

**Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden**

**Der Einfluss von Griseofulvin auf die Biosynthese
adrenokortikaler Hormone und die Anordnung
zentrosomaler Strukturelemente in humanen
Nebennierenrindenzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Senai Bokredenghel
2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Holger Willenberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Für meine geliebte Mutter

Zusammenfassung

Das antifungale Medikament Griseofulvin interferiert mit der Anordnung der Mikrotubuli in menschlichen Zellen. Indirekt könnte Griseofulvin damit auch die Steroidbiosynthese und die intrazelluläre Verteilung von Zentrosomen beeinflussen, da deren Regulation mit dem Mikrotubulusapparat eng verknüpft ist.

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Effekte von Griseofulvin auf die Biosynthese adrenokortikaler Hormone sowie auf die Anordnung zentrosomaler Strukturelemente in humanen Nebennierenrindenzellen.

Für die *in vitro* Untersuchungen wurde die adrenokortikale Tumorzelllinie NCI-H295R kultiviert und für jeweils 24h mit DMSO allein oder mit Griseofulvin in Konzentrationen zwischen 1µM und 100 µM für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen von Dehydroepiandrosteron (DHEA), Aldosteron und Cortisol im Überstand wurden daraufhin mittels eines „Enzyme-linked Immunosorbent-Assay“ (ELISA) bestimmt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der NCI-H295R Zellen zur Analyse der intrazellulären Verteilung von *steroidogenic factor 1* (SF-1) und γ -Tubulin. Die Verteilung der γ -Tubulin-Expression wurde mittels Immunhistochemie in unterschiedlichen in Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe (n= 25) untersucht.

Die Exposition mit Griseofulvin führte in NCI-H295R Zellen zu einem signifikanten dosisabhängigen Anstieg der Aldosteron- (5-fach, $p \leq 0,05$) und der DHEA-Konzentration (3-fach, $p \leq 0,046$). Die Inkubation mit Griseofulvin bewirkte eine Fragmentierung der zytoplasmatischen Verteilung von γ -Tubulin und eine Akkumulation von SF-1 in umschriebenen Strukturen der perinukleären Region, gefolgt von einer nukleären Translokation bei höheren Dosierungen.

Griseofulvin beeinflusst die Steroidbiosynthese, begleitet von einer subzellulären veränderten Verteilung von γ -Tubulin und SF-1. Die Expression von γ -Tubulin scheint sich in verschiedenen Tumorentitäten zu unterscheiden.

Summary

The antifungal drug griseofulvin interferes with the arrangement of microtubules in human cells. Indirectly, griseofulvin could also influence steroid biosynthesis and the intracellular distribution of centrosomes since their regulation is closely linked to the microtubule apparatus.

The aim of the work is to investigate the effects of griseofulvin on the biosynthesis of adrenocortical hormones and on the arrangement of centrosomal structural elements in human adrenocortical cells.

For the *in vitro* studies, the adrenocortical tumor cell line NCI-H295R was cultivated and incubated for 24 hours with DMSO alone or with griseofulvin in concentrations between 1 μ M and 100 μ M for 24 hours. The concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA), aldosterone and cortisol in the supernatant were then determined using an “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA). This was followed by immunofluorescence staining of the NCI-H295R cells to analyze the intracellular distribution of steroidogenic factor 1 (SF-1) and γ -tubulin. The distribution of γ -tubulin expression was examined by immunohistochemistry in different tumor tissues embedded in paraffin (n = 25).

Exposure to griseofulvin resulted in a significant dose-dependent increase in aldosterone (5-fold, $p \leq 0.05$) and DHEA concentration (3-fold, $p \leq 0.046$) in NCI-H295R cells. Incubation of the cell line with griseofulvin caused fragmentation of the cytoplasmic distribution of γ -tubulin and accumulation of SF-1 in circumscribed structures of the perinuclear region, followed by nuclear translocation at higher doses.

Griseofulvin influences steroid biosynthesis, accompanied by a subcellular altered distribution of γ -tubulin and SF-1. The expression of γ -tubulin appears to differ in different tumor entities.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Kortikotropin	DHEA (-S)	Dehydroepiandrosteron (-Sulfat)
ANG	Angiotensin	DIAPH1	<i>diaphanous homolog 1</i>
ANG II	Angiotensin II	DMSO	Dimethylsulfoxid
APA	Aldosteron- produzierendes Adenom	DNA, DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	DNase	<i>deoxyribonuclease</i> , Desoxyribonuklease
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS	ER	endoplasmatisches Retikulum
CPA	Cortisol- produzierendes Adenom	GTP, GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
CRH	<i>corticotropin releasing hormon</i>	HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	HPA	<i>hypothalamic- pituitary-adrenocortical</i>
DAX-1	<i>Dosage sensitive sex reversal (DSS) - adrenal hypoplasia congenital (AHC) critical region on the X chromosome, gene</i>	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
		LDL	<i>low-density lipoprotein</i>

MAD2L1	<i>mitotic arrest deficient 2- like 1 protein</i>	RNA, RNS	<i>ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
MAPK	<i>mitogen activated proteinkinase</i>	RPM	<i>rounds per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
MAPs	<i>microtubule associated proteins</i>	SF-1	<i>steroidogenic factor-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNS</i>	StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>	Sumo Molekül	<i>small ubiquitin like modulator</i>
OD	Optische Dichte	Wnt	<i>wingless-related integration site</i>
PBS	<i>phosphate-buffered- saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>		
PCR	<i>Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion</i>		
PKA	Proteinkinase A		
POMC	Proopiomelanocortin		
RAAS	Renin/ Angiotensin/Aldosteron System		

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Anatomie und Organogenese der Nebenniere	1
1.2 Steroidhormonbiosynthese	3
1.3 Mikrotubulusapparat	5
1.3.1 Aufbau	5
1.3.2 Wechselwirkung mit der Steroidhormonbiosynthese	6
1.3.3 Zentrosomales <i>Clustering</i>	7
1.4 Nebennierenrindentumore	8
1.4.1 Epidemiologische und diagnostische Aspekte	8
1.4.2 Genetische Veränderungen bei Nebennierenkarzinomen	9
1.5 Ziel der Arbeit	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Zellkultur	11
2.1.1 NCI-H295/NCI-H295R Zellen	11
2.1.2 Kultivierung der NCI-H295R Zellreihe	12
2.1.3 Mycoplasmentest	13
2.2 Hormon ELISA	14
2.2.1 Material und Methoden	14
2.2.2 Versuchsaufbau	14
2.2.3 Messung und Auswertung	15
2.3 Kaliummessung im Mediumüberstand	15
2.3.1 Material und Methodik	15
2.3.2 Versuchsaufbau	15
2.3.3 Auswertung	16
2.4 Immunfluoreszenzfärbung der NCI-H295R Zellen	16
2.4.1. Material und Methodik	16
2.4.2 Auswertung	17
2.5 Immunfluoreszenz humaner Paraffinschnitte	17
2.5.1 Material und Methodik	17
2.5.2 Auswertung	18
2.5.3 Ethikvotum	18
2.6 Quantitative TaqMan PCR	18
2.6.1 Versuchsaufbau	18
2.6.2 RNA Isolierung	19
2.6.3 RNA-Messung	19
2.6.4 cDNA-Synthese	20
2.6.5 TaqMan PCR	21
2.6.6 Auswertung	22

3 ERGEBNISSE.....	23
3.1 ELISA.....	23
3.1.1 Aldosteron.....	23
3.1.2 DHEA	24
3.1.3 Cortisol	25
3.2 Kalium	26
3.3 Immunfluoreszenz der NCI-H295R Zellen	26
3.4 Immunfluoreszenz humaner Paraffinschnitte	29
3.5 TaqMan PCR.....	33
4 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	34
4.1 Diskussion.....	34
4.2 Schlussfolgerungen	40
5 LITERATURVERZEICHNIS	41

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Organogenese der Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig angelegt und befinden sich beidseits am oberen Nierenpol. Schon makroskopisch ist das Mark von der Rinde zu unterscheiden. Während im Mark Katecholamine produziert werden, findet in der Rinde die Steroidhormonbiosynthese statt. Mikroskopisch ist eine zonale Gliederung der Rinde zu erkennen. Von außen nach innen, ist die Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis darstellbar [1].

Während der Entwicklung einer regelrechten Anatomie und Funktion der Nebennieren, greifen verschiedene Genexpressionsmuster ein, die eine zeitliche und räumliche Wirkung ermöglichen [2, 3].

In der vierten Entwicklungswoche leitet die Verdichtung der Zölomepithelzellen in den mittleren Anteilen der Urogenitalleiste die Entwicklung der Nebennieren ein [2, 4]. Diese Kondensation und anschließende Proliferation der Zölomzellen, stellt den Ursprung des steroidogenen Gewebes in der Nebennierenrinde und den Gonaden dar [5]. Der adrenale Anteil ist zur dorsalen Aorta gelegen [5]. Ab der achten Entwicklungswoche lassen sich zwei verschiedene Zonen in der adrenalen Anlage unterscheiden. Die definitive äußere Zone, besteht aus kleineren Zellen, die als adrenale Vorläuferzellen betrachtet werden [2, 6]. Die innere Zona fetalis, welche aus großen kubischen Zellen besteht, exprimiert die benötigten Enzyme zur Synthese von Dehydroepiandrosteron und dem sulfatierten Derivat DHEA-S, welche in der Plazenta zu Östrogen umgewandelt werden [2, 7]. Ab der neunten Entwicklungswoche wandern chromaffine Zellen aus der Neuralleiste in die adrenale Anlage ein und bilden damit das spätere Nebennierenmark [8]. Postnatal bildet sich die Zona fetalis zurück und aus der adrenalen äußeren Zone etabliert sich die typische zonale Gliederung in Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis [9, 10].

Auf molekularer Ebene wird die adrenale Organogenese durch eine Vielzahl verschiedener Genprodukte gesteuert. Eine hervorgehobene Rolle spielt hierbei der *steroidogenic factor-1* (SF-1). In einem Mausversuch wurde ersichtlich, dass SF-1 ab dem neunten Entwicklungstag in der Urogenitalleiste exprimiert

wird [11]. Ab dem elften Entwicklungstag ist SF-1 im adrenalen Primordium nachweisbar, insbesondere bei den adrenokortikalen Vorläuferzellen [12]. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch beim Menschen nachgewiesen [13]. Neben diesen räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster, die eine Beteiligung von SF-1 in der Organogenese der Nebenniere wahrscheinlich machte, konnte auch schon früh die funktionelle Bedeutsamkeit von SF-1 nachgewiesen werden. So zeigte eine Abwesenheit von SF-1 eine vermehrte Apoptose der steroidogenen Zellen im adrenalen Primordium. Zudem führte eine Ausschaltung des Ftz-F1 Gens, welches für SF-1 kodiert, im Mausversuch zu einer Nebennierenagenesie [14]. Für die Abläufe auf transkriptioneller Ebene ist das Zusammenwirken von SF-1 mit DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 19*) von besonderer Bedeutung. Aufgrund der Kolo-kalisation von Dax-1 mit SF-1 in der adrenalen Entwicklung wurde schon früh eine Interaktion zwischen den beiden nukleären Rezeptorproteinen vermutet [15]. Später konnte eine Arbeitsgruppe die Abhängigkeit der Genexpression von DAX-1 und SF-1 darstellen. Funktionell arbeiten DAX und SF-1 gegensätzlich zueinander. DAX-1 bildet mit SF-1 einen Komplex. Dabei wird SF-1 in seiner transkriptionellen Aktivität inhibiert. Das Ausmaß dieser Hemmung ist abhängig von dem Verhältnis zwischen DAX-1 und SF-1. Überwiegt die Konzentration von DAX-1 die von SF-1 in der Zelle, ist eher eine transkriptionelle Hemmung zu erwarten (siehe Abb.1). Gegensätzliches wäre bei einem SF-1 Überschuss zu beobachten. Die transkriptionelle Aktivität würde zunehmen [16].

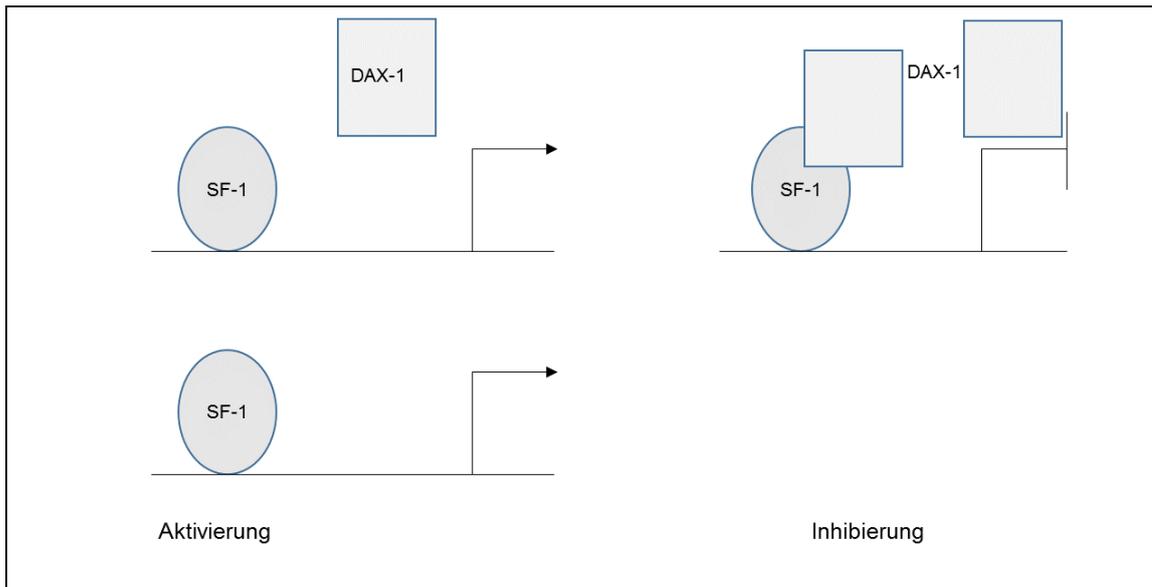


Abb.1: Dax-1 und SF-1 Wechselwirkung auf transkriptioneller Ebene

Bei Überwiegen von SF-1 kommt es zu vermehrter Genexpression. Umgekehrt führt ein DAX-1 Überschuss zu vermehrter Inhibierung. (Graphik wurde selbst erstellt).

1.2 Steroidhormonbiosynthese

Kennzeichnend für die Nebennierenrinde ist die *de novo*-Synthese von Steroiden. Da die adrenokortikalen Zellen nur marginale Mengen der lipophilen Steroide speichern können, ist eine rasche Regulation der Steroidhormonbiosynthese notwendig. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei das StAR protein (*Steroid acute regulatory protein*), welches für den Transport des Cholesterins von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran zuständig ist [17]. Die Zonierung der Nebennierenrinde ermöglicht aufgrund unterschiedlicher Enzymexpressionsmuster ein spezifisches Sekretionsprofil. So wird in der Zona glomerulosa, aufgrund einer Expression der Aldosteronsynthase und dem Fehlen der 17 α -Hydroxylase Aldosteron produziert. In der Zona fasciculata führt die Expression der 17 α -Hydroxylase und der 11 β -Hydroxylase zur Bildung von Cortisol. Ein spezifisches Expressionsmuster ist auch in der Zona reticularis zu finden. Hier werden Androgene, wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion produziert [1].

Bei der Regulation der Nebennierenrinde spielen das Renin-Angiotensin-

Aldosteron-System (RAAS) und die HPA (*hypothalamic-pituitary-adrenocortical*) Achse eine wichtige Rolle. Das RAAS reguliert die Aldosteronsekretion. Verschiedene Stimuli, wie vermindertes Blutvolumen, erniedrigte Chloridkonzentration im Serum oder die Aktivität des Sympathikus bewirken eine Freisetzung des Renins. Am Ende der darauffolgenden Enzym-Kaskade erfolgt eine vermehrte Sekretion von Aldosteron, welches nun seine Salz und Wasser sparende Wirkung darüber entfaltet [18].

Die HPA Achse ist ein negatives Feedback System. Durch verminderte Cortisolspiegel, Stressoren und in Abhängigkeit des zirkadianen Rhythmus erfolgt im Hypothalamus die Sekretion von *Corticotropin-releasing Hormone* (CRH). CRH bewirkt im Hypophysenvorderlappen die Produktion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). ACTH wirkt am Melanocortin Typ 2 Rezeptor (MC2R), der zu der Gruppe G-protein gekoppelter 7-Transmembran-Domänen Rezeptoren gehört [19]. Der Rezeptor ist in allen Zonen der Nebennierenrinde zu finden [20]. ACTH aktiviert den zellulären cAMP-Signalweg [21]. Die erhöhten cAMP Spiegel bewirken eine Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A, die über Phosphorylierung verschiedener Zielproteine zu einer vermehrten Expression von SF-1 führt [22]. SF-1 reguliert die Expression wichtiger Bestandteile der Steroidbiosynthese, wie zum Beispiel den Transport des Cholesterins mittels dem StAR Protein [23, 24]. Ferner wird auch die Expression wichtiger Steroidhydroxylasen gesteuert [25].

1.3 Mikrotubulusapparat

1.3.1 Aufbau

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus Mikrotubuli, Intermediär - und Aktinfilamenten. Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinstrukturen, die maßgeblich an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. Dazu gehören die Zellteilung, der Stofftransport, die mechanische Entlastung und die Anordnung der Zellorganellen [26-28]. Aufgrund ihrer elektrischen Ladung kann man ein Minus- und ein Plus-Ende beschreiben [28]. Sie sind Heterodimere, die sich jeweils aus einer Einheit α -Tubulin und β -Tubulin zusammensetzen [26]. Auf- und Abbau findet an beiden Enden gleichzeitig statt. Hierbei stellt sich ein Gleichgewicht ein, welches als dynamische Instabilität bezeichnet wird [29]. Dabei wechseln sich Phasen abrupter Verkürzung und Verlängerung ab. Das an den Tubulinuntereinheiten gebundene GTP ermöglicht die Assoziation, während die Hydrolyse zu GDP eine Dissoziation bewirkt [28, 30]. Das Verhältnis von GTP zu GDP bestimmt, ob die Verlängerung oder Verkürzung am Mikrotubulus überwiegt [28]. Entscheidenden Einfluss auf dieses Gleichgewicht haben Hilfsproteine, die *microtubule-associated proteins* (MAPs) [31]. Ferner regulieren auch posttranslationale Prozesse an den Tubulinuntereinheiten das dynamische Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Dissoziation [32, 33]. Ein Calcium Überschuss fördert die Depolymerisation [33].

Die Mikrotubuli entspringen einem *microtubule organizing center* (MTOC) [34]. Es gibt verschiedene MTOC-Typen. Einer davon ist das Zentrosom. Es besteht aus einem Paar Zentriolen und einer umgebenden perizentriolaren Matrix. Es organisiert die Zellteilung und ist der Ausgangspunkt der Mitosespindel. Das Zentrosom liegt üblicherweise einzeln vor, teilt sich aber in der S-Phase um einen regelrechten Ablauf der Mitose zu gewährleisten [35, 36]. Zentrosomen beinhalten γ -Tubulin, welche in einer ringartigen Struktur organisiert sind. γ -Tubulin gleicht aufgrund seiner elektrischen Ladung einem Plus-Ende eines Mikrotubuli und ermöglicht dadurch die Anheftung einer Tubulinuntereinheit. Damit ermöglicht der γ -Tubulin Ring im Zentrosom die *de novo* Bildung

(Nukleation) des Mikrotubulusapparates [37].

1.3.2 Wechselwirkung mit der Steroidhormonbiosynthese

Die Steroidhormonbiosynthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Mitochondrium, wobei der Substrataustausch zwischen ER und dem Mitochondrium bislang noch nicht vollständig verstanden ist. Dabei scheint es eine Interaktion zwischen dem Mikrotubulusapparat und der Steroidhormonbiosynthese zu geben. So zeigten einige Studien, dass der Transport von Cholesterin zum P450 *side chain cleavage* Enzym (P450 scc) durch die Gabe von Inhibitoren der Polymerisation der Mikrotubuli verringert wird [38]. Ferner konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass durch die Inhibition der Mikrotubuli die Aufnahme radioaktiv markierter LDL und HDL Moleküle abnimmt [39]. Außerdem greift der Mikrotubulusapparat in die Steroidogenese über die Anordnung der Zellorganellen ein [40]. Die Verbindung zwischen der Steroidogenese und dem Mikrotubulusapparat wird im cAMP-Signalweg gesehen. Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wirkt ACTH über den cAMP-Signalweg auf seine Zielgene. So konnte eine Arbeitsgruppe darstellen, dass die Gabe von ACTH und einem cAMP-Analogen die Beweglichkeit der Mitochondrien ansteigen ließ [41]. Davor wurde schon die Assoziation des Mikrotubulusapparat mit dem Mitochondrium [42] und die Teilnahme von *microtubule associated proteins* (MAPs), wie Kinesin und Dynein, bei mitochondrialer Bewegung dargestellt [43]. Der ACTH/ cAMP-Signalweg bewirkt die erhöhte Beweglichkeit der Mitochondrien über den RhoA *diaphanous homolog 1* (DIAPH1) abhängigen Signalweg [40]. cAMP erhöht die Aktivität der Proteinkinase A, welche den Gehalt an Sphingosin-1-phosphat erhöht. Das führt zu einer erhöhten Konzentration an Calcium, welches RhoA aktiviert. RhoA interagiert mit DIAPH1. Gemeinsam ordnen sich das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrium mithilfe des Zytoskeletts, inklusive des Mikrotubulusapparat, aneinander an. Dadurch könnte der Stoffaustausch begünstigt und die Steroidhormonbiosynthese gefördert werden [40].

1.3.3 Zentrosomales *Clustering*

Die Anzahl der Zentrosomen wird stark reguliert. Veränderungen von Tumorsuppressor- und Onkogenen können zu einer zentrosomalen Amplifikation führen [44]. Zentrosomale Aberrationen sind häufig in bösartigen Tumoren zu finden und sind mit chromosomaler Instabilität und malignen Verhalten vergesellschaftet [45-47]. Chromosomale Instabilität kann als Ursache des Verhaltens diverser maligner Entitäten gesehen werden [48, 49]. Überzählige Zentrosomen bilden während der Zellteilung mehrere Spindelpole. Multipolare Mitosen sind in vielen malignen Tumoren zu beobachten und stehen im Verdacht eine chromosomale Instabilität zu begünstigen [45]. Es wurde aber auch gezeigt, dass das Ausbilden mehrerer Spindelpole während der Mitose, zu einer erhöhten Sterblichkeit bei den betroffenen Tumorzellen führt [48, 50, 51]. Um das zu vermeiden, werden die überzähligen Zentrosomen auf zwei Spindelpole verteilt. Man spricht hierbei von zentrosomalen *Clustering*. Dieser Vorgang wurde vor knapp 30 Jahren bei einer Neuroblastom-Zelllinie erstmalig beschrieben [52]. Die Eigenschaft überzählige Zentrosomen bipolar anzuordnen, ist keine Eigenschaft, die nur malignen Gewebe zugrunde liegt. Auch Hepatozyten besitzen, aufgrund einer physiologischen Polyploidie, überzählige Zentrosomen. Sie sind auch zu einem zentrosomalen *Clustering* befähigt [53]. Während des zentrosomalen *Clustering* greifen diverse Mechanismen. So konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass überschüssige Zentrosomen zu einer Aktivierung des MAD2L1 (*mitotic arrest deficient 2-like 1*) Proteins führen. Dies führt zu einem verspäteten Eintritt in die Anaphase und ermöglicht dadurch das zentrosomale Clustering und das Vermeiden von multipolaren Mitosen [54, 55]. Ferner begünstigt der Zug des Spindelapparates während der Mitose zentrosomales *Clustering* durch eine bipolare Positionierung der Zentrosomen [55]. Interessanterweise führt eine Verminderung des Spindelzugs, begünstigt durch den Verlust wichtiger Hilfsproteine, zu einem vermehrten Auftreten von multipolaren Mitosen [56]. Zudem konnte in *Drosophila* Fliegen gezeigt werden, dass die Induktion zentrosomaler Aberration zu einer Hyperproliferation und anschließender Tumorprogression führen kann [57]. Da zentrosomale Amplifikation fast ausschließlich bei Tumorzellen auftritt, ist die Hemmung des zentrosomalen *Clustering* als therapeutisches Mittel denkbar [45]. Das

Antimykotikum Griseofulvin inhibiert das *Clustering* überschüssiger Zentrosomen [58]. Dabei ist nicht ganz geklärt, ob Griseofulvin den Mikrotubulusapparat direkt oder indirekt über assoziierte Proteine hemmt [59]. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass Griseofulvin in adrenokortikalen Karzinomzellen zu einer vermehrten Apoptose führt [60].

1.4 Nebennierenrindentumore

1.4.1 Epidemiologische und diagnostische Aspekte

Die Inzidenz von Nebennierentumoren ist altersabhängig und steigt mit zunehmendem Lebensalter auf mehr als fünf Prozent an. Aufgrund ihrer variablen Biologie können Nebennierentumore unterschiedliche klinische Probleme verursachen [61, 62]. Zum einen sind Aldosteron-produzierende Adenome oft die Ursache einer sekundären Hypertonie («Conn-Syndrom»). Andererseits können sie als Cortisol-produzierende Tumore Ursache eines Cushing-Syndroms sein. Noch andere Hormonexzesssyndrome (z.B. Androgenexzess) sind zwar seltener, aber dann in vielen Fällen mit Malignität assoziiert [62]. Der Sekretionsstatus von Nebennierenrindenzellkarzinomen schwankt je nach Literatur zwischen 25 bis 75 Prozent [63, 64]. Es scheint aber, dass adrenokortikale Karzinome bei ausführlicher und gründlicher Diagnostik meist Hormone sezernieren [63].

Ein weiteres Charakteristikum bei Nebennierenrindenzellkarzinomen ist die Co-Sekretion von Cortisol und Androgenen [63]. Die histopathologische Untersuchung bereitet oft Schwierigkeiten bezüglich der Dignität, selbst für erfahrene Pathologen. Dies hat eine hohe klinische Relevanz, da die Prognose bei einem malignen Befund deutlich schlechter ist [65]. Aufgrund dieser Problematik schlug der Pathologe L.M. Weiss ein histologisches Bewertungssystem vor, auf dessen Basis adrenokortikale Neoplasien bewertet werden sollen, der *Weiss Score* [66]. Seitdem hat sich der *Weiss Score* in der klinischen Praxis etabliert und sich zu einem weltweiten Standard entwickelt. Dabei bedient sich der *Weiss Score* neun histologischen Kriterien (siehe Abb.2). Zu den Kriterien zählen: Ein hoher nukleärer Grad nach den Kriterien von

Fuhrman [67], eine hohe Mitose-Rate, atypische Zellteilungen, mehr als 25 Prozent der Tumorzellen sind blasse, lipidreiche *clear cells*, diffuse Zytoarchitektur, Nekrosen und entweder Invasion der venösen ,sinusoidalen oder kapsulären Strukturen [66]. Wenn drei oder mehr dieser genannten Kriterien zutreffen, ist ein malignes Verhalten sehr wahrscheinlich [68]. Ferner korreliert ein hoher Weiss Score auch mit einer schlechteren Prognose [69].

Charakteristika	Punkte
Kernatypie (mäßig bis stark)	1
Mitosen	1
Atypische Mitosen (ja/nein)	1
Helle Zellen <25 Vol. Anteil	1
Diffuses Wachstum	1
Veneneinbruch	1
Sinus-Einbruch	1
Tumorkapselinvasion	1
Nekrosen (ja/nein)	1

Abb.2: Weiss Score

Histopathologisches Bewertungssystem zur Beurteilung adrenokortikaler Neoplasien hinsichtlich der Dignität.

1.4.2 Genetische Veränderungen bei Nebennierenkarzinomen

Nebennierenkarzinome weisen eine hohe genetische Instabilität auf. Eine Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation der genomischen Instabilität mit der Tumorgroße und der Malignität darlegen [70]. Eine zentrosomale Amplifikation konnte sowohl in Adenomen, als auch in Karzinomen der Nebennierenrinde beobachtet werden [71]. Bezüglich der Pathogenese sind noch viele Fragen offen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Überexpression von *Insulin-like growth factor 2* (IGF-II) besteht. Durch *in vitro* Experimente wurde ersichtlich, dass IGF-II über Aktivierung des IGF-1 Rezeptors zur adrenalen Tumorproliferation beiträgt [72]. Zudem sind häufig inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und aktivierende Mutationen des Protoonkoproteins β -Catenin in Karzinomen der Nebennierenrinde zu beobachten [73]. Der Wnt (*wingless-related integration site*)/Beta-Catenin-Signalweg kann sowohl bei gutartigen als auch bei bösartigen Tumoren der Nebennierenrinde aktiviert werden [74]. So konnte bei Transkriptom-Studien

gezeigt werden, dass Wnt/ β -Catenin-Zielgene in Nebennierenrindencarcinomen überexprimiert werden [75]. Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bei der Nebennierentumorgenese konnte im Mausmodell dargestellt werden. Die konstitutive Aktivierung von β -Catenin in der Nebennierenrinde transgener Mäuse führte zur Entwicklung makroskopischer Adenome [76]. Ebenfalls wurde beschrieben, dass Veränderungen der DNA-Methylierung und der MicroRNA (miRNA) Expression Auswirkungen auf die Malignität und Prognose haben [77, 78]

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Analyse der *in vitro* Effekte von Griseofulvin auf die adrenale Steroidbiosynthese. Zudem sollte untersucht werden, ob sich hinsichtlich verschiedener adrenokortikaler Tumorentitäten Unterschiede in der Expression von γ -Tubulin als zentrosomales Strukturelement ergeben. Dazu wurde humanes Probenmaterial (Adenome und Nebennierenkarzinome) mittels Immunfluoreszenz gefärbt, mikroskopisch ausgewertet und mit patientenspezifischen Daten, wie z. B. der Metastasierung, korreliert. Ziel war es, den Weiss-Score, hinsichtlich der Trennschärfe zwischen benignen und malignen Veränderungen der Nebennierenrinde zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 NCI-H295/NCI-H295R Zellen

Im Jahr 1980 wurde bei einer 48-jährigen Afroamerikanerin ein adrenokortikales Karzinom entdeckt. Klinisch imponierte die Symptomatik eines Steroidexzesses, der sich durch Akne, Hirsutismus, Ödeme und Unregelmäßigkeiten der Menstruationsblutung bemerkbar machte. Aus diesem invasiv wachsenden Karzinom, welches sich auch schon in Lunge und Leber abgesiedelt hatte, wurde die NCI-H295 Zelllinie gewonnen [79].

Im weiteren Verlauf hat man aus den NCI-H295 Zellen die NCI-H29R Zelllinie kultiviert, die sich besser an den Boden einer Zellkulturplatte anheftet. Diesen Stamm selektierte man durch die konsequente Verwerfung nicht anheftender NCI-H295 Zellen [80].

Der NCI-H295R Stamm wurde für diese Arbeit verwendet.

Aus zytogenetischen Untersuchungen der NCI-H295 Zellen wurde eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen ersichtlich, wie etwa eine Hyperloidie und eine variable Chromosomenzahl [79].

Trotzdem besitzt die NCI-H295 Zelllinie Charakteristika und Eigenschaften, die sie zur Steroidhormonbiosynthese befähigen, welche modellhaft einer humanen adrenokortikalen Zelle gleichen. So ähnelt sie, hinsichtlich dem ultrastrukturellen Aufbau der Mitochondrien und dem glatten endoplasmatischen Retikulum, einer steroidproduzierenden Zelle, so dass es dieser Zelllinie ermöglicht bis zu 30 verschiedener Steroide zu synthetisieren [79].

Wichtige physiologische Einflussgrößen der Steroidhormonbiosynthese in der Nebennierenrinde sind der Serumkaliumspiegel, ACTH und Angiotensin II (ANG II). Bei Erstbeschreibung der NCI-H295 Zellen wurde hinsichtlich der Stimulierbarkeit mit ACTH keine Aussage gemacht [79]. Im weiteren Verlauf wurde deutlich, dass erhöhte ACTH Spiegel nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der für die Steroidhormonbiosynthese kodierenden Enzymtranskripte

führen [81]. Ursächlich ist eine geringe Expression des Melanocortinrezeptors 2, welcher die ACTH Wirkung vermittelt [82].

Im Gegensatz dazu, führt die Stimulation mit Forskolin zu einer vermehrten Produktion diverser Steroide wie Cortisol, DHEA, DHEA-S, Androstendion, Aldosteron und weiterer Zwischenprodukte der Steroidhormonbiosynthese [80] in den NCI-H295 Zellen. Vermittelt wird dieser Effekt durch den intrazellulären cAMP-abhängigen Signalweg. Ferner wird die Aldosteronsynthese noch über den intrazellulären Calciumspiegel, Serumkaliumspiegel und über die Phosphoinositase-C reguliert [83-85].

Zudem bewirkt eine Depolarisation der Glomerulosazellen eine vermehrte Expression der Aldosteronsynthase. Dies wird induziert durch spannungsabhängige Chloridkanäle, welche sich unter Hyperpolarisation öffnen. Mutationen in dem kodierenden Genabschnitt sind in Formen des familiären Hyperaldosteronismus vorzufinden [86].

Des Weiteren stimulieren auch Parathormon und Parathormon-ähnliche Peptide cAMP- abhängig die Aldosteronbiosynthese [87].

Trotz der fehlenden Stimulierbarkeit mit ACTH eignen sich die NCI-H295/NCI-H295R Zelllinien als Modell für die Steroidbiosynthese in einer humanen adrenokortikalen Zelle.

2.1.2 Kultivierung der NCI-H295R Zellreihe

Als Modellsystem für die Stimulationsexperimente diente die NCI-H295R Zelllinie, die aus Nebennierenrindenzellen kultiviert wurde. Es wurde RPMI1640 + L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) als Kulturmedium benutzt, dem 2 % fetales Kälberserum (Invitrogen), Streptomycin 100 µg/ml (Invitrogen), Penicillin 100 U/ml (Invitrogen), Hydrokortison 10 nM (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Apo-Transferrin 10 µg/ml (Sigma-Aldrich), Estradiol 10 nM (Sigma-Aldrich), Natrium-Selenit 30 nM (Sigma-Aldrich) und Insulin 66 nM (Sigma-Aldrich) zugefügt wurde. Die Zellen wurden in einer vollständig mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 95 Prozent Raumluft und 5 Prozent Kohlendioxid in einem Brutschrank bei 37 ° C inkubiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei ausreichender Zelldichte erfolgte

die Aufspaltung mithilfe von Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland). Dazu wurde das Zellkulturmedium verworfen, mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung mit einem PH von 7,4 (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Gibco/Invitrogen) gewaschen und mit Accutase für 7 Minuten für 37 °C Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die in Accutase gelösten Zellen 7 Minuten bei 1400 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Die Resuspension des erhaltenen Zellpellet erfolgte in Medium. Ferner wurden die mit Tryptanblau (Sigma- Aldrich) angefärbten vitalen Zellen mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen dann auf 6-Well Platten ausgesät.

2.1.3 Mycoplasmentest

Die NCI-H295R Zellen wurden regelmäßig auf eine mögliche Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Mycoplasmen beeinträchtigen aufgrund toxischer Stoffwechselprodukte und Verbrauch wichtiger Substrate die Zellproliferation. Für die Kontaminationskontrollen fand das Venor® GeM PCR-Kit (Biochrom, Berlin, Deutschland, W 11-1025) Verwendung. Die Ergebnisse waren dabei immer negativ, sodass eine Verunreinigung und Beeinflussung der Versuchsreihen durch Mycoplasmen auszuschließen ist.

2.2 Hormon ELISA

2.2.1 Material und Methoden

Zur Bestimmung der Konzentration von Aldosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Cortisol im Überstand, der mit Griseofulvin (Sigma- Aldrich) inkubierten NCI-H295R Zellen, wurde jeweils ein spezifischer ELISA-Kit für Aldosteron (EIA-5298, DRG, Marburg, Deutschland), DHEA (EIA-3415, DRG) und Cortisol (EIA-1887, DRG) herangezogen.

Diese basieren auf dem Prinzip eines Festphasen-Enzymimmunoassays. Das Griseofulvin wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich) gelöst. Die 96 Wells der Titerplatten sind mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, der eine freie Antikörper- Bindungsstelle gegen das jeweilige Hormon besitzt. Die Proben wurden daraufhin in die beschichteten Wells pipettiert und zusammen mit einem standardisierten Hormon-Enzymkonjugat inkubiert. Das Hormonkonjugat und das in der Probe vorhandene Hormon konkurrieren kompetitiv um die freie Bindungsstelle. Daraufhin wurden die Wells gewaschen, um nicht gebundenes Konjugat zu entfernen. Dann wurde eine Substratlösung dazugegeben, worauf es aufgrund der enzymatischen Wirkung des Hormon-Enzymkonjugates zu einem Farbumschlag kam.

Dabei ist die Intensität der gebildeten Farbe umgekehrt proportional zur Konzentration des in der Probe gelösten Hormons. Die Konzentration wurde photometrisch, bei einer Wellenlänge von 450 nm, mithilfe eines Mikroplattenlesers gemessen.

2.2.2 Versuchsaufbau

NCI-H29R Zellen wurden ohne oder mit Griseofulvin in Konzentrationen von 0,1µM, 1µM, 10µM, 40µM und 100µM für 24 Stunden inkubiert. Dabei enthielt die Kontrolle 0,12 % DMSO, was der höchsten Konzentration von DMSO als Lösungsmittel für Griseofulvin entsprach. Daraufhin wurde das Medium, der nach jeweiligem Schema inkubierten Zellen, mittels ELISA bezüglich der

Hormonkonzentrationen von Cortisol, DHEA und Aldosteron untersucht.

2.2.3 Messung und Auswertung

Mithilfe eines Mikroplattenlesers wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm bei jedem einzelnen inkubierten Well gemessen. Die Hormonkonzentrationen der Proben wurden mithilfe verschiedener Standardproben ermittelt. Die Hormonkonzentrationen in den Standardproben waren bekannt und wurden, als Bestandteil des jeweiligen ELISA KIT, mitgeliefert. Statistische Berechnungen wurden mittels einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) und einer Bonferroni Korrektur ($p \leq 0.05$) durchgeführt. Hierbei wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt (IBM SPSS *Statistics for Windows*, Version 22.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.).

2.3 Kaliummessung im Mediumüberstand

2.3.1 Material und Methodik

Der Überstand der mit Griseofulvin inkubierten NCI-H295R Zellen wurde abgenommen und im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf analysiert. Dabei wurde die Kaliumkonzentration mittels einer ionenselektiven Elektrode ermittelt. Das verwendete Zellmedium gleicht dem zuvor verwendeten Kultivierungsmedium.

2.3.2 Versuchsaufbau

NCI-H295R Zellen wurden mit und ohne Griseofulvin für 24 Stunden inkubiert, wobei die Kontrolle 0,12 % DMSO enthielt. Das in DMSO gelöste Griseofulvin wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1µM, 1µM, 10µM, 40µM und 100µM in das jeweilige Kulturmedium gegeben.

2.3.3 Auswertung

Statistische Berechnungen wurden mittels einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) und einer Bonferroni Korrektur ($p \leq 0.05$) durchgeführt. Hierbei wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt (IBM SPSS *Statistics for Windows*, Version 22.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.).

2.4 Immunfluoreszenzfärbung der NCI-H295R Zellen

2.4.1. Material und Methodik

Die NCI-H295R Zellen wurden auf sterilen Cover-Slips ausgesät, die sich in 6- Wells befanden. Zur besseren Anheftung der Zellen erfolgte die Vorbehandlung der Cover-Slips mit einem Bunsenbrenner. Bei ausreichender Zelldichte wurden die Zellen für 24 Stunden mit Griseofulvin unter Verwendung aufsteigender Konzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 40 μ M und 100 μ M inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals mit D-PBS gewaschen und anschließend mit -20°C kaltem Methanol 20 Minuten lang fixiert. Daraufhin erfolgte wieder die Waschung mit D-PBS und ein dreimaliges Waschen mit Triton x-100 0,3 %. Nach Blockierung mit 5 % Schweineserum (Dako, Hamburg, Deutschland) für eine Stunde wurden anschließend die Zellen mit einem γ -Tubulin Antikörper (Sigma-Aldrich, monoklonal, Maus, Katalognummer: T6557) oder einem SF-1-Antikörper (Abcam, polyklonal, Kaninchen, Katalognummer: ab65815) in einer Konzentration von 1:1000 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte wiederum eine dreimalige Waschung mit D-PBS. Danach wurde die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 (Huhn Anti- Kaninchen/Ziege Anti- Maus, *Molecular Probes*, Leiden, Niederlande) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 1:1500 vollzogen.

Daraufhin erfolgte wiederum die dreifache Waschung mit PBS. Die Kernfärbung und Eindeckung wurde mittels *Prolong® Gold antifade reagent with DAPI* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, P36931) durchgeführt.

2.4.2 Auswertung

Zur Fotodokumentation wurde die AxioCam und das Axioskop 2 plus benutzt (Carl Zeiss, Jena, Deutschland, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland). Daraufhin wurde mit der frei verfügbaren Grafiksoftware *The Gimp* (GNU, *General Public License*, www.gimp.org) die Kernfärbung entweder mit der SF-1 oder der γ -Tubulin Färbung unter Verwendung von konstanten Parametern zu einem Bild fusioniert. Dem folgte eine deskriptive Auswertung des vorhandenen Bildmaterials.

2.5 Immunfluoreszenz humaner Paraffinschnitte

2.5.1 Material und Methodik

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde menschliches Probenmaterial von Aldosteron-produzierenden Adenomen (n=10), Cortisol- produzierenden Adenomen (n=6), und Nebennierenkarzinomen verwendet (n=9). Die Rehydratation der auf den Objektträgern befindlichen Paraffinschnitte erfolgte mittels einer Xylol/Alkoholreihe. Zuerst wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in ein Xylolbad gelegt. Die Entparaffinisierung erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe. Dabei wurden die Schnitte zuerst mit 99% Ethanol für 5 Minuten inkubiert, anschließend mit 90% Ethanol, dann mit 80% und 60%, hiernach mit 50% und zuletzt mit 30%. Daraufhin wurden die Schnitte dreifach mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit 5 % Schweine-Serum blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem primären γ -Tubulin Antikörper (Sigma-Aldrich, monoklonal, Maus, Katalognummer: T6557) in der Verdünnung 1:2500 über Nacht bei 4° C. Es wurde in jedem Versuch ein Kontrollschnitt ohne primären Antikörper inkubiert, um unspezifische Reaktionen des sekundären Antikörpers zu erfassen. Daraufhin wurden alle Objektträger erneut dreifach mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten sekundären Antikörper

(Alexa Fluor 488, Ziege Anti- Maus, *Molecular Probes*, Leiden, Niederlande) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Konzentration von 1:1500.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Kernfärbung und Eindeckung erfolgte mittels *Prolong® Gold antifade reagent with DAPI* (Life Technologies).

2.5.2 Auswertung

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte anhand eines AxioCam und eines Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Jena, Deutschland, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland). Die Fusion der Bilddaten für die Kernfärbung und die γ -Tubulin spezifische Färbung erfolgte mittels der frei erhältlichen Grafiksoftware *The Gimp* (GNU, General Public License, www.gimp.org). Es wurden jeweils 10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte pro Objektträger bei einer 400-fachen Vergrößerung und 3 bei 630-fachen Vergrößerung gewählt. Innerhalb der Versuche wurden die Belichtungszeit und alle Einstellungen für die grafische Verarbeitung konstant gehalten.

2.5.3 Ethikvotum

Zu dieser Arbeit liegt ein Ethikvotum vor: Studiennummer 4515 („Zentrosomale Aberrationen in Nebennierentumoren“).

2.6 Quantitative TaqMan PCR

2.6.1 Versuchsaufbau

Für die Messung der *steroidogenic factor-1 messenger* RNA (mRNA) wurden 500.000 NCI-H295R Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Bei 70 prozentiger Konfluenz erfolgte die Stimulation der Zellen mit Griseofulvin in Konzentrationen

von 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 40 μ M und 100 μ M über 24 Stunden. Die Kontrolle erfolgte anhand eines nicht stimulierten Wells, dabei wurden in das Zellkulturmedium äquivalente Dosen von DMSO, kongruent zu den stimulierten Zellen, appliziert.

2.6.2 RNA Isolierung

Zur RNA Extraktion wurde ein RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte mit einem RNase-inaktivierenden Guanidinisothiozyanat-haltigen Puffers (RLT). Zur Homogenisierung wurde das Zelllysate auf Qiashreddern (Qiagen, Hilden, Deutschland) bestückt und anschließend mit höchster Drehzahl zentrifugiert. Hierdurch und durch die Zugabe von Ethanol (Sigma-Aldrich) konnte die Viskosität des Zelllysates vermindert werden. Dies begünstigte die Bindung der RNA an die Siliziummembranen. Die Zelllysate wurden auf Qiagen RNeasy-Säulen bestückt und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert, wobei sich die RNA an die Membran bindet. Durch die schrittweise Zugabe von 700 μ L RW1-Puffer und 500 μ L RPE-Puffer und einer darauffolgenden Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sekunden wurde die Waschung durchgeführt. Danach erfolgte zur vollständigen Trocknung noch eine zweiminütige Zentrifugation. Durch die Gabe von 30 μ L RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 Minute konnte die gebundene RNA gelöst und aufgefangen werden. Daraufhin erfolgte ein DNase Verdau.

2.6.3 RNA-Messung

Zur Messung der RNA-Konzentration und deren Reinheit wurde ein Photometer der Firma Eppendorf benutzt. Dabei wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD260) gemessen und die RNA-Konzentration indirekt über die Extinktion berechnet. Gleichzeitig nahm der OD260/OD280 Quotient Werte zwischen 1,8 und 2 an, was auf eine hohe Reinheit der

gemessenen RNA Probe schließen ließ.

2.6.4 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems benutzt. Um die cDNA-Synthese zu starten musste zuerst ein *2X reverse transcription Master Mix* erstellt werden. Er enthielt einen Reaktionspuffer, Deoxynukleotide (8 mM), Random Primer, Nuclease freies Wasser und eine reverse Transkriptase. Daraufhin wurden 10 µl des Master Mix in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Im nächsten Schritt wurde dann 10 µl einer RNA Probe hinzugefügt. Es wurde darauf geachtet, dass die RNA-Probe zwischen 500 bis 1000 ng RNA enthält. Dann wurden die Mikroreaktionsgefäße versiegelt und zentrifugiert.

Um die reverse Transkription zu starten, wurde ein Thermocycler der Firma Biometra mit den Mikroreaktionsgefäßen beladen (siehe Abbildung 3). Zuerst erfolgte die Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten, um eine Anlagerung der Primer an die RNA zu fördern. Daraufhin wurden die Reaktionsansätze bei 37°C für 120 Minuten inkubiert, um die reverse Transkription zu ermöglichen. Danach erfolgte die Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 85 °C für 5 Minuten. Dadurch wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Zuletzt wurden die nun umgeschriebenen Reaktionsansätze auf 4 °C gekühlt und dann bei -20 °C gelagert.

1.Schritt	2.Schritt	3.Schritt	4.Schritt
25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
10 Minuten	120 Minuten	5 Minuten	-

Abb.3: cDNA-Zyklus

Schematische Darstellung des cDNA-Synthese Protokolls mittels eines Thermocyclers. Dargestellt sind die Inkubationszeiten und Temperaturen, die im jeweiligen Schritt verwendet werden.

2.6.5 TaqMan PCR

Als Primer und Sonden für das SF-1 Gen wurde ein vorgefertigtes TaqMan® Gene Expression Assay (*Applied Biosystems by Life technologies*, Darmstadt, Deutschland, Katalognr.: 4331182) benutzt. Als endogene Kontrolle diente das *Housekeeping* Gen β -Actin (ACTB) (*Applied Biosystems by Life technologies*, Katalognr.: 4333762T). Die Reaktionsansätze zur Konzentrationsbestimmung der SF-1- und ACTB-cDNA sind in Abbildung 4 ersichtlich. Es wurde jede Probe dreifach auf ein 96-Well pipettiert und in der späteren Auswertung ein Mittelwert gebildet.

Substanz	SF-1	ACTB
2×TaqMan® Universal Master Mix	10 μ l	10 μ l
TaqMan® Gene Expression Assay	1 μ l	1 μ l
Aqua Dest.	variabel	variabel
cDNA	variabel (150 ng)	variabel (150 ng)
Σ	20 μ l	20 μ l

Abb.4: TaqMan PCR Reaktionsansatz

Aufbau der Reaktionsansätze zur Konzentrationsbestimmung der relativen SF-1- und β Actin-cDNA Konzentrationen durch eine TaqMan-PCR.

Die SF-1- und ACTB-spezifischen Sonden wurden mit Reporterfarbstoff FAM gekoppelt. Die Reaktionsansätze wurden für zwei Minuten bei 50°C inkubiert und darauffolgend für zehn Minuten bei 95 °C. Anschließend erfolgten 40 Zyklen, jeweils bei 95°C für 15 Sekunden und bei 60°C für eine Minute. Zur Bestimmung der relativen mRNA Expression von SF-1 wurde die komparative Ct-Methode gewählt. Dabei wird jeder Amplifikationsreaktion ein Ct-Wert (*cycle threshold*) zugeordnet. Diese theoretische Größe stellt den Zyklus dar, in welcher die Amplifikationskurve erstmalig exponentiell verläuft. Aufgrund der halb-logarithmischen Darstellung stellt sich der exponentielle Abschnitt der Amplifikationskurve linear dar. Durch die Bildung der Differenz Δ Ct aus dem

Zielgen SF-1 und dem Referenzgen ACTB sollten etwaige Schwankungen, durch die Normalisierung auf das Zielgen SF-1, ausgeglichen werden. Die unstimulierte Kontrollprobe diente als Kalibrator zur Berechnung der relativen Expression. Die genaue mathematische Herleitung ist dem User Bulletin 2 von Applied Biosystems zu entnehmen.

2.6.6 Auswertung

Die anschließende statistische Auswertung wurde mittels einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) und einer Bonferroni Korrektur ($p \leq 0.05$) durchgeführt. Hierbei wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt (IBM SPSS *Statistics for Windows*, Version 22.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.).

3 Ergebnisse

3.1 ELISA

3.1.1 Aldosteron

Es zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit Griseofulvin ein Anstieg der Konzentration von Aldosteron im Zellmedium der NCI Zellen. Der Effekt nahm dosisabhängig zu (Abb.5). Eine statistische Signifikanz wurde hierbei erreicht ($p \leq 0,05$).

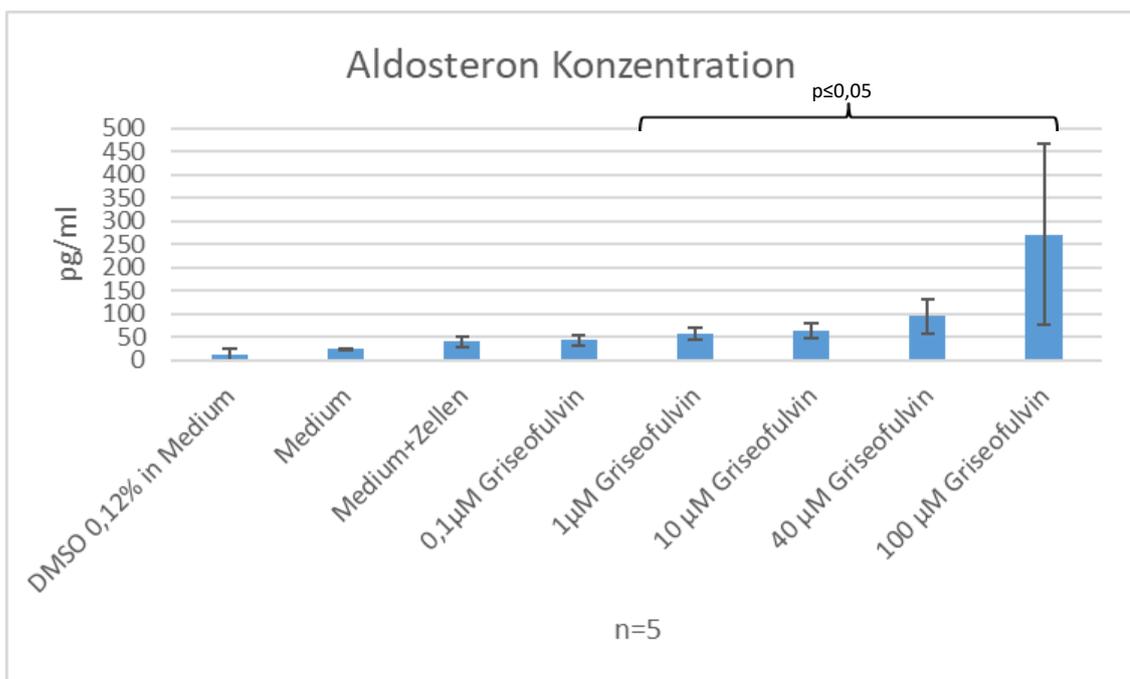


Abb.5: Aldosteron Konzentration bei NCI-H295R Zellen

ELISA Messungen der Aldosteronkonzentration im Zellmedium nach 24 stündiger Inkubation mit Griseofulvin (n=5)

3.1.2 DHEA

Nach 24-stündiger Inkubation mit Griseofulvin war ein Anstieg der DHEA-Konzentration zu verzeichnen (Abb.6). Der Effekt beschreibt einen dosisabhängigen Verlauf. Die Auswertung ergab eine statistische Signifikanz ($p=0,046$).

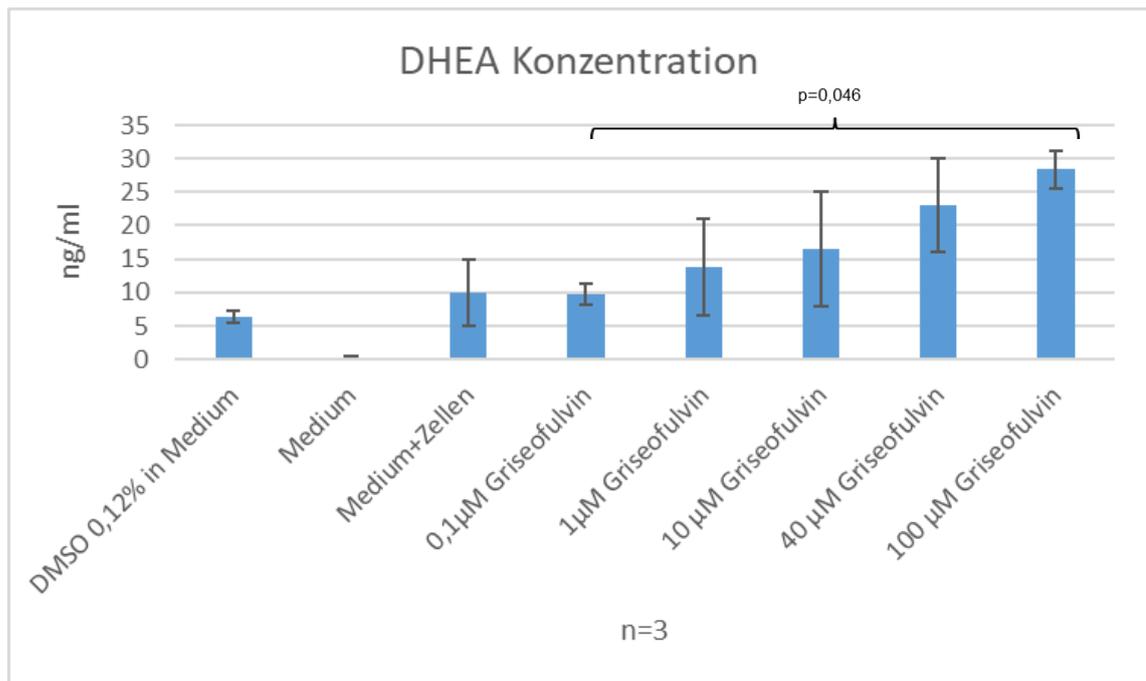


Abb.6: DHEA Konzentrationen bei NCI-H295R Zellen

Elisa Messungen der DHEA Konzentration im Zellmedium nach 24-stündiger Inkubation mit Griseofulvin (n=3)

3.1.3 Cortisol

Ein leichter Anstieg der Cortisolkonzentration im Medium nach Inkubation mit Griseofulvin ist zu erkennen (Abb.7). Es ist aber keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen nachweisbar.

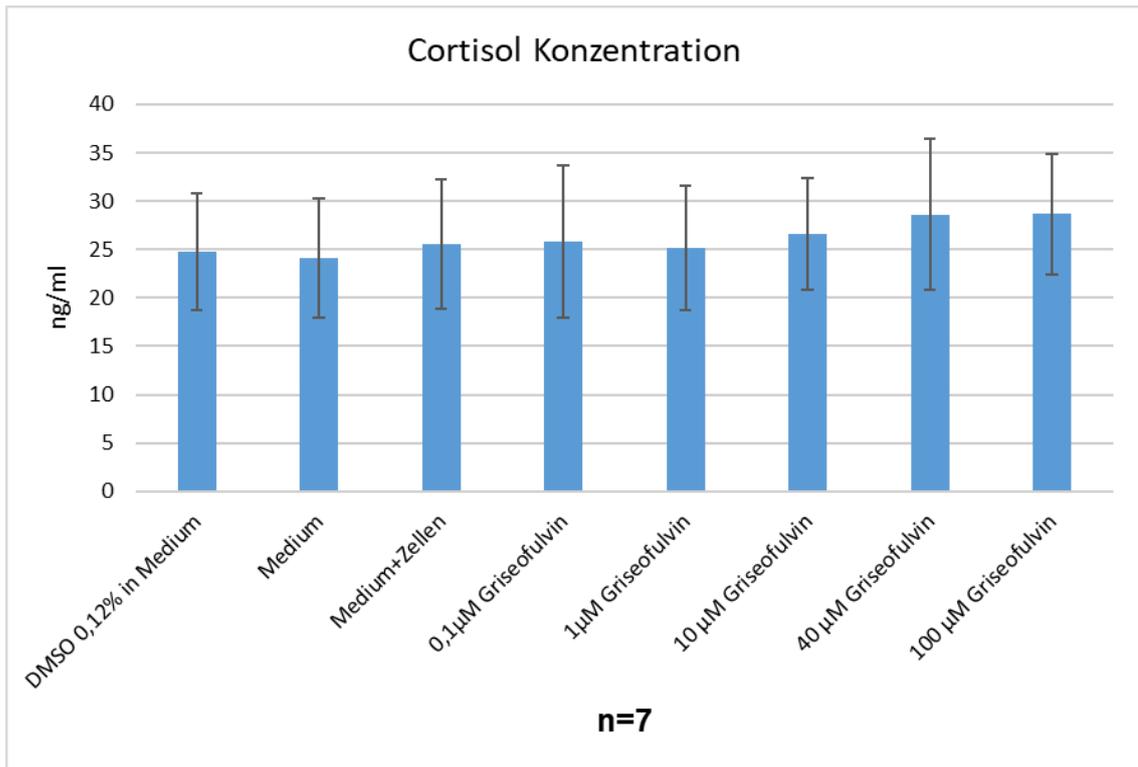


Abb.7: Cortisol Konzentrationen bei NCI-H295R Zellen

Cortisol Konzentration im Zellmedium nach 24-stündiger Inkubation mit Griseofulvin (n=7)

3.2 Kalium

Das Griseofulvin lag gelöst in DMSO vor. Da DMSO bei höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt, wurde auch die Kaliumkonzentration im jeweiligen Zellmedium gemessen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass erhöhte Kaliumspiegel die gemessenen Spiegel von DHEA, Aldosteron und Cortisol beeinflussen.

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Kaliumkonzentration zwischen der Kontrolle und der Intervention (Abb.8).

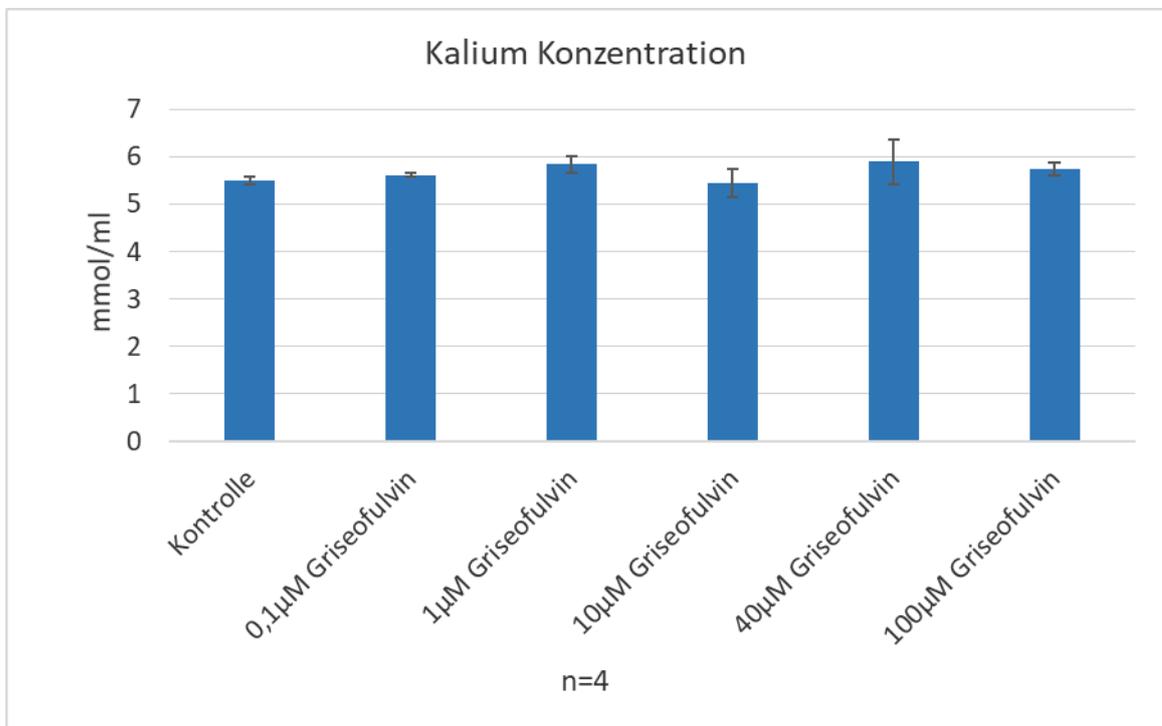


Abb.8: Kalium Konzentrationen bei NCI-H295R Zellen

Kalium Konzentration im Zellmedium nach 24-stündiger Inkubation mit Griseofulvin (n=4)

3.3 Immunfluoreszenz der NCI-H295R Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung, welche mittels eines Antikörpers gegen γ -Tubulin gerichtet ist, zeigte in der Kontrolle eine homogene Verteilung im Zytoplasma mit einem solitären punktähnlichen Signal in der perinukleären

Umgebung. Die Exposition der NCI-H295R Zellen mit Griseofulvin löste hingegen eine Zerstreuung der γ -Tubulinfluoreszenz im gesamten Zytoplasma aus (Abb.9). Des Weiteren hat sich die zelluläre Verteilung von SF-1 in den adrenalen NCI-H295R Zellen nach Inkubation mit Griseofulvin verändert. So wurde die nukleäre Verteilung von SF-1 ausgeprägter (Abb.10).

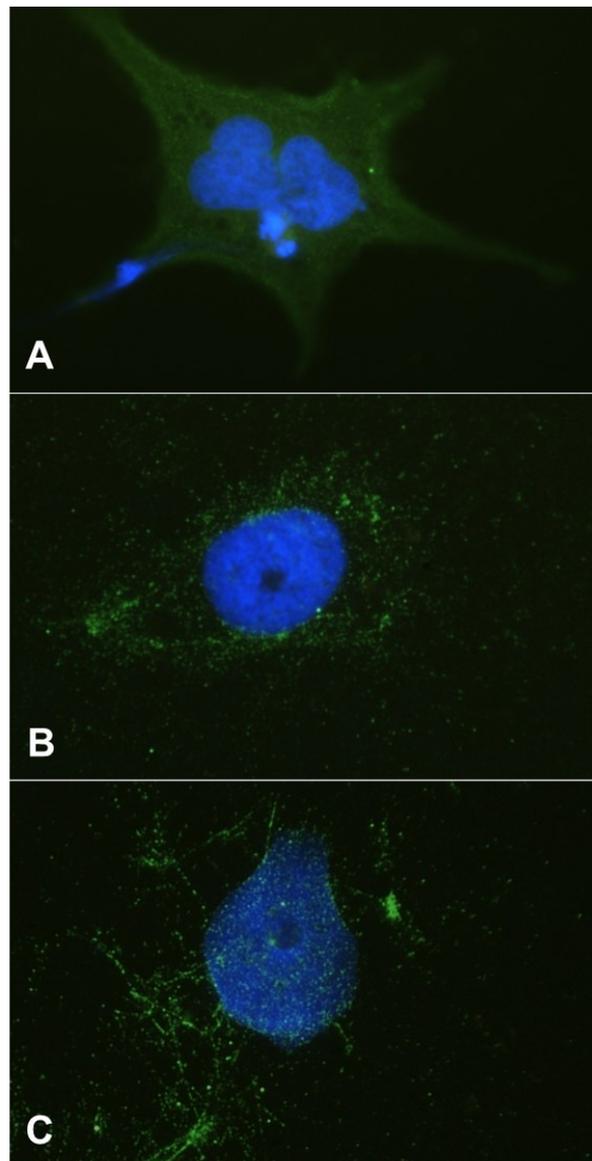


Abb.9: Y-Tubulin Expression bei NCI-H295R Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung demonstriert die γ -Tubulin Expression bei NCI-H295R Zellen. Abbildung A: Unstimulierte Kontrolle. Blau fluoreszierende DAPI-Färbung stellt den Zellkern dar, während γ -Tubulin über ein grün fluoreszierendes Signal markiert wurde. Abbildung B: Inkubation der NCI-H295R Zellen mit Griseofulvin für 24 h (1 μ M). Panel C: Endkonzentration von Griseofulvin wurde appliziert (100 μ M), welches eine Zerstreuung der γ -Tubulinfluoreszenz im gesamten Zytoplasma darstellen konnte.

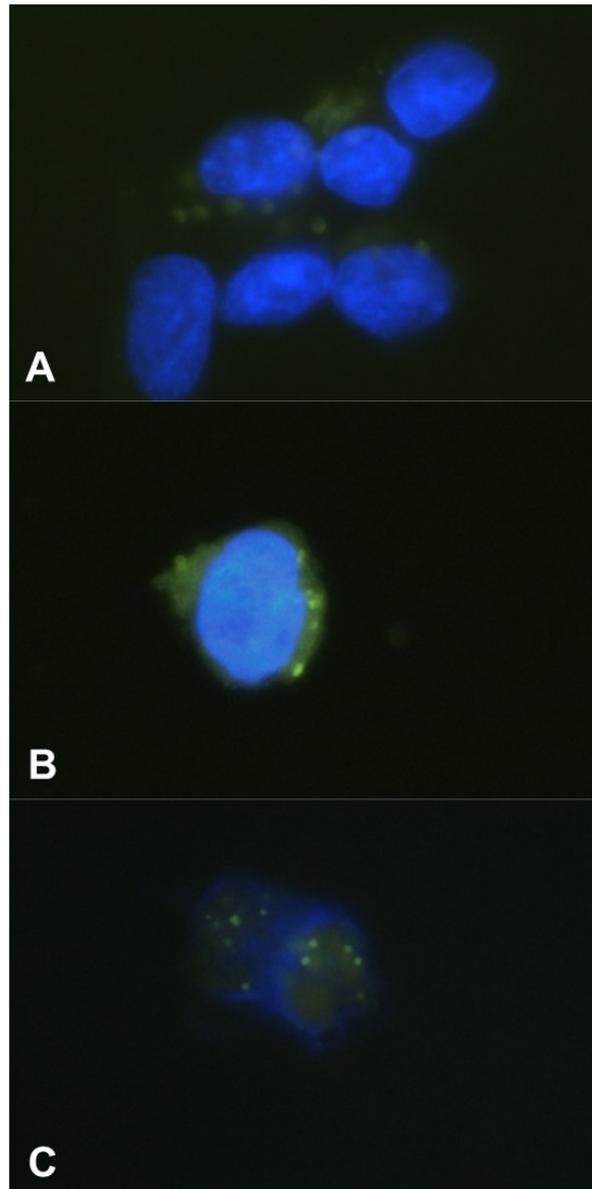


Abb.10: SF-1 Expression bei NCI-H295R Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung stellt die SF-1 Expression bei NCI-H295R Zellen dar. Abbildung A: Unstimulierte Kontrolle. Blau fluoreszierende DAPI-Färbung demonstriert den Zellkern, während SF-1 über ein grün fluoreszierendes Signal dargestellt wird. Abbildung B: Inkubation der NCI-H295R Zellen mit Griseofulvin für 24 h (10 μM). Panel C: Endkonzentration von Griseofulvin wurde supplementiert (100 μM), dabei wird eine verstärkte nukleäre SF-1 Verteilung ersichtlich.

3.4 Immunfluoreszenz humaner Paraffinschnitte

Der *Overlay* der DAPI Kernfärbung und der γ -Tubulin spezifischen Färbung erfolgte, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, mittels der frei verfügbaren Grafiksoftware *The Gimp* 2.8.

Die Lokalisation und das Muster der Färbung waren vereinbar mit einer auf γ - Tubulin gerichteten Immunfluoreszenz. Gleichzeitig konnte die Kernfärbung auch die räumlich Nähe zum Zellkern zeigen. Eine quantitative Auswertung der Strukturen und die Korrelation mit patientenspezifischen Daten waren technisch nicht machbar. Die angefärbten Strukturen waren zu klein, um sie mittels einer geeigneten Software auszuwerten.

Die Schnitte wurden deskriptiv hinsichtlich des Färbemusters beschrieben. Dabei wurden verschiedene Färbemuster deutlich. Während in den Aldosteron-produzierenden (APA) und Cortisol-produzierenden Adenomen (CPA) eher kondensierte einzelne γ -Tubulin angefärbte Strukturen erkennbar sind, liegt in den Nebennierenkarzinomen eher eine Vielzahl kleinerer Strukturen vor. Die verschieden angefärbten Entitäten sind in den Abb.11,12 und 13 zu sehen.

CPA

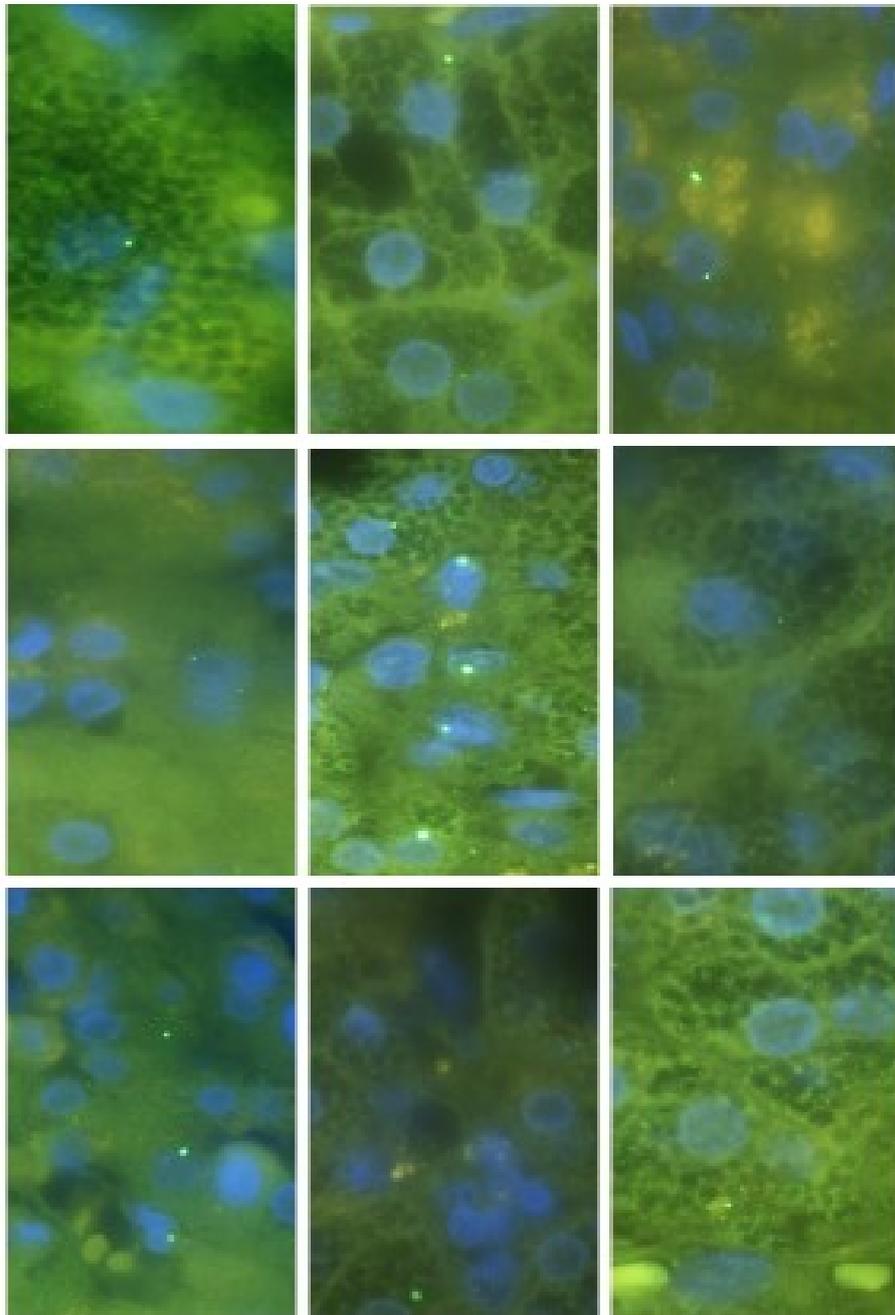


Abb.11: Immunfluoreszenzfärbung von Cortisol-produzierender Adenomen

In den Abbildungen sind gefärbte humane Paraffinschnitte zu erkennen. Dabei handelt es sich um Cortisol-produzierende Adenome (CPA). Es wurde γ -Tubulin angefärbt (grün) und es erfolgte eine DAPI Kernfärbung (blau) (n=6).

APA

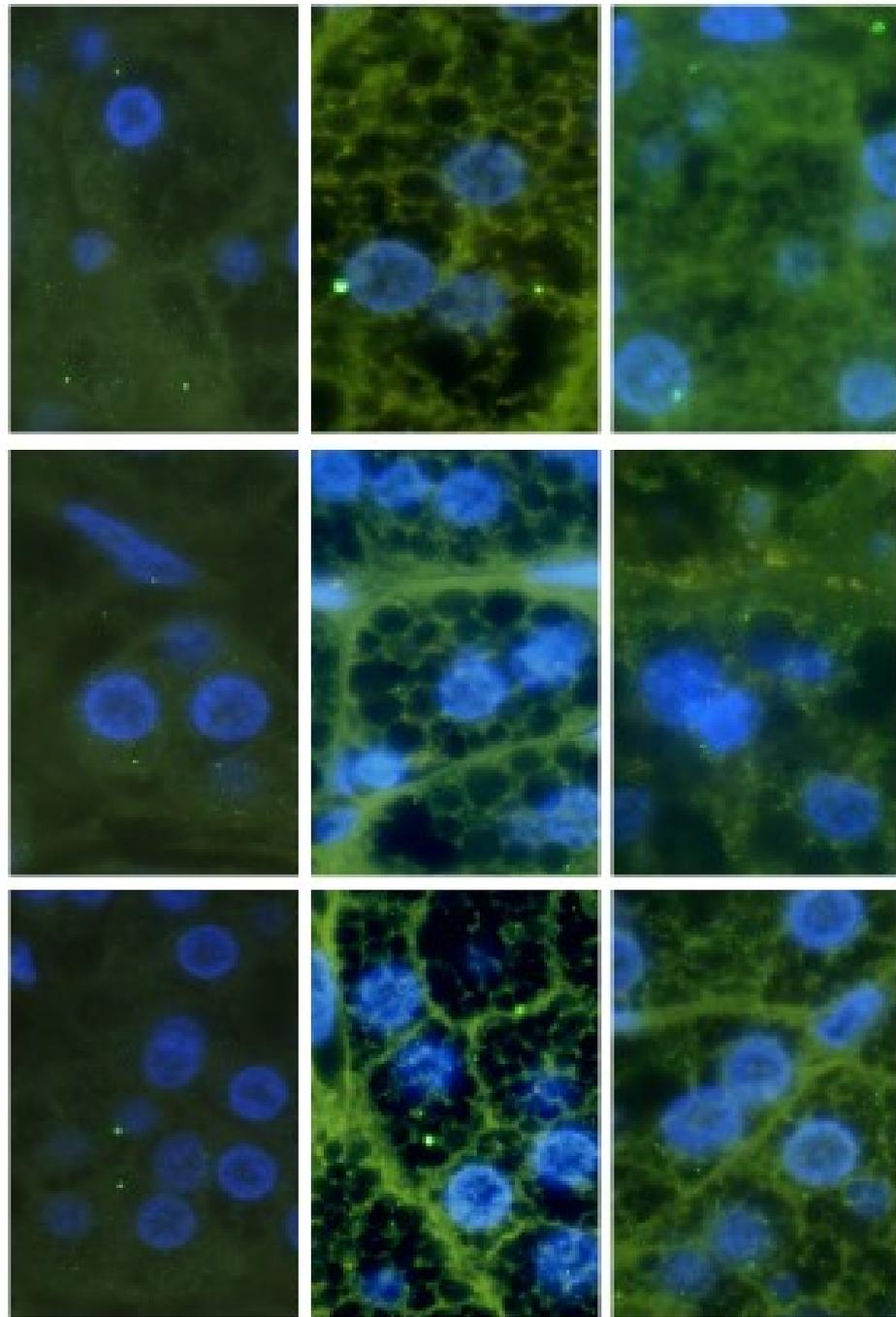


Abb.12: Immunfluoreszenzfärbung von Aldosteron-produzierender Adenomen

In den Abbildungen sind gefärbte humane Paraffinschnitte zu erkennen. Dabei handelt es sich um Aldosteron-produzierende Adenome (APA). Es wurde γ -Tubulin angefärbt (grün) und es erfolgte eine DAPI Kernfärbung (blau) (n=10).

Nebennierenrindenkarzinom

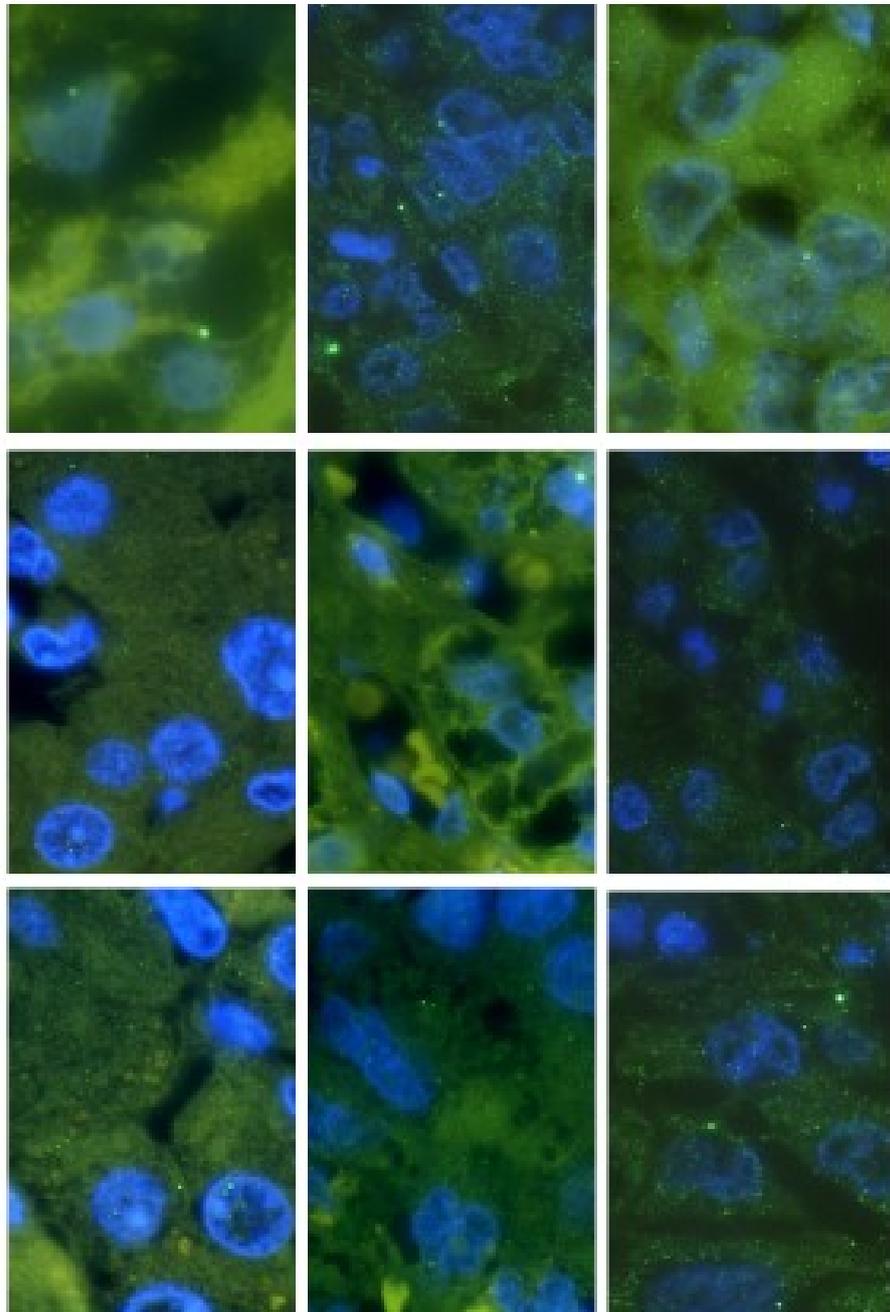


Abb.13: Immunfluoreszenzfärbung von Nebennierenrindenkarzinomen

In den Abbildungen sind gefärbte humane Paraffinschnitte zu erkennen. Dabei handelt es sich um Nebennierenrindenkarzinome. Es wurde γ -Tubulin angefärbt (grün) und es erfolgte eine DAPI Kernfärbung (blau) (n=9).

3.5 TaqMan PCR

Es konnte mittels der TaqMan-PCR eine Expression von SF-1-mRNA in NCI-H295R Zellen gezeigt werden. Dabei wurde ein typischer Amplifikationsverlauf in den jeweiligen Reaktionsansätzen ersichtlich. Gleichzeitig war in den Negativkontrollen, welche RNA freies Wasser enthielten, keine Amplifikation nachweisbar. Zur Berechnung wurde, wie schon in „Material und Methoden“ verdeutlicht, die komparative Ct-Methode herangezogen. Es konnte keine statistisch bemerkbare Veränderung der relativen Genexpression nach Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen mit Griseofulvin nachgewiesen werden (Abb.14).

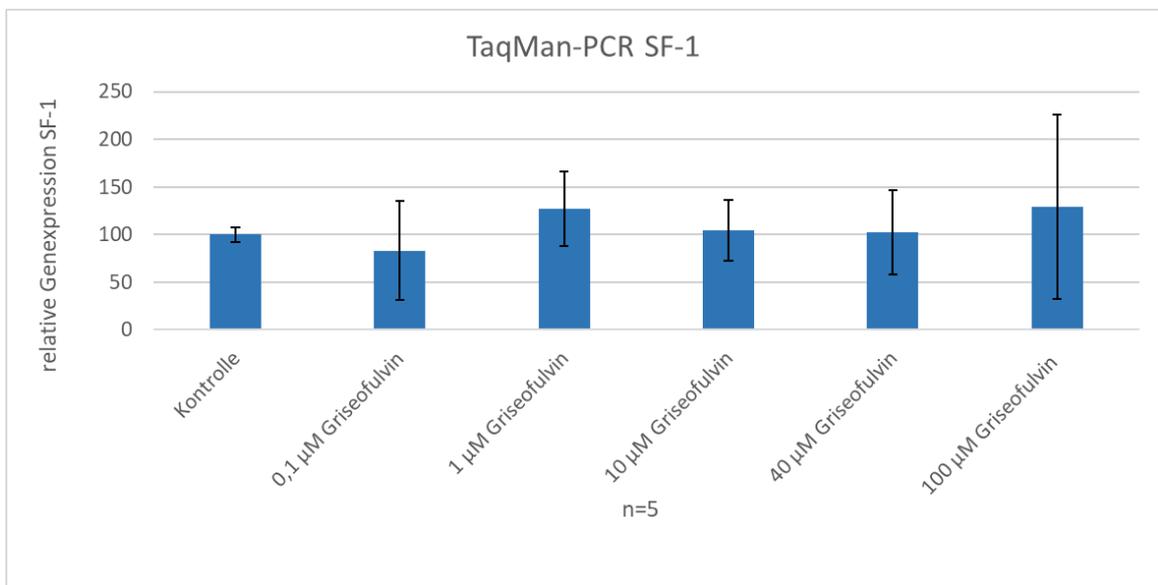


Abb.14: Relative SF-1 Genexpression

Ausgewertet wurde die relative SF-1 mRNA Expression von NCI-H295R Zellen bei ansteigenden Griseofulvinkonzentrationen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (n=5).

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen der Inkubation von NCI-H295R Zellen mit Griseofulvin, welches den Mikrotubulusapparat inhibiert [59, 88, 89], auf die Steroidogenese und die Verteilung von zentrosomalen Strukturelementen zu untersuchen.

Aufgrund von schon veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [60] wurde ersichtlich, dass Griseofulvin eine proapoptotische Wirkung auf NCI-H295R Zellen hat. Kausal wurde die Zunahme der Apoptose durch eine Abnahme des zentrosomalen *Clustering*, aufgrund der Inhibierung des Mikrotubulusapparates mittels Griseofulvin, vermutet. Auch die Auswirkungen auf die Steroidhormonbiosynthese der NCI-H295R Zellen sollten untersucht werden, da der Mikrotubulusapparat bei der Regulation der Steroidogenese eine wichtige Rolle spielt [39, 40, 90].

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden als Modelle die NCI-H295R Zelllinie und humane Gewebsschnitte gewählt. Die NCI-H295R Zellen haben trotz ihrer Ähnlichkeiten zu einer steroidproduzierenden Zelle, so besitzen sie einen ähnlichen Aufbau und auch die Genexpression der nötigen Enzyme zur Steroidogenese ist vergleichbar [79], einige Limitierungen. Sie zeichnen sich durch eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen, wie zum Beispiel eine häufig beobachtbare Hyperploidie, aus [79]. Außerdem unterscheiden sie sich von normalen Nebennierenrindenzellen durch einer fehlenden Stimulierbarkeit durch ACTH [81]. Bei der Bewertung der Ergebnisse wurde auf die Besonderheiten des gewählten biologischen Modells Rücksicht genommen.

Da in unserer Arbeitsgruppe schon gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation mit Griseofulvin zu vermehrten Apoptosen führt [60], sollte geprüft werden, ob möglicherweise hierdurch eine Erhöhung der Kaliumkonzentration im Serum für eine Veränderung der Hormonkonzentration verantwortlich sein kann. Insbesondere deshalb, da ein Kaliumefflux bei Apoptosen schon beschrieben wurde [91] und ein Kaliumanstieg bei NCI-H295R Zellen zu einer

Veränderung des Steroidprofils führen kann. So ist eine Zunahme der Aldosteronkonzentration im Serum durch erhöhte Kaliumspiegel zu verzeichnen [92].

Dem gegenüber deuten die Daten dieser Arbeit jedoch darauf hin, dass der Anstieg der Hormonsekretion nach Griseofulvingabe über einen Kalium-unabhängigen Prozess vermittelt wird.

Vergleicht man die ELISA-Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten, welche die Auswirkungen diverser Inhibitoren des Mikrotubulusapparates auf die Steroidogenese verschiedener endokrin aktiver Zellenlinien untersucht haben, so werden teils gegensätzliche Ergebnisse deutlich. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass die Gabe von Taxol, die Synthese von Pregnenolon, einer wichtigen Vorläufersubstanz in der adrenalen Steroidhormonbiosynthese, inhibiert. Dabei wurde, wie auch in dieser Arbeit, ein dosisabhängiger Verlauf beobachtet [93]. Auch führt die Inkubation mit Colchicin in adrenokortikalen Zellen der Ratte zu einer Stimulation der Kortikosteronbiosynthese [94]. Die Gabe von Colchicin bewirkte eine vermehrte cAMP-unabhängige Kortikosteronsekretion in murinen Proteinkinase A defizienten (kin-8) adrenalen Zelllinien [95].

Taxol, welches eine stabilisierende Wirkung auf den Mikrotubulusapparat hat, führt eher zu einer Inhibierung der Steroidogenese [93], während Colchicin, wie bereits aufgeführt, eine cAMP-unabhängige Stimulation der Kortikosteronsynthese zur Folge hat. Colchicin vermittelt seine Wirkung über eine Depolymerisierung des Mikrotubulusapparates [95]. Die Wirkweise von Griseofulvin an den Mikrotubuli ist noch nicht vollständig geklärt. Die Arbeiten einer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass Griseofulvin die dynamische Instabilität des Mikrotubulusapparates hemmt. Dadurch werden Auf- und Abbauprozesse reduziert. Dabei soll Griseofulvin seine Wirkung über eine direkte Bindung an das Tubulin entfalten [88].

Gleichzeitig stellte sich auch die Frage, ob die Inkubation mit Griseofulvin auch Veränderungen auf der Ebene der Genexpression mit sich bringt. Als Zielgen wurde SF-1 gewählt, welches eine Schlüsselrolle in der Steroidhormonbiosynthese einnimmt. Es wurden gleiche Konzentrationsverläufe und Inkubationszeiten wie bei den Hormonassays benutzt.

Die TaqMan-PCR ergab keine signifikanten Veränderungen auf der Ebene der Genexpression. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass bei der Regulierung der Funktion von SF-1 die posttranslationalen Proteinmodifikationen eine besonders hervorgehobene Rolle spielen. So konnte demonstriert werden, dass die Acetylierung von SF-1 zu einer Vervielfachung der biologischen Aktivität führt [96]. Ferner ruft die Phosphorylierung durch die *mitogen activated* Proteinkinase (MAPK) an einen Serinrest eine Aktivitätssteigerung von SF-1 hervor [97].

Ebenso bewirkt eine Konjugation durch das Sumo Molekül (*small ubiquitin like modulator*) eine Aktivitätsminderung von SF-1. Dabei kommt es zu einer Translokation von SF-1 in die *SUMO-1-formed Nuclear Speckles*, welche Transkriptionsrepressoren enthält [98]. Die eben genannten posttranslationalen Prozesse, scheinen nicht die SF-1 Konzentrationen zu verändern. Eine Inhibition der SF-1 Aktivität über eine Verminderung des Gehaltes von SF-1 in der Zelle, kann über eine Hemmung der Histondeacetylase erfolgen. Durch die vermehrte Ubiquitinierung von SF-1 kommt es zu einer verstärkten Degradation und darauffolgender Reduktion der Steroidhormonbiosynthese [99].

Daneben scheint sich auch die nukleäre Lokalisation von SF-1 je nach posttranslationaler Prozessierung zu verändern [96, 98]. Daneben wurde auch eine zentrosomale Lokalisation von SF-1 in NCI-H295R Zellen beschrieben, die sich durch eine räumliche Nähe zu γ -Tubulin auszeichnet [100].

Um Veränderungen von SF-1 auf Proteinebene zu detektieren, etablierten wir eine Immunfluoreszenzfärbung in NCI-H295R Zellen. Da die Veränderungen auf posttranslationaler Ebene nicht immer mit einer Konzentrationsänderung von SF-1 einhergehen, wurde die Immunfluoreszenz als Verfahren gewählt, welches insbesondere für den Nachweis von Veränderungen der Lokalisation von SF-1 geeignet ist.

Bei ansteigender Konzentrationsgabe von Griseofulvin ist eine Zunahme der nukleären Färbung zu erkennen, was auf eine Translokation des *steroidogenic Factor-1* in den Zellkern hindeuten könnte. Auch korrelieren die strukturell morphologischen Veränderungen der Zellkulturfärbungen mit dem Anstieg der Aldosteron- und DHEA Konzentrationen bei den jeweiligen Griseofulvinkonzentrationen. Die Lokalisationsänderung von SF-1 könnte damit auch im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Sekretionsmustern der

gemessenen Steroidhormone stehen.

SF-1 ist neben seiner bedeutenden Funktion in der Steroidhormonbiosynthese auch an der Regulation der Zentrosomen beteiligt. So konnte eine Arbeitsgruppe darstellen, dass eine SF-1 Depletion zu einer genomischen Instabilität, vermittelt durch Erhöhung der Zentrosomenanzahl und Vorhandensein aberranter Mitosen, führt [100]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte den Wirkmechanismus weiterführend aufklären. So vermittelt SF-1 seine Wirkung über eine Inhibierung der zentrosomalen DNA-Proteinkinase, welches wiederum die Teilung der Zentriolen verhindert [101].

Zentrosomale Veränderung können zu einer chromosomalen Instabilität führen [102]. Das wiederum kann je nach Ausprägung eine vermehrte Apoptose zur Folge haben [48]. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die Inkubation mit Griseofulvin das Wachstum von NCI-H295R Zellen inhibiert [60]. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass die erhöhte Anzahl an Apoptosen der mit Griseofulvin inkubierten NCI-H295R Zellen durch die Fehllokalisierung von γ -Tubulin verursacht sein kann.

Das unter Griseofulvininkubation vermehrt multipolare Mitosen auftreten und diese darauffolgend zu einer vermehrten Apoptose der betroffenen Zelllinie führen, konnte eine weitere Arbeitsgruppe zeigen, welche menschliche Fibroblasten und Tumorzellen verwendet hat [58].

Eine andere Arbeitsgruppe konnte mithilfe von GF-15, einem Griseofulvin Derivat, eine Progression von Tumorzellen verhindern. Bemerkenswerterweise konnte das Wachstum *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden. Für die *in vivo* Versuche wurde ein *Xenograft* Mausmodell etabliert. Dabei wurden die Mäuse in ihrer rechten Flanke mit Tumorzellen inokuliert. Die mit GF-15 inkubierten Versuchstiere zeichneten sich durch ein vermindertes Tumorstadium und eine teilweise verlängerte Überlebenszeit aus. Überdies ergab die histologische Untersuchung der Mäuse eine Abnahme multipolarer Mitosen [103].

Die Tumore der Nebennierenrinde lassen sich wie in der Einleitung schon erwähnt, nach der Dignität und dem Sekretionsprofil unterscheiden [62]. Zur Dignitätsbestimmung wird der *Weiss Score* herangezogen, um das Gewebe nach bestimmten histopathologischen Gesichtspunkten zu bewerten [66]. Leider ist die Dignitätsbestimmung zwischen benignen und malignen Gewebe nicht immer einfach und erschwert auch einem erfahrenen Pathologen eine

klare Diagnose zu stellen. Aus dieser Problematik heraus wurde versucht eine γ -Tubulin Färbung zu etablieren, welche die Zentrosomen in humanem Gewebe darstellen kann. Das Ziel war es die Dignitätsbestimmung mittels der Darstellung zentrosomaler Strukturen zu erleichtern. Durch vorangehende Arbeiten wurden bereits zentrosomale Aberrationen in Adenomen und Karzinomen beobachtet [71].

Bei der Auswertung der Bilder war deskriptiv ein Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorentitäten zu erkennen. Während bei den Adenomen, unabhängig davon ob es sich um ein CPA oder APA handelt, eher kondensierte einzelne γ -Tubulin angefärbte Strukturen erkennbar sind, ist teilweise bei den Nebennierenrindenzarzinomen eine inhomogene, diffuse Färbung zu erkennen. Teilweise konnte dieses für das Nebennierenkarzinom typische Bild auch bei Aldosteron-produzierenden Adenomen beobachtet werden. Eine Korrelation mit der bekannten Größe des Adenoms, wie sie in anderen Arbeiten getroffen werden konnte [71], konnte in der deskriptiven Auswertung der Bilder nicht festgestellt werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung der humanen Paraffinschnitte muss allerdings kritisch bewertet werden. So hatten die Gewebeschnitte an sich eine starke Eigenfluoreszenz, was sich mittels einer Testfärbung sehr gut darstellen ließ. Das machte die genaue Auswertung der γ -Tubulinfärbung schwierig und auch die quantitative Auswertung der angefärbten Strukturen erwies sich als nicht durchführbar. Zudem war es technisch nicht möglich, mit einer geeigneten Software, die Vielzahl der kleinen γ -Tubulin angefärbten Strukturen zu erfassen. Aufgrund dieser Tatsache wurde entschieden eine deskriptive Auswertung vorzuziehen.

Es scheint eine Veränderung des γ -Tubulin-Färbemusters von benignen Gewebe hin zu Karzinomgewebe ersichtlich zu sein. Leider war eine Quantifizierung nicht möglich.

Die Nutzung einer Immunfluoreszenz zur Verbesserung des *Weiss Score* wurde ebenso von anderen Arbeitsgruppen verfolgt. Eines dieser Zielproteine, welches ausgiebig untersucht wurde, ist die Expression von Ki-67. So war zwar die Ki-67 Expression in den Karzinomen stärker als in den Adenomen [104]. Die Ki-67 Expression hat jedoch teilweise so gestreut, dass sie sich mit dem Färbeverhalten der Adenome überschneiden hat [105]. Dennoch ist die

Expression von Ki-67 ein bedeutendes Kriterium zur Beschreibung des Tumorverhaltens aufgrund seiner prognostischen Aussagekraft hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs nach R0-Resektion [106, 107]. Eine vergleichbare Problematik ergab sich auch bei dieser Arbeit. So war teilweise das γ -Tubulin *Staining* eines Nebennierenkarzinoms nicht immer von dem eines Aldosteronproduzierenden Adenoms zu unterscheiden. Diese teils ausgeprägte Streuung des Färbemusters sollte daher hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit eher kritisch betrachtet werden.

Durch die Griseofulvinkubation der NCI-H295R Zellen konnten mehrere Beobachtungen getroffen werden. So stiegen die Aldosteron- und DHEA Konzentrationen an. Gleichzeitig war auch eine Veränderung des γ -Tubulin-Färbemusters ersichtlich. Überdies konnte in der Immunfluoreszenzfärbung ein Anstieg der SF-1 Lokalisation im Zellkern beobachtet werden. Durch das veränderte Muster der γ -Tubulin Expression, könnte SF-1 in seiner Lokalisation beeinflusst werden. Diese Argumentation erscheint deshalb schlüssig, abgesehen von den beobachteten Veränderungen bei Griseofulvingabe, weil SF-1 eine besondere Rolle in der Regulation der Zentrosomen einnimmt. Dadurch verändert sich das Hormonexpressionsprofil der adrenalen Karzinomzellen, da SF-1 eine Schlüsselrolle in der Steroidhormonbiosynthese einnimmt [108].

Es muss aber auch angenommen werden, dass der Anstieg der Konzentrationen von Aldosteron und DHEA nicht nur durch einen etwaigen Aktivitätsanstieg von SF-1 erklärbar ist. So könnte ferner die Inhibierung des Mikrotubulusapparates durch Griseofulvin Auswirkungen auf das Cholesterin *Trafficking* haben, was schon bei anderen Inhibitoren des Mikrotubulusapparates gezeigt worden ist [39].

Ebenso könnte die Hemmung der Mikrotubuli Auswirkungen auf die Anordnung der Zellorganellen haben. Da die Steroidhormonbiosynthese mehrere Zellkompartimente mit einschließt, könnte sich dadurch die räumliche Distanz zwischen den Organellen verändern und folglich Auswirkungen auf den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten haben [40].

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten die Grundlage weiterer Arbeiten bilden. So könnte versucht werden, eine γ -Tubulin und SF-1 Cofärbung zu etablieren. Anschließend könnte der posttranslationale Status des *steroidogenic factor-1*

weiter untersucht werden.

Ebenso könnte dargestellt werden, inwiefern sich die Anordnung der Zellorganellen unter Griseofulvininkubation verändert. Dabei könnte man die Zellorganellen beispielsweise anfärben und nachfolgend auswerten.

Außerdem wäre es möglich ein Tiermodell zu nutzen. Dabei könnten Versuchstiere mit adrenalen Karzinomzellen inokuliert werden, um daraufhin die Effekte einer Griseofulvininkubation zu untersuchen. Zudem wäre es denkbar den eventuellen therapeutischen Nutzen von Griseofulvin näher zu beleuchten, da Griseofulvin pharmakologisch günstige Eigenschaften besitzt, welche einen klinischen Gebrauch praktikabel erscheinen lassen, insbesondere aufgrund des günstigen Toxizitätsprofils [59].

4.2 Schlussfolgerungen

Griseofulvin beeinflusst die Steroidhormonbiosynthese. Ein möglicher Mechanismus könnte die Veränderung der Verteilung von SF-1 sein. Dabei könnte die Inhibierung des Mikrotubulusapparates und Veränderung in der γ -Tubulin Distribution nach Exposition mit Griseofulvin einen wichtigen Anteil haben. Des Weiteren konnten in humanen Nebennierenrindentumoren deskriptiv Veränderungen des γ -Tubulin-Färbemusters festgestellt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Nussey, S. and S. Whitehead, in *Endocrinology: An Integrated Approach*. 2001: Oxford.
2. Mesiano, S. and R.B. Jaffe, *Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex*. *Steroids*, 1997. **62**(1): p. 62-72.
3. Dumontet, T., et al., *Adrenocortical development: Lessons from mouse models*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2018. **79**(3): p. 95-97.
4. Else, T. and G.D. Hammer, *Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(10): p. 458-68.
5. Hatano, O., et al., *Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1*. *Genes Cells*, 1996. **1**(7): p. 663-71.
6. Muench, M.O., et al., *Isolation of definitive zone and chromaffin cells based upon expression of CD56 (neural cell adhesion molecule) in the human fetal adrenal gland*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(8): p. 3921-30.
7. Keegan, C.E. and G.D. Hammer, *Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex*. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. **13**(5): p. 200-8.
8. Molenaar, W.M., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Early fetal acquisition of the chromaffin and neuronal immunophenotype by human adrenal medullary cells. An immunohistological study using monoclonal antibodies to chromogranin A, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, and neuronal cytoskeletal proteins*. *Exp Neurol*, 1990. **108**(1): p. 1-9.
9. Zubair, M., K.L. Parker, and K. Morohashi, *Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(23): p. 7030-40.
10. Xing, Y., et al., *Development of adrenal cortex zonation*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015. **44**(2): p. 243-74.
11. Hatano, O., et al., *Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development*. *Development*, 1994. **120**(10): p. 2787-97.
12. Morohashi, K., et al., *Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(5): p. 643-53.
13. Ramayya, M.S., et al., *Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(6): p. 1799-806.
14. Luo, X., Y. Ikeda, and K.L. Parker, *A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation*. *Cell*, 1994. **77**(4): p. 481-90.
15. Ikeda, Y., et al., *Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development*. *Mol Endocrinol*, 1996. **10**(10): p. 1261-72.
16. Nachtigal, M.W., et al., *Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 445-54.
17. Christenson, L.K. and J.F. Strauss, 3rd, *Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action*. *Arch Med Res*, 2001. **32**(6): p. 576-86.

18. Patel, S., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies*. Biomed Pharmacother, 2017. **94**: p. 317-325.
19. Costa, J.L., et al., *Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues*. Gen Comp Endocrinol, 2004. **136**(1): p. 12-6.
20. Allolio, B. and M. Reincke, *Adrenocorticotropin receptor and adrenal disorders*. Horm Res, 1997. **47**(4-6): p. 273-8.
21. Sala, G.B., et al., *Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis*. J Biol Chem, 1979. **254**(10): p. 3861-5.
22. Stocco, D.M., et al., *Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(11): p. 2647-59.
23. Caron, K.M., et al., *Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(2): p. 138-47.
24. Sugawara, T., *[Role of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in the delivery of cholesterol to the inner mitochondrial membrane]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1997. **42**(13): p. 2081-8.
25. Parker, K.L. and B.P. Schimmer, *Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 361-77.
26. Nogales, E., *Structural insights into microtubule function*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 277-302.
27. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
28. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
29. Walker, R.A., et al., *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1437-48.
30. Mitchison, T.J., *Compare and contrast actin filaments and microtubules*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(12): p. 1309-15.
31. Drewes, G., A. Ebner, and E.M. Mandelkow, *MAPs, MARKs and microtubule dynamics*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(8): p. 307-11.
32. Garnham, C.P. and A. Roll-Mecak, *The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions*. Cytoskeleton (Hoboken), 2012. **69**(7): p. 442-63.
33. Janke, C. and J.C. Bulinski, *Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(12): p. 773-86.
34. Brinkley, B.R., *Microtubule organizing centers*. Annu Rev Cell Biol, 1985. **1**: p. 145-72.
35. Rieder, C.L., S. Faruki, and A. Khodjakov, *The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(10): p. 413-9.
36. Bornens, M., *Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 25-34.
37. Moritz, M., et al., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 638-40.
38. Crivello, J.F. and C.R. Jefcoate, *Mechanisms of corticotropin action in rat adrenal cells. I. The effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis*. Biochim Biophys Acta,

1978. **542**(2): p. 315-29.
39. Rajan, V.P. and K.M. Menon, *Involvement of microtubules in lipoprotein degradation and utilization for steroidogenesis in cultured rat luteal cells*. *Endocrinology*, 1985. **117**(6): p. 2408-16.
 40. Sewer, M.B. and D. Li, *Regulation of adrenocortical steroid hormone production by RhoA–diaphanous 1 signaling and the cytoskeleton*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013. **371**(1-2): p. 79-86.
 41. Li, D. and M.B. Sewer, *RhoA and DIAPH1 mediate adrenocorticotropin-stimulated cortisol biosynthesis by regulating mitochondrial trafficking*. *Endocrinology*, 2010. **151**(9): p. 4313-23.
 42. Ball, E.H. and S.J. Singer, *Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(1): p. 123-6.
 43. Gross, S.P., *Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport*. *Phys Biol*, 2004. **1**(1-2): p. R1-11.
 44. Fukasawa, K., *Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(12): p. 911-24.
 45. Nigg, E.A., *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(11): p. 815-25.
 46. Lingle, W.L., et al., *Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(6): p. 2950-5.
 47. Koutsami, M.K., et al., *Centrosome abnormalities are frequently observed in non-small-cell lung cancer and are associated with aneuploidy and cyclin E overexpression*. *J Pathol*, 2006. **209**(4): p. 512-21.
 48. Weaver, B.A., et al., *Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 25-36.
 49. Sotillo, R., et al., *Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 9-23.
 50. Brinkley, B.R., *Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(1): p. 18-21.
 51. Ganem, N.J., S.A. Godinho, and D. Pellman, *A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability*. *Nature*, 2009. **460**(7252): p. 278-82.
 52. Ring, D., R. Hubble, and M. Kirschner, *Mitosis in a cell with multiple centrioles*. *J Cell Biol*, 1982. **94**(3): p. 549-56.
 53. Guidotti, J.E., et al., *Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 19095-101.
 54. Yang, Z., et al., *Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(6): p. 748-51.
 55. Kwon, M., et al., *Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes*. *Genes Dev*, 2008. **22**(16): p. 2189-203.
 56. Leber, B., et al., *Proteins required for centrosome clustering in cancer cells*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(33): p. 33ra38.
 57. Basto, R., et al., *Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies*. *Cell*, 2008. **133**(6): p. 1032-42.
 58. Rebacz, B., et al., *Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6342-50.
 59. Panda, D., et al., *Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(28): p. 9878-83.

60. Bramann, E.L., et al., *Griseofulvin inhibits the growth of adrenocortical cancer cells in vitro*. *Horm Metab Res*, 2013. **45**(4): p. 297-300.
61. Willenberg, H.S., D. Zschucke, and S.R. Bornstein, [*Adrenal gland tumors*]. *Internist (Berl)*, 2007. **48**(9): p. 971-86.
62. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 309-40.
63. Abiven, G., et al., *Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(7): p. 2650-5.
64. Didolkar, M.S., et al., *Natural history of adrenal cortical carcinoma: a clinicopathologic study of 42 patients*. *Cancer*, 1981. **47**(9): p. 2153-61.
65. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
66. Weiss, L.M., *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. *Am J Surg Pathol*, 1984. **8**(3): p. 163-9.
67. Fuhrman, S.A., L.C. Lasky, and C. Limas, *Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 1982. **6**(7): p. 655-63.
68. Weiss, L.M., L.J. Medeiros, and A.L. Vickery, Jr., *Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 1989. **13**(3): p. 202-6.
69. Lucon, A.M., et al., *Adrenocortical tumors: results of treatment and study of Weiss's score as a prognostic factor*. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 2002. **57**(6): p. 251-6.
70. Kjellman, M., et al., *Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy*. *Cancer Res*, 1996. **56**(18): p. 4219-23.
71. Roshani, L., et al., *Aberrations of centrosomes in adrenocortical tumors*. *Int J Oncol*, 2002. **20**(6): p. 1161-5.
72. Logie, A., et al., *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line*. *J Mol Endocrinol*, 1999. **23**(1): p. 23-32.
73. Bruno Ragazzon, R.L., Sébastien Gaujoux, Guillaume Assié, Amato Fratticci, Pierre Launay, Eric Clauser, Xavier Bertagna, Frédérique Tissier, Aurélien de Reyniès and Jérôme Bertherat, *Transcriptome Analysis Reveals that p53 and β -Catenin Alterations Occur in a Group of Aggressive Adrenocortical Cancers*. *Cancer Res*.
74. Bonnet-Serrano, F. and J. Bertherat, *Genetics of tumors of the adrenal cortex*. *Endocr Relat Cancer*, 2018. **25**(3): p. R131-r152.
75. Assie, G., T.J. Giordano, and J. Bertherat, *Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **351**(1): p. 111-7.
76. Berthon, A., et al., *Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(8): p. 1561-76.
77. Fonseca, A.L., et al., *Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. **51**(10): p. 949-60.
78. Patterson, E.E., et al., *MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy*. *Cancer*, 2011. **117**(8): p. 1630-9.
79. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human*

- adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. *Cancer Res*, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
80. Rainey, W.E., K. Saner, and B.P. Schimmer, *Adrenocortical cell lines*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **228**(1-2): p. 23-38.
 81. Staels, B., D.W. Hum, and W.L. Miller, *Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**(3): p. 423-33.
 82. Wang, T., et al., *Comparison of aldosterone production among human adrenocortical cell lines*. *Horm Metab Res*, 2012. **44**(3): p. 245-50.
 83. Bird, I.M., et al., *Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion*. *Endocrinology*, 1993. **133**(4): p. 1555-61.
 84. Bird, I.M., et al., *Potassium negatively regulates angiotensin II type 1 receptor expression in human adrenocortical H295R cells*. *Hypertension*, 1995. **25**(6): p. 1129-34.
 85. Clyne, C.D., et al., *Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(5): p. 638-49.
 86. Scholl, U.I., et al., *CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II*. *Nat Genet*, 2018. **50**(3): p. 349-354.
 87. Hanley, N., et al., *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide stimulate aldosterone production in the human adrenocortical cell line, NCI-H295*. *Endocr. J*, 1993. **1**: p. 447-450.
 88. Rathinasamy, K., et al., *Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 213.
 89. Singh, P., et al., *Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(6): p. 368-75.
 90. Sewer, M.B. and D. Li, *Regulation of steroid hormone biosynthesis by the cytoskeleton*. *Lipids*, 2008. **43**(12): p. 1109-15.
 91. Bortner, C.D. and J.A. Cidlowski, *Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21953-62.
 92. Lichtenauer, U.D., et al., *Characterization of NCI-H295R cells as an in vitro model of hyperaldosteronism*. *Horm Metab Res*, 2013. **45**(2): p. 124-9.
 93. Rainey, W.E., et al., *The effects of taxol, a microtubule-stabilizing drug, on steroidogenic cells*. *J Cell Physiol*, 1985. **123**(1): p. 17-24.
 94. Lee, L.J., et al., *Mechanism of colchicine-induced steroidogenesis in rat adrenocortical cells*. *J Cell Biochem*, 2001. **81**(1): p. 162-71.
 95. Sackett, D.L. and J. Wolff, *Cyclic AMP-independent stimulation of steroidogenesis in Y-1 adrenal tumor cells by antimetabolic agents*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **888**(2): p. 163-70.
 96. Chen, W.Y., L.J. Juan, and B.C. Chung, *SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(23): p. 10442-53.
 97. Hammer, G.D., et al., *Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress*. *Mol Cell*, 1999. **3**(4): p. 521-6.
 98. Chen, W.Y., et al., *SUMO modification of repression domains modulates*

- function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1)*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38730-5.
99. Chen, W.Y., et al., *Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1)*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 7284-90.
 100. Lai, P.Y., et al., *Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) resides in centrosomes and maintains genomic stability by controlling centrosome homeostasis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(12): p. 1836-44.
 101. Wang, C.Y., et al., *NR5A1 prevents centriole splitting by inhibiting centrosomal DNA-PK activation and ss-catenin accumulation*. Cell Commun Signal, 2014. **12**(1): p. 55.
 102. Nam, H.J., R.M. Naylor, and J.M. van Deursen, *Centrosome dynamics as a source of chromosomal instability*. Trends Cell Biol, 2014.
 103. Raab, M.S., et al., *GF-15, a novel inhibitor of centrosomal clustering, suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5374-85.
 104. Terzolo, M., et al., *Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors*. Urology, 2001. **57**(1): p. 176-82.
 105. Iino, K., et al., *DNA topoisomerase II alpha and Ki-67 in human adrenocortical neoplasms: a possible marker of differentiation between adenomas and carcinomas*. Mod Pathol, 1997. **10**(9): p. 901-7.
 106. Fassnacht, M., et al., *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, 2018. **179**(4): p. G1-g46.
 107. Beuschlein, F., et al., *Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(3): p. 841-9.
 108. Mizutani, T., et al., *Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex*. Mol Cell Endocrinol, 2014.