin

Manche bekannten und vielfach eingesetzten Chemotherapeutika greifen die Mitosespindel und/oder den Mikrotubulusapparat an, so z.B. Taxane und Vincaalkaloide (Hara *et al.*, Cancer Research, 2015; Vindya *et al.*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2015). Dieser sehr effektive Eingriff in die Zellproliferation ist jedoch nicht tumorzellspezifisch (Ohira *et al.*, Biochimica Et Biophysica Acta, 2015; Vindya *et al.*, Current Topics and Medicinal Chemistry, 2015). Man findet diese Form der Chemotherapeutika daher in vielen onkologischen Therapieregimen, zum Beispiel in der Therapie des Hodgkin-Lymphoms, des Mamma-Karzinoms,

des Magenkarzinoms und der akuten lymphatischen Leukämie (Godinho *et al.*, *Cancer and Metastasis Reviews*, 2009; Vindya *et al.*, *Current Topics and Medicinal Chemistry*, 2015; Stanton *et al.*, *Medical Research Reviews*, 2011). Jedoch werden auch gesunde Gewebe mit hoher Regenerationsrate, wie z.B. das Knochenmark oder der Gastrointestinaltrakt durch die Substanzen mit z.T. deutlichen Nebenwirkungen geschädigt. Während diese schnell proliferierenden Gewebe jedoch oft nur vorübergehend geschädigt werden, ist die Schädigung langsam proliferierender Gewebe häufig irreversibel. Dies resultiert z.B. in den Patienten dauerhaft stark einschränkenden Neuropathien oder Nephropathien (Godinho *et al.* *Cancer and Metastasis Reviews*, 2009; Ohira *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015). In Zukunft möchte man Chemotherapeutika entwickeln, die möglichst präzise auf Tumorzellen wirken, um noch effizienter und vor allem auch nebenwirkungsärmer zu behandeln. Auf der Suche nach solchen Substanzen werden vielfach auch natürliche, das heißt in der Natur bereits vorhandene Stoffe, auf ihre proliferationshemmenden Eigenschaften untersucht (Larsen *et al.*, *Natural Product Reports*, 2005; Newman *et al.*, *Natural Product Reports*, 2003).

Viele auch fungizid wirkende Wirkstoffe werden in der Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt. Einige davon wirken auf den Mikrotubulusapparat der Zellen, ähnlich wie Taxane und Vincaalkaloide (Jordan *et al.*, *Nature Reviews Cancer*, 2004). Auf der Suche nach entsprechenden Wirkstoffen wurde auch Griseofulvin als mögliches, gegen Tumorzellen wirkendes Medikament, „neu“ entdeckt (Rebacz *et al.*, *Cancer Research*, 2007).

Abbildung 4, Strukturformel von Griseofulvin



(Abbildung mit Genehmigung aus Raab *et al.*, Cancer Research, 2012)

Griseofulvin (C₁₇H₁₇ClO₆) ist ein bereits seit langer Zeit etablierter, weißer, geruchsloser Feststoff, der als Medikament in der Therapie dermatophytischer Infektionen eingesetzt wird (Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011; Liu *et al.*, Biochemical Pharmacology, 2015). Er wurde erstmals 1939 von Oxford *et al.* als gartenbaulich eingesetztes Fungizid für die Bekämpfung der Grauschimmelfäule entwickelt (De Carli *et al.*, Mutation Research, 1988). Es ist das metabolische Produkt von einigen Pinselschimmelarten, z.B. *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium janczewski* und *Penicillium patulum* (De Carli *et al.*, Mutation Research, 1988). Es ist wirksam gegen dermatophytische Pilze der Gattung *Microsporum*, *Trichophyton* und *Epidermophyton* (De Carli *et al.*, Mutation Research, 1988). Nach der von Gentles 1958 erfolgreich durchgeführten Behandlung von an *Microsporum canis* und *Trichophyton mantogrophytes* erkrankten Meerschweinchen wurde es für die Therapie am Menschen eingeführt (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988).

Es inhibiert die Mitose in darauf sensitiv reagierenden Pilzen (Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011; Gull *et al.*, Nature, 1973) und

manchen Säugetierzellen (Krämer *et al.*, Molecular Oncology, 2011; Grisham *et al.*, Nature, 1973; Raab *et al.*, Cancer Research, 2012). Außerdem reichert es sich in Keratinschichten der Epidermis an (Panda *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005). Frühe Studien deuteten daraufhin, dass Griseofulvin ähnlich dem Spindelgift Colchicin zur Mikrotubulusdepolymeration führt (Panda *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005). In weiteren Studien konnte eine Bindung an Tubulin bei schon geringer Konzentration, eine Depolymeration von Mikrotubuli aber in der Regel erst bei hohen Griseofulvinkonzentrationen in Säugetierzellen festgestellt werden. Daher wird angenommen, dass der Wirkmechanismus möglicherweise eher in einer Veränderung in der Mikrotubulusdynamik besteht (Panda *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005; Malawista *et al.*, Science, 1968; Weber *et al.*, Journal of Molecular Biology, 1976). Neue Studien zeigen, dass Griseofulvin nicht nur auf die Mitosephase der Zellen, sondern auch in der Interphase wirkt. Da sich in vivo mehr Zellen eines Tumors in der Interphase befinden als in der Zellteilung, könnte das Medikament so eine hohe Zahl an Zellen erreichen (Pannu *et al.*, Cell Death Discovery, 2014).

Bereits 1968 wurde gezeigt, dass es tumorreduzierend auf mit Crotonöl behandelte Mäuse wirkt (Vesselinovitch *et al.*, Cancer Research, 1968). Vor Kurzem wurde es als Initiator multipolarer Spindeln und multipolarer Mitosen in Zellen mit überzähligen Zentrosomen identifiziert, da es anscheinend den Mechanismus des zentrosomalen Clustering verhindert (Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007; Kawamura *et al.*, Oncotarget, 2013). Die so erzielte Induktion multipolarer Spindeln resultierte in Apoptosen und Proliferationsminderung verschiedener Tumorzelllinien (Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007). Der verursachende Mechanismus des zentrosomalen Clustering scheint eine Inhibition des in der Interphase aktiven tubulären Netzwerkes und der mikrotubulären

Polymeration zu sein. Dies führt zu einer Verteilung der überzähligen Zentrosomen, unabhängig von Mikrotubulus assoziierten Proteinen (MAPs) im Zytoplasma (Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007; Raab *et al.*, Cancer Research, 2012). Bekannt ist, dass Griseofulvin an der Colchicin-Bindungsstelle, nämlich der intradimeren alpha-beta-Oberfläche der Mikrotubuliheterodimere, ansetzt und somit in niedriger Konzentration Mikrotubuli stabilisiert, in höherer Konzentration aber zu den destabilisierenden Tubulinreagenzien gehört (Stanton *et al.*, Medical Research Reviews, 2011). Griseofulvin wurde bereits in mehreren Studien als mögliche neue Option in der Tumorthherapie untersucht. Griseofulvin hemmt die Proliferation bösartiger Zellen in mehreren Zelllinien alleine oder in Kombination mit bereits etablierten chemotherapeutischen Substanzen (Rathanasamy *et al.*, Cancer, 2010). Es wurde zudem gezeigt, dass Griseofulvin auch in viral transformierten Zellen die Proliferation reduzieren kann (Kamech *et al.*, Cancer Research, 1988). Neu entwickelte Griseofulvin-Derivate zeigen zwar zum Teil weniger Wirksamkeit gegen Pilzinfektionen, jedoch stärkere Wirksamkeit in Bezug auf Tumorzellen (Ronnest *et al.*, Cell Death & Disease, 2012; Raab *et al.*, Cancer Research, 2012).

1.5 Die Zelllinie NCI-H295R

In dieser Doktorarbeit wird untersucht, ob die oben beschriebene Wirkung von Griseofulvin auch auf das ACC zutrifft. Als geeignetes Modell für das ACC verwendeten wir die Zelllinie NCI-H295R. Diese Zelllinie wurde aus einem 11 x 13 x 14 cm großen Tumor einer 48-jährigen schwarzen Patientin gewonnen (Gazdar *et al.*, Cancer Research, 1990; T. Wang *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 2012). Einige Monate nach Resektion kam es zu einem Rezidiv und zu einer Fernmetastasierung. Trotz Therapie mit Mitotane und weiteren operativen Resektionen verstarb die Patientin elf Monate nach Erstvorstellung an ihrem ACC (Gazdar *et al.*,

Cancer Research, 1990).

Nach der operativen Tumorentfernung wurden Tumorteile zerkleinert, defragmentiert und über ein Jahr in verschiedenen serumhaltigen und serumfreien Medien kultiviert. Im Anschluss wurden die am stärksten wachsenden Zellen selektiert: Die NCI-H295 Zelllinie (Gazdar *et al.*, Cancer Research, 1990; T. Wang *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 2012).

Mit dem Ziel aus den in Clustern und relativ zögerlich wachsenden Zellen schnellwachsende Monolayerkulturen zu kultivieren, wurde die Zelllinie H295R entwickelt (Rainey *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 1994). Im Gegensatz zu den damals bekannten adrenokortikalen Zelllinien (die humane SW-13-Zelllinie, die Y-1-Mauszelllinie) produziert die NCI-H295R Zelllinie Mineralokortikoide, Glukokortikoide und C19-Steroide (Gazdar *et al.*, Cancer Research, 1990; Rainey *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 1994). Auch zehn Jahre nach Erstkultivierung produzieren die NCI-H295R-Zellen große Mengen von Pregnenolon, 17-Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron, sowie kleinere Mengen Aldosteron und zahlreiche andere Metaboliten (H. Rodriguez *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1997). Es wurden auch andere Zelllinien, wie z.B. NCI-H295A, entwickelt. Hier wurde der Fokus auf die Erforschung der Steroidgenese gesetzt (H. Rodriguez *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1997). In der Vergangenheit wurde vorwiegend die NCI-H295R-Zelllinie als Model für die Wirkung tumorhemmender Therapien eingesetzt, da sie ein gutes Modell für das ACC darstellt (Cerquetti *et al.*, International Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010; Doghman *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008; T. Wang *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 2012). Die Konzentration auf eine Zelllinie in der

Erforschung des ACCs stellt eine Einschränkung dar (T. Wang *et al.*,
Molecular and Cellular Endocrinology, 2012).

2. Ziele der Arbeit

Unklar ist, ob die oben genannten Wirkungen des Griseofulvin auch auf ACC-Zellen übertragbar sind. Ziel der Arbeit ist daher die Untersuchung der Proliferation, Viabilität und Apoptose in der ACC-Zelllinie NCI-H295R.

Die Arbeit wurde in der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie unter Betreuung von Professor Dr. med. Holger Willenberg durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Dr. med. Matthias Haase.

Außer der zytogenetischen Analyse wurden sämtliche Versuche (nach Einarbeitung durch Prof. Dr.med. Holger Willenberg und Dr. med. Matthias Haase, sowie durch Roswitha Charko) von mir eigenständig durchgeführt. Die zytogenetische Analyse erfolgte durch Dr. rer. nat. Barbara Hildebrandt aus dem Institut für Humangenetik, Düsseldorf.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Matthias Haase.

3. Publierte Originalarbeit

Original Basic 297

Griseofulvin Inhibits the Growth of Adrenocortical Cancer Cells In Vitro

Authors E. L. Bramann¹, H. S. Willenberg¹, B. Hildebrandt², V. Müller-Mattheis³, M. Schott¹, W. A. Scherbaum¹, M. Haase¹

Affiliations ¹ Department of Endocrinology, Diabetes and Rheumatology, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany
² Institute of Human Genetics and Anthropology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Germany
³ Department of Urology, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

Key words

- adrenal tumor
- proliferation
- viability
- apoptosis

Abstract

Supernumerary centrosomes and aneuploidy are associated with a malignant phenotype of tumor cells. Centrosomal clustering is a mechanism used by cancer cells with supernumerary centrosomes to solve the threatening problem of multipolar spindles. Griseofulvin is an antifungal substance that interferes with the microtubule apparatus and inhibits centrosomal clustering. It has also been demonstrated that griseofulvin inhibits the growth of tumor cells in vitro and in vivo. However, it is not yet known whether treatment with griseofulvin inhibits growth of adrenocortical tumor cells. We studied the viability and antiproliferative effects of griseofulvin on cultured NCI-H295R adrenocortical carcinoma cells using Wst-1-, BrdUrd-, and [³H]-thymidine

assays. For the detection of apoptosis we used a caspase 3/7 cleavage assay and light microscopy techniques. We observed that incubation with griseofulvin for 24–48 h leads to a decrease in the viability and proliferation of NCI-H295R cells in a dose-dependent manner. Significant effects could be observed after incubation with griseofulvin as measured by Wst-1-, BrdUrd-, and [³H] dT- uptake assays. Apoptosis of NCI-H295R cells was increased in a dose-dependent manner up to 4.5-fold after incubation with griseofulvin 40 μM for 24 h as shown by caspase 3/7 cleavage assay and light microscopy. With regard to new treatment strategies for adrenocortical cancer, griseofulvin, and possibly other agents, which interfere with the microtubule apparatus and inhibit centrosomal clustering, may turn out to be interesting targets for further research.

received 06.08.2012
accepted 20.09.2012

Bibliography
DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1327642>
Published online:
October 30, 2012
Horm Metab Res 2013;
45: 297–300
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0018-5043

Correspondence

M. Haase M.D.
Department of Endocrinology,
Diabetes and Rheumatology
University Hospital Duesseldorf
Moorenstraße 5
40225 Duesseldorf
Germany
Tel.: +49/211/811 7810
Fax: +49/211/811 7860
Matthias.Haase@uni-duessel
dorf.de

Introduction

It has been shown that the antifungal substance griseofulvin inhibits centrosomal clustering, a cellular mechanism that presumably saves the genetic integrity and thus enables cancer cells to survive and proliferate [1,2]. Amplification of centrosomes is a common characteristic of tumor cells and is associated with genetic instability [3–5]. Supernumerary centrosomes on the one hand support tumorigenesis through promoting aneuploidy and/or disrupting cell polarity [3]. On the other hand it represents a severe fitness risk for the growth of mature cancer cells due to multipolar mitosis and the genesis of nonviable daughter cells [3]. To avoid the genetic instability, which is thought to be associated with multipolar mitosis, affected cells use centrosomal clustering to prevent the formation of multipolar spindles. This process of coalescence is probably influenced by microtubule based motor proteins and microtubule binding proteins along the microtubular network, but not all details have been fully understood [2,6].

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignant disease with a poor prognosis despite surgery, radiation, and pharmacotherapy [7–10]. Few agents have been proven to be of some benefit in the treatment, for example, platinum-based cytotoxic chemotherapy, streptozotocin, and mitotane [11–13]. However, despite best clinical care, the overall survival rate remains lower than 50% at 5 years [14]. The malignant phenotype may be supported by the genetic instability and centrosomal amplification that is also typical for adrenocortical carcinomas [15,16]. Griseofulvin is an established antifungal agent that has recently been identified as an inducer of multipolar spindles and mitoses in tumor cells with supernumerary centrosomes via the inhibition of centrosomal clustering [2]. The induction of multipolar mitoses was associated with apoptosis as well as with the inhibition of proliferation in different cancer cell lines [2]. The mechanism of action seems to be the disruption of the interphase microtubule network via an inhibition of microtubule polymerization, result-

Bramann EL et al. Griseofulvin and Adrenocortical Cancer ... Horm Metab Res 2013; 45: 297–300

ing in the dispersion of supernumerary centrosomes throughout the cytoplasm [2]. Griseofulvin has been tested in several studies as a new option in cancer therapy and it has been described that griseofulvin diminishes proliferation of malignant cells in several cell lines alone or in combination with established chemotherapeutic treatment strategies [17, 18]. Moreover, it has also been described that griseofulvin blocks proliferation in cells that are transformed by polyoma virus or by SV40. This observation has been thought to be a result of the altered microtubule network in transformed cells [19].

Therefore, we posed the question whether griseofulvin may also be an effective agent in the treatment of adrenocortical carcinoma. We studied here the effects of griseofulvin on the viability, proliferation and apoptosis of adrenocortical carcinoma cells *in vitro*.

Material and Methods

Cell culture

For *in vitro* studies, we employed the NCI-H295R adrenocortical cancer cell line. The medium used was RPMI1640+L-glutamine (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) supplemented with 2% fetal bovine serum, insulin (66 nM), hydrocortisone (10 nM), apotransferrin (10 µg/ml), β-estradiol (10 nM), sodium-selenite (30 nM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂, as described before [20]. Medium was changed every 3 days and cells were subcultured at confluence using accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Germany). We seeded the NCI-H295R cells in 96-well microtiter culture plates for the wst-1 assay, the BrdUrd assay, the apoptosis detection, and for measuring the tritiated thymidine ([³H]dT) uptake. Griseofulvin was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and dissolved in DMSO and added to the cell culture medium at a final concentration of 100 nM, 1 µM, 10 µM, 40 µM, or 100 µM. A DMSO-containing vehicle medium served as control. The control contained 0.12% DMSO and was equal to the maximum final concentration of DMSO used for the incubation with griseofulvin.

Chromosomal analysis

NCI-H295R cells were analyzed for genetic aberrations. Chromosome preparations were obtained after colcemid treatment using standard hypotonic pretreatment procedures with KCl. Fifteen trypsin G-banded cells were analyzed and karyotyped for detecting numerical and structural chromosome aberrations.

Wst-1 assay

To assess cell viability we applied the wst-1 assay (Roche, Mannheim, Germany) as described by the manufacturer's instructions. In short, the cells were seeded in 96-well microtiter plates and cultured with or without griseofulvin at the concentrations given above. After 24 h of incubation, the tetrazolium salt wst-1 was added to the medium for 4 h. The change of the tetrazolium salt into a red formazan dye that correlates with the viability of the cells was detected by the measurement of absorbance at 440 nm using a microplate reader. A control without cells was used to measure the background absorbance of the medium, which was subtracted from the results.

BrdUrd assay

To determine cell proliferation more directly through measuring the DNA-synthesis we applied the colorimetric BrdUrd Assay (Cell Proliferation ELISA, BrdUrd by Roche) as indicated by the manufacturer's instructions. Again, we seeded NCI-H295R-cells in 96 well microtiter plates and cultured with or without griseofulvin at the indicated concentrations. After 12 h, the cells were labeled with BrdUrd and the plates incubated at 37°C for another 12 h. The cell medium was then carefully removed and the cells dried and affixed. Subsequently we located the BrdUrd label in the DNA with the peroxidase-conjugated BrdUrd antibody. The microplate was then washed thoroughly 3 times with 1×PBS. Afterwards the bound peroxidase-conjugated BrdUrd antibody was quantified with peroxidase substrate tetramethylbenzidine. Finally the BrdUrd Absorbance was measured at 440 nm using an ELISA plate reader. A control without cells was used to measure the background absorbance of the medium and was subtracted from the results.

Tritiated thymidine ([³H]dT) uptake assay

Proliferation of cells was determined measuring the incorporation of [³H]dT. Briefly, cells were seeded at a density of 2×10⁴ cells/well in a 96 well plate and subsequently incubated with or without griseofulvin as indicated. After 24 h of incubation, cells were pulsed with [³H]dT (Amersham Pharmacia) 1 µCi for a further 24 h. At the end of the incubation period cells were transferred to a 96-well uni-filter microplate (PerkinElmer, Massachusetts, USA), washed extensively, dried, and covered with scintillation mixture. [³H]dT uptake was analyzed by measuring radioactivity using a scintillation counter (Trilux, Wallach, Germany).

Apoptosis assay

To determine the fraction of apoptotic cells we applied the Apoptoglo Assay (Apotoglo Triplex Assay G6320, Promega), based on the manufacturer's instructions. In this case, we only used the last test component to measure the caspase-Glo 3/7 cleavage with luminescence, which corresponds to the amount of apoptotic cells. The NCI-H295R cells were seeded in 96 well microtiter plates and the cells incubated with griseofulvin for 24 h at the concentrations indicated above. The Caspase Glo 3/7 reagent was then added, incubated, and subsequently the cleavage of the substrate was measured through luminescence detection with a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies). Three wells of each sample were pooled before the measurement of the luminescence. A control without cells was used to measure the background luminescence and was subtracted from the results of each experiment. The apoptosis positive control was set up with paclitaxel, a substance well known for its antiproliferative and proapoptotic effects on adrenocortical NCI H295 cells [21, 22].

Statistical analysis

The results are given as the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least 3 separate experiments each performed in triplicate, with the control mean adjusted to 100%. Statistical analysis was performed using a Kruskal-Wallis statistic followed by Dunn's post-test applying GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, USA). A p-value of <0.05 was determined as significant.

Results

Cytogenetic analysis of the NCI-H295R cells

A wide range of chromosome numbers were observed in the NCI-H295R cell line; with 89–103 chromosomes the cell line is near tetraploid. Numerical and structural abnormalities were observed. The chromosomes 17 and 18 were present in up to 8 copies. Most of the structural aberrations were present in a different number of copies. The structural rearrangements were mostly 2- or 3-break rearrangements.

Effects of griseofulvin on the viability and proliferation of NCI-H295R

Exposure to griseofulvin for 28 h decreased the viability of NCI-H295R cells in a dose-dependent manner as measured by metabolism of wst-1-salt. The incubation with griseofulvin 10 μ M reduced viability to 93% in comparison to the control.

Exposure of NCI-H295R cells to griseofulvin 40 μ M and 100 μ M reduced viability to approximately 69 and 72%, respectively.

Using the BrdUrd-Assay, a decrease in the proliferation to 76% at 10 μ M griseofulvin and to 63% at 100 μ M griseofulvin could be detected after exposure of NCI-H295R cells for 24 h when compared with the control.

The [3 H]dT uptake assay results indicated a nearly equally strong effect of griseofulvin on the proliferation of NCI-H295R cells after exposure for 48 h. Concentrations of 10 μ M griseofulvin decreased the [3 H]dT uptake to approximately 81% of the basal uptake. Concentrations of griseofulvin 100 μ M led to a decrease to 57% as compared to the [3 H]dT uptake of the untreated control (○ Fig. 1).

Assessment of apoptosis

Exposure to griseofulvin for 24 h increased the caspase 3/7 cleavage activity, correlating with the level of apoptosis, in NCI-H295R cells in a dose-dependent manner. A concentration of 10 μ M griseofulvin lead to an increase in the rate of apoptosis of

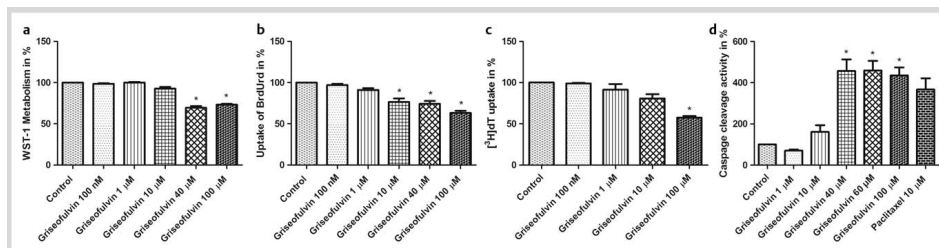


Fig. 1 **a** Relative viability of NCI-H295R cells after incubation with griseofulvin ($n \geq 3$). Cells were exposed to griseofulvin at concentrations of 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 40 μ M, and 100 μ M for 28 h. Viability was determined by measuring wst-1-salt metabolism. Results were examined for statistical significance using a Kruskal–Wallis statistic followed by Dunn's post-test. Starlets indicate significant differences as compared to control ($*p < 0.05$). **b** Proliferation of NCI-H295R cells after incubation with griseofulvin ($n \geq 3$). Cells were exposed to griseofulvin at concentrations of 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 40 μ M, and 100 μ M for 24 h. Proliferation was determined by the measurement of the incorporation of BrdUrd into the proliferating cells. Results were examined for statistical significance using a Kruskal–Wallis statistic followed by Dunn's post-test. Starlets indicate significant differences as compared to control ($*p < 0.05$). **c** Pro-

liferation of NCI-H295R cells ($n \geq 3$) after incubation with griseofulvin at concentrations of 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, and 100 μ M for 48 h. Proliferation was determined by measuring [3 H]dT uptake. Results were examined for statistical significance using a Kruskal–Wallis statistic followed by Dunn's post-test. Starlets indicate significant differences as compared to control ($*p < 0.05$). **d** Apoptosis of NCI-H295R cells after incubation with griseofulvin ($n \geq 3$). Cells were treated with griseofulvin for 24 h at concentrations of 1 μ M, 10 μ M, 40 μ M, 60 μ M, and 100 μ M. The level of apoptosis was determined by measuring caspase 3/7 cleavage activity. Results were examined for statistical significance using a Kruskal–Wallis statistic followed by Dunn's post-test. Starlets indicate significant differences as compared to control ($*p < 0.05$).

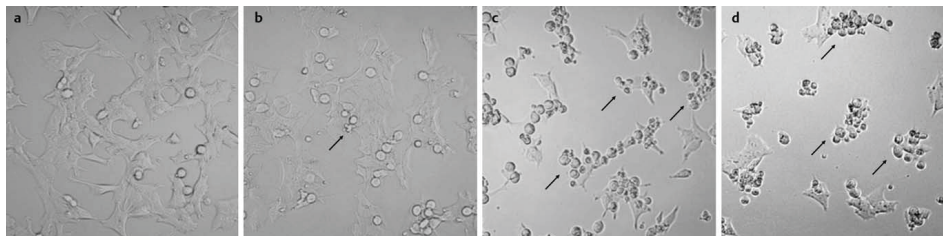


Fig. 2 **a** NCI-H295R cells were treated with 1 μ M griseofulvin for 24 h, 100 \times enlarged by light microscopy. At 1 μ M we observe still well connected cells with a defined cell structure. **b** NCI-H295R cells treated with 10 μ M griseofulvin for 24 h, 100 \times enlarged by light microscopy. Already at 10 μ M there is a significant change in the cellular body and confluence. **c** NCI-H295R cells treated with 40 μ M griseofulvin for 24 h, 100 \times enlarged

by light microscopy. When treated with 40 μ M there are a high number of apoptotic cells, the cell structure is almost annihilated. **d** NCI-H295R cells treated with 100 μ M griseofulvin for 24 h, 100 \times enlarged by light microscopy. At a concentration of 100 μ M very few, singular viable cells remain. Even more apoptotic bodies are visible, indicating the dose-dependent induction of apoptosis by griseofulvin.

NCI-H295R cells to 161% as compared to the control. After exposure to griseofulvin, 40 μ M caspase activity raised to 459% in comparison to the control. At concentrations of griseofulvin 100 μ M we detected a level of caspase activity of 435% (● Fig. 1, 2).

Discussion and Conclusions

Although there are several therapeutic regimes to treat adrenocortical carcinoma, the prognosis of this disease remains poor and none of the established cytotoxic agents acts exclusively on malignant cells. Therapy, therefore, frequently leads to severe side effects and sometimes even to discontinuation of treatment. Recently, griseofulvin has been identified as an inhibitor of centrosomal clustering that is able to interfere relative specifically with the expansion of tumor cells which contain supernumerary centrosomes [2]. Further studies suggest that griseofulvin leads to growth inhibition by interfering with the microtubule apparatus [18]. Our data demonstrate significant effects of griseofulvin on the viability, proliferation, and apoptosis of adrenocortical carcinoma cells starting at doses of 10 μ M after exposure for 24–48 h in vitro. However, this study does not compare the effects of griseofulvin on adrenocortical cancer cells and normal adrenocortical cells. Thus, further studies are necessary to evaluate the specificity of the observed effects.

Although the pharmacokinetics of griseofulvin differ in vivo from the simple conditions in vitro, peak concentrations that are necessary for growth inhibition of NCI-H295R cells may also be reached in vivo. For the treatment of fungal infections a typical single dose consists of 250–500 mg griseofulvin (depending on the size of the griseofulvin particles), leading to a peak serum concentration of 0.5–2.0 μ g/ml equivalent to 1.4–5.7 μ M after 4 h of oral administration [23]. We have chosen the concentrations of griseofulvin in our experiments with regard to these observations. However, a half maximal inhibition of proliferation and viability could not be reached using these concentrations. Furthermore, the distribution of griseofulvin may vary between different tissues.

Nevertheless, there are studies that demonstrate antitumor effects of griseofulvin in animals in vivo. For example, griseofulvin alone or in combination with nocodazole inhibits the growth of colon adenocarcinoma xenografts in athymic mice [17]. Another study demonstrated that vinblastine and griseofulvin have synergistic effects on MCF-7 cells [18]. Interestingly, Rønneest et al. reported a collection of griseofulvin analogues, 18 of which demonstrated an increased activity as compared to griseofulvin that might prove another option in therapy [24].

With regard to new treatment strategies for adrenocortical cancer, griseofulvin and possibly other agents, which interfere with the microtubule apparatus and inhibit centrosomal clustering, may turn out to be interesting targets for further research.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest.

References

- 1 Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 2005; 307: 127–129
- 2 Rebacz B, Larsen TO, Clausen MH, Rønneest MH, Löffler H, Ho AD, Krämer A. Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer Res* 2007; 67: 6342–6350

- 3 Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, Thery M, Pellman D. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 2008; 22: 2189–2203
- 4 Nigg EA. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* 2006; 119: 2717–2723
- 5 Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 1998; 58: 3974–3985
- 6 Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": Understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Develop* 2001; 15: 1167–1181
- 7 Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M, Allolio B. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4501–4504
- 8 Kirschner LS. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 14–21
- 9 Libè R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 13–28
- 10 Shteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 667–680
- 11 Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Della Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 657–666
- 12 Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Grondal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B. Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol* 2000; 11: 1281–1287
- 13 Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Eng J Med* 2007; 356: 2372–2380
- 14 Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2027–2037
- 15 Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 145–152
- 16 Roshani L, Fujioka K, Auer G, Kjellman M, Lagercrantz S, Larsson C. Aberrations of centrosomes in adrenocortical tumors. *Int J Oncol* 2002; 20: 1161–1165
- 17 Ho YS, Duh JS, Jeng JH, Wang YJ, Liang YC, Lin CH, Tseng CJ, Yu CF, Chen RJ, Lin JK. Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 91: 393–401
- 18 Rathinasamy K, Jindal B, Asthana J, Singh P, Balaji PV, Panda D. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer* 2010; 10: 213
- 19 Kamech N, Seif R. Effect of microtubule disorganizing or overstabilizing drugs on the proliferation of rat 3T3 cells and their virally induced transformed derivatives. *Cancer Res* 1988; 48: 4892–4896
- 20 Haase M, Schott M, Bornstein SR, Malendowicz LK, Scherbaum WA, Wilenberg HS. CITED2 is expressed in human adrenocortical cells and regulated by basic fibroblast growth factor. *J Endocrinol* 2007; 192: 459–465
- 21 Fallo F, Pilon C, Barzon L, Pistorello M, Pagotto U, Altavilla G, Boscaro M, Sonino N. Paclitaxel is an effective antiproliferative agent on the human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cell line. *Chemotherapy* 1998; 44: 129–134
- 22 Berruti A, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, De Francia S, Volante M, Daffara F, Generali D, Lebouleux S, Perotti S, Baudin E, Papotti M, Terzolo M. Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 451–458
- 23 Arida AI, Al-Tabakha MM, Hamoury HA. Improving the high variable bioavailability of griseofulvin by SEDDS. *Chem Pharm Bull* 2007; 55: 1713–1719
- 24 Rønneest MH, Rebacz B, Markworth L, Terp AH, Larsen TO, Krämer A, Clausen MH. Synthesis and structure-activity relationship of griseofulvin analogues as inhibitors of centrosomal clustering in cancer cells. *J Med Chem* 2009; 52: 3342–3347

4. Diskussion

Neue, effektive Therapieoptionen sind bei der geringen Inzidenz des ACC schwer zu entwickeln. Seit der Einführung von Mitotane 1959 konnte bisher noch keine spezifische, ausschließlich auf bösartig entartete Nebennierenrindenzellen wirkende Medikation entwickelt werden (Kerkhofs *et al.*, Therapeutic Drug Monitoring, 2015). Die Entwicklung und Prüfung vielversprechender Therapeutika, wie z.B. Griseofulvin oder seiner Derivate, ist daher von großer Bedeutung.

Griseofulvin wirkt auf Zellen mit überzähligen Zentrosomen und verhindert wahrscheinlich den das Überleben sichernden Mechanismus des Zentrosomalen Clusterings durch Interaktion mit dem Tubulusnetzwerk (Rebacz *et al.*, Cancer Research, 2007). Jedoch muss auch gesagt werden, dass das Zentrosomale Clustering kein ausschließlich von Tumorzellen verwendeter Mechanismus ist, sondern physiologischerweise auch von polyploiden Leberzellen verwendet wird (Guidotti *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 2003).

Weitere Studien legen die Vermutung nahe, dass Griseofulvin das Zellwachstum auch durch Interaktionen mit dem Mikrotubulusapparat verhindern kann (Mauro *et al.*, Apoptosis, 2013; Rathinasamy *et al.*, Cancer, 2010). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass Griseofulvin in Keimzellentumoren das Tumorstadium über eine Aktivierung der Apoptose (via eines Connexin 43 abhängigen Mechanismus) senkte (Mauro *et al.*, Apoptosis, 2013).

Insgesamt scheint die Wirkung des Medikaments stark von dem damit behandelten Zelltyp abhängig zu sein. Es wird ebenso eine proliferationshemmende Wirkung beschrieben, wie eine Apoptose induzierende und/oder ein Aufhalten des Zellzyklus in der G2/M Phase

der Mitose durch Veränderung der Mitosespindel und Unterdrückung des reaktiven dynamischen Mikrotubulusverhaltens (Mauro *et al.*, Apoptosis, 2013; Uen *et al.*, Cell Biochemistry, 2007). Diese vom Zelltypus abhängigen Ergebnisse sind am ehesten einem Mangel an durchgreifendem Verständnis der molekularen Ziele und Wirkmechanismen von Griseofulvin zu schulden (Mauro *et al.*, Apoptosis, 2013). Die Unbekanntheit der Wirkweise kann die Anwendung von Griseofulvin in der Tumorthherapie möglicherweise beeinträchtigen (Mauro *et al.*, Apoptosis, 2013). Auch in unserer Studie könnten wir keine Ergebnisse zum Verständnis des Wirkmechanismus auf molekularer Ebene beitragen.

In unserer Studie zeigt sich eine wachstums- und lebensfähigkeits-hemmende Wirkung von Griseofulvin auf die ACC-Zelllinie NCI-H295R. Die Zelllinie NCI-H295R ist zwar langjährig als Modell der humanen Nebenniere etabliert, ist jedoch wie jedes Modell kein ausreichender Beweis einer möglichen gleichen Wirkung im menschlichen Körper (Samandari *et al.*, The Journal of Endocrinology, 2007). Leider gibt es außer dieser Zelllinie bisher kaum andere geeignete Zelllinien, die ein ähnlich gutes, Steroide produzierendes Modell für das ACC darstellen (T. Wang, Molecular and Cellular Endocrinology, 2012).

Die von uns durchgeführte genetische Untersuchung zeigt, dass bei der Zelllinie NCI-H295R eine Vielzahl an strukturellen und numerischen Abnormitäten und ein fast tetraploider Chromosomensatz vorliegen. Entsprechende Veränderungen sind häufig mit einer Chromosomalen Instabilität (CIN) und multipolaren Mitosen und ggf. dem Zentrosomalen Clustering assoziiert (Lim *et al.*, Oncotarget, 2014).

Die von uns erhobenen Daten demonstrieren signifikante Effekte von Griseofulvin auf die Lebensfähigkeit, die Proliferation und die Apoptose der NCI-H295R-Zelllinie bei Dosen von bereits 10 μm nach einer Expositionsdauer von 24 - 48 Stunden.

Die Ermittlung der Proliferation mit dem Erfassen und Messen der DNA-Synthese via einer Markierung durch BrdU- oder [^3H]-Thymidin-Aufnahme und -Einbau in die DNA sind gut etablierte, sichere Verfahren. [^3H]-Thymidin-Assays sind lange bekannte, sensitive Testverfahren, jedoch ist die Entsorgung des radioaktiven Materials schwierig. Das Verfahren mit BrdU kommt ohne Radioaktivität aus, ist aber deutlich aufwendiger und damit gegebenenfalls für Fehler anfälliger. Insgesamt waren die von uns erhobenen Daten zur Proliferation im Vergleich der beiden Testverfahren konsistent und dosisabhängig reproduzierbar.

Das eingesetzte Verfahren zur Messung der Proliferation und Viabilität mittels Tretrazoliumsalzreduktion mit WST-1 ist ein bekanntes, verbreitetes Verfahren. Die Viabilität der NCI-H295R-Zellen nahm nach 28 h-Inkubation mit 10 μm auf 93 % ab. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Viabilität bei 40 μm auf 69 % und bei 100 μm auf 72 % ab. Die bei 40 μm im Vergleich erhöhte, verglichen mit der Kontrollgruppe aber immer noch deutlich erniedrigte Umsetzung von Wst-1 zu Formazan, ist am ehesten durch Messungenauigkeiten zu erklären. Hierzu zeigte sich in der Messung mit BrdU eine vergleichbare dosisabhängige Senkung der Proliferation auf 76% bei 10 μM und auf 63 % bei 100 μM . Auch die Untersuchung der Proliferation mittels des [^3H]-Thymidin-Testverfahrens konnten ähnliche Ergebnisse ermittelt werden. Hier wurde die Proliferation bei 10 μM um 81 % und bei 100 μM um 57 % gesenkt.

Eine Bestimmung der Viabilität mit einem noch sensitiveren Verfahren, wie mit einem ATP-Detektions-Assay, wäre besonders im

Bereich mittlerer Konzentrationen zwischen 10 und 40 μM interessant (Riss *et al.*, Cell Viability Assays, 2016). Auch Kim *et al.* zeigten 2011 eine deutliche Reduktion der Viabilität nach Behandlung mit 10 – 200 μM Griseofulvin auf mehrere humane Myelom-Zelllinien, sowie eine murine Plasmozytom-Zelllinie (Kim *et al.*, Leukemia Research, 2011).

Ebenfalls ließ sich eine Dosis abhängige Induktion der Apoptose feststellen. So war bei 10 μM der Apoptoserate um 161 % gesteigert, bei 40 μM um 459 % und bei 100 μM um 435 %. Die ähnlichen Ergebnisse im Bereich von hohen Griseofulvinkonzentrationen können einerseits einer Absättigung des Prozesses, oder auch Messunregelmäßigkeiten entsprechen. Ho *et al.* haben 2001 eine Aktivierung der Apoptose vermittelnden Caspasen durch Griseofulvin auf Kolonkarzinomzellen bei einer Konzentration $> 5 \mu\text{M}$ ermittelt (Ho *et al.*, Journal of Cancer, 2001). Pannu *et al.* konnten 2014 zeigen, dass Griseofulvin mit einer IC_{50} von 25 μM auf murine Neuroblastomzellen (N1E-115) ebenfalls Apoptose induzierend wirkt (Pannu *et al.*, Cell Death Discovery, 2014). Ogden *et al.* konnten 2015 belegen, dass Griseofulvin in Konzentrationen von 25 μM und 50 μM in verschiedenen Zelllinien Apoptose induziert und zu einer Steigerung der Zentrosomalen Amplifikation führt (Ogden *et al.*, Cell Death & Disease, 2014).

Ebenfalls wichtig wären Versuche mit nativen Nebennierenrindenzellen, um die Hypothese der selektiv tumorsuppressiven Wirkung von Griseofulvin auf Nebennierenrindentumorzellen zu bestätigen. Entsprechende Zellmodelle sind schwer zu etablieren und standen uns bislang nicht zur Verfügung.

Obwohl die vereinfachte Pharmakokinetik *in vitro* von der deutlich komplexeren *in vivo* abweicht, könnten die für einen signifikanten Effekt benötigten Dosen auch *in vivo* erreicht werden. In der Behandlung

fungaler Infektionen sind üblicherweise Einzeldosen von 250 bis 500 mg Griseofulvin, je nach Partikelgröße, notwendig, welche sechs Stunden nach oraler Applikation zu einer maximalen Serumkonzentration von 0,5 - 2,0 µg/ml gleichbedeutend mit 1,4 - 5,7 µM führen (Arida *et al.*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2007). Die von uns verwendeten Konzentrationen wurden in Anbetracht dieser Beobachtungen gewählt. In den 2005 durch Panda *et al.* durchgeführten Versuchen konnte eine die Mitose betreffende mittlere inhibitorische Konzentration von 20 µM festgestellt werden (Panda *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005). Die in der Therapie gegen Pilzkrankungen wie Tinea capitis eingesetzten Dosen sind bei erhöhter Affinität von Griseofulvin gegenüber fungalem Tubulin niedriger anzusetzen, als die in tierischen oder menschlichen Zellen für vergleichbare Effekte notwendige Menge bei geringerer Tubulinaffinität des Substrats (Rathinasamy *et al.*, Cancer, 2010; Panda *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005). Interessant ist, dass Uen *et al.* 2007 feststellen konnten, dass der in zwei Tumorzelllinien auch durch höhere Griseofulvinkonzentrationen von 30 - 60 µM induzierte Arrest der Mitose reversibel war (Uen *et al.*, Cell Biochemistry, 2007). Auch ältere Studien bestätigen die reversible Auflösung von Mitosespindeln in Säugerzellen (Malawista *et al.*, Science, 1968). Dieses könnte auf eine möglicherweise gute Verträglichkeit auch höherer Dosismengen des Medikaments hindeuten (Uen *et al.*, Cell Biochemistry, 2007).

Zudem ist die Verteilung von Griseofulvin in den einzelnen Geweben unterschiedlich. Es wird vor allem in der Haut, insbesondere im Stratum corneum und Hautanhangsgebilden, angereichert, zum Teil aber auch in Leber, Muskeln und Fettgeweben (Götz, Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen, 1961). Die Resorption des Medikaments schwankt und kann durch fettreiche Nahrung gesteigert werden. Jedoch muss gesagt werden, dass Griseofulvin in Tierexperimenten teratogen, embryo- und spermenschädigend war und gerade bei den relativ häufig betroffenen

Patienten in gebär- oder zeugungsfähigem Alter mit Vorsicht einzusetzen ist (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988; Forth, Spezielle und Allgemeine Pharmakologie und Toxilogie, 2013). Dieses gilt jedoch für fast alle Chemotherapeutika und stellt damit keinen Nachteil Griseofulvins im Vergleich dar (Forth, Spezielle und Allgemeine Pharmakologie und Toxilogie, 2013). Insgesamt ist Griseofulvin aber ein in der Literatur als gut verträgliches Medikament beschrieben (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988). Eine längere Einnahme führt vor allem zu Störungen im Porphyrin-Stoffwechsel, Veränderungen in der mikrosomalen Zytochromkonzentration und der Bildung von Mallorykörperchen (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988). Schwerwiegende Nebenwirkungen, die zu Therapieabbrüchen führen, wurden nicht oder nur als sehr selten beschrieben (DeCarli *et al.*, 1988). Die oben genannten Veränderungen führen bei Mäusen zur Bildung von Hepatomen, jedoch konnte eine kanzerogene Wirkung nur bei Mäusen und Ratten, nicht aber bei Hamstern nachgewiesen werden (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988). Dennoch ist es auf Grund der mehrfach berichteten karzinogenen und teratogenen Wirkung vor allen in Säugetierzellen *in vitro* und *in vivo* mittlerweile ein zurückhaltend in der Behandlung von Dermatophyten eingesetztes Medikament, wenn es Therapiealternativen gibt (DeCarli *et al.*, Mutation Research, 1988).

Gleichwohl gibt es Studien, die die Tumorwachstum hemmenden Effekte von Griseofulvin *in vivo* demonstrieren konnten. Zum Beispiel inhibiert Griseofulvin allein, oder in Kombination mit Nocodazole, das Wachstum von Kolonadenokarzinom-Xenografts in athymischen Mäusen (Ho *et al.*, Journal of Cancer, 2001). Andere Studien zeigen, dass Vinblastin und Griseofulvin synergistische wachstumshemmende Effekte auf MCF-7 Zellen haben (Rathinasamy *et al.*, Cancer, 2010). Kim *et al.* konnten 2011 bei Mäusen, die mit murinen Plasmazytomzellen xenotransplantiert wurden und subkutane Tumor entwickelten, ein

deutlich reduziertes Tumorwachstum unter einer Behandlung mit Griseofulvin im Vergleich zur Kontrollgruppe beschreiben (Kim *et al.*, Leukemia Research, 2011).

Interessanterweise wurde auch von Griseofulvin-Analoga berichtet, von denen 18 eine gesteigerte Aktivität der das Zentrosomale Clustering hemmenden Wirkung im Vergleich zu Griseofulvin haben sollen. Besonders zu erwähnen ist hier das Griseofulvin-15 (Raab *et al.*, Cancer Research, 2012; Rønneest *et al.*, Journal of Medical Chemistry, 2009). Auch diese stellen möglicherweise eine zukünftige therapeutische Option dar. Ebenfalls konnten Liéby-Muller *et al.* 2015 eine deutlich antiproliferative Wirkung von Griseofulvin-Analoga auf die Zelllinien SCC114 (oral squamos carcinoma) und HCC1937 (Brustkrebs) feststellen (Liéby-Muller *et al.*, Bioorganic and Medical Chemistry Letters, 2015).

Die Feststellung, dass die meisten Tumoren eine Verdopplungszeit von 100-700 Tagen haben und somit eher langsam proliferieren, lässt es außerdem notwendig und sinnvoll erscheinen, Medikamente zu entwickeln, die nicht nur auf die Mitose, sondern auch auf in der Interphase wirken. Griseofulvin stellt in seiner auf das Tubulusnetzwerk wirkenden Eigenschaft nicht nur als Inhibitor des Zentrosomalen Clusterings ein interessantes mögliches Agens in der Krebstherapie dar, da es auch in der Interphase, also unabhängig von der Mitose wirkt (Pannu *et al.*, Cell Death Discovery, 2014).

5. Schlussfolgerung

Wir konnten in unseren Ergebnissen zeigen, dass Griseofulvin die Lebensfähigkeit der NCI-H295R-Zellen abhängig von der applizierten Dosis reduzierte. Auch die Proliferation der Nebennierenrindenzellen reduzierte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits bei 10 μM auf 76 %. Die Apoptoserate wurde in weitestgehend dosisabhängiger Form gesteigert. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass sich gerade die NCI-H295R-Zelllinie durch multiple genetische strukturelle Aberrationen und einen nahezu tetraploiden Chromosomensatz auszeichnet.

Insgesamt stellt Griseofulvin oder eines seiner Derivate vielleicht eine mögliche Therapieoption dar. Es bedarf aber noch weiterführender Studien.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abiven, G., Coste, J., Groussin, L., Anract, P., Tissier, F., Legmann, P., Dousset, B., Bertagna, X., Bertherat, J. (2013). Clinical and Biological Features in the Prognosis of Adrenocortical Cancer: Poor Outcome of Cortisol-Secreting Tumors in a Series of 202 Consecutive Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91 (7), 2650–2655.
- Allolio, B., Fassnacht, M. (2006). Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91 (6), 2027 – 2037.
- Anderhub, S. J., Krämer, A., Maier, B. (2012). Centrosome amplification in tumorigenesis. *Cancer Letters*, 322 (1), 8 – 17.
- Arida, A. I., Al-Tabakha, M. M., Hamoury, H. A. J. (2007). Improving the High Variable Bioavailability of Griseofulvin by SEDDS. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55 (12), 1713 – 1719.
- Arlt, W., Biehl, M., Taylor, A. E., Hahner, S., Libè, R., Hughes, B. A., et al. (2011). Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (12), 3775 – 3784.
- Assié, G., Letouzé, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., René-Corail, F., Elarouci, N., Sbiera, S., Kroiss, M., Allolio, B., Waldmann, J., Quinkler, M., Mannelli, M., Mantero, F., Papatomas, T., de Krijger, R., Tabarin, A., Kerlan, V., Baudin, E., Tissier, F., Dousset, B., Groussin, L., Amar, L., Clauser, E., Bertagna, X., Ragazzon, B., Beuschlein, F., Libè, R., de Reyniès, A., Bertherat, J. (2014). Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nature Genetics*, 46 (6), 607 – 612.
- Avidor-Reiss, T., Gopalakrishnan, J. (2013). Building a centriole. *Current Opinion in Cell Biology*, 25 (1), 72 – 77.
- Ayala-Ramirez, M., Jasim, S., Feng, L., Ejaz, S., Deniz, F., Busaidy, N., et al. (2013). Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 169 (6), 891 – 899.
- Babinska, A., Sworczak, K., Wisniewski, P., Nańecz, A., Jaskiewicz, K. (2008). *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 116 (4), 246 – 51
- Bahe, S., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J., Leiss, F. Nigg, E.A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *Journal of Cell Biology*, 171 (1), 27 – 33.
- Barlaskar, F. M., Spalding, A. C., Heaton, J. H., Kuick, R., Kim, A. C., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Ben-Josef, E., Hammer, G.D. (2009). Preclinical Targeting of the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94 (1), 204 – 212.

- Barr, F.A., Sillje, H.H. Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 429 – 440.
- Basto, R., Brunk, K., Vinadogrova, T., Peel, N., Franz, A., Khodjakov, A., Raff, J.W. (2008). Centrosome Amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell*. 133 (6), 1032 – 42.
- Berruti, A., Fassnacht, M., Haak, H., Else, T., Baudin, E., Sperone, P. (2014). Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer. *European Urology*, 65(4), 832–838.
- Berruti, A., Ferrero, A., Sperone, P., Daffara, F., & Reimondo, G. (2008). Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 13 (3), 497 – 509.
- Berruti, A., Sperone, P., Ferrero, A., Germano, A., Ardito, A., Priola, A. M., De Francia, S., Volante, M., Daffara, F., Generali, D., Leboulleux, S., Perotti, P., Baudin, E., Papotti, M., Terzolo, M. (2012). Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 166 (3), 451 – 458.
- Bettencourt-Dias, M. (2013). Q&A: Who needs a centrosome? *BMC Biology*, 11 (1), 28.
- Bettencourt-Dias, M., Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (6), 451 – 463.
- Bielinska, M., Parviainen, H., Kiiveri, S., Heikinheimo, M., Wilson, D. B. (2009). Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Veterinary Pathology*, 46 (2), 194 – 210.
- Bilimoria, K. Y., Shen, W. T., Elaraj, D., & Bentrem, D. J. (2008). Adrenocortical carcinoma in the United States. *Cancer*, 113 (11), 3130–6.
- Brennan, M. F. (1987). Adrenocortical carcinoma. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 37 (6), 348 – 365.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J. B., Bettencourt-Dias, M. (2011). Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *The Journal of Cell Biology*, 194 (2), 165 – 175.
- Castiel, A., Visochek, L., Mittelman, L., Zilberstein, Y. (2013). Cell Death Associated with Abnormal Mitosis Observed by Confocal Imaging in Live Cancer Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (78), e50568.
- Cerquetti, L., Sampaoli, C., Amendola, D., Bucci, B., Misiti, S., Raza, G., et al. (2010). Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. *International Journal of Oncology*, 37 (2), 493 – 501.
- Chan, J. Y. (2011). A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *International Journal of Biological Sciences*. 7(8), 1122 – 1144.
- Chen, J. V., & Megraw, T. L. (2014). Mother centrioles do a cartwheel to

- produce just one daughter. *Developmental Cell*, 30 (2), 111 – 112.
- De Carli, L., Larizza, L. (1988). Griseofulvin. *Mutation Research*, 195 (2), 91 – 126.
- Debec, A., Sullivan, W., Bettencourt-Dias, M. (2010). Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 (13), 2173 – 2194.
- Doghman, M., Cazareth, J., Lalli, E. (2008). The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (8), 3222 – 3225.
- Dohna, M., Reincke, M., Mincheva, A., Allolio, B., Solinas-Toldo, S., Lichter, P. (2000). Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 28 (2), 145 – 152.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (9), 688 – 698.
- Doxsey, S. J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P. D., Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell*, 76 (4), 639 – 650.
- Dworakowska, D., Drabarek, A., Wenzel, I., Babińska, A., Świątkowska-Stodulska, R., Sworczak, K. (2014). Adrenocortical cancer (ACC) - literature overview and own experience. *Endokrynologia Polska*, 65 (6), 492 – 502.
- Else, T., Kim, A. C., Sabolch, A., Raymond, V. M., Kandathil, A., Caoili, E. M., Jolly, S., Miller, B. S., Giordano, T. J., Hammer, G. D. (2014). Adrenocortical Carcinoma. *Endocrine Reviews*, 35 (2), 282 – 326.
- Erickson, L. A., Rivera, M., Zhang, J. (2014). Adrenocortical Carcinoma: Review and Update. *Advances in Anatomic Pathology*, 21 (3), 151 – 159.
- Fassnacht, M., Berruti, A., Baudin, E., Demeure, M. J., Gilbert, J., Haak, H., Kroiss, M., Quinn, D. I., Hesseltine, E., Ronchi, C. L., Terzolo, M., Choueiri, T. K., Poondru, S., Fleege, T., Rorig, R., Chen, J., Stephens, A. W., Worden, F., Hammer, G. D. (2015). Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 16 (4), 426 – 435.
- Fassnacht, M., Hahner, S., Polat, B., Koschker, A.-C., Kenn, W., Flentje, M., Allolio, B. (2006). Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91 (11), 4501 – 4504.
- Fassnacht, M., Kroiss, M., Allolio, B. (2013). Update in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98 (12), 4551 – 4564.
- Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B., Baudin, E., Haak, H., Berruti, A., Welin, S., Schade-Brittinger, C., Lacroix, A., Jarzab, B., Sorbye, H., Torpy, D. J., Stepan, V., Schteingart, D. E., Arlt, W., Kroiss, M., Leboulleux, S., Sperone, P., Sundin, A., Hermsen, I., Hahner, S., Willenberg, H. S., Tabarin, A., Quinkler, M., la Fouchardière, de, C.,

- Schlumberger, M., Mantero, F., Weismann, D., Beuschlein, F., Gelderblom, H., Wilmink, H., Sender, M., Edgerly, M., Kenn, W., Fojo, T., Müller, H.-H., Skogseid, B. (2012). Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 366 (23), 2189 – 2197.
- Fassnacht, P., Wittekind, C., Allolio, B. (2010). Aktuelle TNM-Klassifikationssysteme für das Nebennierenkarzinom. *Der Pathologe*. 31 (5), 374 – 378.
- Fay, A. P., Elfiky, A., Teló, G. H., McKay, R. R., Kaymakcalan, M., Nguyen, P. L., Vaidya, A., Ruan, D. T., Bellmunt, J., Choueiri, T. K. (2014). Adrenocortical carcinoma: The management of metastatic disease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 92 (2), 123 – 132.
- Forth, W., Aktories, K. (Herausgeber), Förstermann, U. (Herausgeber), Hofmann, F.B. (Herausgeber), Starke, K. (Herausgeber) (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier Verlag, 11. Auflage, Seite 826.
- Fraenkel, M., Gueorguiev, M., Barak, D., Salmon, A., Grossman, A. B., & Gross, D. J. (2013). Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine*, 44 (1), 187 – 192.
- Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letters*, 230 (1), 6 – 19.
- Ganem, N. J., Godinho, S. A., Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*, 460 (7252), 278 – 282.
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein C. A., La Rocca R. V. (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Research*, 50 (17), 5488 – 5496.
- Gergely, F., Basto, R. (2008). Multiple centrosomes: together they stand, divided they fall. *Genes & Development*, 22 (17), 2291 – 2296.
- Giordano, T. J., Thomas, D. G., Kuick, R., Lizyness, M., Misek, D. E., Smith, A. L., Sanders, D., Aljundi, R. T., Gauger, P. G., Thompson, N. W., Taylor, J. M., Hanash, S. M. (2003). Distinct Transcriptional Profiles of Adrenocortical Tumors Uncovered by DNA Microarray Analysis. *The American Journal of Pathology*, 162 (2), 521 – 531.
- Godinho, S. A., Kwon, M., Pellman, D. (2009). Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28 (1), 85 – 98.
- Götz, H. (1961). Die Griseofulvinbehandlung der Dermatomykosen. (H. Götz, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag., 1. Auflage, S 33.
- Graser, S., Stierhof, Y.D. Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *Journal of Cell Sciences* 120 (24), 4321-4331
- Grisham, L.M., Wilson L., Bensch, K.G. (1973) Antimitotic action of Griseofulvin does not involve disruption of microtubules, 244 (5415), 294 – 6

- Gross, D. J., Munter, G., Bitan, M., Siegal, T., Gabizon, A., Weitzen, R., Merimsky, O., Ackerstein, A., Salmon, A., Sella, A., Slavin, S.; (2006). The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocrine-Related Cancer*, 13 (2), 535 – 540.
- Grumbach, M. M., Biller, B. M., Braunstein, G. D., Campbell, K. K., Carney, J. A., Godley, P. A., Harris, E. L., Lee, J. K., Oertel, Y. C., Posner, M. C., Schlechte, J. A., Wieand, H. S. (2002). Management of Clinically Inapparent Adrenal Mass: Summary. *Annals of Internal Medicine*, 138 (5), 424 – 429
- Gruschwitz, T., Breza, J., Wunderlich, H., Junker, K. (2010). Improvement of histopathological classification of adrenal gland tumors by genetic differentiation, *World Journal of Urology* 28 (3), 329 – 34
- Guidotti, J.E., Br gerie O., Robert A., Debey P. Brechot C., Desdouets C. (2003). *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19095 –101
- Guillaud-Bataille, M., Ragazzon, B., de Reyni s, A., Chevalier, C., Francillard, I., Barreau, O., et al. (2014). IGF2 promotes growth of adrenocortical carcinoma cells, but its overexpression does not modify phenotypic and molecular features of adrenocortical carcinoma. *PLoS One*, 9 (8), e103744.
- Gull K., Trinci AP. (1973). Griseofulvin inhibits fungal mitosis, *Nature*, 244 (5414), 292 – 4
- Gupta, D., Shidham, V., Holden, J., & Layfield, L. (2001). Value of Topoisomerase II α , MIB-1, p53, E-Cadherin, Retinoblastoma Gene Protein Product, and HER-2/neu Immunohistochemical Expression for the Prediction of Biologic Behavior in Adrenocortical Neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9 (3), 215.
- Haider, M. A., Ghai, S., Jhaveri, K., & Lockwood, G. (2004). Chemical Shift MR Imaging of Hyperattenuating (>10 HU) Adrenal Masses: Does It Still Have a Role? *Radiology*, 231 (3), 711 – 716.
- Halperin, D. M., Phan, A. T., Hoff, A. O., Aaron, M., Yao, J. C., & Hoff, P. M. (2014). A phase I study of imatinib, dacarbazine, and capecitabine in advanced endocrine cancers. *BMC Cancer*, 14 (1), 561.
- Hara, F., Mukai, H., Watanabe, T., Uemura, Y., & Ohashi, Y. (2015). Abstract P6-08-16: NSAS BC02 substudy of chemo-induced amenorrhea (CIA) in premenopausal women who received either taxane alone or AC followed by taxane as a postoperative chemotherapy. *Cancer Research*, 75 (9, Supplement), 6 – 16.
- Hinchcliffe, E. H., Sluder, G. (2001). “It takes two to tango”: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes & Development*, 15(10), 1167 – 1181.
- Ho, Y. S., Duh, J. S., Jeng, J. H., Wang, Y. J. (2001). Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 91(3), 393 – 401.
- Jordan, M. A., Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253 – 265.

- Juhlin, C. C., Goh, G., Healy, J. M., Fonseca, A. L., Scholl, U. I., Stenman, A., John W. Kunstman, J. W., Taylor C. Brown, T.C., John D. Overton; Mane, S. M.; Nelsin-Williams, C., Bäckdahl, M., Suttorp, A.-C., Haase, M., Choi, M., Schlessinger, J., Rimm, D. L., Höög, A., Prasad, M. L., Korah, R., Larsson, C., Lifton, R. P., Carling, T., (2014). Whole-Exome Sequencing Characterizes the Landscape of Somatic Mutations and Copy Number Alterations in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100 (3), E493 – E502.
- Kamech, N., Seif, R. (1988). Effect of microtubule disorganizing or overstabilizing drugs on the proliferation of rat 3T3 cells and their virally induced transformed derivatives. *Cancer Research*, 48 (17), 4892 – 4896.
- Kawamura, E., Fielding, A. B., Kannan, N., Balgi, A., Eaves, C. J., Roberge, M., Dedhar, S. (2013). Identification of novel small molecule inhibitors of centrosome clustering in cancer cells. *Oncotarget*, 4 (10), 1763 – 1776.
- Kebapci, M., Kaya, T., Gurbuz, E., Adapinar, B., Kebapci, N., Demirustu, C. (2003). Differentiation of adrenal adenomas (lipid rich and lipid poor) from nonadenomas by use of washout characteristics on delayed enhanced CT. *Abdominal Imaging*, 28 (5), 709 – 715.
- Kerkhofs, T. M. A., Ettaieb, M. H. T., Hermsen, I. G. C., Haak, H. R. (2015). Developing treatment for adrenocortical carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, 22 (6), R325 – R338.
- Kerkhofs, T.M., Derijks, L.J., Ettaieb, H., den Hartigh, J., Neef, K., Gelderblom, H., Guchelaar, H.J., Haak, H.R. (2015). Development of a pharmacokinetic model of mitotane: toward personalized dosing in adrenocortical carcinoma. *Therapeutic Drug Monitoring*, 37 (1), 58 – 65.
- Khan, T. S., Imam, H., Juhlin, C., Skogseid, B., Gröndal, S., Tibblin, S., et al. (2000). Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 11 (10), 1281 – 1287.
- Kim, Y., Alpmann, P., Blaum-Feder, S., Krämer, S., Endo, T., Lu, D., Carson, D., Schmidt-Wolf, I.G. (2011), In vivo efficacy of griseofulvin against multiple myeloma. *Leukemia research*, 35 (8), 1070 – 3.
- Kirschner, L. S. (2006). Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(1), 14 – 21.
- Krämer, A., Maier, B., Bartek, J. (2011). Centrosome clustering and chromosomal (in)stability: A matter of life and death. *Molecular Oncology*, 5 (4), 324 – 335.
- Krämer, A., Neben, K., Ho, A. D. (2002). Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia*, 16 (5), 767 – 775.
- Kroiss, M., Quinkler, M., Johanssen, S., van Erp, N. P., Lankheet, N., Pöllinger, A., Laubner, K., Strasburger, C. J., Hahner, S., Müller, H. H., Alolio, B., Fassnacht, M. (2012). Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *The Journal of*

- Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97 (10), 3495 – 3503.
- Kroiss, M., Quinkler, M., Lutz, W. K., Allolio, B., Fassnacht, M. (2011). Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. *Clinical Endocrinology*, 75 (5), 585 – 591.
- Kwon, M., Godinho, S. A., Chandhok, N. S. (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & Development*, 22 (16), 2189 – 203.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. E., Frisvad, J. C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, 22 (6), 672 – 695.
- Lau, S. K., Weiss, L. M. (2009). The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Human Pathology*, 40 (6), 757 – 768.
- Leboulleux, S., Dromain, C., Bonniaud, G., Aupérin, A., Caillou, B., Lumbroso, J., Sigal R, Baudin E, Schlumberger M., (2006). Diagnostic and Prognostic Value of 18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Adrenocortical Carcinoma: A Prospective Comparison with Computed Tomography. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3), 920 – 925.
- Libè, R. (2015). Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3, 45.
- Libè, R., Fratticci, A., Bertherat, J. (2007). Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocrine-Related Cancer*, 14 (1), 13 – 28.
- Liéby-Muller, F., Heudré Le Baliner, Q., Grisoni, S., Fournier, E., Guilbaud, N., Marion, F. (2015) Synthesis and activities towards resistant cancer cells of sulfone and sulfoxide griseofulvin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 (10), 2078 – 81.
- Lim, S, Ganem, N.J. (2014). Tetraploidy and tumor development, *Oncotarget*, 5 (22), 10959 – 60.
- Liu, K., Yan, J., Sachar, M., Zhang, X., Guan, M., Xie, W., Ma, X. (2015). A metabolomic perspective of griseofulvin-induced liver injury in mice. *Biochemical Pharmacology*, 98 (3), 493 – 501.
- Logie, A., Boulle, N., Gaston, V., Perin, L., Boudou, P., Le Bouc, Y., Gicquel, C. (1999). Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *Journal of Molecular Endocrinology*, 23 (1), 23 – 32.
- Malawista, SE. Sato, H., Bensch, KG. (1968). Vinblastine and griseofulvin reversibly disrupt the living mitotic spindle. *Science*, 160 (3829), 770 – 2.
- Mauro, V., Carette, D., Pontier-Bres, R., Dompierre, J., Czerucka, D., Segretain, D., Gilleron, J., Pointis, G. (2013). The anti-mitotic drug griseofulvin induces apoptosis of human germ cell tumor cells through a connexin 43-dependent molecular mechanism. *Apoptosis*, 18 (4), 480 – 491.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2003). Natural products as

- sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66 (7), 1022 – 1037.
- Ng, L., Libertino, J. M. (2003). Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *The Journal of Urology*, 169 (1), 5 – 11.
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Reviews Cancer*, 2, 815 – 825.
- Nigg, E. A. (2007) Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends in Cell Biology*, 17 (5), 215 – 21.
- Nigg, E. A. (2006). Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 119 (12), 2717 – 2723.
- Nigg, E. A., Stearns, T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biology*, 13 (10), 1154 – 1160.
- Ogden, A., Rida, P. C. G., Aneja, R. (2012). Let's huddle to prevent a muddle: centrosome declustering as an attractive anticancer strategy. *Cell Death & Differentiation*, 19 (8), 1255 – 1267.
- Ogden, A., Cheng A., Rida, P. C. G., Pannu, V., Osan, R., Clewley, R., Aneja, R. (2014), Quantitative multi-parametric evaluation of centrosome declustering drugs: Centrosome amplification, mitotic phenotype, cell cycle and death. *Cell Death & Disease*. 5 (5), e1204
- Ohira, M., Iwasaki, Y., Tanaka, C., Kuroki, M., Matsuo, N., Kitamura, T., et al. (2015). A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1850 (9), 1676 – 1684.
- Ozcan Kara, P., Kara, T., Kara Gedik, G., Kara, F., Sahin, O., Ceylan Gunay, E., Sari, O. (2011). The role of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in differentiating between benign and malignant adrenal lesions. *Nuclear Medicine Communications*, 32 (2), 106 – 112.
- Pannu, V., Rida, P.C.G., Celik, B., Turaga, R.C., Ogden, A., Cantuaria, G., Gopalakrishnan, J., Aneja, R. (2014). Centrosome-declustering drugs mediate a two-pronged attack on interphase and mitosis in supercentrosomal cancer cells. *Cell Death Discovery*, 5 (11), e1538.
- Panda, D., Rathinasamy, K., Santra, MK., Wilson, L. (2005). Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102 (28), 9878 – 83.
- Papotti, M., Libè, R., Duregon, E., Volante, M., Bertherat, J., Tissier, F. (2011). The Weiss Score and Beyond — Histopathology for Adrenocortical Carcinoma. *Hormones & Cancer*, 2 (6), 333 – 340.
- Park, B. K., Kim, C. K., Kim, B., Lee, J. H. (2007). Comparison of Delayed Enhanced CT and Chemical Shift MR for Evaluating Hyperattenuating Incidental Adrenal Masses *Radiology*, 243 (3), 760 – 765.
- Pawar, S., Donthamsetty, S., Pannu, V., Rida, P. (2014). KIFCI, a novel putative prognostic biomarker for ovarian adenocarcinomas: delineating protein interaction networks and signaling circuitries.

Journal of Ovarian Research, 7, 53.

- Pennanen, M., Heiskanen, I., Sane, T., Remes, S., Mustonen, H., Haglund, C., Arola, J. (2015). Helsinki score-a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. *Human Pathology*, 46 (3), 404 – 410.
- Pera, B., Calvo-Vidal, M. N., Ambati, S., Jordi, M., Kahn, A., Díaz, J. F., Fang, W., Altmann, K. H., Cerchietti, L., Moore, M. A. (2015). High affinity and covalent-binding microtubule stabilizing agents show activity in chemotherapy-resistant acute myeloid leukemia cells. *Cancer Letters*, 368 (1), 97 – 104.
- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., Doxsey, S. J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Research*, 58 (17), 3974 – 3985.
- Quinkler, M., Hahner, S., Wortmann, S., Johanssen, S., Adam, P., Ritter, C., Strasburger, C., Allolio, B., Fassnacht, M. (2008). Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (6), 2057 – 2062.
- Quintyne, N. J., Reing, J. E., Hoffelder, D. R., Gollin, S. M., Saunders, W. S. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*, 307 (5706), 127 – 129.
- Raab, M. S., Breikreutz, I., Anderhub, S., Rønneest, M. H., Leber, B., Larsen, T. O., Weiz, L., Konotop, G., Hayden, P. J., Podar, K., Fruehauf, J., Nissen, F., Mier, W., Haberkorn, U., Ho, A. D., Goldschmidt, H., Anderson, K. C., Clausen, M. H., Krämer, A. (2012). GF-15, a novel inhibitor of centrosomal clustering, suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 72 (20), 5374 – 5385.
- Rainey, W. E., Bird, I. M., Mason, J. I. (1994). The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100 (1 – 2), 45 – 50.
- Rathinasamy, K., Jindal, B., Asthana, J., Singh, P. (2010). Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer*, 10, 23.
- Rebacz, B., Larsen, T. O., Clausen, M. H., Rønneest, M. H., Löffler, H., Ho, A. D., Krämer, A. (2007). Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer Research*, 67 (13), 6342 – 6350.
- Riss, TL., Moravec, RA., Niles AL., Duellman, S., Benink, HA., Worzella TJ., Minor, L. (2013, Updated 2016) Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- Rodriguez, H., Hum, D. W., Staels, B., & Miller, W. L. (1997). Transcription of the human genes for cytochrome P450scc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. *The Journal of Clinical Endocrinology &*

Metabolism, 82 (2), 365 – 371.

- Roshani, L., Fujioka, K., Auer, G., Kjellman, M., Lagercrantz, S., Larsson, C. (2002). Aberrations of centrosomes in adrenocortical tumors. *International Journal of Oncology*, 20 (6), 1161 – 1165.
- Rønnest, M. H., Rebacz, B., Markworth, L., Terp, A. H., Larsen, T. O., Krämer, A., & Clausen, M. H. (2009). Synthesis and Structure–Activity Relationship of Griseofulvin Analogues as Inhibitors of Centrosomal Clustering in Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (10), 3342 – 3347.
- Salisbury, J. L. (2004). Centrosomes: Sfilp and Centrin Unravel a Structural Riddle. *Current Biology*, 14 (1), R27 – R29.
- Samandari, E., Kempná, P., Nuoffer, J.-M., Hofer, G., Mullis, P. E., Flück, C. E. (2007). Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. *The Journal of Endocrinology*, 195 (3), 459 – 472.
- Sbiera, S., Leich, E., Liebisch, G., Sbiera, I., Schirbel, A., Wiemer, L., Matysik, S., Eckhardt, C., Gardill, F., Gehl, A., Kendl, S., Weigand, I., Bala, M., Ronchi, C. L., Deutschbein, T., Schmitz, G., Rosenwald, A., Allolio, B., Fassnacht, M., Kroiss, M.. (2015). Mitotane inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*, 156 (11), 3895 – 3908.
- Schteingart, D. E., Doherty, G. M., Gauger, P. G., Giordano, T. J., Hammer, G. D., Korobkin, M., Worden, F. P. (2005). Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. (Vol. 12, pp. 667–680). Presented at the Endocrine-related cancer, BioScientifica.
- Schteingart, D. E., Sinsheimer, J. E., Counsell, R. E., Abrams, G. D., McClellan, N., Djanegara, T., Hines, J., Ruangwises, N., Benitez, R., Wotring, L. L. (1993). Comparison of the adrenalytic activity of mitotane and a methylated homolog on normal adrenal cortex and adrenal cortical carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 31 (6), 459 – 466.
- Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R., & Panda, D. (2008). Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 60 (6), 368 – 375.
- Stanton, R.A., Gernet, K.M., Nettles, J.H., Aneja, R. (2011). Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Medical Research Reviews*, 31 (3), 443 – 481.
- Stigliano, A., Chiodini, I., Giordano, R., Faggiano, A., Canu, L., Della Casa, S., Loli, P., Luconi, M., Mantero, F., Terzolo, M.. (2015). Management of adrenocortical carcinoma: a consensus statement of the Italian Society of Endocrinology (SIE). *Journal of Endocrinological Investigation*, 39 (1), 103 – 121.
- Szolar, D. H., Korobkin, M., Reittner, P., Berghold, A., Bauernhofer, T.,

- Trummer, H., Schoellnast, H., Preidler, K. W., Samonigg, H. (2005). Adrenocortical Carcinomas and Adrenal Pheochromocytomas: Mass and Enhancement Loss Evaluation at Delayed Contrast-enhanced CT1. *Radiology*, 234 (2), 479 – 485.
- Takizawa, C. G., Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology*, 12 (6), 658 – 665.
- Terzolo, M., Zaggia, B., Allasino, B., De Francia, S. (2014). Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 21 (3), 159 – 165.
- Terzolo, M., Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. (2007). Adjuvant Mitotane in Adrenocortical Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 357 (12), 2372 – 2380.
- Uen Y.H., Liu D.Z., Weng M.S., Ho Y.S., Lin S.Y. (2007). NF-kappaB pathway is involved in griseofulvin-induced G2/M arrest and apoptosis in HL-60 cells. *Cell Biochemistry*, 101 (5), 1165 – 75.
- Vargas, F. R., Brentani, R. R., Prolla, P. A. (2010). Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p. R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Human Mutation*, 31 (2), 143 – 150.
- Vesselinovitch, S. D., Mihailovich, N. (1968). The inhibitory effect of griseofulvin on the “promotion” of skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 28 (12), 2463 – 2465.
- Vindya, N. G., Sharma, N., Yadav, M., Ethiraj, K. R. (2015). Tubulins - the target for anticancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15 (1), 73 – 82.
- Wang, T., Rainey, W. E. (2012). Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 35 1(1), 58 – 65.
- Weber, K., Wehland, J., Herzog, W. (1976). Griseofulvin interacts with microtubules both in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*. 102 (4), 817 – 29.
- Wilson, E. B. (1925). *Cell In Development And Heredity*, 3., revidierte Edition erschienen bei Macmillan, Seite 1145 – 1203.
- Wortmann, S., Quinkler, M., Ritter, C., Kroiss, M., Johanssen, S., Hahner, S., Allolio, B., Fassnacht, M. (2010). Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 162 (2), 349 – 356.
- Yoo, J. Y., McCoy, K. L., Carty, S. E., Stang, M. T., Armstrong, M. J., Howell, G. M., Bartlett, D. L., Tublin, M. E., Yip L. (2015). Adrenal Imaging Features Predict Malignancy Better than Tumor Size. *Annals of Surgical Oncology*, 22 Supplement 3 (S3), 721 – 727.
- Zhou, J., Gupta, K., Aggarwal, S., Aneja, R., Chandra, R., Panda, D.,

- Joshi, H.C. (2003). Brominated derivatives of noscapine are potent microtubule-interfering agents that perturb mitosis and inhibit cell proliferation. *Molecular Pharmacology*. 63 (4), 799 – 807.
- Zini, L., Porpiglia, F., Fassnacht, M. (2011). Contemporary Management of Adrenocortical Carcinoma. *European Urology*. 60 (5), 1055 – 65.
- Zyss, D., Gergely, F. (2009). Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends in Cell Biology*, 19 (7), 334 – 346.

7. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Willenberg möchte ich mich für seine immer freundliche, humorvolle und unkomplizierte Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit sehr bedanken.

Von ganzem Herzen und vor allem möchte ich mich bei Dr. med. Matthias Haase bedanken. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit niemals durchführen, geschweige denn beenden können. Die immer freundliche, geduldige, beständige und weisungsgebende Unterstützung war für mich nie selbstverständlich, vor allem aber unersetzlich. Danke, Matthias.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei all den lieben Weggefährten im Labor: Roswitha, Birgit, Ulla, Maggi, Carolin, Anja, Markus, Till, ... Danke für die vielen schönen Momente im Labor und Drumherum und Eure Hilfe!

Außerdem gebührt großer Dank allen meinen geduldigen Freunden, herausragend aber: Jan, der mich in der Laborphase ertragen, gefahren und auch sonst in jeder erdenklichen Form unterstützt hat. Myrella, denn ohne unsere Schreibsessions wäre ich niemals fertig geworden. Nora (auch fürs Ertragen) und Lotte und Mathias fürs Korrekturlesen! Daniel danke ich ebenfalls fürs Korrekturlesen, Einspringen und natürlich für die Abgabe... Aber auch herzlichen Dank an alle meine anderen lieben Freunde für die vielen gemeinsam gefeierten Meilensteine oder zusammen ertragenen Rückschläge!

Dank gebührt auch meiner mich stets antreibenden Familie. Vor allem meinem Großvater für seine Unterstützung und seinen unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten.