

Aus der Medizinischen Klinik IV, Sektion Endokrinologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Expression von Hsp90 α , Hsp90 β , FKBP51 und dem Glucocorticoid-Rezeptor
in Tumoren der Nebenniere**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Frei-Stuber

aus

Weilheim in Oberbayern

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Felix Beuschlein
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Frank Berger Prof. Dr. med. Alexander Bartelt
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Luis Gustavo Pérez-Rivas
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.10.2020



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Frei-Stuber, Ludwig

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Expression von Hsp90 α , Hsp90 β , FKBP51 und dem Glucocorticoid-Rezeptor in Tumoren der Nebenniere

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.11.2019

Ort, Datum

Ludwig Frei-Stuber

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	5
1.1	Die Nebenniere	5
1.1.1	Aufbau und Funktion.....	5
1.1.2	Adrenale Steroide und Steroidbiosynthese	6
1.1.3	Das Cushing-Syndrom	10
1.1.4	Das Nebennierenrindenkarzinom	12
1.2	Der Glucocorticoid-Rezeptor	14
1.3	Hitzeschockproteine	17
1.3.1	Grundlagen.....	17
1.3.2	Aufbau und Funktion.....	17
1.3.3	Pathophysiologische Relevanz	20
1.3.4	Hsp90-Inhibitoren	22
1.4	Das FK506 bindende Protein 51.....	25
1.4.1	Aufbau und Funktion.....	25
1.4.2	Pathophysiologische Relevanz	27
1.4.3	FKBP51-Inhibitoren	29
1.5	Interaktionen zwischen GR, Hsp90 und FKBP51	31
2	Zielsetzung des Projekts.....	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Materialien und Reagenzien	35
3.1.1	Allgemeine Laborgeräte	35
3.1.2	Reagenzien	37
3.2	Herstellung der Lösungen	40
3.2.1	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline (PBS))....	40
3.2.2	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris-buffered saline (TBS))	41
3.2.3	Lösung aus 1 M Tris-HCl (pH 7,4) und 1 % Tween®20.....	41
3.2.4	Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-Puffer (TE-Puffer) (100 mM, pH 9,0, 1 l).....	42
3.2.5	Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0, 1 l)	42
3.2.6	Differenzierungslösung	42
3.2.7	Scott's tap water substitution	42
3.2.8	Eosin	43

3.3	Der Tissue Microarray	43
3.4	Patienten und Gewebe	45
3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
3.6	Immunhistochemie	48
3.6.1	Anfertigung der Schnitte.....	48
3.6.2	Deparaffinisierung der Schnitte	49
3.6.3	Erhitzen zur Antigenfreilegung unter Verwendung von TE-Puffer (pH 9,0) bzw. Zitratpuffer (pH 6,0)	49
3.6.4	Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität und unspezifischer Antigene.....	50
3.6.5	Inkubation mit dem primären Antikörper	51
3.6.6	Inkubation mit dem sekundären Antikörper	52
3.6.7	Färbung mit Substrat-Chromogen-Lösung.....	52
3.6.8	Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	53
3.6.9	Dehydrierung und Auflage der Deckgläser	54
3.7	Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung	54
3.7.1	Gewebeblöcke.....	54
3.7.2	Tissue microarray	56
3.8	Statistik.....	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Ergebnisse der Analyse von Kohorte 1	59
4.1.1	Hsp90α	60
4.1.2	Hsp90β	63
4.1.3	FKBP51	70
4.1.4	GR.....	73
4.2	Ergebnisse der Analyse von Kohorte 2	74
4.2.1	Hsp90α	76
4.2.2	Hsp90β	80
4.2.3	FKBP51	85
4.2.4	GR.....	85
4.2.5	Gesamtüberlebensraten	87
5	Diskussion	90
5.1	Vorteile des Vorgehens bei Kohorte 1	90
5.2	Vorteile des Vorgehens bei Kohorte 2	91
5.3	Beurteilung der Ergebnisse zur Hsp90α-Expression	93
5.4	Beurteilung der Ergebnisse zur Hsp90β-Expression	95

5.5	Beurteilung der Ergebnisse zur FKBP51-Expression	96
5.6	Beurteilung der Ergebnisse zur Expression des GR.....	97
5.7	Klinische Relevanz und Ausblick	98
6	Zusammenfassung	100
7	Literaturverzeichnis	103
8	Anhang	131
8.1	Zusatzmaterial zu den Ergebnissen.....	131
8.1.1	Zusatzmaterial zu den Ergebnissen von Kohorte 1	131
8.1.2	Zusatzmaterial zu den Ergebnissen von Kohorte 2	137
8.2	Abbildungsverzeichnis	140
8.3	Tabellenverzeichnis.....	142
8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	144
8.5	Danksagung	146
8.6	Veröffentlichungen	148

1 Einleitung

1.1 Die Nebenniere

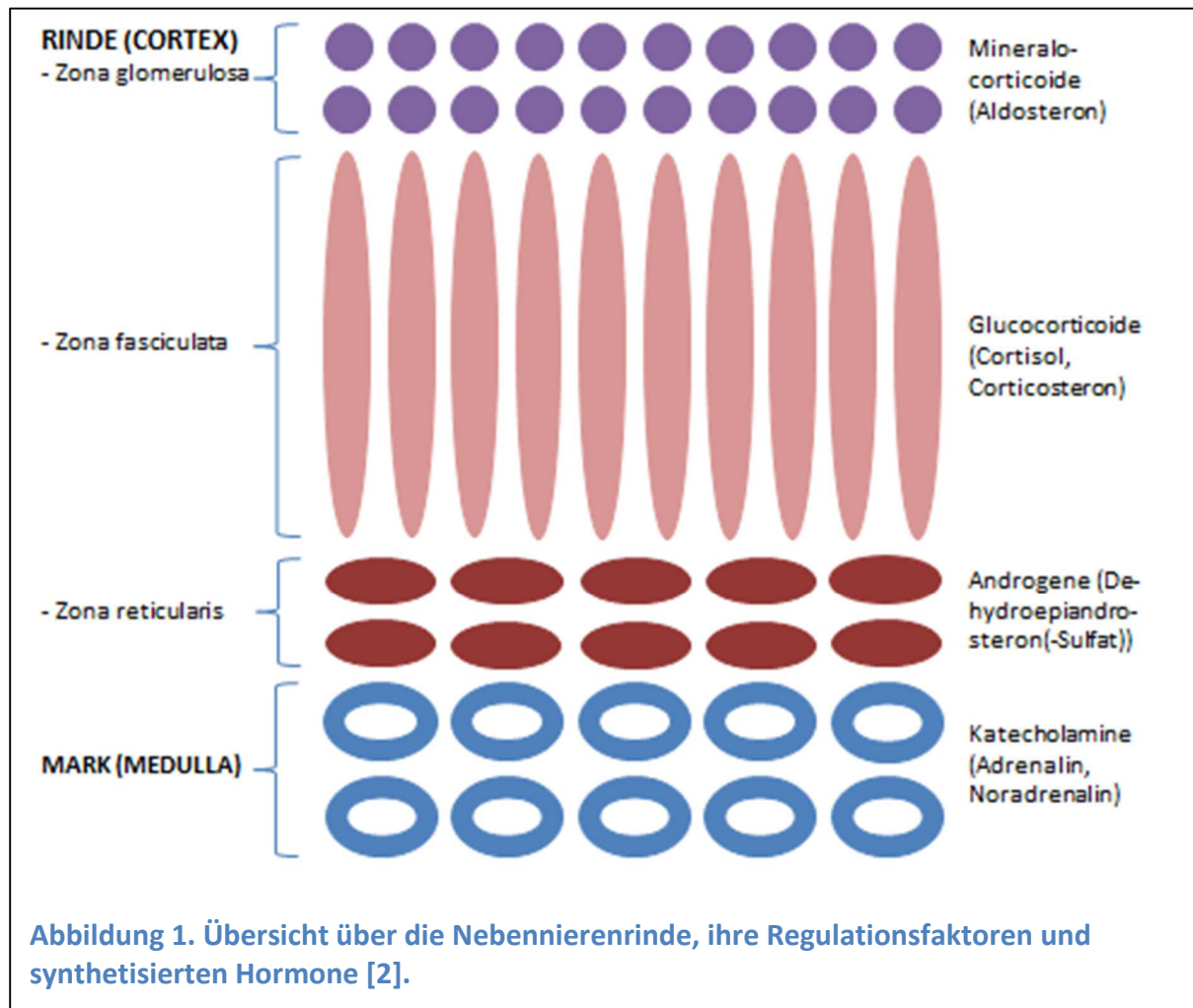
1.1.1 Aufbau und Funktion

Der menschliche Organismus verfügt über zwei Nebennieren, die sich beide jeweils kranial der Nieren befinden. Die Nebenniere ist aus verschiedenen Arten von Gewebe aufgebaut. Jeder Gewebetyp ist für die Synthese bestimmter Hormone zuständig. Zunächst muss zwischen der außen gelegenen Rinde (Cortex) und dem sich unter der Rinde befindlichen Mark (Medulla) unterschieden werden. Außerdem ist jede Nebenniere von einer Kapsel umgeben, die das Organ gegenüber der Umgebung abgrenzt. Bezüglich der Rinde muss eine weitere Unterteilung in verschiedene Bereiche erfolgen, von denen wiederum zonenspezifisch bestimmte Hormone produziert werden [1]:

- Unmittelbar unterhalb der Nebennieren-Kapsel liegt die Zona glomerulosa. Diese ist für die Sekretion von Mineralocorticoiden wie beispielsweise Aldosteron zuständig. Die Modulation der Aktivität der Zona glomerulosa erfolgt über Angiotensin II und die einfach positiv geladenen Kaliumionen.
- Die mittlere Zone des Cortex, die sich der Zona glomerulosa anschließt, heißt Zona fasciculata. Diese Region der Nebennierenrinde ist für die Produktion von Glucocorticoiden verantwortlich. Die Regulation der Zona fasciculata erfolgt über das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus der Hypophyse.
- Schließlich gibt es noch die Zona reticularis, die zwischen der Zona fasciculata und dem Mark der Nebenniere lokalisiert ist. In der Zona reticularis findet die Synthese von Androgenen, Dehydroepiandrosteron sowie Dehydroepiandrosteron-Sulfaten statt, die unter anderem durch ACTH stimuliert werden.

Außerdem folgt nach innen auf die Zona reticularis noch die Medulla. Hier werden Katecholamine wie beispielsweise Adrenalin und Noradrenalin sezerniert. Die Regulation der Aktivität des Nebennierenmarks erfolgt über die Nervi splanchnici, Chromatin-Zellen sowie medulläre Venen. Es ist auffällig, dass es eine ganz konkrete Gliederung des Cortex gibt, wobei ganz bestimmte Bereiche die Herstellung spezieller Hormone übernehmen. Dies wird

dadurch begründet, dass in jeder Zone selektiv bestimmte Enzyme mit der Fähigkeit zum Metabolismus von Steroiden vorhanden sind. Wie die spezifische Expression der Enzyme zustande kommt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden [2].

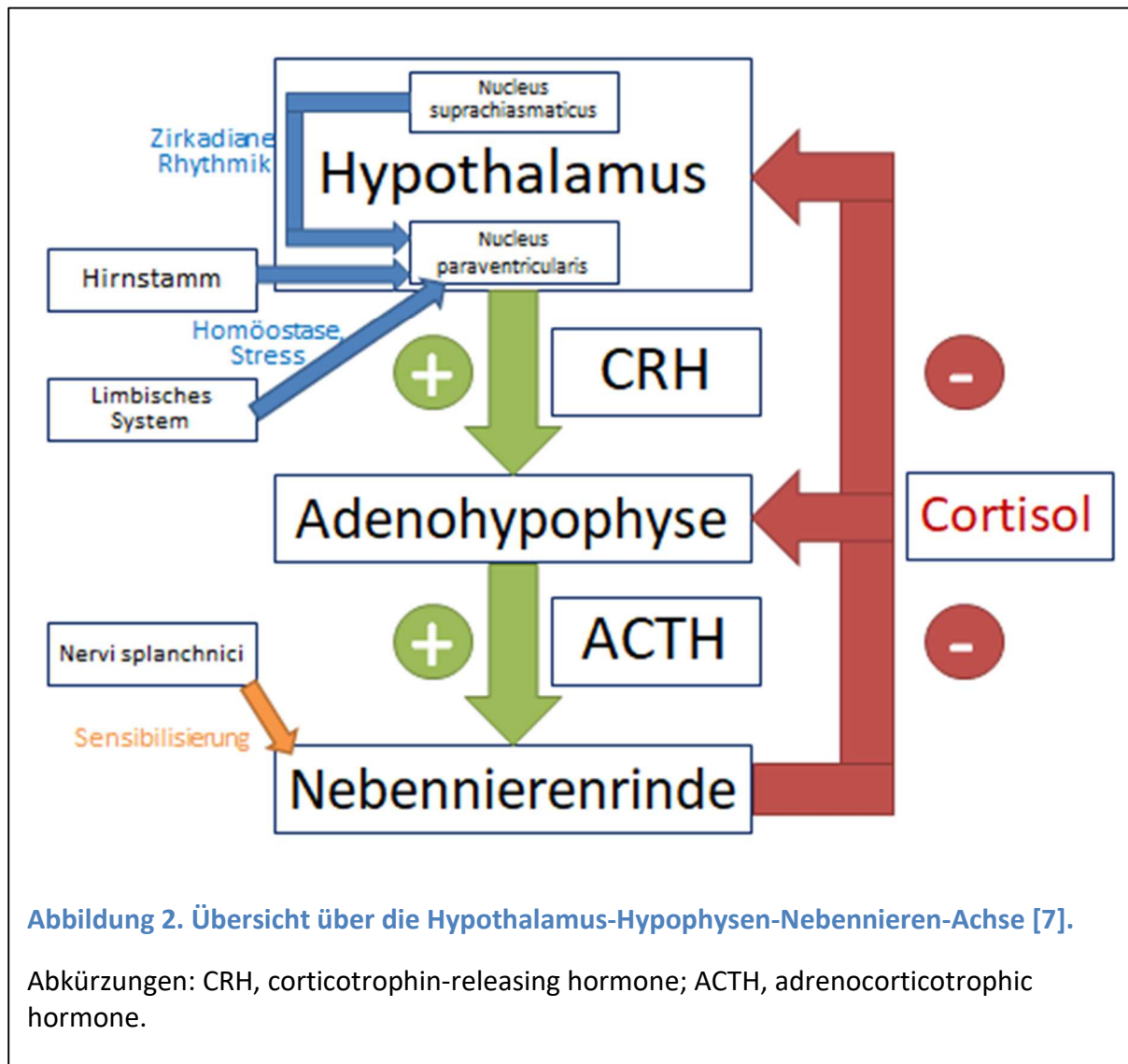


1.1.2 Adrenale Steroide und Steroidbiosynthese

Für Lebewesen ist es essentiell, auf Situationen, in denen sie Stress ausgesetzt sind, adäquat reagieren zu können. Zunächst erfolgt eine schnelle Antwort auf den Stressor in Form von einer temporär erhöhten Leistungsfähigkeit des Organismus, der infolgedessen eine gesteigerte Vigilanz aufweist. Dieser Zustand wird über eine verbesserte Blutzirkulation durch Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz sowie einen höheren Sauerstoffgehalt des Blutes infolge eines höheren Atemminutenvolumens erreicht. Zusätzlich wird der Glucose-

Level im Blut angehoben. Neben der unmittelbaren Stressreaktion ist es natürlich langfristig auch sinnvoll, dass der Körper die Eigenschaften des Stressors in Erinnerung behält, um zukünftig noch besser auf bekannte Stresssituationen reagieren zu können. Deshalb wird simultan die Merkfähigkeit durch die vermehrt freigesetzte Glucose verbessert. Der Prozess der Stressantwort wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA-Achse)) vermittelt, wobei es im Endeffekt vor allem zu einer Ausschüttung von Cortisol aus der Zona fasciculata kommt [3] [4] [5] [6].

Das Grundprinzip der Funktionsweise der HPA-Achse besteht in einem Zusammenspiel aus positiven und negativen Feedbackmechanismen, wodurch die Hormonsynthese reguliert wird. Vom Nucleus suprachiasmaticus werden Signale über die aktuelle zeitliche Einordnung in Bezug auf den Tagesverlauf an den Nucleus paraventricularis weitergeleitet. Außerdem werden letzterem Informationen über die aktuelle Anpassung des Organismus an endogene und exogene Faktoren aus dem Hirnstamm und dem limbischen System übermittelt. Sowohl der Nucleus suprachiasmaticus als auch der Nucleus paraventricularis sind im Hypothalamus lokalisiert. Verlagert sich die Situation aus der Homöostase (z.B. Hypoglykämie), so erfolgt eine Zunahme der Sekretion von Corticotropin-releasing Hormone (CRH) aus den genannten Nuclei des Hypothalamus, das auf dem Blutweg zur Adenohypophyse gelangt [7]. Das CRH bewirkt im Hypophysenvorderlappen die vermehrte Bildung von ACTH, das sowohl den Hypothalamus als auch die Nebenniere über das Blut erreicht. ACTH stimuliert die Synthese von Cortisol und weiteren Glucocorticoiden in der Zona fasciculata. Durch die erhöhten Glucocorticoid-Spiegel wird sowohl die Sekretion von CRH im Hypothalamus als auch von ACTH in der Adenohypophyse inhibiert [8] (Abbildung 2).

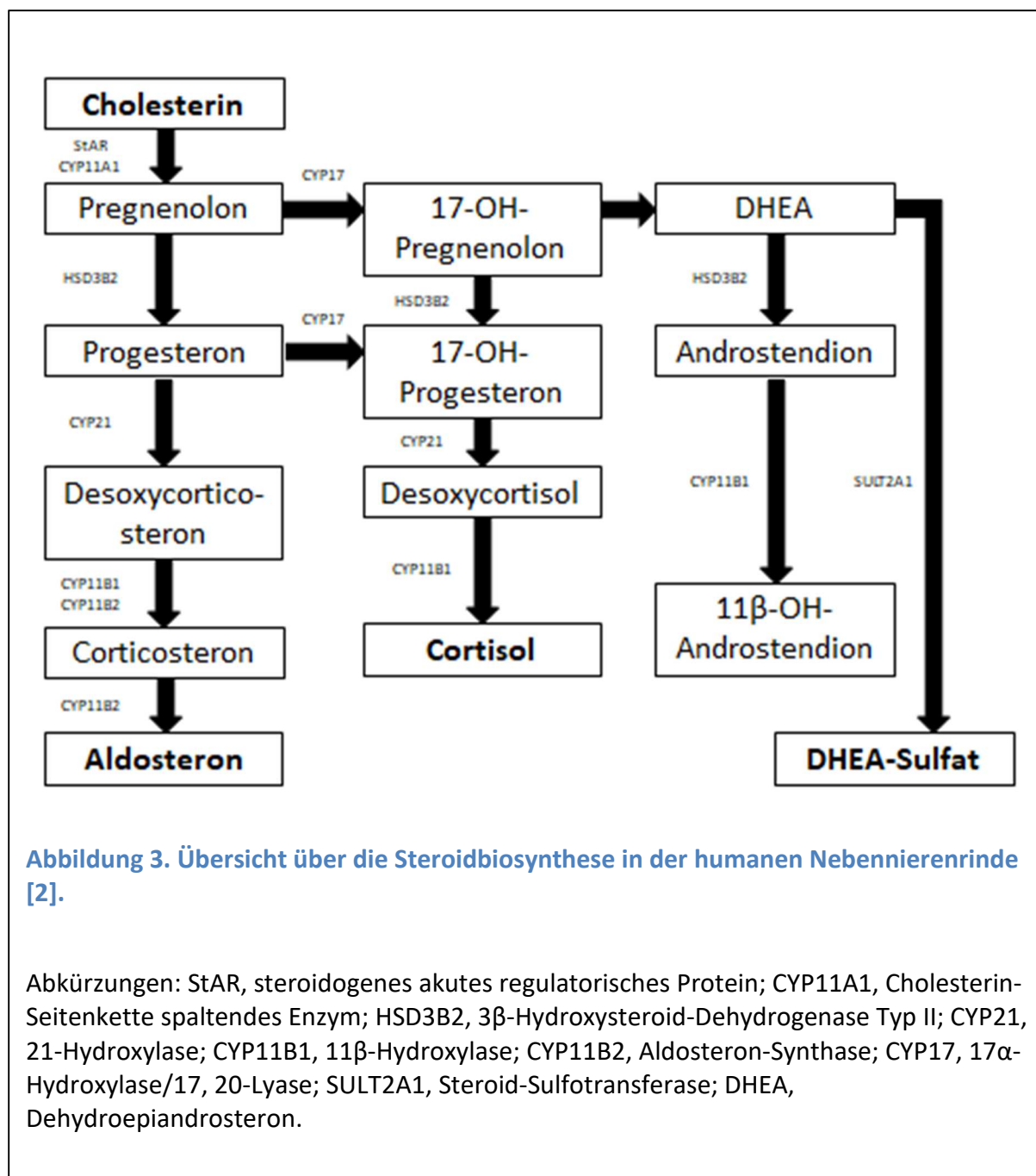


Beim Menschen ist Cortisol das wichtigste Glucocorticoid. Die regelmäßigen Schwankungen der Cortisol-Spiegel im Tagesverlauf werden als zirkadiane Rhythmik bezeichnet. Cortisol ist für den Erhalt und die Wiederherstellung der körpereigenen Homöostase verantwortlich. Um dies zu verwirklichen, kann Cortisol Einfluss auf den Transport von Ionen, die Regulation der Glycogenolyse, das Immunsystem sowie die Gedächtnisfunktionen nehmen. Die Wirkungen von Glucocorticoiden werden in physiologischer Konzentration durch den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) vermittelt. Damit Glucocorticoide diesen intrazellulären Rezeptor erreichen, müssen sie die Zellmembranen passieren, was durch die lipophilen Eigenschaften der Steroidhormone ermöglicht wird [9].

Neben dem körpereigenen Cortisol gibt es zahlreiche weitere modifizierte Glucocorticoide wie Prednisolon, Methylprednisolon, Betamethason und Dexamethason. Glucocorticoide haben einen festen Bestandteil als immunsuppressive Therapeutika bei Organtransplantationen, Allergien und werden wegen ihrer antiinflammatorischen Wirkung ebenso bei vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Kollagenosen, Vaskulitiden und weiteren Autoimmunkrankheiten verwendet [10] [11]. Außerdem ist die therapeutische Wirkung bei hämatologischen Neoplasien, etwa Leukämien, Lymphomen und multiplen Myelomen gut belegt. Insgesamt gehören Glucocorticoide zu den am häufigsten eingesetzten Pharmaka überhaupt [12] [13] [14].

Die Steroidbiosynthese ist eine komplexe Abfolge enzymatisch vermittelter Schritte mit dem Ziel, aus Cholesterin Steroidhormone zu produzieren. Es ist gut bekannt, dass ACTH die Steroidgenese stimuliert, wobei viele weitere Modulatoren der Steroidbiosynthese existieren [15] [16] [17]. Die Geschwindigkeit der Syntheseleistung wird vor allem durch die Dauer des Transports von Cholesterin von der äußeren zur inneren Membran der Mitochondrien bestimmt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und damit das Ausmaß der aktuell ablaufenden Steroidgenese wird durch das steroidogene akute regulatorische Protein (StAR) sowie einige andere Proteine (etwa voltage dependent anion channel (VDAC)) beeinflusst. An der inneren Mitochondrienmembran befindet sich das Cholesterin-Seitenkette spaltende Enzym (CYP11A1), das als Katalysator den Start der Steroidbiosynthese unterstützt. Dabei erfolgt die Reaktion von Cholesterin zu Pregnenolon, das für weitere Schritte zum endoplasmatischen Retikulum transferiert wird. Schließlich entstehen dort Androgene bzw. Dehydroepiandrosteron(-Sulfat). Sollte jedoch Aldosteron oder Cortisol gebildet werden, ist für die weitere Synthese erforderlich, dass entsprechende Metaboliten wieder zurück zum Mitochondrium gelangen [18] [19] [20] [21] [22]. Einen Überblick über die Steroidbiosynthese sowie die dafür erforderlichen Enzyme zeigt die Abbildung 3.

Als Ausgangspunkt der Produktion neuer Steroidhormone dient Cholesterin. Über die in der Abbildung 3 in den Rahmen dargestellten Metaboliten und neben den Reaktionspfeilen aufgeführten Enzyme werden schließlich die drei Gruppen von Hormonen gebildet: Aldosteron als Vertreter der Mineralocorticoide, Cortisol als wichtigstes Beispiel für Glucocorticoide sowie die Androgene [2].



1.1.3 Das Cushing-Syndrom

Das Cushing-Syndrom bzw. seine Symptome treten infolge einer erhöhten Konzentration von Cortisol, einem Hypercortisolismus, auf. Das Cushing-Syndrom kann sowohl exogene als auch endogene Ursachen haben. Der häufigste Grund für ein exogenes Cushing-Syndrom ist eine iatrogene medikamentöse Therapie mit Glucocorticoiden [23]. Der Grund für endogene Formen des Hypercortisolismus besteht vor allem in der autonomen Produktion von ACTH

durch einen Tumor im Hypophysenvorderlappen (Morbus Cushing, ca. 70 %), in ektopen Quellen (ca. 15 %) und in Cortisol produzierenden Tumoren der Nebenniere (ca. 15 %) [24]. Im speziellen Fall, dass das Cushing-Syndrom aufgrund eines ACTH-produzierenden Tumors – im Regelfall einem Adenom – der Adenohypophyse entsteht, spricht man vom Morbus Cushing [23]. Beim Cushing-Syndrom finden sich in rund 80 % erhöhte Spiegel von Cortisol infolge eines ACTH-Exzesses. Zu den entsprechenden Ursachen für ACTH-abhängige und -unabhängige Varianten siehe die Tabelle 1 [25].

ACTH-abhängig (ca. 80 %)	ACTH-unabhängig (ca. 20 %)
ACTH-produzierender (benigner) Tumor in der Adenohypophyse (entspricht dem eigentlichen Morbus Cushing) (ca. 70 %)	Adenome und Karzinome der Nebennierenrinde (ca. 20 %)
Ektope (nicht hypophysäre) ACTH-Synthese (z.B. kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC), C-Zell-Schilddrüsenkarzinom, Karzinoide) (ca. 15 %)	Primäre pigmentierte noduläre adrenocorticale Dysplasie (PPNAD) (< 1 %)
Ektope (nicht-hypothalamische) CRH-Sekretion (< 1 %)	Hyperplasie der beiden Nebennieren (< 1 %)

Tabelle 1. Übersicht über die Ursachen der ACTH-abhängigen und ACTH-unabhängigen Form des Cushing-Syndroms [25].

Prinzipiell ist es unwahrscheinlich, an einem endogenen Cushing-Syndrom zu erkranken. Die Inzidenz der Erkrankung liegt im Bereich von 1,2 bis 2,4 pro 1.000.000 Einwohner [26]. Die Konsequenzen des Hypercortisolismus können für die Patienten sehr schwerwiegend sein. Bei einigen Folgekrankheiten ist unter Umständen auch mit einem tödlichen Verlauf zu rechnen. Zum klinischen Erscheinungsbild gehören Stiernacken, Vollmondgesicht, Hirsutismus, Fertilitätsstörungen, Unregelmäßigkeiten beim Menstruationszyklus, Depression, verminderte Leistungsfähigkeit des Immunsystems, Striae rubrae et distensae, Osteoporose und Muskelatrophien. Außerdem bestehen häufig eine stammbetonte Adipositas mit Gewichtszunahme und pergamentartiger Haut, eine pathologische Glucose-Toleranz bis zur Entstehung eines manifesten Diabetes mellitus, einer Hyperlipidämie, erhöhten Gerinnungsneigung und arteriellen Hypertonie. Komplikationen

wie Myokardinfarkt und Apoplex sind ursächlich für ca. 50 % der Mortalität innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung. Leider vergehen vom Auftreten erster klinischer Anzeichen eines Cushing-Syndroms bis zur Stellung der korrekten Diagnose im Durchschnitt 6,0 Jahre [27].

1.1.4 Das Nebennierenrindenkarzinom

Beim Nebennierenrindenkarzinom (engl. adrenocortical carcinoma (ACC)) handelt es sich um eine sehr seltene Krankheit. Die jährliche Inzidenz dieser Neoplasie wird mit ungefähr 1 – 2 : 1.000.000 Menschen angegeben [28] [29] [30]. Dabei fällt auf, dass Neuerkrankungen besonders oft entweder vor dem fünften Lebensjahr oder während des fünften und sechsten Lebensjahrzehnts auftreten. Bei der Geschlechterverteilung beträgt das Verhältnis weiblich : männlich etwa 2 : 1. Die Mehrheit der Erkrankungen tritt spontan auf. Wesentlich seltener besteht eine genetische Komponente, die zur Entwicklung eines ACCs prädestiniert. Letzteres liegt vor allem bei folgenden Konstellationen vor:

- Multiple endokrine Neoplasie Typ 1,
- Li-Fraumeni-Syndrom,
- Beckwith-Wiedemann-Syndrom und
- Carney-Komplex.

Das klinische Erscheinungsbild der Patienten ist von der Art der hormonellen Störungen abhängig. In 60 – 80 % treten Veränderungen der Hormonspiegel auf, wobei am häufigsten entweder eine vermehrte autonome Produktion von Glucocorticoiden oder von Glucocorticoiden und Androgenen vorkommt [28] [31] [32]. Sollte durch das ACC eine verstärkte Synthese von Glucocorticoiden hervorgerufen werden, so ist mit der Manifestation eines Cushing-Syndroms (siehe hierzu 1.1.3) zu rechnen. In einigen Fällen kommt es zu einer Zunahme der Produktion von Androgenen bzw. Östrogenen. Erhöhte Androgen-Spiegel bewirken bei Patientinnen klinisch einen Hirsutismus, wohingegen ein Anstieg der Östrogene bei männlichen Probanden eine Gynäkomastie und bei Frauen nach der Menopause eine Metrorrhagie verursachen [28] [31] [32]. Bei den nur in Einzelfällen auftretenden Aldosteron-produzierenden ACCs kommt es zu einer vermehrten Rückresorption von Wasser und Natrium sowie einer stärkeren Exkretion von Protonen und

Kalium. Dies erklärt die Entstehung einer arteriellen Hypertonie, einer metabolischen Alkalose und einer Hypokaliämie. Des Weiteren existieren auch hormonell inaktive Varianten des ACCs oder solche, die hormonelle Vorstufen ohne wesentliche biologische Aktivität sezernieren. Diese können erst durch Lokalsymptome auffallen [28] [32]. ACCs sind typischerweise groß mit Durchmessern von ca. 5 – 20 cm und einem Gewicht von rund 1.000 g [28] [29] [32].

ACCs werden überwiegend spät diagnostiziert, weswegen der Tumor daher oft bereits ein fortgeschrittenes Stadium (Tabelle 2) erreicht hat [28] [32] [33]. In dieser Situation kann bereits eine Metastasierung stattgefunden haben, wobei sich meist lymphatische, hepatische und pulmonale Filiae finden [28] [32] [33]. Aufgrund des meist weit fortgeschrittenen Krebsleidens leben nach fünf Jahren nur noch zwischen 30 und 45 % der betroffenen Personen [29] [34].

Stadium	ENSAT 2008
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1 – T2, N1, M0 T3 – T4, N0 – N1, M0
IV	T1 – T4, N0 – N1, M1

Tabelle 2. Klassifikation der Tumorstadien des ACC nach ENSAT [222].

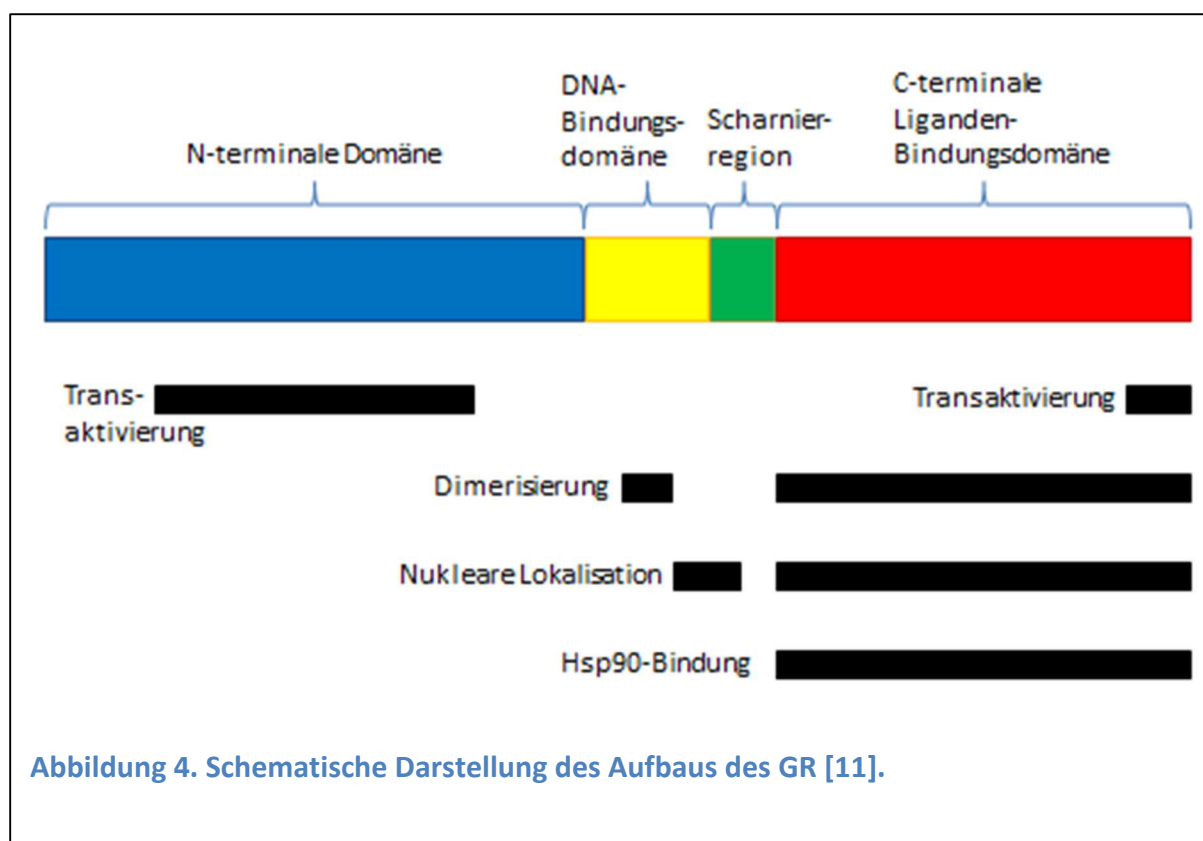
Abkürzungen: ENSAT, European Network for the Study of Adrenal Tumors; T1, Tumor ≤ 5 cm; T2, Tumor > 5 cm; T3, Tumor infiltriert umliegendes Gewebe; T4, Tumor infiltriert benachbarte Organe oder venöser Tumorthrombus in der Vena cava oder in der Vena renalis; N0, keine positiven Lymphknoten; N1, positive(r) Lymphknoten; M0, keine Fernmetastasen; M1, Fernmetastasen.

Die weiterhin schlechte Prognose des ACCs machen therapeutische Verbesserungen erforderlich. Selbst wenn es gelingt, ein ACC in sano zu resektieren, so muss man doch häufig mit Rezidiven rechnen [35]. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass man das Risiko für ein Neuauftreten des ACCs nach R0-Resektion selbst in einer hochspezialisierten Klinik auf bis zu 30 % beziffern kann [36] [37].

1.2 Der Glucocorticoid-Rezeptor

Der GR ist ein Rezeptor, der die Effekte der Glucocorticoide vermittelt. Er wird ubiquitär exprimiert und ist je nach Aktivierung im Zytoplasma oder im Nukleus der Zellen lokalisiert. Es gibt sehr viele Gene, auf die der GR Einfluss nehmen kann, man geht von bis zu 10 – 20 % der im Menschen vorhandenen Gene aus [38] [39] [40]. Die Sensitivität des GR zeigt eine Variabilität, abhängig von individuellen genetischen Varianten, vom Gewebetyp und Phase des Zellzyklus. Der humane GR setzt sich aus vier funktionellen Domänen zusammen, die in insgesamt neun Exonen kodiert sind:

- Eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (codiert von Exon 2),
 - einer sich in der Mitte befindenden DNA-Bindungsdomäne (codiert von Exon 3 und 4),
 - eine Scharnierregion (engl. „hinge region“) und
 - eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (beide codiert von den Exons 5 – 9)
- (Abbildung 4).



In Abwesenheit des Liganden ist der GR in einen größeren Protein-Komplex integriert, der im Zytosol lokalisiert ist. Zu diesem Komplex gehören beispielsweise auch das Hitzeschockprotein (Hsp) 70, Hsp90 und p23 sowie Proteine der FK506-Gruppe wie das FK506 bindende Protein 51 (FKBP51) und das FK506 bindende Protein 52 (FKBP52) [41] [42].

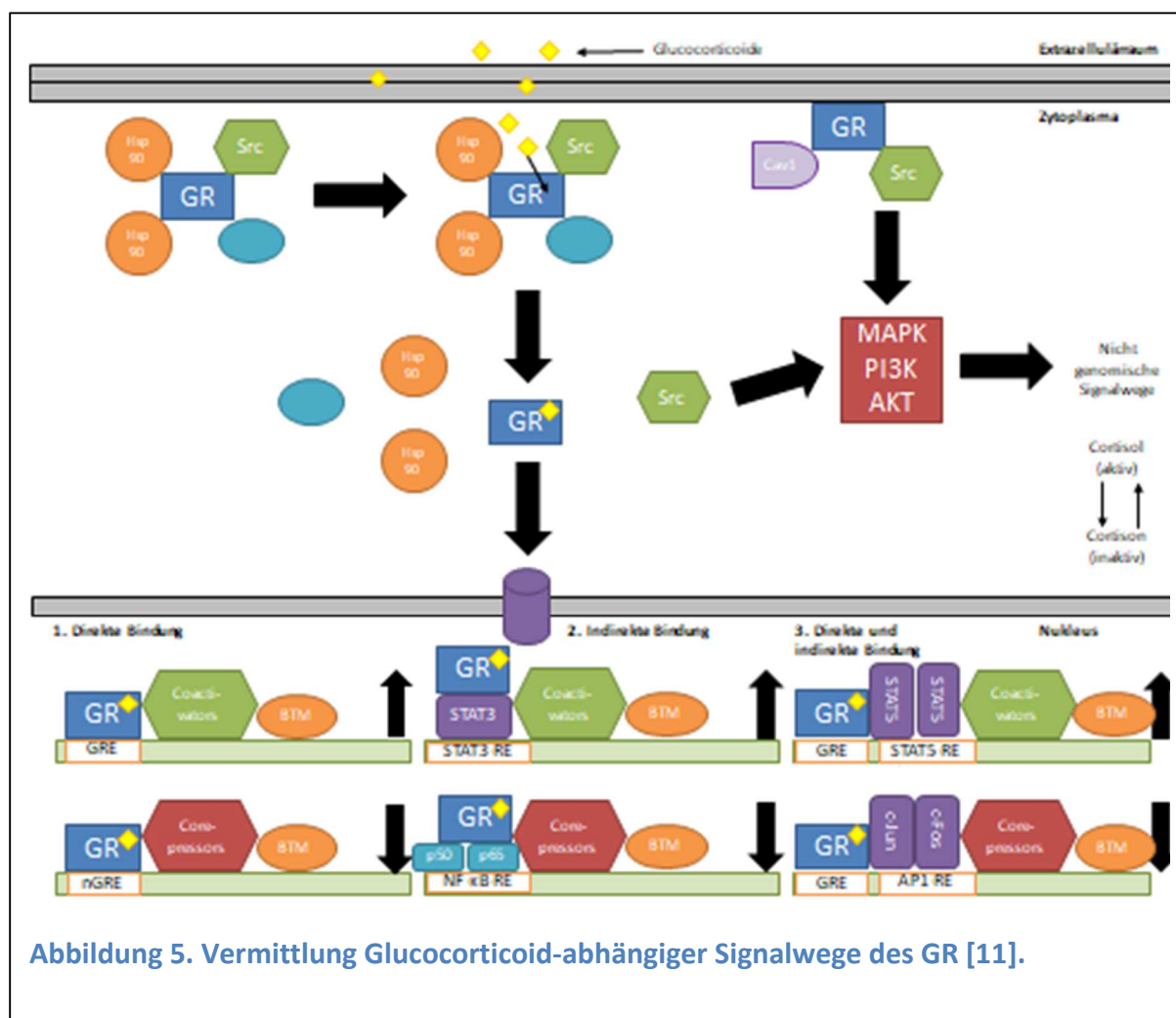
Die beiden verschiedenen GR-Isoformen GR α und GR β sind das Resultat von alternativem Splicing im Bereich des Exons 9. Der molekulare Aufbau beider Isoformen ist damit für die ersten 727 Aminosäuren identisch. Bei GR α schließen sich daraufhin 50 weitere Aminosäuren an, wohingegen die Aminosäure-Sequenz des GR β auf 15 Aminosäuren gekürzt ist. GR α ist die Isoform, die auf eine Ligandenbindung von Glucocorticoiden eine Signaltransduktion vermittelt. GR β ist hingegen auch in Anwesenheit von Glucocorticoiden inaktiv [43] [44]. GR β entfaltet seine Funktion nur bei simultaner Aktivierung beider Rezeptor-Isoformen und hemmt GR α . Auf welchen Wegen dies genau geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt immerhin einige Erklärungsansätze:

- Blockade der Interaktion mit Glucocorticoid-response elements (GREs),
- Einflussnahme auf Proteine, die für die Kontrolle der Transkription verantwortlich sind, und
- Bindung von GR β an GR α .

Damit ist bereits erklärt, dass GR α seine Funktion nur erfüllt, wenn geringe Konzentrationen von GR β vorhanden sind, was im Wesentlichen der physiologischen Verteilung entspricht. Die anti-inflammatorische Wirkung des GR wird durch einen Anstieg von GR β durch Entzündungsmediatoren negativ moduliert. Prinzipiell wird GR β in vielerlei Zellen beim Menschen exprimiert, besonders hoch jedoch in neutrophilen Granulozyten, die für die unspezifische Immunabwehr zuständig sind, und – interessanterweise – in Epithelzellen [45] [46] [47]. Neben den GR α und GR β gibt es weitere Subtypen des GR. So existieren acht verschiedene Transkripte infolge acht verschiedener Startcodons, die vom Exon 2 des GR-Gens stammen. Infolgedessen gibt es auch acht verschiedene daraus resultierende Varianten von GR α , wobei deren N-terminale Transaktivierungsdomänen kürzer sind als bei der klassischen Form von GR α . Diese acht Subtypen sind GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, and GR α -D3 [48] [49].

Nach Bindung der Glucocorticoide kommt es zu strukturellen Veränderungen des GR (Abbildung 5). Infolgedessen löst sich der Komplex auf und die einzelnen Komponenten –

inklusive GR – liegen somit frei im Zytoplasma vor, was eine Translokation des GR in den Nukleus zur Folge hat. Dort bindet der GR unmittelbar an GREs und kontrolliert auf diese Weise die Genexpression [50] [51] [11]. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften überqueren Glucocorticoide ohne große Probleme die Zellmembran. Die Bindung an den GR bewirkt eine Freisetzung der anderen Proteine vom GR-Multimolekülkomplex. Nun transloziert der GR mit dem Glucocorticoid in den Nukleus und startet die Transkription. Zur Regulation der Genexpression gibt es drei Möglichkeiten: 1. Die unmittelbare Interaktion mit dem Erbgut. 2. Die Anlagerung an bereits sich an der DNA befindende Motive. 3. Eine Kombination aus den beiden erstgenannten Optionen. Außerdem ist der GR in der Lage, regulatorisch auf andere Kinasen einzuwirken und somit Informationen zu geben, ohne dabei unmittelbar die Genexpression zu beeinflussen [11].



1.3 Hitzeschockproteine

1.3.1 Grundlagen

Hsps sind für die Aufrechterhaltung von Zellfunktionen essentiell. Ihre Aufgaben bestehen im Wesentlichen in der Faltung von Proteinen, ihrem Transport sowie der Unterstützung der Interaktionen untereinander bei Bildung von Komplexen. Mehrheitlich werden sie infolge von Stressreaktionen exprimiert, doch es existieren Ausnahmen [52]. Darüber hinaus können auch falsche Proteinstrukturen erkannt werden. Je nach Möglichkeit korrigieren entsprechende Chaperone diese Proteine oder versehen sie bei zu großem Schadensausmaß mit Ubiquitin-Ketten, was den Abbau durch das Proteasom einleitet [53]. Als Unterscheidungskriterium der Hsps wird gerne ihr jeweiliges Molekulargewicht in kDa herangezogen. Es existieren folgende sieben Klassen von Hsps: kleine Hsps, die ein Gewicht von etwa 15 – 30 kDa aufweisen, Hsp40 (ca. 40 kDa schwer), Hsp60 (ca. 60 kDa schwer), Hsp70 (ca. 70 kDa schwer), Hsp90 (ca. 90 kDa schwer), Hsp100 (ca. 100 kDa schwer) und Hsp110 (ca. 110 kDa schwer) [54] [55] [56] [57] [58]. In diesem Projekt wurden u.a. Expressionen von Hsp90 untersucht.

1.3.2 Aufbau und Funktion

Bei Hsp90 handelt es sich um ein Chaperon, das für die Regulation, Aufrechterhaltung und Beständigkeit anderer Proteine, mit denen es in Interaktionen tritt, verantwortlich ist. Diese Proteine werden als „Klienten“ von Hsp90 bezeichnet. Mittlerweile sind mehr als 200 dieser „Klienten“ bekannt. Medizinisch ist besonders interessant, dass die Mehrheit von ihnen wesentliche Funktionen in Signalkaskaden innehat, die das Zellwachstum kontrollieren. Somit ist davon auszugehen, dass Hsps auch bei der Kanzerogenese eine wichtige Rolle spielen [59]. In gesunden Zellen liegen im Regelfall hohe Konzentrationen von Hsp90 vor [60] [61]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, in welcher Form Hsp90 auftreten kann. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um folgende Varianten:

- Im Zytoplasma entweder als Hsp90 α , dessen Level durch andere Proteine moduliert wird, oder als Hsp90 β , das unter Basalbedingungen vorhanden ist,

- im Mitochondrium als TNF receptor-associated protein 1 und
- im endoplasmatischen Retikulum als glucose regulated protein 94.

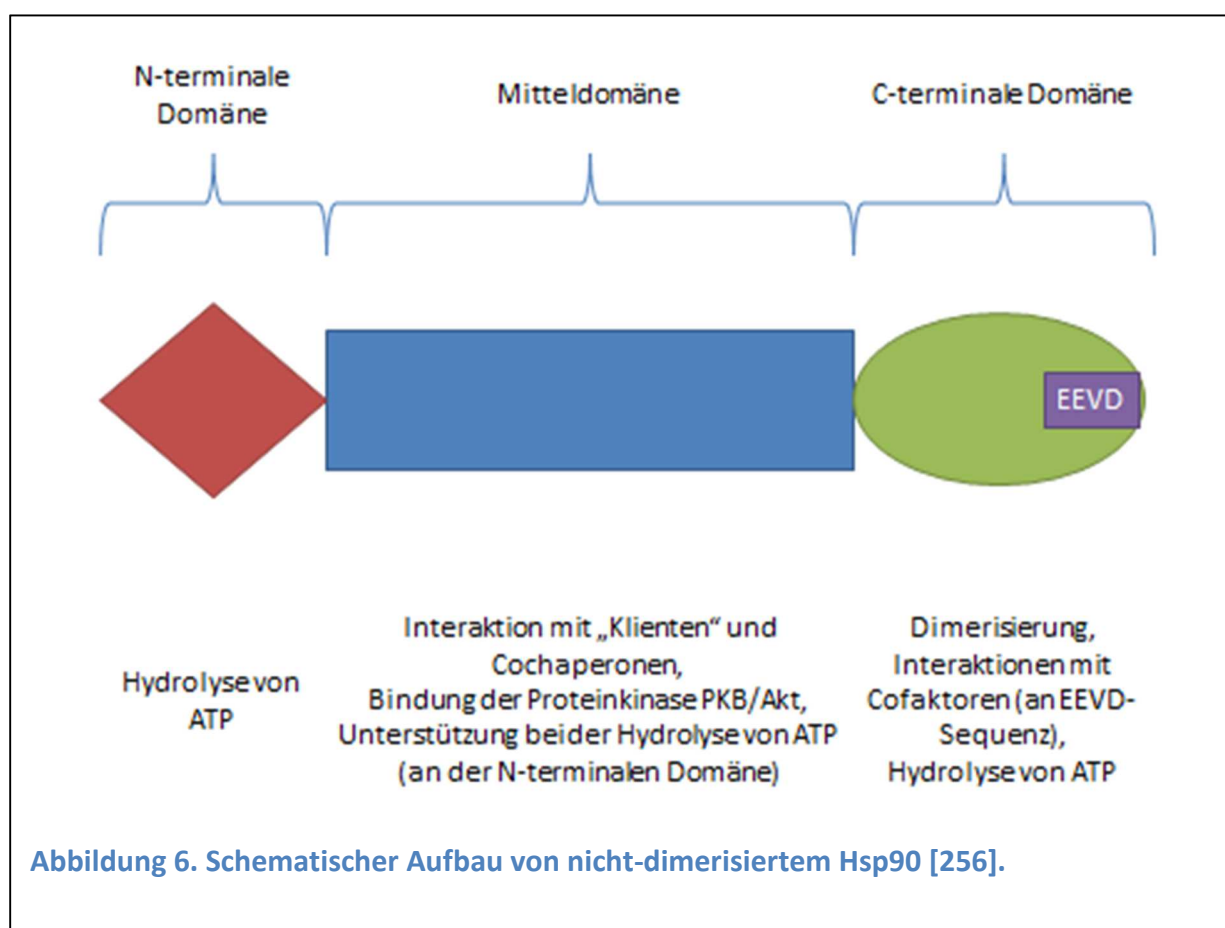
Die Isoformen Hsp90 α und Hsp90 β sind für den Fortbestand von Zellen unverzichtbar [62]. Viele Chaperone sind an der Proteinfaltung beteiligt und sind dabei recht unspezifisch in Bezug auf die jeweiligen Proteine. Es fällt auf, dass Hsp90 nur für ganz bestimmte „Klienten“ zuständig zu sein scheint. Außerdem gelangen die meisten von ihnen erst zu Hsp90, nachdem sie bereits vorher durch Hsp70 bearbeitet wurden. Hsp90 ist neben der Proteinfaltung insbesondere für die Stabilisierung des aktuellen Zustands seiner Substrate verantwortlich, damit ausreichend Zeit für regulatorische Einflüsse bleibt [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69]. Es ist mit der Zeit gelungen, immer mehr Proteine zu finden, die der Regulation durch Hsp90 unterliegen. Allerdings gibt es noch keinen relevanten Hinweis auf molekulare Gemeinsamkeiten zwischen den „Klienten“ [70] [71].

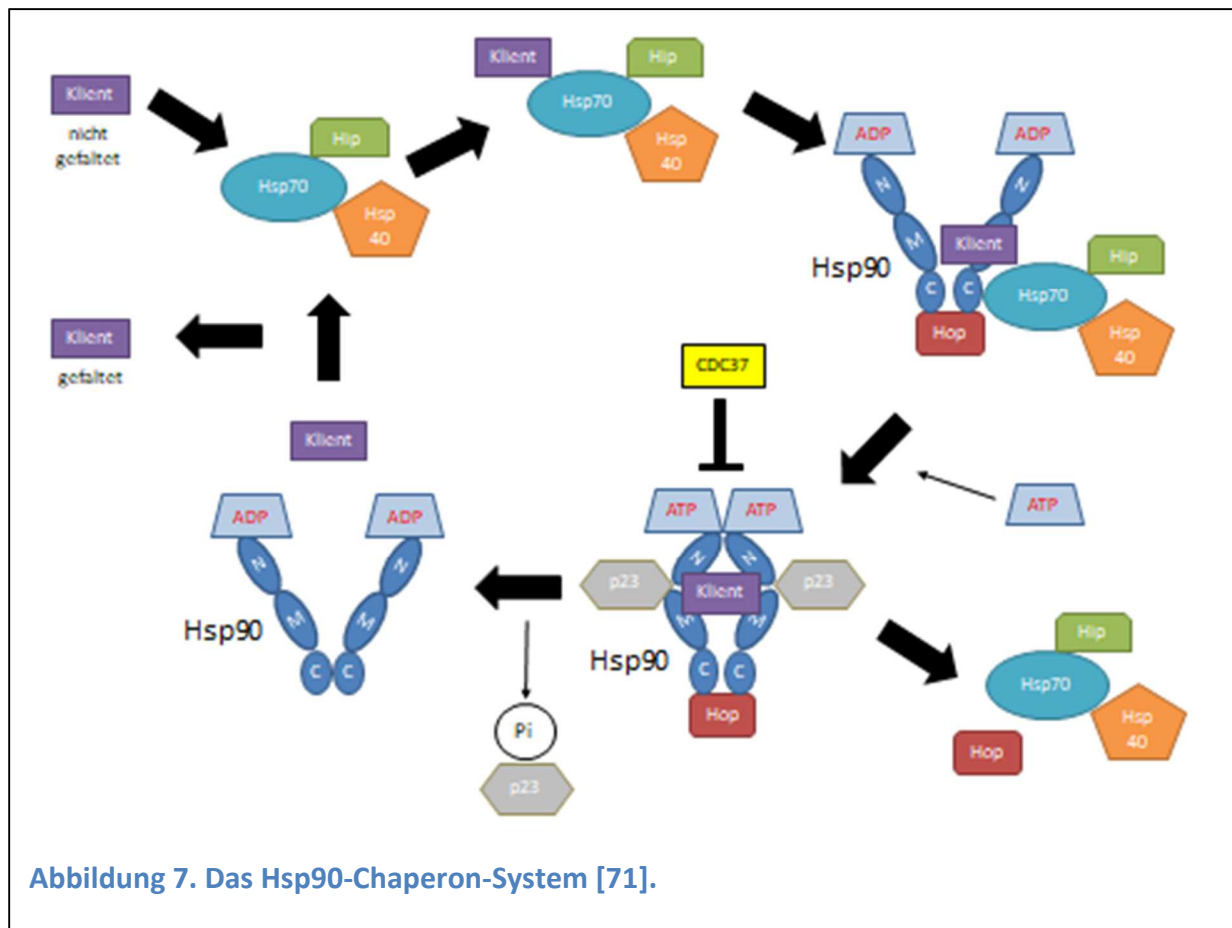
Hsp90 ist ein hochkonserviertes Protein, dass sich in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren inklusive dem Menschen finden lässt. Es kommt also in Prokaryoten und Eukaryoten vor und betont seine essentielle Funktion auch mit seinem hohen Anteil von 1 – 2 % am Gesamteiweiß [72] [73] [74]. Im Regelfall liegt Hsp90 als Homodimer vor und setzt sich aus folgenden Regionen zusammen:

- Eine N-terminale Domäne, die über ATPase-Aktivität verfügt,
- eine zentrale Domäne, an der Hsp90 mit den „Klienten“ in Verbindung treten kann, und
- eine C-terminale Domäne, die es Hsp90 ermöglicht, Dimere zu bilden (Abbildung 6) [70].

Ohne Hydrolyse von ATP zu ADP und einer Phosphatgruppe kann Hsp90 seine Aufgaben nicht erfüllen [75] [76]. Wenn ein Protein von Hsp90 gefaltet werden soll, so muss es zunächst an die offene Konfiguration von Hsp90 binden (Abbildung 7). Zur Veränderung seiner Struktur von der offenen zur geschlossenen Konfiguration ist die Anlagerung von ATP erforderlich [77]. Die geschlossene Position wird dadurch erreicht, dass neben der bereits dimerisierten C-terminalen Domäne auch die beiden Mittel-Domänen und die beiden N-terminalen Domänen jeweils eine Dimerisierung eingehen [78] [79]. Die Zentralregion ist zudem die Bindungsdomäne für die Proteinkinase PKB/Akt [80]. Weiterhin kann dieser Bereich mit anderen Cochaperonen interagieren und unterstützt die Hydrolyse von ATP an

der N-terminalen Domäne. Diese Umwandlung von ATP zu ADP und einer Phosphatgruppe wäre ohne die Mitwirkung der sich in der Mitte befindenden Domäne nicht möglich. An der C-terminalen Region befindet sich noch der hochkonservierte sog. EEVD-Abschnitt (Abbildung 6). Hier können Interaktionen mit diversen Cofaktoren, u.a. das in Abbildung 7 enthaltene „Hop“, stattfinden. Diese Proteine, die für Hsp90 als Cofaktoren fungieren, verfügen über „tetratricopeptide repeats“ [81] [82] [71]. Zu ihnen gehören Hop (Sti1, p60), Chip, CyP40, FKBP51 (p54), FKBP52 (p59, Hsp56) und PP5 [83]. Die C-terminale Domäne ist so aufgebaut, dass auch sie – abgesehen von der N-terminalen Domäne – zu einer Anlagerung von ATP und anschließender Hydrolyse in der Lage ist [84] [85]. Welche Rolle diese Möglichkeit, mit ATP auch an der C-terminalen Domäne interagieren zu können, für die prinzipielle Erfüllung der Aufgaben von Hsp90 spielt, bleibt unklar [71].





Eiweiße mit fehlerhafter Struktur entstehen durch unterschiedliche zelluläre Stressoren wie etwa zu niedrige oder zu hohe Temperaturen, zu niedrige oder zu hohe pH-Werten und die Anwesenheit reaktiver Stoffe wie Radikale etc.

1.3.3 Pathophysiologische Relevanz

Wie bereits im Abschnitt 1.3.2 erwähnt sind über 200 verschiedene Eiweiße bekannt, bei denen es sich um Substrate für Hsp90 handelt. Diese Proteine spielen oft in Prozessen, die für die Regulation des Zellzyklus inklusive der Zellproliferation verantwortlich sind, eine zentrale Rolle. So stimuliert Hsp90 zahlreiche Moleküle, die die Zellproliferation steigern und das Zellwachstum außer Kontrolle geraten lassen können (z.B. Onkoproteine, Kinasen, Transkriptionsfaktoren). Außerdem verschlechtern sich die Lebensbedingungen der Zellen innerhalb eines Tumors erheblich. Es kann beispielsweise zu Temperaturveränderungen, Verschiebungen des Säure-Basen-Haushalts, vermehrtem Glucose-Bedarf und Down-

Regulation von Genen, die für das Zellwachstum nicht wesentlich sind, kommen. Hsp90 unterstützt das zelluläre Überleben bei bzw. die Adaptation an diese neue ungünstigere Umgebung [60] [86] [61]. Es konnte beobachtet werden, dass es im Rahmen von Krebserkrankungen öfters zu einer Induktion der Expression von Hsp90 α kommt. Dadurch erhöht sich das molare Verhältnis von Hsp90 α zu Hsp90 β . In Malignomen leistet Hsp90 einen erblichen Beitrag für die Stabilität mutierter Moleküle, die letztlich für Prozesse wie Angiogenese und Bildung von Metastasen notwendig sind. Beispiele umfassen Wachstumsfaktorrezeptoren, Enzyme zur Vermittlung von Überlebenssignalen (z.B. Kinasen wie Akt und PI3K) und Onkogene (z.B. v-Src, Bcr/Abl, Raf-1, Erb-2 und mutierte Varianten von dem Tumorsuppressorgen p53) [87] [88]. Ferner kann von Hsp90 eine maligne Erkrankung begünstigt werden, indem das Chaperon antiapoptotische Aktivität zeigt. Dies erfolgt auf verschiedene Weisen beispielsweise über Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands von Apaf-1 durch Cytochrom C und Bindung an Hsp90 [89]. Die Beteiligung von Hsp90 an Angiogenese und der Bildung von Filiae erfolgt hauptsächlich durch Stimulation von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „nitric oxide synthase“ (NOS) and „matrix metalloprotease“ (MMP2). Bei Inaktivierung von Hsp90 entfallen vielerlei stimulierende Effekte auf die Zellproliferation und die Tendenz zum programmierten Zelltod nimmt wieder zu [90].

Hsp90 ist zudem Teil des „RNA-induced silencing complex“, dem auch Hsp70 angehört [91]. Dieser Komplex ist in zahlreiche Signalkaskaden integriert, die auch in Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen [92] [93] [94].

Hsp90 kann als prognostischer Biomarker für Patienten mit Tumorerkrankung zum Einsatz kommen. Beim Mammakarzinom besteht ein positiver Zusammenhang zwischen erhöhter Hsp90-Expression und einer verkürzten Überlebenszeit [95]. Im Falle von Tumoren im Magenbereich weisen höhere Spiegel von Hsp90 ebenfalls auf geringere Lebensdauer und außerdem auf ein aggressiveres Verhalten des Tumors hin [96]. Darüber hinaus stellte man fest, dass Patienten, die an chronisch-myeloischer Leukämie erkrankt sind, bei verstärkter Hsp90-Expression die Krankheit oft schon weiter fortgeschrittenen war und das Ansprechen auf die Behandlung schlechter wurde [97] [71]. Auch bei gastrointestinalen Stromatumoren konnte man signifikante Zusammenhänge zwischen erhöhten Levels von Hsp90 (55 %) und einer Reduktion der Lebenszeit in Remission beobachten [98].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Hsp90 sowohl für gesunde als auch maligne Zellen sehr nützlich ist. Es wird somit durchaus als potentieller Angriffspunkt zur Tumorthherapie gesehen [99] [100].

1.3.4 Hsp90-Inhibitoren

Prinzipiell werden Inhibitoren am C- und N-terminalen Ende von Hsp90 unterschieden. Beispiele sind in Tabelle 3 aufgeführt [101] [102].

C-terminale Hsp90-Inhibitoren	N-terminale Hsp90-Inhibitoren
Novobiocin und seine Derivate (z.B. RTA901 (Reata Pharmaceuticals), KU32, KU135, KU174, KU675)	Ansamycine (z.B. Geldanamycin)
	Natürlich vorkommende Resorcinole (z.B. Radicicol)
	Synthetische Resorcinole (z.B. Ganetespib)
	Indanone (z.B. SNX-2112 = Serenex)
	Tropanone (z.B. XL888 = Exelixis)
	Purine (z.B. PU-H71 = Sloan-Kettering)

Tabelle 3. Überblick über C- und N-terminale Hsp90-Inhibitoren [101] [102].

Bei der Entwicklung neuer Pharmaka zur Blockade bestimmter Zielstrukturen sollte der Angriffspunkt natürlich möglichst spezifisch für das zu antagonisierende Molekül sein. Bei Hsp90 konnte man feststellen, dass ATP eine Krümmung seiner Längsachse erreichen muss, um sich überhaupt an Hsp90 anlagern zu können und dort hydrolysiert werden kann [103]. Diese besondere Konfiguration der ATP-Bindungsstelle von Hsp90 wird auch als Bergerat-Faltung bezeichnet. Diese Struktur ist besonders gut für die Interaktion mit ATPasen vom GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidin Kinase, MutL)-Typ geeignet [104]. Da diese Art der Nukleotid-

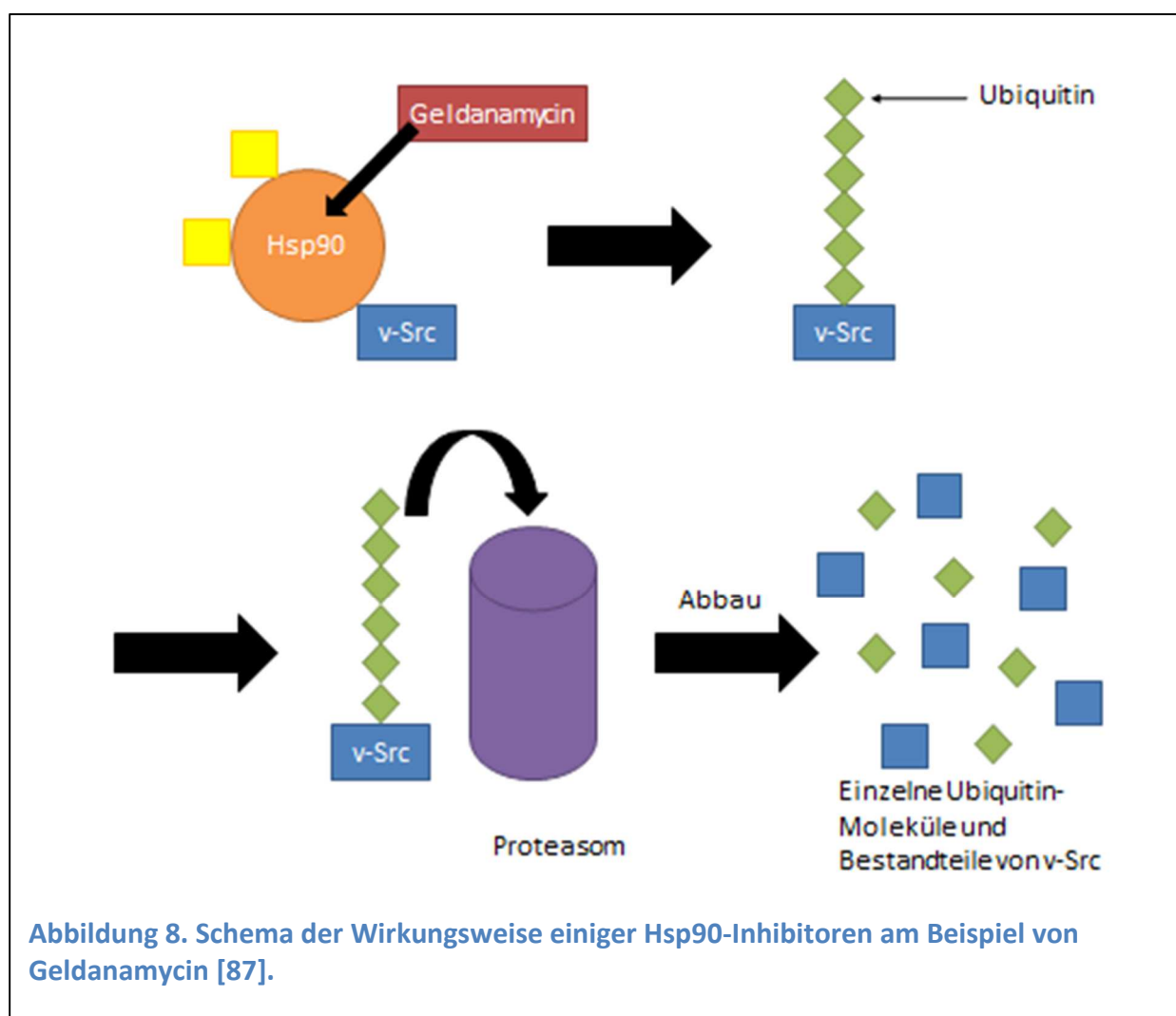
Bindung so spezifisch für Hsp90 ist, ist leicht nachvollziehbar, warum sie als Angriffspunkt von Hsp90-Inhibitoren verwendet wird [103]. Darüber hinaus wurden weitere Mechanismen zur Antagonisierung von Hsp90 gefunden. Als Optionen stehen u.a. die C-terminale-Domäne sowie Anlagerungsstellen für Cochaperone und „Klienten“-Proteine zur Verfügung [86] [105] [106]. Einen Überblick über eine mögliche Klassifikation von Hsp90-Inhibitoren gibt Tabelle 4 [107].

Klassifikation von Hsp90-Inhibitoren
• Ansamycin-Derivate
• Puringerüst-Derivate
• Imidazopyridine (purinähnlich)
• Imidazol-Derivate (purinähnlich)
• Pyrrolopyridine/Pyrrolopyrimidine/Pyrazolopyrimidin-Derivate
• Quinazolin-Derivate
• Tetrahydropteridine und Derivate
• Resorcinol-Derivate
• Sonstige (z.B. SNX-5422, XL888 und NVP-HSP990)

Tabelle 4. Überblick über eine mögliche Klassifikation von Hsp90-Inhibitoren [107].

Die Wirkstoffe Geldanamycin, Herbimycin A und Radicol vermitteln ihre Hsp90-antagonisierenden Effekte durch den Abbau verschiedener Moleküle. Hierzu zählen v-Src, Bcr-Abl, Raf-1, ErbB2, einige Rezeptoren von Wachstumsfaktoren sowie Steroidhormonen. Durch Bindung des Inhibitors an Hsp90 dissoziiert der jeweilige „Klient“ vom Proteinkomplex. An diese „Klienten“, die häufig für eine Stimulierung von Zellproliferation zuständig sind, werden zahlreiche Ubiquitin-Einheiten gekoppelt und schließlich im Proteasom der Abbau durchgeführt (Abbildung 8) [108] [109] [110] [111]. Die Wirkungen der

Hsp90-Inhibitoren können im Einzelfall sehr unterschiedlich – durchaus auch gegensätzlich – sein. Dies ist dadurch bedingt, dass Hsp90 über sehr viele „Klienten“ verfügt und an zahlreichen Reaktionswegen im Organismus beteiligt ist. Beispielsweise kann es zu einer Reduktion der Zellvermehrung, aber auch Stimulation der Reifung von neuen Zellen kommen. Ferner kann sowohl ein positiver als auch ein negativer Einfluss auf die Induktion des programmierten Zelltods genommen werden. Dadurch wird klar, dass man durch Blockade der Aktivität von Hsp90 nicht zwangsläufig eine erfolgreiche Tumorthherapie erreicht. Man geht insgesamt jedoch davon aus, dass Hsp90-Antagonisten eher eine Tendenz zum Angriff auf maligne Zellen zeigen als auf gesunde [87].



Geldanamycin gehört zu den Ansamycinen und war der erste Wirkstoff, der entwickelt wurde, um Hsp90 zu antagonisieren. Es konnten noch weitere Substanzen von dieser Stoffklasse hergestellt werden, z.B. Tanespimycin (17-AAG) sowie 17-DMAG. Bei allen

drei Stoffen bestand das Problem einer Hepatotoxizität [103]. Diese wird wahrscheinlich durch einen Benzoquinon-Anteil vermittelt, der das Antioxidans Glutathion metabolisiert [112].

Unter der Substanzgruppe, deren Wirkstoffe sich für ihren Molekülaufbau an Resorciol als Prototyp orientieren, war Radicol die Ursubstanz, die als Makrolid zur antibakteriellen Therapie eingesetzt wird. Allerdings kann es auch die N-terminale Domäne von Hsp90 blockieren [113] [114]. Später wurden einige weitere Varianten der Stoffklasse geschaffen, darunter NVP-AUY922, AT13387 und KW-2478 [115].

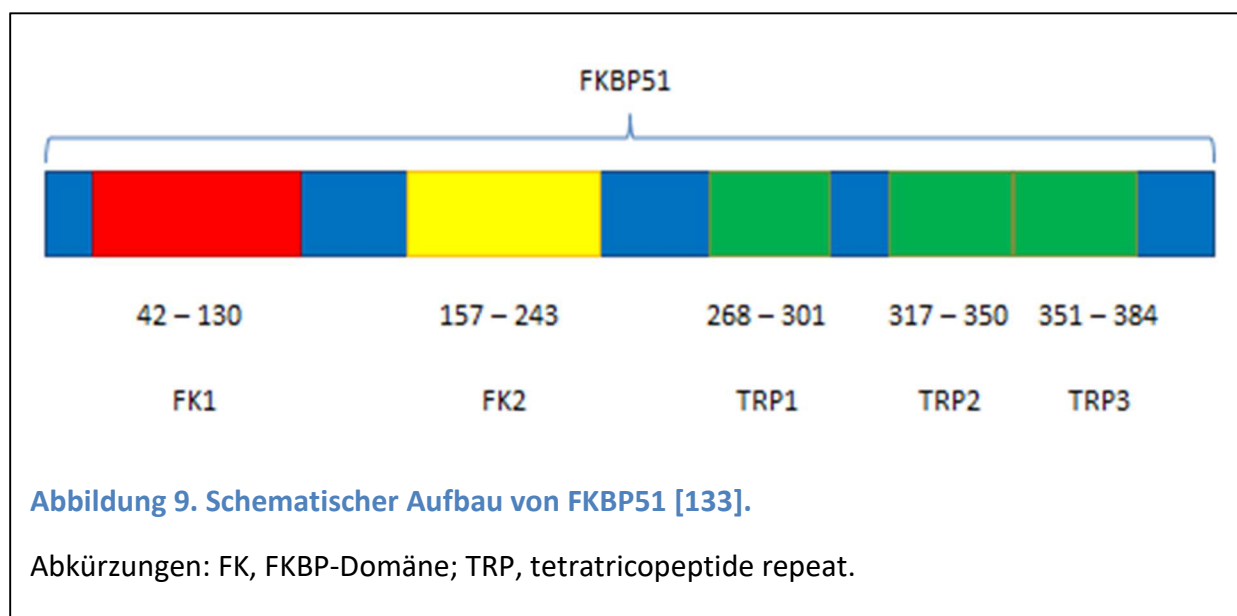
Erste Erfolge in der Therapie von Krebskrankheiten mit Hsp90-Inhibitoren konnten bereits verzeichnet werden. So konnte für 17-AAG antitumoröse Aktivität nachgewiesen werden, insbesondere beim Mammakarzinom [116] [117]. Hierbei wurde es bei HER2-neu-positivem Rezeptorstatus verwendet, wenn sich mit Trastuzumab kein Behandlungserfolg einstellte. Dann wurde das Konzept neben dem Antikörper gegen HER2-neu um 17-AAG erweitert [118] [119] [116]. Sollte durch die Therapie eines multiplen Myeloms mit Bortezomib, wodurch die Aktivität des Proteasoms verringert wird, keine Besserung eintreten, so ist eine zusätzliche Applikation von 17-AAG sinnvoll. Die Prognose konnte dadurch in einigen Fällen positiv beeinflusst werden [120] [121] [122] [123]. Es gibt noch einige weitere maligne Erkrankungen, bei denen durch Antagonisierung der Hsp90-Aktivität antitumoröse Effekte erzielt wurden, beispielsweise bei Bcr-Abl positiver chronisch-myeloischer Leukämie – auch bei Wirkungsverlust von Imatinib – [124], bei NSCLC in höheren Tumorstadien mit STA-9090 [125] und beim Prostatakarzinom, Chondrosarkom und Nierenzellkarzinom [126] [127].

1.4 Das FK506 bindende Protein 51

1.4.1 Aufbau und Funktion

Das FK506 bindende Protein (FKBP) 51 gehört zu den Immunophilinen und dort zur Subgruppe der FK506 bindenden Proteine. Von manchen Autoren wird auch einfach die Abkürzung FKBP5 verwendet. Die Zahl „51“ bezieht sich auf das Molekulargewicht von 51

kDa [128]. Im FKBP51-Molekül unterscheidet man zwei FKBP-Regionen (FK1 und FK2), die nacheinander angeordnet sind, sowie drei tetratricopeptide repeat (TPR)-Sequenzen (Abbildung 9). In FK1 ist das Enzym Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) sowie eine Möglichkeit zum Andocken für Sirolimus enthalten, während FK2 Interaktionsdomänen mit vielen anderen Proteinen beinhaltet [129].



FKBP51 ist ein wesentlicher Bestandteil zur Modulation der Aktivität von Steroidhormonrezeptoren. Diese Funktion ist jedoch als Cochaperon nur durch die Interaktion mit anderen Proteinen wie beispielsweise die Chaperone Hsp70 und Hsp90 gewährleistet [129] [130] [131] [132] [133]. Außerdem ist FKBP51 als Marker geeignet, die Sensitivität des GR abzuschätzen [129] [134] [135].

FKBP51 hat eine immunsuppressive Funktion, die durch Calcineurin vermittelt wird [128]. Außerdem spielt FKBP51 eine wichtige Rolle als Puffer zytotoxischer Sauerstoffradikale. Im Rahmen ungünstiger Umgebungsbedingungen wird FKBP51 vom Mitochondrium zum Zellkern transportiert und wirkt dort anti-apoptotisch. Innerhalb der Mitochondrien tritt es in Interaktion mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 sowie dem GR. Je niedriger die Aktivität von Hsp90 ist, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass FKBP51 das Mitochondrium verlässt und in den Nukleus gelangt [136]. Darüber hinaus ist FKBP51 dafür zuständig, die Struktur von Mikrotubuli aufrecht zu erhalten, und sorgt für die

Elimination des Proteins tau [130]. Einen Überblick über die Funktionen von FKBP51 gibt die Tabelle 5.

Funktion	Wirkungsort
Regulation der Sensitivität auf Steroidhormone	Rezeptoren für Steroidhormone (Mineralcorticoide, Glucocorticoide, Androgene, Östrogene, Progesteron)
Herabsetzung der Aktivität des Immunsystems	Immunsystem (Antagonisierung von Calcineurin)
Schutzfunktion für neuronale Strukturen inklusive Zytoskelett	Isomerisierung und Elimination des Proteins tau, Instandhaltung der Mikrotubuli
Stimulation der NFκB-Signalkaskade	Steigerung der Leistung des IκB-Kinase-Komplexes
Dephosphorylierung und dadurch Inaktivierung (Brognard, J. et al., 2007; Gao, T. et al., 2005; Zhao, L. et al., 2018) von Akt	Proteinkinase B/Akt

Tabelle 5. Übersicht über die Hauptfunktionen von FKBP51 [313].

1.4.2 Pathophysiologische Relevanz

FKBP51 ist ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Signalkaskaden, u.a. von Steroidhormonen, NFκB und Akt-PHLPP, die meist das Zellwachstum kontrollieren. So wird verständlich, warum FKBP51 Einfluss auf die Sensitivität der Krebszellen auf eine Behandlung mit Zytostatika haben kann (Tabelle 6) [135].

Art des Tumors (Diagnose)	Zugehöriger Signalweg	Expression von FKBP51	Sensitivität auf Zytostatika	Quellennachweis
Mamma-karzinom	GR, Progesteron-Rezeptor	↑	Resistenz gegen FK506 und Rapamycin	Le Bihan, S. et al., 1998 [137]
Prostata-karzinom	Androgen-Rezeptor	↑	Resistenz gegen FK506	Ni, L. et al., 2010 [131]
Multiples Myelom	GR	↑	Resistenz gegen Dexamethason	Rees-Unwin, K.S. et al., 2007 [134]

Malignes Melanom, akute lymphatische Leukämie	NFκB	↑	Resistenz gegen Rapamycin	Romano, M.F. et al., 2004 [138]; Avellino, R. et al., 2005 [139]
Malignes Melanom	NFκB	↑	Resistenz gegen Strahlen- therapie	Romano, S. et al., 2010 [140]
Mamma- karzinom, Pankreas- karzinom	Akt	↓	Resistenz gegen Gemcitabin	Li, L. et al., 2008 [141]; Pei, H. et al., 2009 [142]
			Resistenz gegen Cytosin- arabinosid	
			Resistenz gegen Etoposid	
			Resistenz gegen Taxane	

Tabelle 6. Die Bedeutung von FKBP51 in Tumorgenese und Sensitivität auf Zytostatika [135].

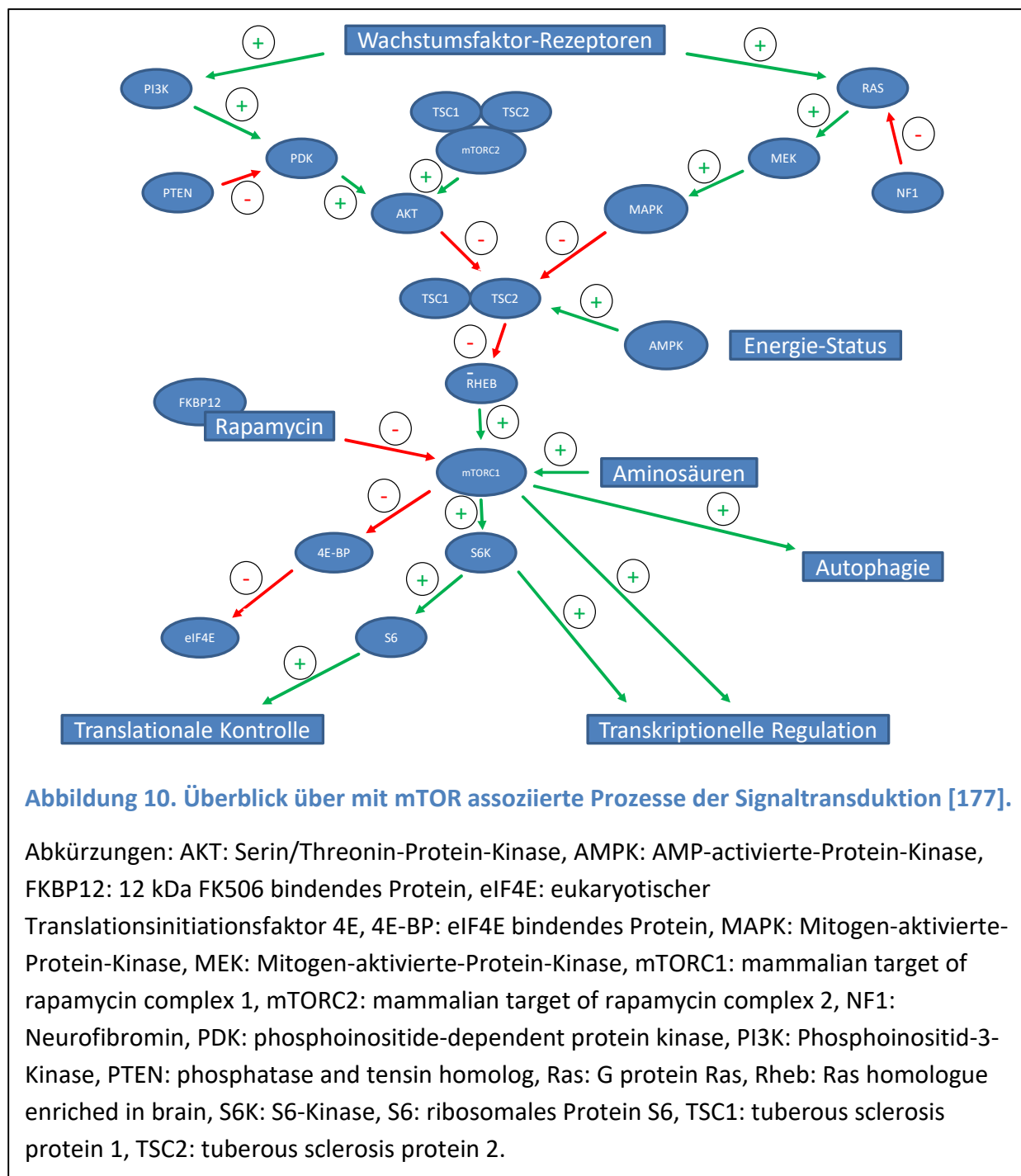
Beim malignen Melanom befindet sich die Expression (quantifiziert mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie) von FKBP51 häufig weit über der physiologischen [138] [140]. Je stärker diese ausgeprägt ist, desto schlechter ist die Prognose für die Patienten. Außerdem sind die Konzentrationen von FKBP51 am allerhöchsten im Bereich der Filiae im Falle eines malignen Melanoms als Primärherd [140] [143]. Es gibt auch Hinweise auf eine Bedeutung von FKBP51 bei ZNS-Erkrankungen [130]. Als Cochaperon von Hsp90 scheint es das Ausmaß der Elimination des Proteins tau zu reduzieren und an der Rate der tau-Phosphorylierung mitzuwirken. Durch gezieltes Ausschalten der Synthese von FKBP51 konnte man im Gegensatz zu FKBP52 deutlich niedrigere tau-Akkumulationen feststellen [130]. Veränderungen im Sinne von single nucleotide polymorphisms (SNPs) bei Genen, die für FKBP51 kodieren, scheinen für eine erhöhte Tendenz zum Auftreten von einigen psychiatrischen Erkrankungen (z.B. Depressionen) ursächlich zu sein [144] [145]. Darüber hinaus gibt es auch einige Beziehungen zwischen FKBP51 und dem Asthma

bronchiale. Bei Untersuchungen fand man heraus, dass die Expression von FKBP51 umso größer war, je schwerer der Ausprägungsgrad der Erkrankung war und je höher die Dosis für die Applikation von inhalativem Cortisol bzw. seiner Derivate gewählt wurde [146].

1.4.3 FKBP51-Inhibitoren

Klassische Inhibitoren von PPlasen bzw. FKBP51 sind die Wirkstoffe Sirolimus (Synonym: Rapamycin) und Tacrolimus (Synonym: FK506 bzw. FK-506) [147]. Beide Wirkstoffe vermitteln ihre Wirkung über eine Inhibition von PPlasen in der FK1-Domäne von FKBP51 [148] [149] [150] [151] [152] [153].

Sirolimus ist ein Antagonist des „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) [154], wobei mTOR als Bestandteil innerhalb zweier Proteinkomplexe gefunden wird, die dementsprechend als „mTORC1“ und „mTORC2“ bezeichnet werden. Das „C“ steht für „complex“ [155]. Bei mTOR handelt es sich um ein Enzym, das der Phosphorylierung anderer Substrate dient und damit deren Effekte modulieren kann [156]. Der mTOR1-Komplex ist aus drei Komponenten aufgebaut: „regulatory-associated protein of mTOR“, mLST8 und mTOR selbst. Mittlerweile sind einige wichtige Signalkaskaden bekannt, die mit mTORC1 in Verbindung stehen (Abbildung 10). Hierzu zählen solche, an denen u.a. PI3K/Akt [157] [158], Ras/MAPK [159] [160] und die AMP-aktivierte Proteinkinase beteiligt sind [161]. Insgesamt kann man sagen, dass mTORC1 eine wesentliche Bedeutung in der Versorgung mit energiereichen Verbindungen wie beispielsweise ATP, der Aneinanderreihung von Aminosäuren und bei der Regulation der Zellteilung zukommt [156] [162] [163].



Neben mTORC1 wurde die Variante mTORC2 beschrieben, die sich aus den Molekülen „rapamycin-insensitive companion of mTOR“, GßL, „mammalian stress-activated protein kinase interacting protein“ und mTOR zusammensetzt. Auch mTORC2 kontrolliert die Aktivität der Proteinkinase B [164]. Wie oben bereits angesprochen, erfolgt durch Sirolimus nur eine Blockade von mTORC1. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Sirolimus indirekt eine Antagonisierung von mTORC2 bewirkt, wenn sich die Einnahme über lange Zeiträume erstreckt [165].

In der Klinik kennt man Sirolimus vor allem als Immunsuppressivum zur lebenslangen Therapie nach erfolgreicher Nierentransplantation. Darüber hinaus wird die Substanz in der Kardiologie bei „drug eluting stents“ zusammen mit dem Zytoskelett-Inhibitor Paclitaxel eingesetzt, um eine Proliferation von Epithelzellen zu verhindern, sodass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Re-Stenosen im Bereich des Stents gesenkt wird [166] [167].

Als zweites Beispiel für einen FKBP51-Inhibitor wird hier Tacrolimus erläutert. Obwohl es sich dabei um ein Makrolid, also ein Antibiotikum, handelt, wurde es ursprünglich bei einem Bakterium gefunden, nämlich *Streptomyces tsukubaensis*. Nachdem man die potente Wirkung von Tacrolimus als Immunsuppressivum erkannt hatte, löste es bald Cyclosporin A – das vorherige Mittel der Wahl nach erfolgter Leber- oder Nierentransplantation – ab. Dies beruhte auf der stärkeren Herabsetzung der körpereigenen Abwehrkräfte als auch der besseren Verträglichkeit für die Patienten [168]. Mittlerweile wird es bei Transplantation verschiedener Organe als Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion verwendet. Der zugrunde liegende Mechanismus ist sehr komplex und besteht im Wesentlichen im Antagonismus der Calcineurin-Phosphatase [169] [170].

1.5 Interaktionen zwischen GR, Hsp90 und FKBP51

Zur erfolgreichen Bewältigung bedrohlicher Lebensbedingungen sind Glucocorticoide für den Menschen essentiell [3]. Als Co-Chaperon bestimmt das Immunophilin FKBP51 die Sensitivität des GR auf seine Liganden. Wie bereits unter 1.4.1 angesprochen, verfügt FKBP51 über drei TPR-Domänen und die Funktion der PPIase [171]. Eine Zusammenlagerung mit anderen Molekülen ist bei FKBP51 über die TPR-Regionen möglich [172] [129]. Für eine Verminderung der Funktionsweise des GR ist FKBP51 auf die Zusammenarbeit mit Hsp90 angewiesen [173]. Wenn der GR durch ein Glucocorticoid gebunden wird, so soll er nun dessen Information weitergeben, also stimuliert werden. In diesem Fall verlässt FKBP51 den Molekülkomplex und FKBP52 tritt an seine Stelle [150]. Infolgedessen nimmt die Tätigkeit des GR wieder zu [174].

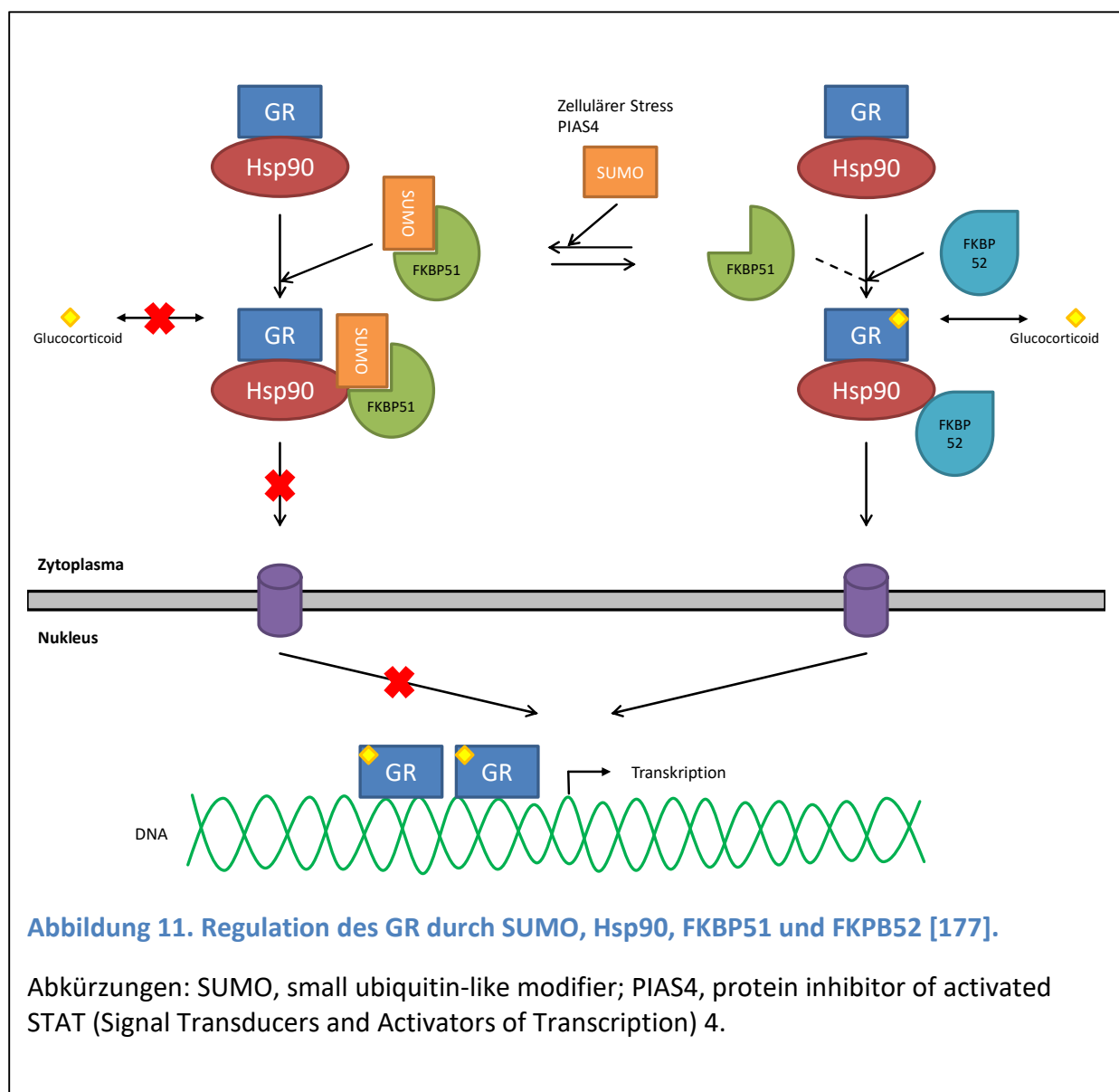
Unter den sehr zahlreichen Möglichkeiten der molekularen Veränderungen an Proteinen nach Abschluss der Translation gibt es auch die Anlagerung von „small ubiquitin-like modifiers“ (SUMOs). Für diesen Vorgang werden drei Schritte mit jeweils eigenem

Enzym benötigt: Das erste Enzym bringt den Prozess in Gang, das zweite sorgt für die Konjugation und ein drittes schließlich ist für die eigentliche Bindung von SUMO an das vorgesehene Molekül verantwortlich. Dabei ist die Bedeutung des SUMOylierung von Verbindung zu Verbindung sehr unterschiedlich bzw. individuell ausgeprägt. Hiermit kann beispielsweise Einfluss auf den Ort, die Fragilität und das Ausmaß der Tätigkeit des Zielmoleküls genommen werden [175] [176].

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Anlagerung von SUMO an FKBP51 zu einer Reduktion der Aktivität des GR führt. Drei verschiedene Mechanismen wurden dabei beobachtet:

- Glucocorticoide haben eine geringere Tendenz zur Bindung an den GR.
- Der Wechsel der Lokalisation des GR vom Zytoplasma in den Nukleus wird erheblich unwahrscheinlicher.
- Innerhalb des Nukleus wird die Transkriptionsrate von Genen, die durch den GR reguliert werden, herabgesetzt.

Bleibt dagegen die SUMOylierung von FKBP51 aus, erfolgt eine vermehrte Expression von FKBP52. Nach Bindung des Liganden an den GR dissoziiert FKBP51 aus dem Proteinkomplex, während FKBP52 assoziiert und andere Bestandteile des Komplexes abgegeben werden. Dies erlaubt schließlich die Translokation des GR in den Nukleus und Initiierung der Genexpression (Abbildung 11) [177].



Auch Cofaktoren von Hsp90 können indirekt zu einer Reduktion der GR-Funktion beitragen. Häufig besteht der Mechanismus der Interaktion mit Hsp90 darin, dass der jeweilige Cofaktor über eine TPR-Region verfügt und mit dieser sich an die am N-Terminus von Hsp90 lokalisierte EEVD-Sequenz anlagert [178] [179] [180]. Aufgrund der Vielzahl der mit Hsp90 assoziierten Moleküle existiert ein breites Spektrum an Verbindungen mit stimulierenden oder inhibierenden Effekten [181] [182] [183].

2 Zielsetzung des Projekts

In diesem Projekt untersuchten wir humane Nebennierentumore auf die Expression von Hsp90 α , Hsp90 β , FKBP51 und GR mittels Immunhistochemie. Nach semiquantitativer Auswertung wurden die Expressionen mit einer Reihe klinischer und pathologischer Parameter korreliert. Durch die Erfassung signifikanter Korrelationen wollten wir Hinweise gewinnen, ob die Anwesenheit der Hsps oder deren Cofaktoren Anteil an der Pathophysiologie von Nebennierenkarzinomen haben könnten. Zudem waren diese Untersuchungen Ausgangspunkt für die Frage, ob Hsp-Inhibitoren prinzipiell in der Therapie von Patienten mit Nebennierenkarzinomen zum Einsatz kommen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Reagenzien

3.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Bezeichnung	Marke	Hersteller
Pipettierhilfen	Biosphere® 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl	REF 70.760.211, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfen	Biosphere® 0,5 – 20 µl	REF 70.1116.210, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Analysewaage	BP 121 S	Sartorius Werkzeuge GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Kor-6485	Dongbu Daewoo Electronics Corporation, Eschborn, Deutschland
pH-Meter	pH 521	WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten), Weilheim (Oberbayern), Deutschland
Vortexer	Vortex Genie, Vortex Genie 2	Scientific Industries, Springfield, USA
Minizentrifuge	Zentrifuge MC 6	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop	Leica DMRB	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Scanner	MIRAX DESK (www.zeiss.de/mirax)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen,

		Deutschland
Mikrotom	HM 335 E	Produkt-ID: M-HM-335E, ProMeTec, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Paraffinstreckbad	SB 80	ProMeTec, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Deckgläser 100 Stück, 24 x 55 mm	Menzel-Gläser	Gerhard Menzel B.V. und Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Mounting Media 100 ml	Permout Mounting Media	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten	Eppendorf/Gilson	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 2 ml	SafeSeal Reagiergefäße	REF 72.695.400, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	SafeSeal Reagiergefäße	REF 72.706.400, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 0,5 ml	SafeSeal Reagiergefäße	REF 72.704.400, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser, Superfrost® Plus	REF J1800AMNZ, Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. und Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Fettstift	PAP PEN	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Dutscher Group, Steinfurt, Deutschland
Laborfilm	Parafilm®	American National Can TM,

		IL 60631, Chicago, USA
Laborhandschuhe	Vasco® Basic	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Handtücher 2-lagig, weiß	Tapira® Plus	REF 07730003, GVS Großverbraucherspezialisten eG, Heidenheim, Deutschland
Tabelle 7. Übersicht über verwendete allgemeine Laborgeräte.		

3.1.2 Reagenzien

Substanz	Bezeichnung	Firma
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline (PBS))	Gibco®, live technologies TM	REF 18912-014, Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
Tween®20 für die Molekularbiologie, 250 ml	Panreac	ITW Companies, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes Wasser 50 ml (Infusionslösung)	Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Doppelt destilliertes Wasser 10 l	Kerndl Aqua Bidest.	H. Kerndl GmbH, Weissenfeld, Deutschland
Xylol 2,5 l	Xylenes puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol 2,5 l	Methanol puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., ≥ 99.8 % (GC)	REF UN1230, Apotheke Innenstadt LMU München, Deutschland
Ethanol 99 % 5 l	Ethanol S99 % VG 1 %	REF 5016030249002, SAV

	Petrolether SAV K5L	liquid production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethanol 96 % 5 l	Ethanol 96 % vollst. verg. MEK/BITREX	REF 5015044062002, CLN GmbH Chemikalien Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland
Ethanol 80 % 5 l	Ethanol 80 % vollst. verg. MEK/BITREX	REF 1004051726011, CLN GmbH Chemikalien Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland
Ethanol 70 % 5 l	Ethanol 70 % vollst. verg. MEK/BIT.	REF 5016030249006, CLN GmbH Chemikalien Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland
Ethanol 30 % 5 l	Ethanol 30 % (V/V) mit Methylethylketon vergällt	REF UN1170, Apotheke Innenstadt LMU München, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % 250 ml	EMSURE® ISO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)- und Wasserstoffperoxid- Tabletten	SIGMAFAST TM	Sigma® Life Science, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes Serum 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml	Aus dem Blutkuchen	Biochrom 501049, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Harris-Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich®	REF HHS32-1L, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO 63103, USA
Eosin Y-Lösung	Sigma-Aldrich®	REF HT110232-1L, Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, MO 63103, USA

Salzsäure rauchend 37 %	Merck KGaA	REF 1.00317.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 96 %	Merck KGaA	REF 1.00062.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge c(NaOH) 5 mol/l	Merck KGaA	REF 1.09913.0001, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) 500 g	Emsure®	CAS-No: 7647-14-5, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und EMD Millipore Corporation Billerica MA 01821, USA
Tris-Base 1 kg	Trizma®base	CAS: 77-86-1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland und Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO 63103, USA
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) diNa salt (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ · 2 H ₂ O) 500 g	99 + %	E-5134, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178, USA
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) 1 kg	≥ 99,5 %, p.a., ACS, wasserfrei	Art.-Nr. X863.2, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) 1 kg	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O) z.A., ISO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O) 500 g	≥ 99 %, p.a., ACS	Art.-Nr. P027.1, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) 1 kg	≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Art.-Nr. 6885.1, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tabelle 8. Übersicht über verwendete Reagenzien.		

Reagenz	Bezeichnung	Firma
Dako-Kit - HRP rabbit/mouse - Substrate buffer - DAB + Chromogen (X50)	DakoREAL®, EnVision™, Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	REF K5007, Dako, Dänemark A/S, DK-2600 Glostrup, Dänemark
Hsp90α-Antikörper	Klonnummer ERP3953	Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, Großbritannien
Hsp90β-Antikörper	Klonnummer E296	Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, Großbritannien
FKBP51-Antikörper	Klonnummer D-4	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
GR-Antikörper	Klonnummer E-20	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Tabelle 9. Übersicht über Reagenzien für Immunhistochemie.		

3.2 Herstellung der Lösungen

3.2.1 Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline (PBS))

Die Herstellung von PBS erfolgte durch Auflösen von 1 Gibco®-PBS-Tablette ($m(\text{Na}_3\text{PO}_4) = 95,0 \text{ g}$; $m(\text{KCl}) = 75,0 \text{ g}$; $m(\text{NaCl}) = 58,0 \text{ g}$) in 500 ml doppelt destilliertem Wasser. Hierfür war ein Magnetrührer – wie bei der Herstellung anderer Lösungen – sinnvoll.

3.2.2 Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris-buffered saline (TBS))

Zunächst wurde TBS mit zehnfacher Konzentration vorbereitet, da TBS inklusive dem Detergenz Tween®20 (TBS-T) oft gebraucht wurde, aber ihre Produktion mit der Einstellung des pH-Werts auf 7,6 aufwändig war. So war ein recht großer Vorrat vorhanden und für die TBS-T mit der gewünschten Konzentration war lediglich eine Verdünnung mit doppelt destilliertem Wasser erforderlich. Bei der Produktion der zehnfach konzentrierten TBS wurden 87,7 g NaCl und 60,6 g Tris-Base sorgfältig abgewogen und in 800 ml doppelt destilliertes Wasser gegeben. Daraufhin wurde mittels HCl (ggf. auch NaOH bei Überdosierung von HCl) der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Schließlich wurde die Lösung mit so viel doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass insgesamt ein Volumen von 1 l erreicht wurde.

Um TBS-T mit einfacher Konzentration zu erhalten, wurden 100 ml TBS mit zehnfacher Konzentration in 900 ml doppelt destilliertem Wasser verdünnt und mit einer Pipette 0,5 ml Tween®20 hinzugefügt.

3.2.3 Lösung aus 1 M Tris-HCl (pH 7,4) und 1 % Tween®20

Zur Vorbereitung von 1 l 1 M Tris-HCl (pH 7,4) wurden 121,14 g Tris-Base genau abgewogen und in 800 ml doppelt destilliertes Wasser gelöst. Anschließend wurde mittels HCl (ggf. auch NaOH bei Überdosierung von HCl) der pH-Wert auf 7,4 gebracht. Als nächster Schritt wurde der Lösung so viel doppelt destilliertes Wasser hinzugefügt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 1 l ergab.

Um 15 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4) mit 1 % Tween®20 herzustellen, wurden 15 ml von Tris-HCl (pH 7,4) mit Pipetten in ein entsprechendes Reagiergefäß gegeben und mit einer Pipette 0,15 ml Tween®20 der Lösung hinzugefügt.

3.2.4 Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-Puffer (TE-Puffer) (100 mM, pH 9,0, 1 l)

Die Herstellung von 1 l 100 mM TE-Puffer (pH 9,0) erfolgte durch sorgfältige Bestimmung von 1,21 g Tris-Base sowie 0,37 g EDTA, diNa salt. Beide Stoffe wurden einem Messbecher zugeführt und in 800 ml doppelt destilliertes Wasser gelöst. Im Anschluss daran erfolgte mit HCl (ggf. auch NaOH bei Überdosierung von HCl) die Einstellung des pH-Werts auf 9,0. Schließlich wurden der Lösung noch 0,5 ml Tween®20 mit einer Pipette hinzugefügt. Zum Abschluss wurde der Messbecher mit so viel doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt, damit das Volumen insgesamt 1 l betrug. Verwendet wurde schließlich 10 mM TE-Puffer durch Verdünnung von 100 ml 100 mM TE-Puffer in 900 ml doppelt destilliertem Wasser.

3.2.5 Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0, 1 l)

Um den Zitratpuffer vorzubereiten waren zunächst zwei Stammlösungen erforderlich. Diese wurden als Stammlösung A und Stammlösung B bezeichnet. Für die Stammlösung A wurden 19,2 g $C_6H_8O_7$ (Zitronensäure) in 1 l doppelt destilliertes Wasser gegeben, sodass 0,1 M $C_6H_8O_7$ entstand. Bei der Stammlösung B erfolgte die Lösung von 29,4 g $C_6H_5Na_3O_7$ (Natriumcitrat) in 1 l doppelt destilliertem Wasser.

Damit man 1 l 10 mM Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0) erhielt, war die Lösung von 18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B sowie 0,5 ml Tween®20 in 900 ml doppelt destilliertem Wasser erforderlich.

3.2.6 Differenzierungslösung

Zur Herstellung von 1 l Differenzierungslösung erfolgte die Gabe von 2,5 ml HCl 37,5 % in 1 l Ethanol 70 %.

3.2.7 Scott's tap water substitution

Für die Vorbereitung von Scott's tap water substitution wurden 40,9 g MgSO_4 und 3,8 g NaHCO_3 genau abgewogen. Schließlich wurden die Substanzen in einen Messbecher gegeben und es wurde so viel doppelt destilliertes Wasser hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 1 l erreicht wurde.

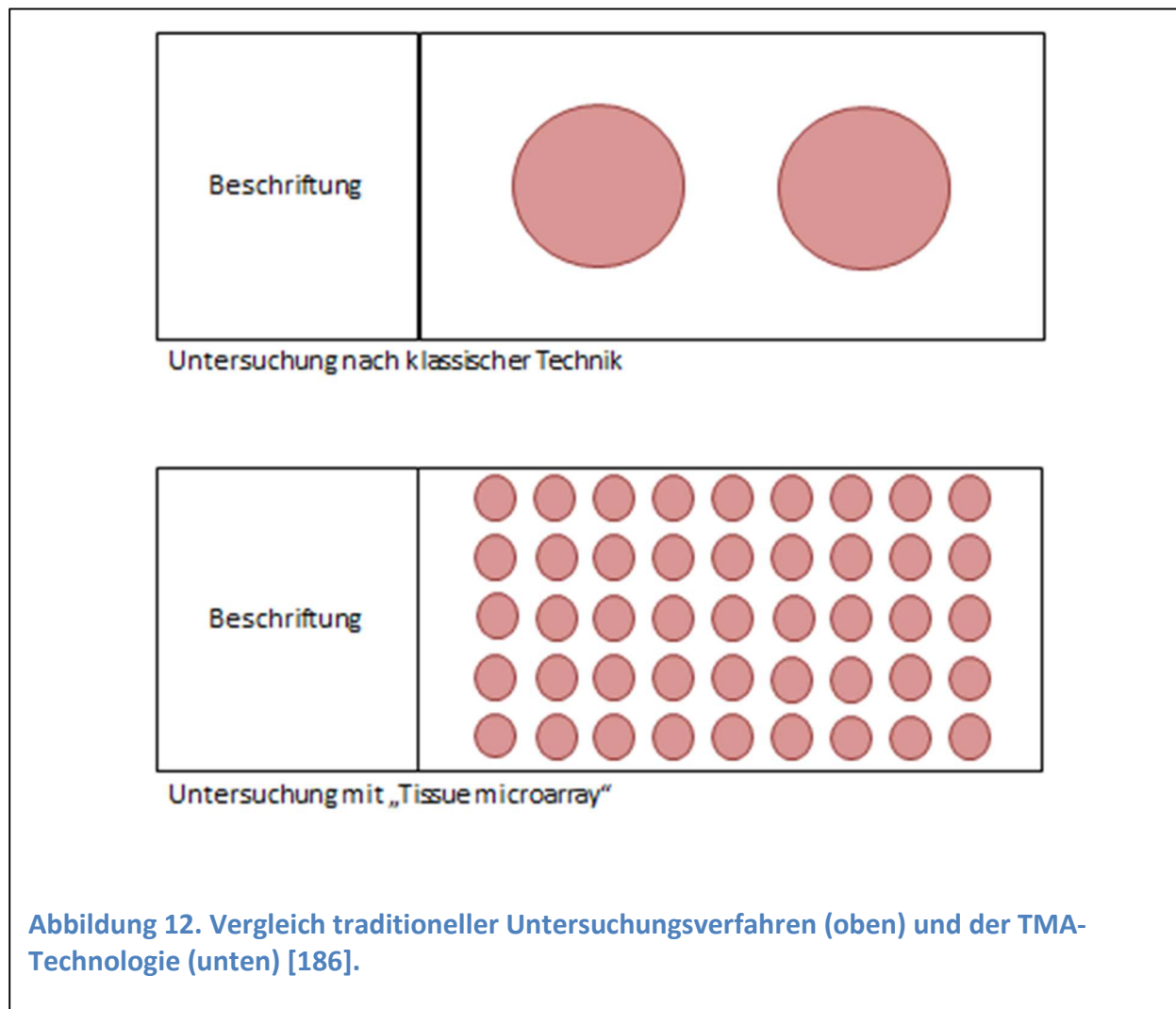
3.2.8 Eosin

Die Herstellung von Eosin erfolgte durch die Lösung von 100 ml Eosin Y-Lösung in 0,5 ml $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (Essigsäure) 96 % (Eisessigsäure).

3.3 Der Tissue Microarray

Etwa seit dem Jahr 2000 hat sich der „Tissue microarray“ (TMA) als neue Technologie etabliert. Besonders gut sind TMAs dazu geeignet, die Expression von bestimmten Zielmolekülen sowie die Morphologie von vielen Gewebeproben in besonders standardisierter Weise zu untersuchen. Vor allem für onkologische Fragestellungen findet die Methode Anwendung [184] [185].

Für einen TMA ist es essentiell, dass repräsentativste Anteile eines Tumors ausgewählt werden. Von diesen Bereichen werden Stanzzylinder aus dem Paraffinblock gewonnen und diese Zylinder wiederum in Paraffin eingebettet, sodass möglichst viele – mitunter bis zu 1.000 – Proben in den Block passen. Hiervon können mit einem Mikrotom viele (bis zu 300) Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen werden. Schließlich kann man die vielen kleinen Gewebe weiteren Untersuchungen zuführen wie in unserem Fall der Immunhistochemie. Noch zeiteffizienter kann man das Vorgehen bei der TMA-Technologie gestalten, indem zunächst zahlreiche Blöcke mit einer großen Anzahl an in Paraffin eingebetteten Proben hergestellt werden. Damit enthält ein TMA sehr zahlreiche Gewebeproben und von diesen die besonders repräsentativen Areale, wohingegen nach dem traditionellen Procedere auf einem Objektträger oft nur ein oder zwei verschiedene Tumorproben Platz haben (Abbildung 12). Der Durchsatz pro Arbeitsgang ist damit wesentlich höher [186].



Zunächst muss, wie bereits oben angesprochen, die für den TMA vorgesehene Region optimal gewählt werden, damit kein „selection bias“ entsteht [187]. Hierbei können Hämatoxylin-Eosin-Färbungen helfen. Unter Verwendung von TMAs ändert sich der Hauptaufwand der Tätigkeit bei der Vorbereitung der Proben. Beim klassischen Vorgehen mit normal großen Geweben ist man im Wesentlichen mit dem Erstellen der Schnitte am Mikrotom sowie der Beschriftung der Objektträger mit den korrekten Nummern der Tumorproben beschäftigt. Bei der TMA-Technologie umfassen die Auswahl der idealen Gewebeareale und die Produktion der kleinen Zylinderstanzen sowie das Einbetten in Paraffinblöcke unter Einhaltung des bestmöglichen Abstands (so wenig wie möglich, so viel wie nötig) den größten Zeitaufwand [188].

3.4 Patienten und Gewebe

Die den Untersuchungen zugrunde liegenden Gewebeproben stammen aus zwei unterschiedlichen Kollektiven:

- 33 Gewebeproben von Nebennierenrindentumoren (hier als „Kohorte 1“ bezeichnet, Tabellen 10 und 11). 26 Proben stammen aus dem Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München und 7 Proben wurden uns freundlicherweise vom Universitätsklinikum Würzburg überlassen.
- 80 ACCs (hier als „Kohorte 2“ bezeichnet), repräsentiert mit jeweils 3 Stanzzyclindern und 30 Negativkontrollen wie beispielsweise Exemplare gesunder humaner Leber, Niere und Placenta auf insgesamt zwei TMAs (Tabelle 12). Beide TMAs in Objektträgerform erhielten wir freundlicherweise von Esther Korpershoek und Ronald de Krijger von der Erasmus Universität Rotterdam.

Alle Patienten wurden im Rahmen des ENSAT-Registers untersucht nach entsprechender Genehmigung durch die Ethikkommissionen der beteiligten Zentren und nach unterschriebenem „informed consent“ durch die Patienten.

Art des Tumors (Diagnose)	Anzahl an Gewebeproben (%)
Adrenocorticales Karzinom (ACC)	6 (18,2 %).
- Mit Hormonaktivität	- 4 (12,1 %).
- Ohne Hormonaktivität	- 2 (6,3 %).
Cortisol produzierende Adenome	18 (54,5 %).
- Mit Cushing-Syndrom	- 14 (42,4 %).
- Mit subklinischem Cushing-Syndrom	- 4 (12,1 %).
Androgen produzierendes Adenom	1 (3,0 %).
Inzidentalome (Adenome ohne Hormonaktivität)	8 (24,2 %).
Insgesamt	33 (100,0 %).

Tabelle 10. Übersicht über die Tumorarten von Kohorte 1.

Parameter	Daten
Geschlecht	Weiblich: 28/33 (84,8 %). Männlich: 5/33 (15,2 %).
Alter bei Diagnosestellung (Jahre)	49,0 ± 17,9.
Zeit bis zum Tod oder letztem follow-up (Jahre)	3,9 ± 3,4 (0,1 – 15,8).
Krankheitsbedingter Tod	3/14 (21,4 %).
Tumortyp (Dignität)	Benigne: 27/33 (81,8 %). Maligne: 6/33 (18,2 %).
Klinische Symptomatik	Weder Cushing noch Virilismus: 11/24 (45,8 %). Cushing: 9/24 (37,5 %). Virilismus: 2/24 (8,3 %). Cushing und Virilismus: 2/24 (8,3 %).
Rezidiv	2/12 (16,7 %).
Metastasierung	3/32 (9,4 %).
Resektionsstatus	R0: 22/23 (95,7 %). R1: 0/23 (0,0 %). R2: 1/23 (4,3 %).
Hormonproduktion	17/26 (65,4 %).
Cortisolproduktion (ohne weitere Hormone)	11/26 (42,3 %).
Androgenproduktion (ohne weitere Hormone)	2/26 (7,7 %).
Androgen- und Cortisolproduktion	3/26 (11,5 %).
ACTH- und Cortisolproduktion	1/26 (3,8 %).
Tumorgröße (cm)	4,9 (1, – 22,0).
Weiss-Score (%)	2,3 (1 – 5).
Ki-67-Index (%)	11,0 (1 – 40).
ENSAT-Stadium (für ACC)	Stadium 1: 0/6 (0,0 %). Stadium 2: 3/6 (50,0 %). Stadium 3: 3/6 (50,0 %). Stadium 4: 0/6 (0,0 %).

Tabelle 11. Übersicht über die klinischen Daten von Kohorte 1.

Parameter	Daten
Geschlecht	Weiblich: 47/80 (58,8 %). Männlich: 33/80 (41,3 %).
Alter bei Diagnosestellung (Jahre)	50,0 ± 15,6.
Tumorgröße (cm)	10,3 (7,5 – 15,1).
Weiss-Score (%)	6 (5,5 – 7).
Ki-67-Index (%)	14 (5 – 30).
Krankheitsbedingter Tod	40/77 (51,9 %).
Metastasierung	52/78 (66,7 %).
Resektionsstatus	R0: 43/67 (64,2 %). R1: 7/67 (10,4 %). R2: 17/67 (25,4 %).
Hormonproduktion	45/78 (57,7 %).
Cortisolproduktion	34/78 (43,6 %).
Androgenproduktion	23/78 (29,5 %).
ENSAT-Stadium (für ACC)	Stadium 1: 6/74 (8,1 %). Stadium 2: 36/74 (48,7 %). Stadium 3: 16/74 (21,6 %). Stadium 4: 16/74 (21,6 %).
Tabelle 12. Übersicht über die klinischen Daten von Kohorte 2.	

3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gewebeproben wurden nacheinander in folgende Lösungen gegeben, die sich jeweils in eigenen Glaswannen befanden:

- Für 10 Minuten in 100 % Xylol,
- erneut für 10 Minuten in 100 % Xylol,
- für 5 Minuten in 100 % Ethanol,

- erneut für 5 Minuten in 100 % Ethanol,
- für 5 Minuten in 70 % Ethanol,
- für 5 Minuten in 30 % Ethanol,
- für 5 Minuten in doppelt destilliertes Wasser,
- für 1 Minute in Hämatoxylin nach Harris,
- für 30 Sekunden in Leitungswasser,
- für 5 Minuten in Differenzierungslösung,
- erneut für 5 Minuten in Differenzierungslösung,
- für 1 Minute in Leitungswasser,
- für 1 Minute in Scott's tap water substitution,
- für 10 Sekunden in doppelt destilliertes Wasser,
- für 15 Sekunden in Eosin,
- für 15 Sekunden in doppelt destilliertes Wasser,
- für 1 Minute in 80 % Ethanol,
- für 2 Minuten in 100 % Ethanol,
- erneut für 2 Minuten in 100 % Ethanol,
- für 5 Minuten in 100 % Xylol und
- erneut für 5 Minuten in 100 % Xylol.

Schließlich wurde das Deckmedium auf die Objektträger aufgetragen, Deckgläser darüber gelegt und etwaige Luftblasen entfernt, sodass die Gewebeproben danach im Lichtmikroskop untersucht werden konnten.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Anfertigung der Schnitte

Zum Anfertigen der Präparate wurden die Paraffinblöcke am Mikrotom 2 µm dick geschnitten und auf Wasser, das zuvor auf 40 °C erhitzt worden war, in einem Paraffinstreckbad gelegt. Schließlich wurden sie auf den Objektträger gezogen und über 24

Stunden bei 37 °C im Inkubator gelagert. Daraufhin konnten sie zur immunhistochemischen Färbung verwendet werden.

3.6.2 Deparaffinisierung der Schnitte

Die Objektträger wurden, um unnötiges Paraffin zu entfernen, nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

- Für 10 Minuten in 100 % Xylol,
- erneut für 10 Minuten in 100 % Xylol,
- für 5 Minuten in 100 % Ethanol,
- erneut für 5 Minuten in 100 % Ethanol,
- für 5 Minuten in 70 % Ethanol und daraufhin
- für 5 Minuten in 30 % Ethanol.

Zum Abschluss der Deparaffinisierung wurden die Objektträger noch für 2 Minuten in PBS gewaschen.

3.6.3 Erhitzen zur Antigenfreilegung unter Verwendung von TE-Puffer (pH 9,0) bzw. Zitratpuffer (pH 6,0)

Zuerst wurde der Puffer in eine Glaswanne gegeben und für 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, bis der Puffer zu kochen begann, also eine Temperatur von etwa 95 bis 100 °C erreichte. Erst dann sollten die Objektträger in den bereits heißen Puffer hinzugegeben werden. Der jeweilige Puffer wurde für 15 Minuten weiterhin in der eingeschalteten Mikrowelle belassen, um eine Temperatur des Puffers von etwa 80 bis 90 °C zu erhalten. Daraufhin wurden die Objektträger noch für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur außerhalb der Mikrowelle stehen gelassen. Anschließend kamen die Gewebeproben dann zum Waschen in eine Glaswanne mit PBS. Beim Hsp90 α - und GR-Antikörper wurde Zitratpuffer, beim Hsp90 β und FKBP51-Antikörper wurde TE-Puffer verwendet.

3.6.4 Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität und unspezifischer Antigene

Zunächst wurde eine Mischung aus 1,5 ml 3 % Wasserstoffperoxid und 50 ml Methanol vorbereitet, mit der die endogene Peroxidaseaktivität blockiert wird. Daraufhin wurden die Präparate in dieser Lösung für eine Dauer von 10 Minuten inkubiert und anschließend noch 5 Minuten in PBS gewaschen. Als nächstes wurde der Blockierungspuffer, der unspezifische Antigenbindungen verhindern soll, in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Dies geschah folgendermaßen:

- Anhand der Anzahl und der Größe von den verwendeten Gewebeproben entschied man zunächst, welches Gesamtvolumen $V(\text{gesamt})$ sinnvoll ist.
- Gebraucht wurde Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,4 sowie ein Detergenz, nämlich Tween20. Beide Stoffe wurden gemischt und schließlich das Volumen aus dieser Mischung bestimmt: $V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween20}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,1$.
- Ferner verwendeten wir auch humanes Serum, dessen Volumen wir wie folgt errechneten: $V(20 \% \text{ humanes Serum}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,2$.
- Um das benötigte Gesamtvolumen zu erreichen, wurde abschließend destilliertes Wasser hinzugegeben, dessen Volumen sich folgendermaßen ergibt: $V(\text{destilliertes Wasser}) = V(\text{gesamt}) - (V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween } 20) + V(20 \% \text{ humanes Serum}))$.

Die entsprechenden Volumina von 0,1 M Tris-HCl pH 7,4 und 0,1 % Tween20, 20 % humanes Serum sowie dem destillierten Wasser wurden durch Pipettieren in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nachdem der Blockierungspuffer fertig zubereitet war, wurden die Objektträger mit Papiertüchern abgetrocknet und die Gewebeproben mit einem Fettstift umkreist, damit keine Flüssigkeit aus dem Kreis herausfließt. Danach wurde der Blockierungspuffer in den Kreis mit den Gewebeproben gegeben und die Objektträger in einer befeuchteten Box für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Blockierungspuffer von den Gewebeproben entfernt, indem die Objektträger auf einem Stapel Papiertücher abgeklopft wurden. Außerdem wurden die Präparate noch 5 Minuten lang in einer Glaswanne mit Tris-buffered saline inklusive Tween20 (TBS-T) gewaschen.

3.6.5 Inkubation mit dem primären Antikörper

Während sich die Gewebeproben in der Glaswanne mit TBS-T befanden, konnten die Reagenzien für die Negativkontrollen sowie mit den primären Antikörpern hergestellt werden. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt:

Negativkontrollen

Die Herstellung erfolgt genauso wie beim Blockierungspuffer:

- Anhand der Anzahl und der Größe von den verwendeten Gewebeproben entschied man zunächst, welches Gesamtvolumen $V(\text{gesamt})$ sinnvoll ist.
- $V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween20}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,1.$
- $V(20 \% \text{ humanes Serum}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,2.$
- $V(\text{destilliertes Wasser}) = V(\text{gesamt}) - (V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween } 20) + V(20 \% \text{ humanes Serum})).$

Primäre Antikörper

Durch vorausgegangene immunhistochemische Färbungen konnte man sagen, welche Konzentration für welchen primären Antikörper gut geeignet ist.

- Hsp90 α (ERP3953)-Antikörper: $c(\text{Hsp90}\alpha\text{-Antikörper}) = 1 : 300$
- Hsp90 β (E296)-Antikörper: $c(\text{Hsp90}\beta\text{-Antikörper}) = 1 : 750$
- FKBP51 (D-4)-Antikörper: $c(\text{FKBP51-Antikörper}) = 1 : 200$
- GR (E-20)-Antikörper: $c(\text{GR-Antikörper}) = 1 : 80$

Im Anschluss ist die allgemeine Berechnung der Puffer für die primären Antikörper aufgeführt:

- Anhand der Anzahl und der Größe von den verwendeten Gewebeproben entschied man zunächst, welches Gesamtvolumen $V(\text{gesamt})$ sinnvoll ist.
- $V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween20}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,1.$
- $V(20 \% \text{ humanes Serum}) = V(\text{gesamt}) \cdot 0,2.$
- $V(\text{primärer Antikörper}) = V(\text{gesamt}) \cdot c(\text{primärer Antikörper}).$

- $V(\text{destilliertes Wasser}) = V(\text{gesamt}) - (V(0,1 \text{ M Tris-HCl pH } 7,4 \text{ und } 0,1 \% \text{ Tween } 20) + V(20 \% \text{ humanes Serum}) + V(\text{primärer Antikörper}))$.

Die Objektträger wurden wiederum mit Papiertüchern abgetrocknet, bei Bedarf wurde der Kreis mit dem Fettstift nachgezeichnet und schließlich die entsprechenden Reagenzien auf die entsprechenden Gewebeproben aufgetragen. Für 16 Stunden wurden die Objektträger über Nacht in einer befeuchteten Box im Kühlraum (ca. 4 °C) inkubiert (Ausnahme: Beim GR-Antikörper wurden die Objektträger nur für 1 Stunde in einer befeuchteten Box bei Raumtemperatur inkubiert.).

3.6.6 Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Zunächst galt es, den Puffer für die Negativkontrolle und den Puffer mit dem primären Antikörper von den Gewebeproben zu entfernen, indem die Objektträger erneut auf einem Stapel Papiertüchern abgeklopft wurden. Anschließend wurden die Präparate viermal für 5 Minuten in einer Glaswanne mit TBS-T gewaschen.

Als sekundärer Antikörper wurde der Dako-Kit verwendet, der als entsprechendes Reagenz „HRP rabbit/mouse“ enthielt, in dem sich der sekundäre Antikörper befand.

Schließlich wurden die Objektträger mit Papiertüchern abgetrocknet, bei Bedarf der Kreis um die Gewebeproben mit dem Fettstift nachgezeichnet und schließlich der Puffer mit dem entsprechenden sekundären Antikörper hinzugegeben. Die Objektträger wurden mit dem aufgetragenen Puffer für 30 Minuten in einer befeuchteten Box bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Objektträger auf einem Stapel Papier abgeklopft, damit der Antikörperpuffer nicht länger auf den Gewebeproben bleibt. Die Präparate werden nun viermal für 5 Minuten in einer Glaswanne mit TBS-T gewaschen.

3.6.7 Färbung mit Substrat-Chromogen-Lösung

Bei allen in diesem Projekt verwendeten Antikörpern wurde die Substrat-Chromogen-Lösung mit dem Dako-Kit zubereitet. Es gab eine Flasche mit Substratpuffer sowie eine Flasche mit flüssigem 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Chromogen. Nacheinander wurden in ein Reaktionsgefäß der Substratpuffer und die flüssige DAB-Chromogen-Mischung (Verhältnis Substratpuffer : flüssige DAB-Chromogen-Mischung = 50 : 1; beispielsweise 1000 µl Substratpuffer + 20 µl flüssige DAB-Chromogen-Mischung) gegeben und abschließend die neu entstandene Lösung im Reaktionsgefäß mittels Vortexen gemischt.

Nach Beendigung des 20-minütigen Waschvorgangs in einer Glaswanne mit TBS-T wurden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser gelegt, daraufhin mit Papiertüchern getrocknet und bei Bedarf der Kreis um das Gewebe mit dem Fettstift nachgezeichnet. Sodann wurden die entsprechenden Substrat-Chromogen-Lösungen auf die entsprechenden Gewebeproben aufgetragen und für unterschiedlich lange Zeiten bei Raumtemperatur stehengelassen (Hsp90α: 4 Minuten, Hsp90β: 90 Sekunden, FKBP51: 90 Sekunden, GR: 5 Minuten). Danach wurde die Substrat-Chromogen-Lösung von den Geweben durch Abklopfen der Objektträger auf Papiertüchern entfernt. Die Gewebeproben wurden wiederum kurz in destilliertes Wasser gelegt und schließlich für 5 Minuten in einer Glaswanne mit PBS gewaschen.

3.6.8 Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Hierfür ist eine Vielzahl von Glaswannen mit entsprechenden Substanzen darin notwendig. Das Vorgehen zum Anfärben der Gewebeproben mit Hämatoxylin nach Harris ist im Folgenden aufgeführt:

- Kurzes Waschen der Objektträger in destilliertem Wasser.
- Anfärben der Gewebe mit Hämatoxylin nach Harris für 90 Sekunden.
- Waschen der Gewebeproben in Leitungswasser für 30 Sekunden.
- Inkubation der Objektträger in Differenzierungslösung für 3 Minuten.
- Waschen der Gewebeproben in Leitungswasser für 30 Sekunden.
- Inkubation der Objektträger mit Scott's tap water substitution für 60 Sekunden.
- Waschen der Gewebeproben in destilliertem Wasser für 60 Sekunden.

3.6.9 Dehydrierung und Auflage der Deckgläser

Das Vorgehen mit den Objektträgern zur Dehydrierung ist im Anschluss beschrieben:

- Für 2 Minuten in 30 % Ethanol,
- für 2 Minuten in 70 % Ethanol,
- für 2 Minuten in 100 % Ethanol,
- erneut für 2 Minuten in 100 % Ethanol,
- für 5 Minuten in 100 % Xylol und
- erneut für 5 Minuten in 100 % Xylol.

Zum Abschluss der Immunhistochemie sind noch ein Deckmedium sowie Deckgläser für die Objektträger erforderlich. Letztere werden aus der Glaswanne mit 100 % Xylol genommen und mit Papiertüchern getrocknet. Daraufhin wird durch Pipettieren an der oberen Kante des Objektträgers das Eindeckmedium aufgetragen und das Deckglas von oben nach unten auf den Objektträger gelegt. Dabei ist es entscheidend, das Entstehen von Luftblasen soweit wie möglich zu verhindern. Sollten Luftblasen dennoch vorhanden sein, versucht man, sie mit einer flachen Oberfläche (z.B. hinteres Ende eines Bleistifts) wegzudrücken. Schließlich ist man mit der immunhistochemischen Färbung fertig und die Gewebeproben können unter dem Mikroskop fotografiert und analysiert werden.

3.7 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung

3.7.1 Gewebeblöcke

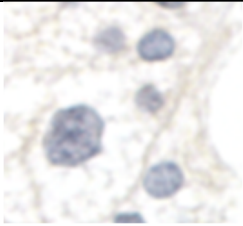
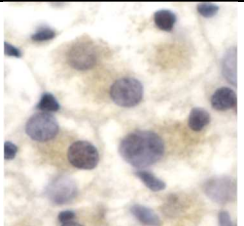
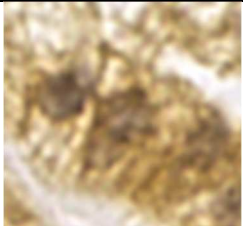
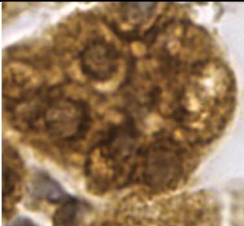
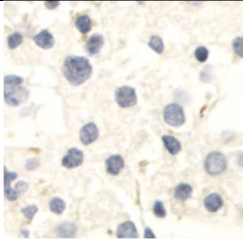
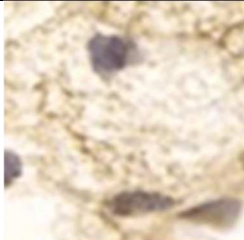
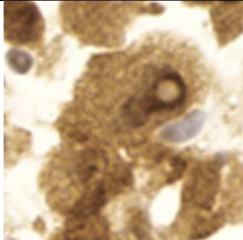
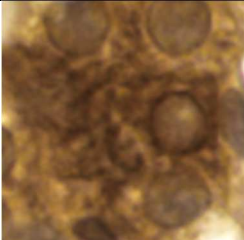
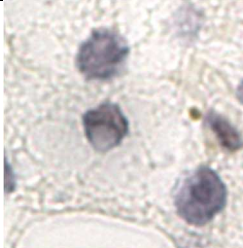
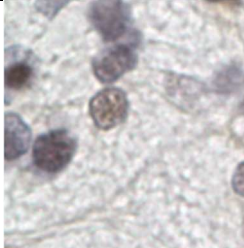
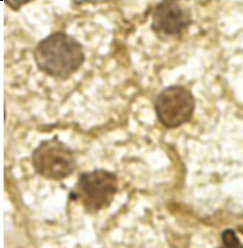
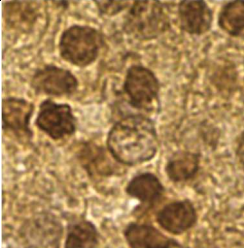
Die 33 Gewebeblöcke der Kohorte 1 wurden nach der Immunhistochemie fotodokumentiert: Mit dem Mikroskop Leica DMRB (Firma Leica Camera AG®, Wetzlar, Deutschland) wurden von jedem Gewebe 30 Bilder mit 400x-Vergrößerung erstellt. Wir definierten vier Kategorien, die der Einteilung der jeweiligen Zellen in verschiedene Signalintensitätsstufen dienten: „0“ für „kein Signal“, „1“ für „geringe Signalintensität“, „2“ für „mäßige

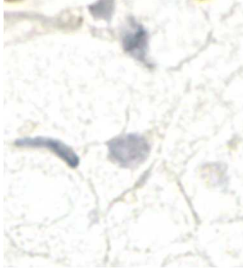
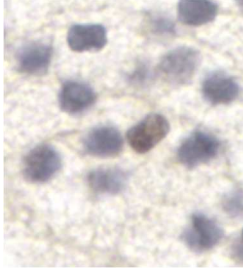
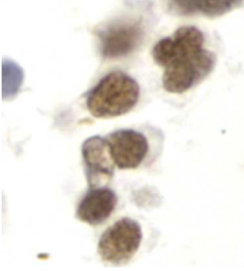
Signalintensität“ und „3“ für „hohe Signalintensität“ (Tabelle 13). Bei den mit Hsp90α- und Hsp90β-Antikörpern behandelten Proben wurde das Signal im Zytosol, bei den mit FKBP51- und GR-Antikörpern behandelten Geweben wurde das Signal im Nukleus untersucht, da die entsprechenden Zielstrukturen typischerweise dort zu finden sind. Schließlich wählten wir für jedes Gewebe aus allen Bildern die 10 repräsentativsten Bilder aus, zählten die vorhandenen Zellen und ordneten Sie den entsprechenden Kategorien zu. Berechnet wurden die jeweiligen H-Scores dann folgendermaßen:

Die Variable n steht für die „Anzahl an Zellen“.

$$\text{Individueller H-Score (für ein Bild)} = \frac{n_0 \cdot 0 + n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 2 + n_3 \cdot 3}{n}.$$

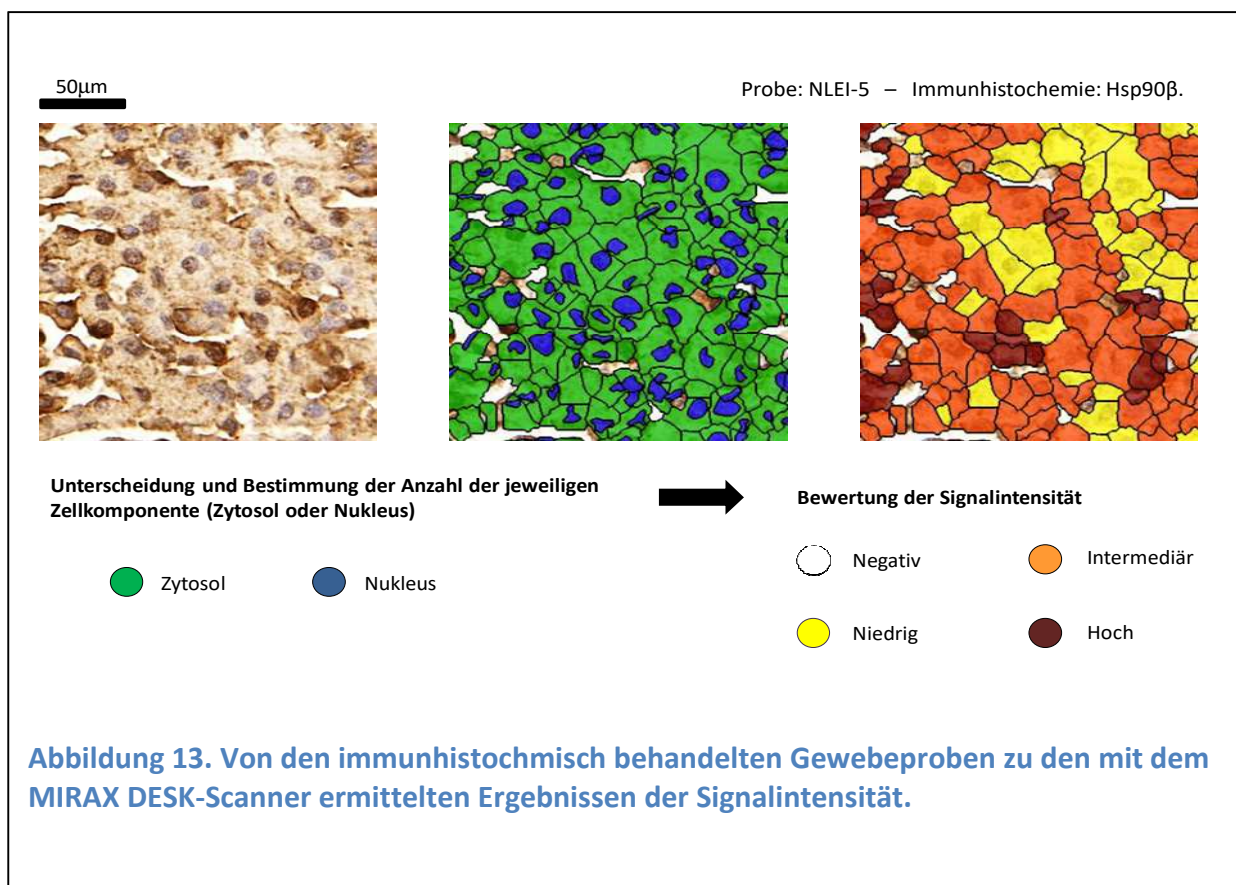
$$\text{Individueller H-Score (für ein Gewebe)} = \frac{\sum(\text{H-Scores der 10 repräsentativsten Bilder})}{10}.$$

Antigen	Kategorie 0	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3
Hsp90α (Zytosol)				
Hsp90β (Zytosol)				
FKBP51 (Nukleus)				

GR (Nukleus)				
Tabelle 13. Beispielhafte Übersicht über die Zuordnung verschiedener Signalintensitätsstufen in die entsprechenden Kategorien.				

3.7.2 Tissue microarray

Für die Kohorte 2 nutzten wir viermal (wegen vier untersuchten molekularen Zielstrukturen) zwei TMAs in Objektträgerform, die insgesamt jeweils drei Proben von 80 ACCs sowie 30 Negativkontrollen enthielten. Die Immunhistochemie wurde wie oben unter 3.6 beschrieben durchgeführt. Mit dem Gerät MIRAX DESK-Scanner (www.zeiss.de/mirax, Firma Zeiss MicroImaging GmbH®, Göttingen, Deutschland) wurden die insgesamt acht TMAs gescannt und quantifiziert (Abbildung 13). Auch hier gilt: Bei den mit Hsp90 α - und Hsp90 β -Antikörpern behandelten Proben wurde das Signal im Zytosol, bei den mit FKBP51- und GR-Antikörpern behandelten Geweben wurde das Signal im Nukleus untersucht, da die entsprechenden Zielstrukturen typischerweise dort zu finden sind. Wiederum wurde unterschieden zwischen negativen, wenig gefärbten, mäßig gefärbten und stark gefärbten Zellen.



3.8 Statistik

Wir verglichen die H-Scores, beruhend auf der Intensität im Zytosol (für Hsp90α und Hsp90β) bzw. Nukleus (für FKBP51 und GR) mit verschiedenen klinischen Parametern wie Geschlecht, Art des Tumors (Diagnose), klinische Symptomatik, Hormonproduktion, Rezidiv, Metastasierung, krankheitsbedingter Tod, Alter bei Diagnosestellung, Gesamtüberleben, Tumorgröße, Weiss-Score, Ki-67-Proliferationsindex und ENSAT-Stadium für ACC. Als Tests verwendeten wir für die Kohorte 1 den t-Test (bei zwei Variablen, eine davon unterteilt in zwei Kategorien) und die Varianzanalyse (ANOVA, bei über zwei Kategorien) sowie für die Kohorte 2 den Wilcoxon-Test (bei zwei Variablen, eine davon unterteilt in zwei Kategorien) bzw. den Kruskal-Wallis-Test (bei über zwei Kategorien). Außerdem wurde in einigen Fällen der Korrelationskoeffizient nach Spearman r_s (z.B. für Beziehungen zwischen den H-Scores der vier molekularen Zielstrukturen untereinander) berechnet. Für die statistische Analyse

(Berechnung der p-Werte, Korrelationskoeffizienten nach Spearman r_s , Erstellung verschiedener Abbildungen etc.) verwendeten wir Software „IBM SPSS Statistics“ (Version 25, Firma IBM®, Armonk, New York, USA). Bei Kohorte 2 wurden allerdings die Untersuchung mit dem Scanner und die statistischen Berechnungen ausschließlich durch Herrn Dr. Masanori Murakami am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Für die Statistik verwendete er die Software „R“ (<https://www.r-project.org>, Günter Faes, Dormagen, Deutschland). Als Signifikanzniveau wählten wir $\alpha = 0,05$, sodass bei uns signifikante Beziehungen bei $p < 0,05$ vorlagen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Analyse von Kohorte 1

Bei der Analyse konnten die in den unten stehenden Tabellen (Tabellen 14 und 15) aufgeführten p-Werte berechnet werden. Signifikante Beziehungen ($p < 0,05$) wurden fett hervorgehoben. Bezüglich der Frage nach krankheitsbedingtem Tod, Metastasierung und Rezidiv ist eine Unterscheidung nur zwischen den ACCs sinnvoll. Da mangels klinischer Daten bei diesen Fragestellungen stets mindestens eine Gruppe nur eine Fallzahl von $n = 2$ aufwies, war keine vernünftige Berechnung einer Signifikanz möglich. Die Tabellen mit den einzelnen Daten (z.B. Fallzahl, Mittelwert, Standardabweichung) zum jeweiligen Parameter, die im Text bereits erwähnt werden, befinden sich als Zusatzmaterial im Anhang unter dem Punkt 8.1.1.

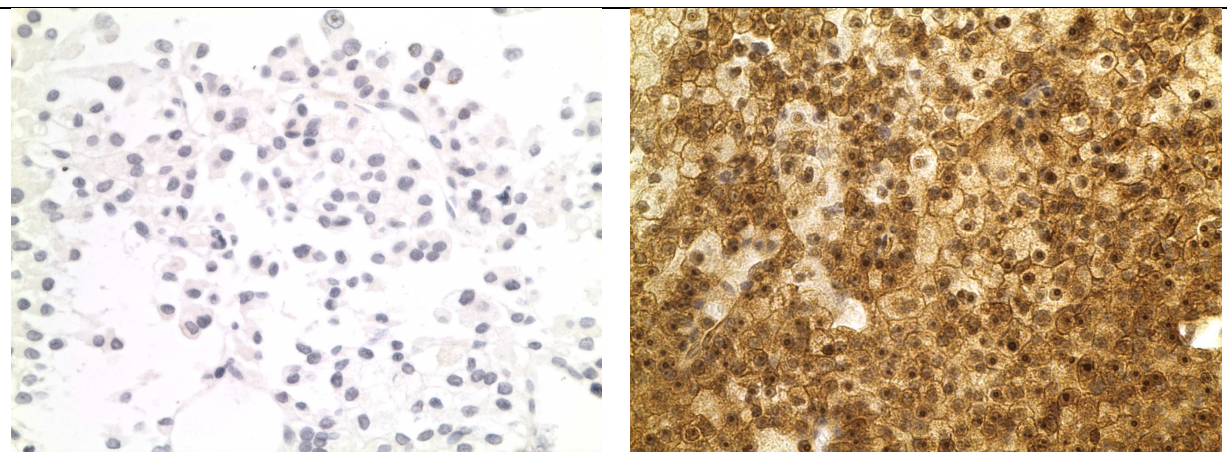
	Hsp90α (H-Score)	Hsp90β (H-Score)	FKBP51 (H-Score)	GR (H-Score)
Hsp90α (H-Score)	-	0,102	0,847	0,093
Hsp90β (H-Score)	0,102	-	0,021	0,245
FKBP51 (H-Score)	0,847	0,021	-	0,013
GR (H-Score)	0,093	0,245	0,013	-
Tabelle 14. Übersicht über die p-Werte der Korrelationen zwischen der Expression der Zielstrukturen untereinander bei der Kohorte 1.				

	Hsp90α (H-Score)	Hsp90β (H-Score)	FKBP51 (H-Score)	GR (H-Score)
Geschlecht	0,175	0,130	0,877	0,879

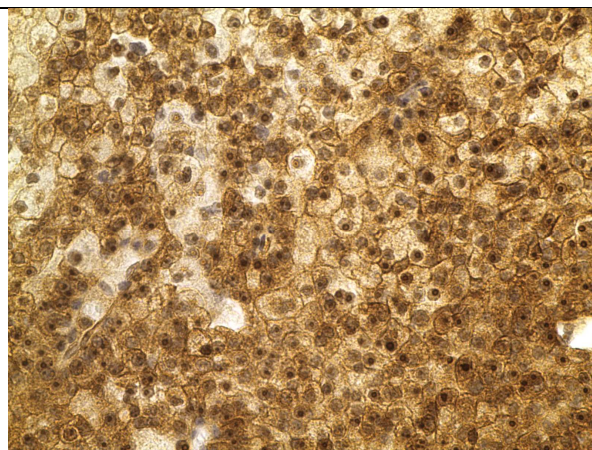
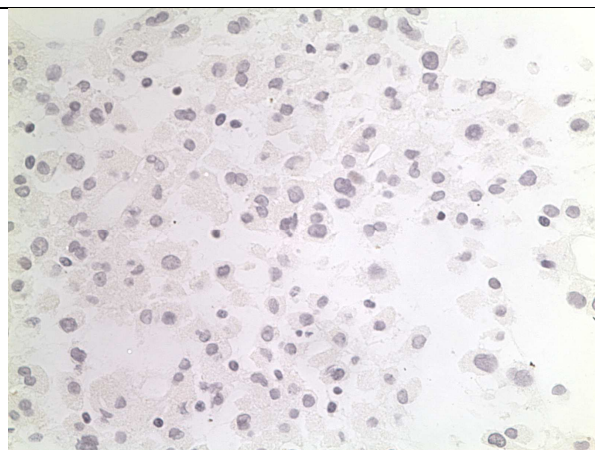
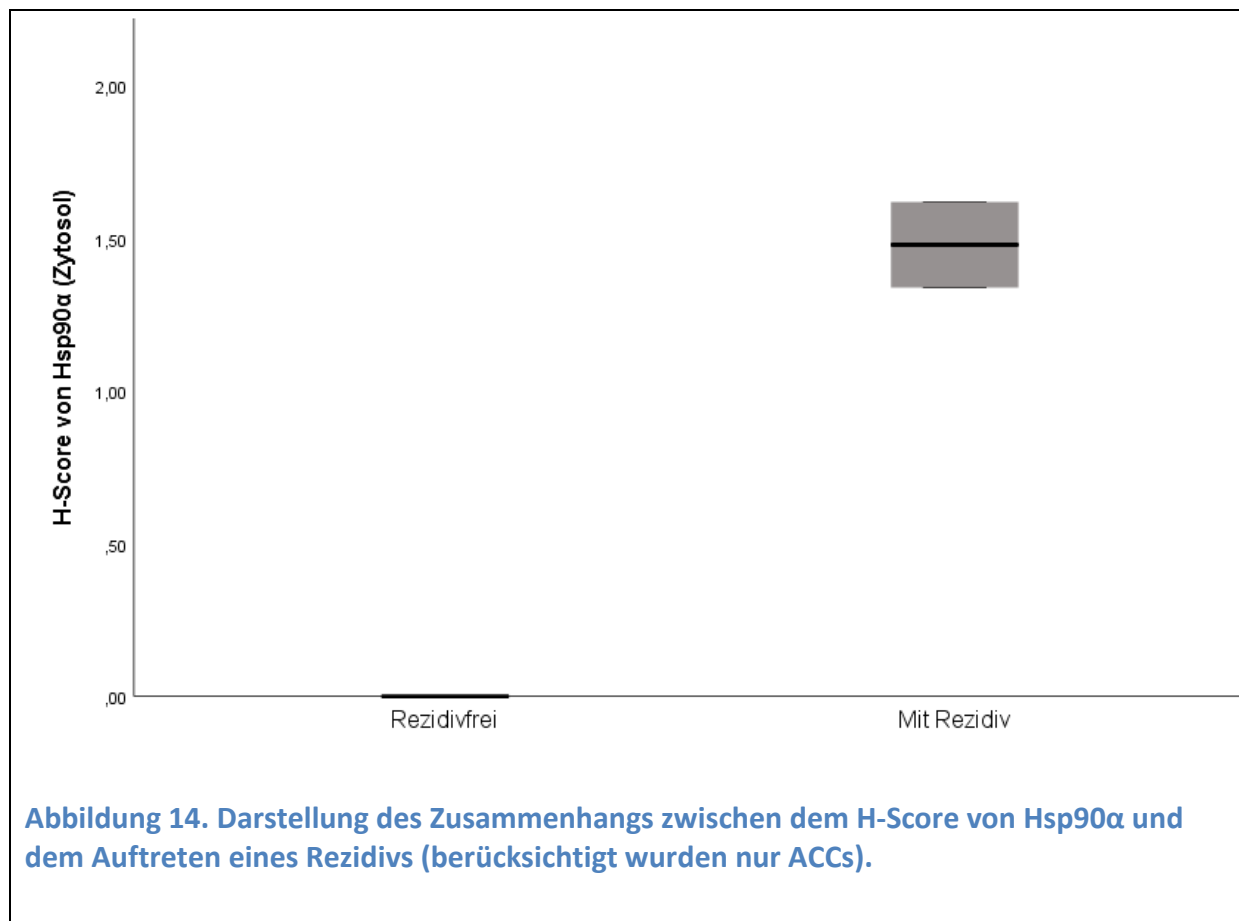
Krankheitsbedingter Tod	Wegen zu geringer Fallzahl (nur ACC, mindestens eine Gruppe n = 2 mangels klinischer Daten) keine sinnvolle Signifikanz bestimmbar			
Rezidiv	Wegen zu geringer Fallzahl (nur ACC, mindestens eine Gruppe n = 2 mangels klinischer Daten) keine sinnvolle Signifikanz bestimmbar			
Metastasierung	Wegen zu geringer Fallzahl (nur ACC, mindestens eine Gruppe n = 2 mangels klinischer Daten) keine sinnvolle Signifikanz bestimmbar			
Tumorhistologie (ACA vs. ACC)	0,857	0,001	0,316	0,650
Histologie und Funktionalität	0,682	0,003	0,557	0,765
Hormonaktivität (ja oder nein)	0,473	0,062	0,965	0,952
Hormonproduktion (differenziert)	0,696	0,001	0,454	0,865
Klinische Symptomatik	0,913	0,008	0,096	0,371
Alter bei Diagnosestellung	0,932	0,120	0,155	0,805
Gesamtüberleben	0,560	0,731	0,819	0,484
Tumorgröße	0,462	0,956	0,181	0,480
Weiss-Score	0,824	0,108	0,545	0,298
Tabelle 15. Übersicht über die p-Werte einiger Korrelationen bei der Kohorte 1.				

4.1.1 Hsp90α

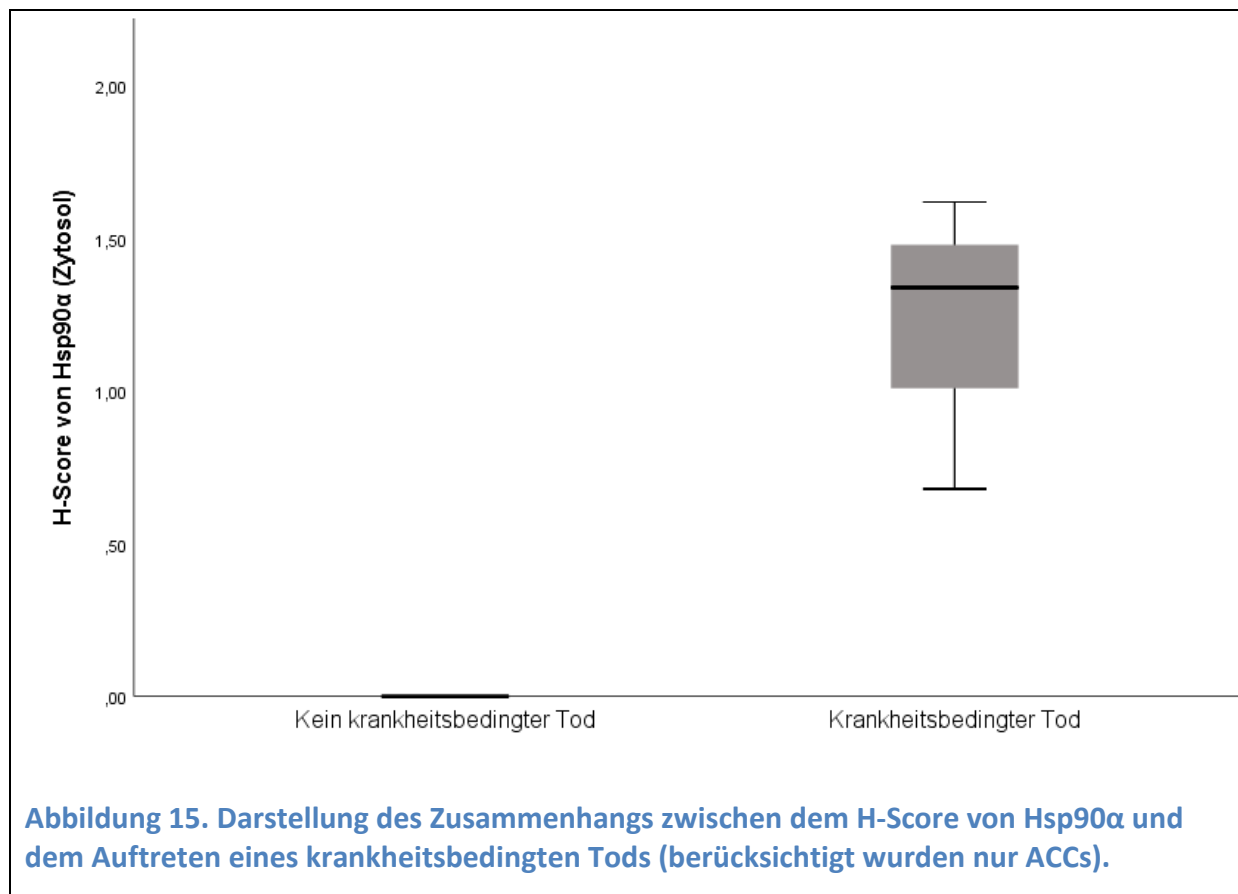
Bezüglich Hsp90 α konnten keine Korrelationen mit klinischen Parametern gefunden werden, welche statistisch signifikant waren. Es zeigte sich eine eher höhere Expression von Hsp90 α bei ACCs mit Rezidiv (n = 2, Mittelwert = 1,48, Standardabweichung = 0,20) als bei ACCs ohne Rezidiv (n = 2, Mittelwert = 0,00, Standardabweichung = 0,00). Außerdem war das Auftreten eines krankheitsbedingten Todes bei ACCs mit hohem H-Score (n = 3, Mittelwert = 1,21, Standardabweichung = 0,48) häufiger als bei ACCs mit niedrigem H-Score (n = 2, Mittelwert = 0,00, Standardabweichung = 0,00).



Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines Rezidivs (links) und mit Auftreten eines Rezidivs (rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression von Hsp90 α .



Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines krankheitsbedingten Todes (links) und mit Auftreten eines krankheitsbedingten Todes (rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression von Hsp90α.



4.1.2 Hsp90β

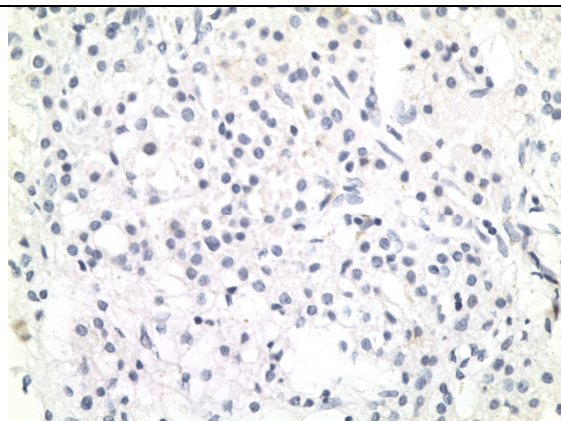
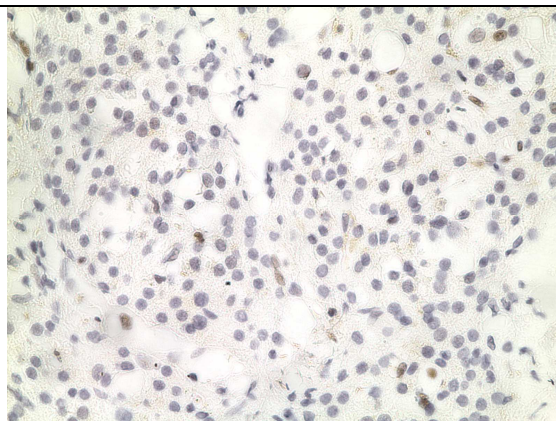
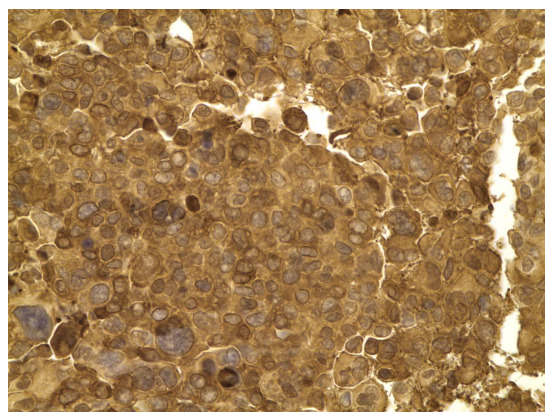
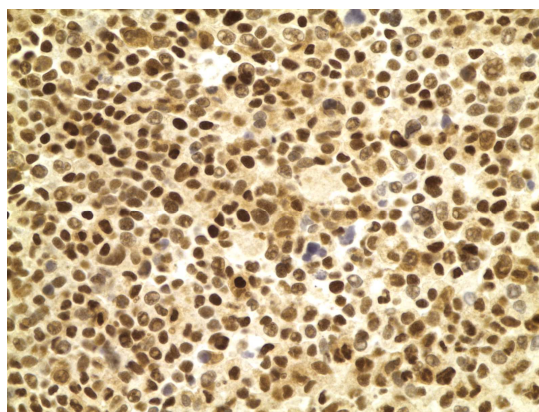
Bei der Untersuchung der Proben der Kohorte 1 konnten wir die Mehrheit der signifikanten Beziehungen bei Hsp90β detektieren. Diese wurden zwischen dem H-Score der Expression von Hsp90β und dem H-Score von FKBP51 ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,450$), der Tumorphistologie ($p = 0,001$), der Histologie und Funktionalität ($p = 0,003$) und der Art der Hormonproduktion (differenziert) ($p = 0,001$) gefunden. Im Falle der klinischen Symptomatik konnte keine sinnvolle Signifikanz berechnet werden, da für Virilismus sowie die Kombination aus Virilismus und Symptomen des Cushing-Syndroms zu geringe Fallzahlen (teilweise jeweils $n = 2$) vorlagen.

Es zeigte sich eine positive signifikante Beziehung ($p = 0,021$) zwischen der Expression von Hsp90β ($n = 33$) und FKBP51 ($n = 26$). Hierbei handelte es sich um eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,450$), sodass sich mit zunehmendem H-Score von Hsp90β auch eine Steigerung der Expression von FKBP51 zeigte.

Bezüglich der Tumorphistologie fand sich zudem eine höhere Expression in ACCs (n = 6, Mittelwert = 1,62, Standardabweichung = 0,43) als in adrenocorticalen Adenomen (ACAs) (n = 26, Mittelwert = 0,90, Standardabweichung = 0,39).

Ferner wurde die Expression von Hsp90 β zwischen verschiedenen konkreteren Tumordiagnosen untersucht. Hierzu zählten das inaktive Nebennierenadenom, das Cushing-Adenom sowohl in der subklinischen als auch der klinisch manifesten Form, das Androgen-produzierende Adenom und das ACC. Die Bonferroni-Testung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von Hsp90 β in ACCs (n = 6, Mittelwert = 1,62, Standardabweichung = 0,43) gegenüber inaktiven Nebennierenadenomen (p = 0,006, n = 8, Mittelwert = 0,84, Standardabweichung = 0,38), subklinischen Cushing-Adenomen (p = 0,013, n = 4, Mittelwert = 0,76, Standardabweichung = 0,36) und klinisch manifesten Cortisol-produzierenden Tumoren (p = 0,015, n = 14, Mittelwert = 0,98, Standardabweichung = 0,40). In allen drei Fällen war die Expression von Hsp90 β in ACCs signifikant höher als in den anderen Tumoren. Beim Androgen-produzierenden Adenom konnte wegen der geringen Fallzahl (n = 2) keine sinnvolle Berechnung der Signifikanz erfolgen.

Außerdem erfolgte auch eine statistische Analyse zwischen der hormonellen Aktivität. Inaktive Tumore (n = 9, davon waren n = 8 ACAs und n = 1 ACC, Mittelwert = 0,80, Standardabweichung = 0,34) exprimierten signifikant (p = 0,007) weniger Hsp90 β als Tumoren mit Cortisol- und weiterer Hormonproduktion (n = 4, davon waren n = 2 ACAs und n = 2 ACCs, Mittelwert = 1,57, Standardabweichung = 0,28). Darüber hinaus fand sich bei Tumoren mit Cortisol- und zusätzlicher Hormonsekretion eine signifikant (p = 0,018) höhere Expression als in ausschließlich Cortisol-produzierende Neoplasien (n = 11, davon handelte es sich in allen Fällen um ACAs, Mittelwert = 0,90, Standardabweichung = 0,37). Bei den Androgen-sezernierenden Tumoren (n = 2, davon waren n = 1 ACA und n = 1 ACC, Mittelwert = 1,71, Standardabweichung = 0,48) zeigte sich eine höhere Expression von Hsp90 β als in den hormonell inaktiven Neoplasien und den nur Cortisol-produzierenden Tumoren.

**A****B****C****D**

Beispiele von einem Cushing-Adenom (TB-M076; Immunhistochemie: Hsp90 β) **(A)**, einem weiteren Cushing-Adenom (TB-M076; Immunhistochemie: FKBP51) **(B)**, einem ACC (TB-M196; Immunhistochemie: Hsp90 β) **(C)** und einem weiteren ACC (TB-M196; Immunhistochemie: FKBP51) **(D)** mit jeweils niedriger Expression **(A, B)** bzw. hoher Expression **(C, D)**. Bei den beiden Cushing-Adenomen und den beiden ACCs handelt es sich jeweils um die gleichen Gewebe.

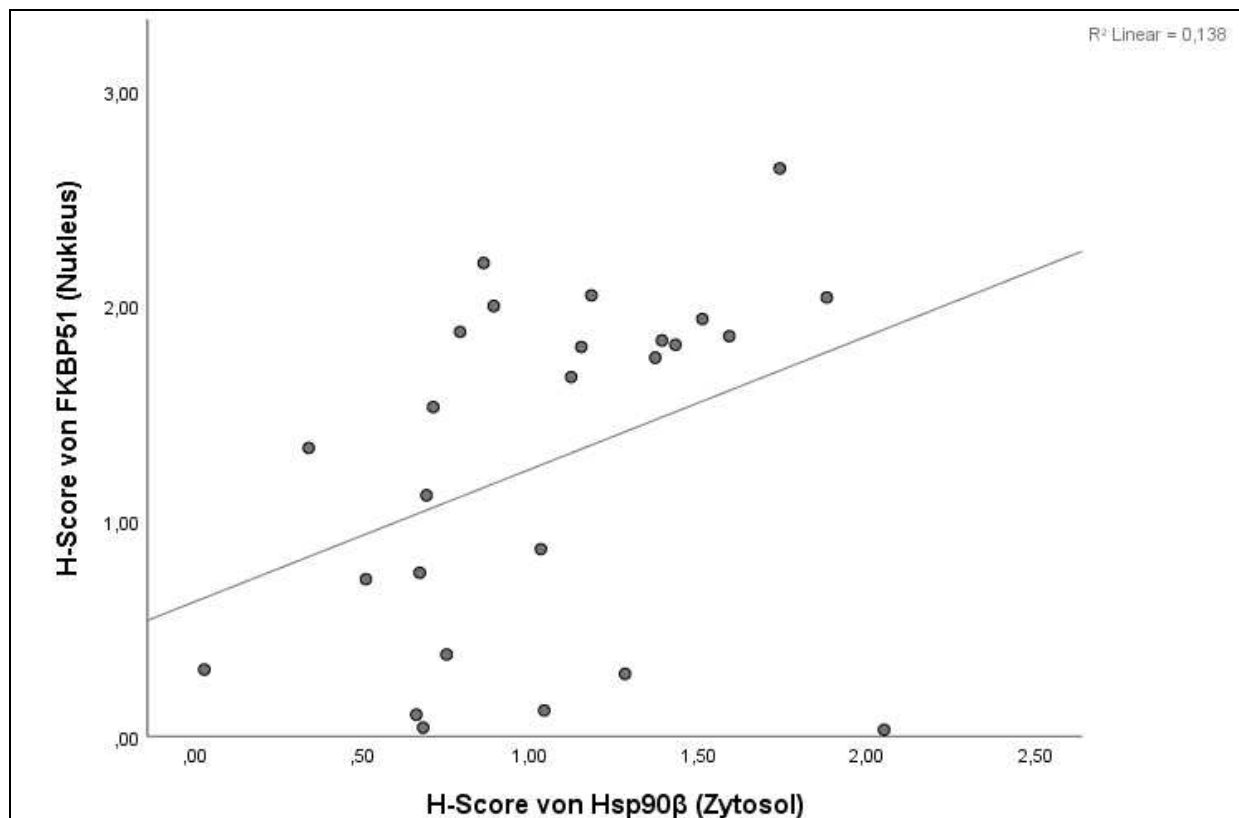
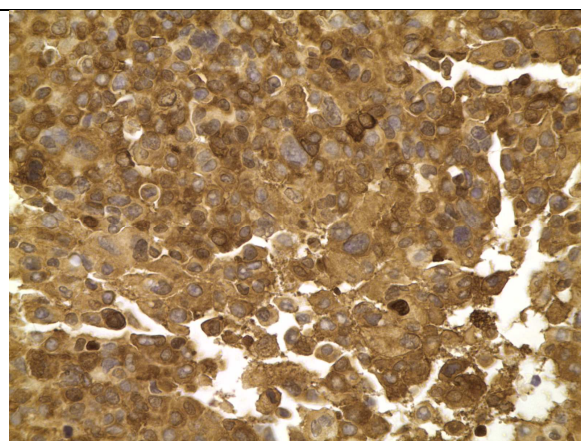
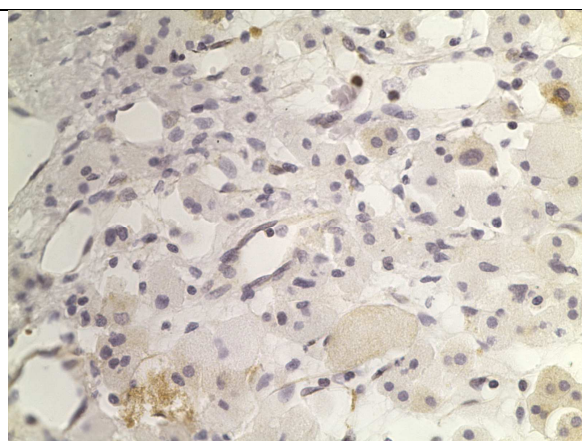
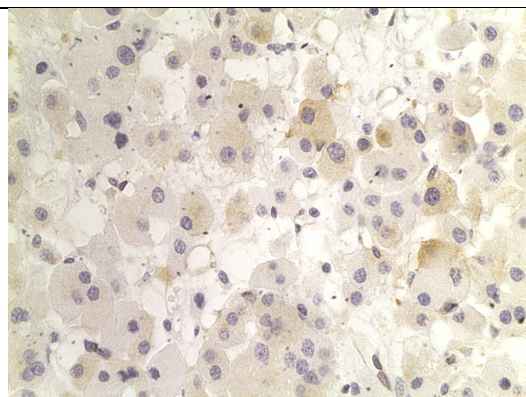
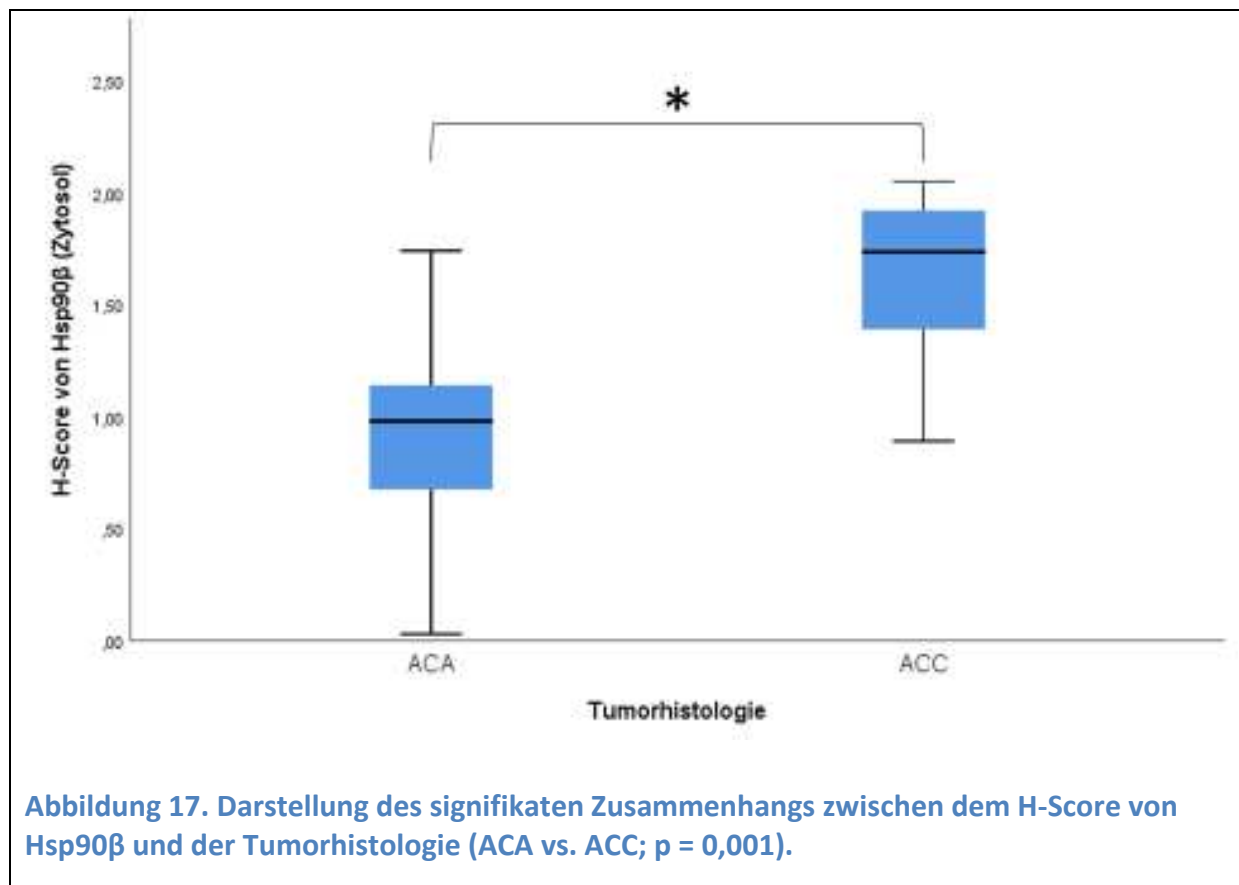
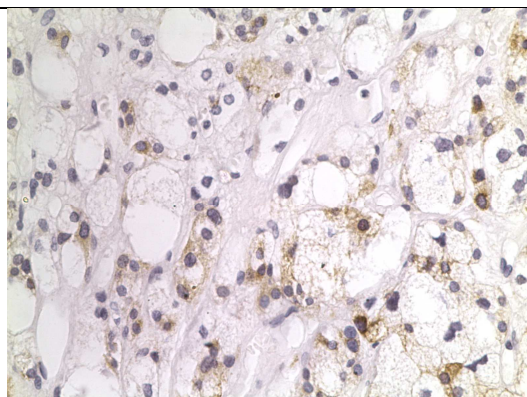
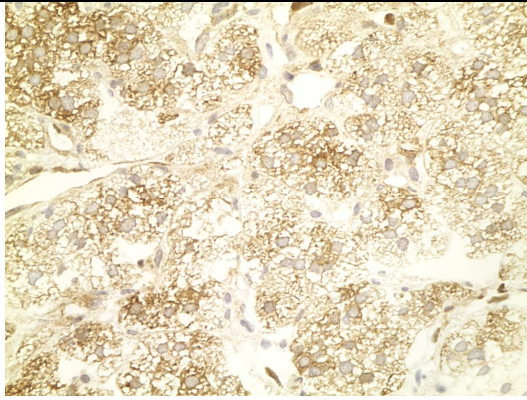


Abbildung 16. Darstellung der signifikanten Korrelation zwischen dem H-Score von Hsp90 β und dem H-Score von FKBP51 ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,450$).

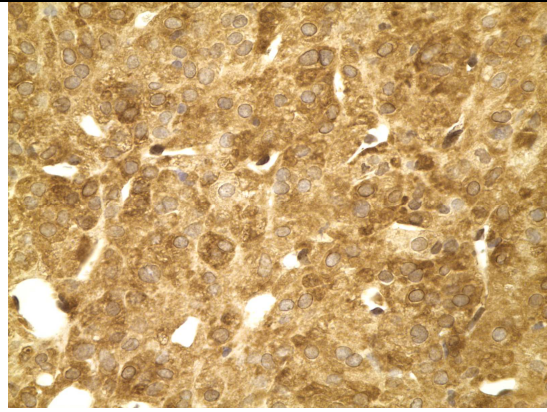


Beispiele von einem ACA (inaktives Nebennieren-Adenom) (links) und einem ACC (rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression von Hsp90 β .

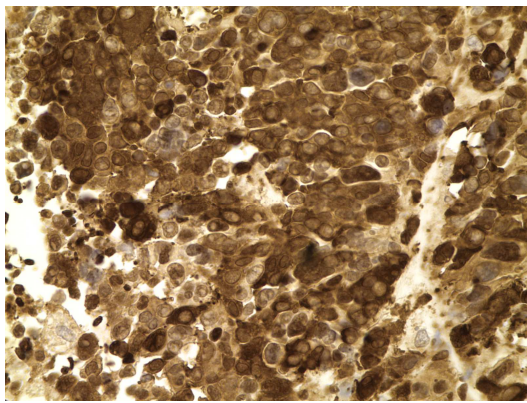
**A****B**



C

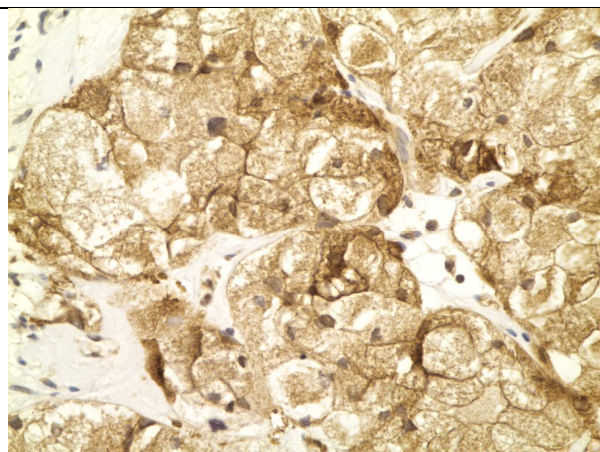
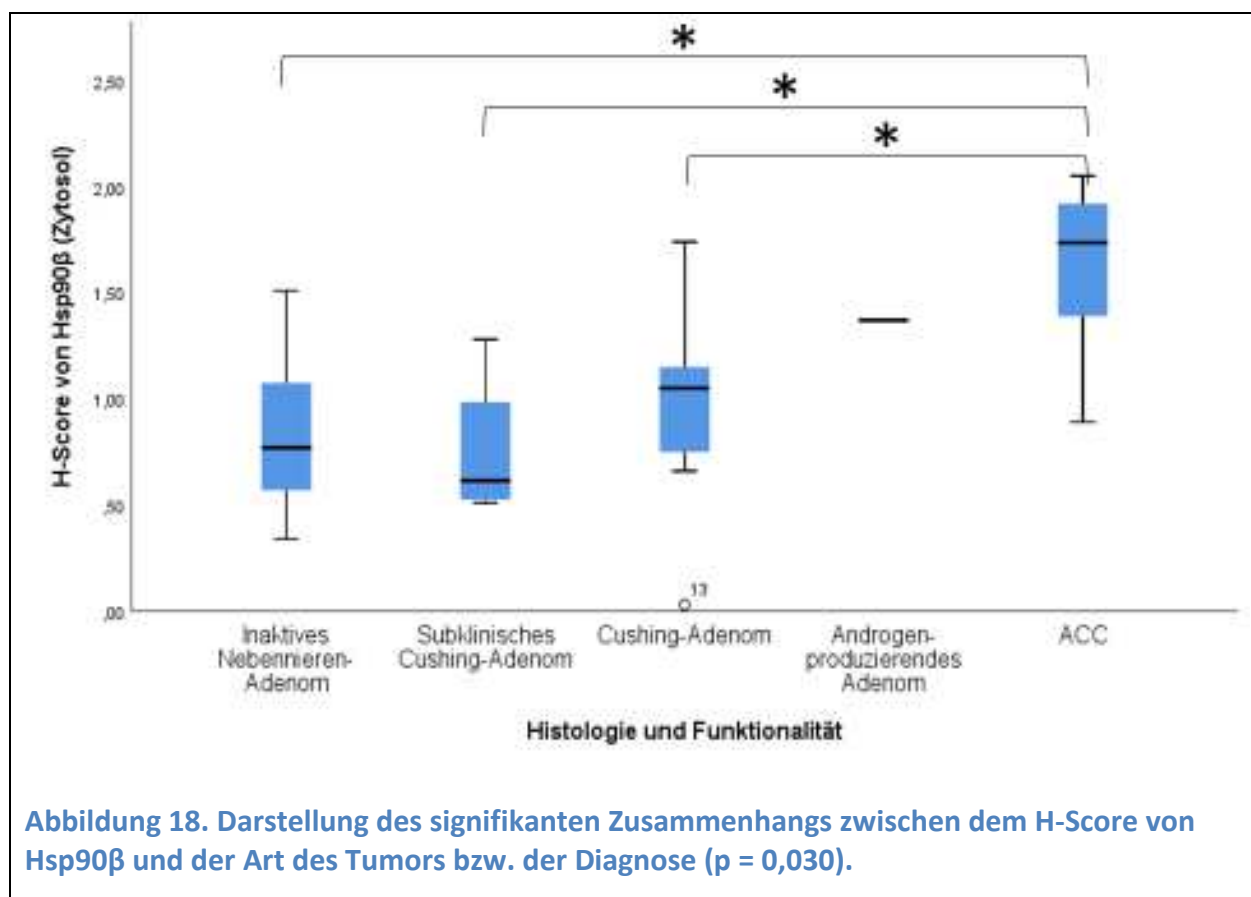


D

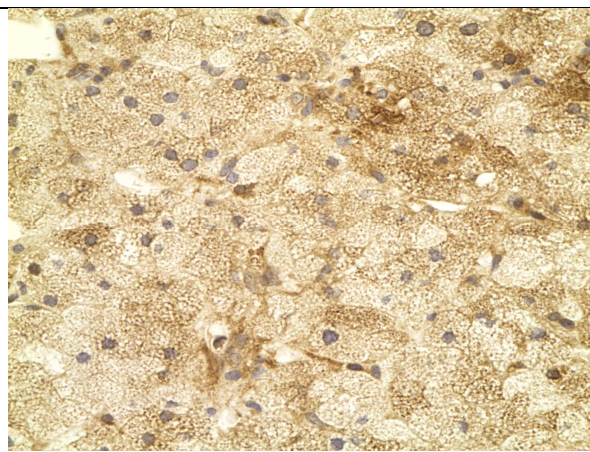


E

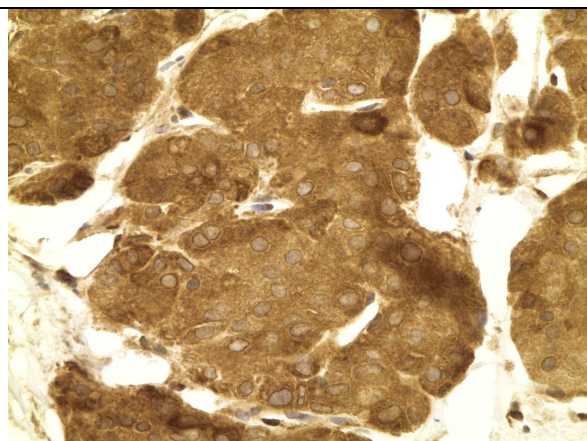
Beispiele von einem inaktiven Nebennierden-Adenom **(A)**, einem subklinischen Cushing-Adenom **(B)**, einem Cushing-Adenom **(C)**, einem Androgen-produzierenden Adenom **(D)** und einem ACC **(E)** mit niedriger **(A, B)**, intermediärer **(C)** und hoher **(D, E)** Expression von Hsp90β.



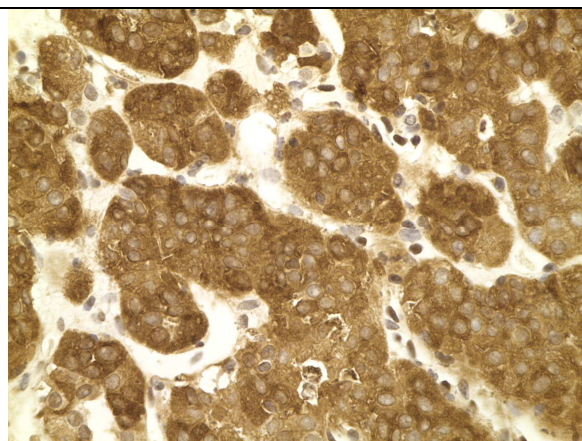
A



B



C



D

Beispiele von einem inaktiven Nebennieren-Adenom **(A)**, einem Cushing-Adenom **(B)**, einem Androgen-produzierenden Adenom mit Virilismus **(C)** und einem ACC mit Androgen- und Cortisol-Sekretion mit Cushing- und Virilismus-Symptomatik **(D)** mit verhältnismäßig niedriger **(A, B)** und hoher **(C, D)** Expression von Hsp90β.

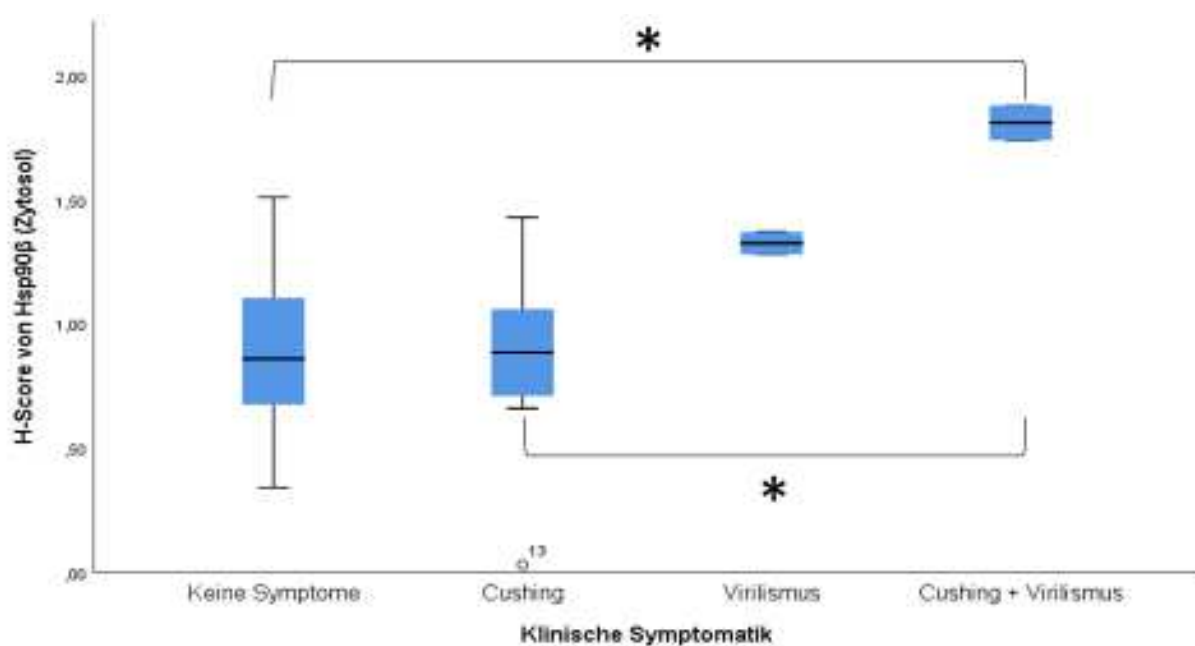
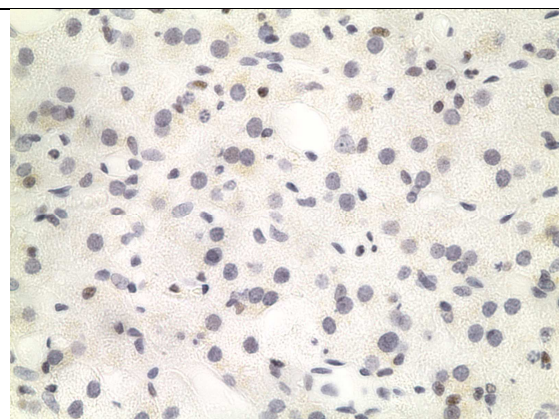
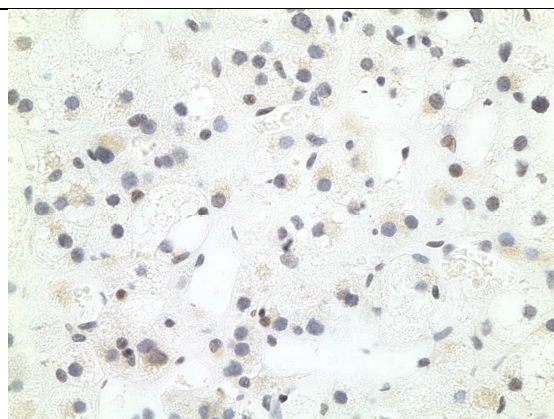
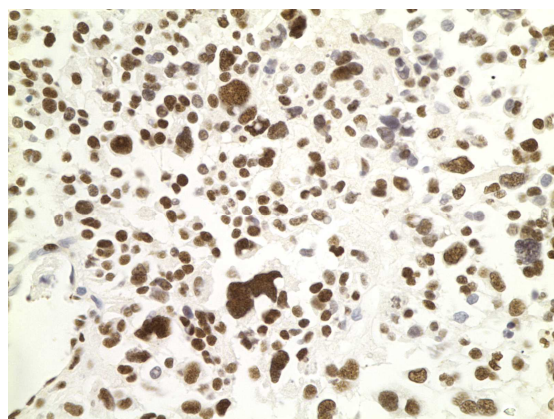
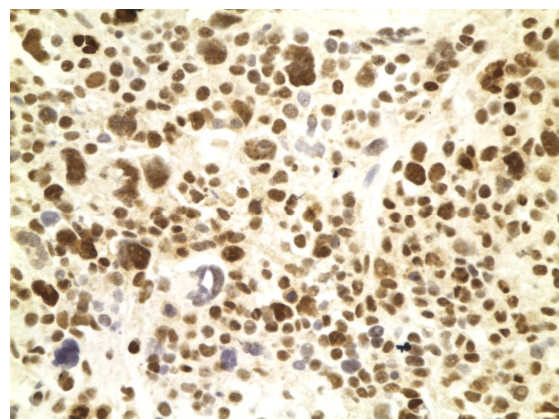


Abbildung 19. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90β und der klinischen Symptomatik ($p = 0,007$).

4.1.3 FKBP51

Abgesehen von der bereits unter 4.1.2 erwähnten positiven signifikanten Korrelation ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,450$) zwischen dem H-Score von FKBP51 ($n = 26$) und dem H-Score von Hsp90 β ($n = 33$) wurde zusätzlich eine solche ($p = 0,013$) zwischen dem H-Score von FKBP51 ($n = 26$) und dem H-Score des GR ($n = 26$) gefunden.

Auch in diesem Fall sahen wir eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,478$). Tendenziell war also die Expression von FKBP51 eher hoch, wenn auch der H-Score des GR einen größeren Wert ergab. Infolge der niedrigen Fallzahl bezüglich ACC ohne Rezidiv und ACC mit Rezidiv (jeweils $n = 2$) war eine vernünftige Berechnung eines p-Werts für diesen klinischen Parameter nicht möglich. Dennoch sah es eher so aus, als ob ein Rezidiv ggf. eher bei niedrigerer Expression von FKBP51 ($n = 2$, Mittelwert = 1,85, Standardabweichung = 0,01) auftreten würde als bei höherem ($n = 2$, Mittelwert = 2,02, Standardabweichung = 0,03) H-Score.

**A****B**

C**D**

Beispiele von einem subklinischen Cushing-Adenom mit niedriger Expression von FKBP51 **(A)** und GR **(B)** und von einem ACC mit hoher Expression von FKBP51 **(C)** und GR **(D)**. Es handelt sich jeweils um das gleiche subklinische Cushing-Adenom bzw. ACC.

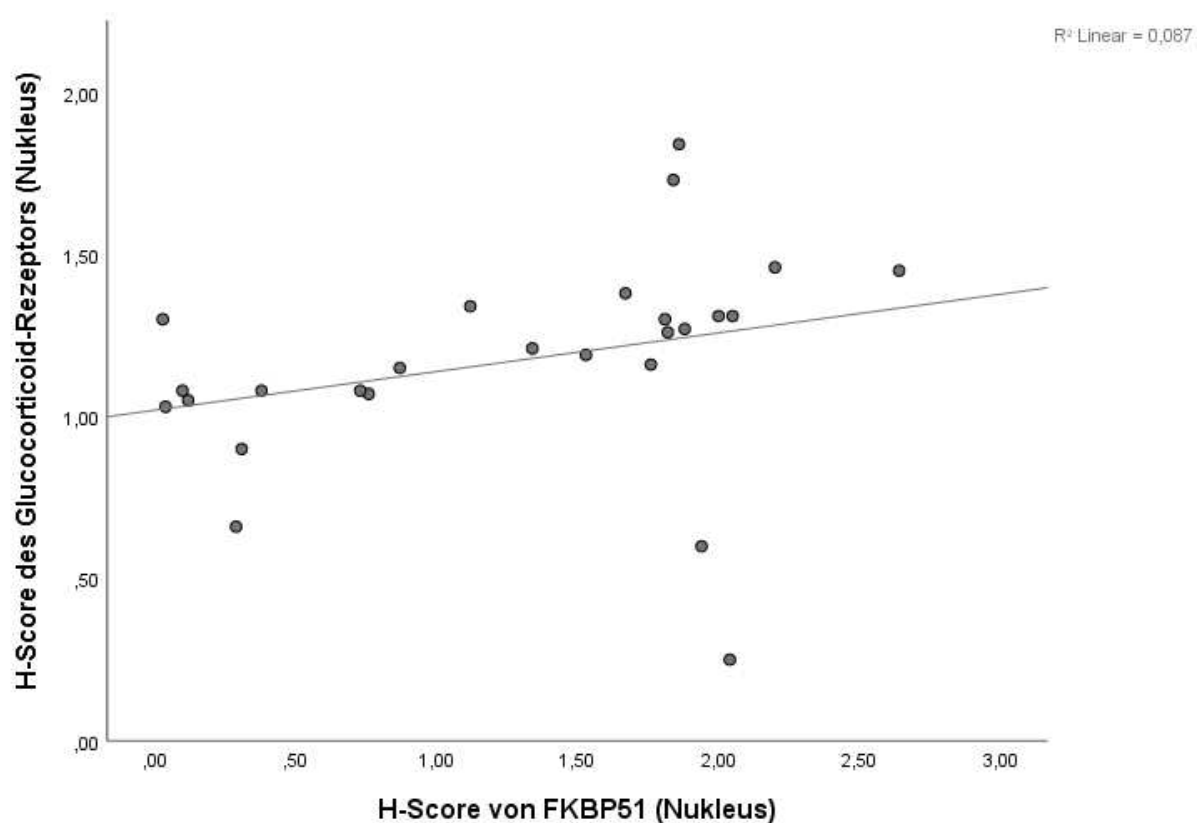
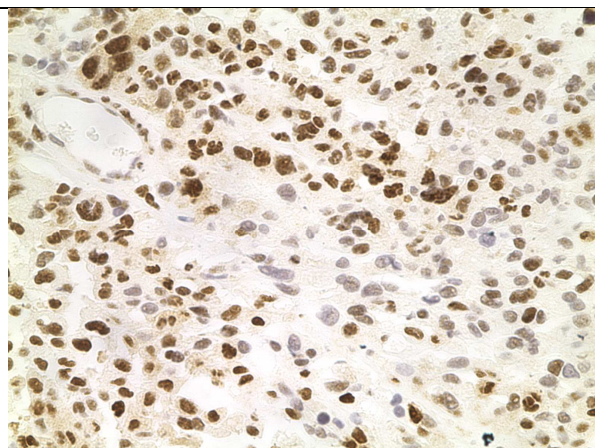
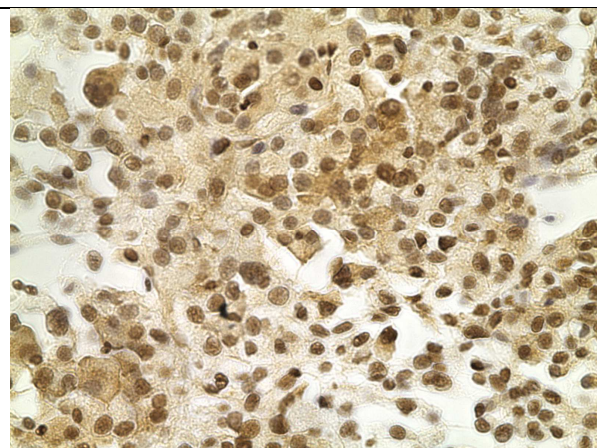


Abbildung 20. Darstellung der signifikanten Korrelation zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem H-Score von GR ($p = 0,013$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,478$).



Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines Rezidivs (links) und mit Auftreten eines Rezidivs

(rechts) mit hoher bzw. verhältnismäßig niedriger Expression von FKBP51.

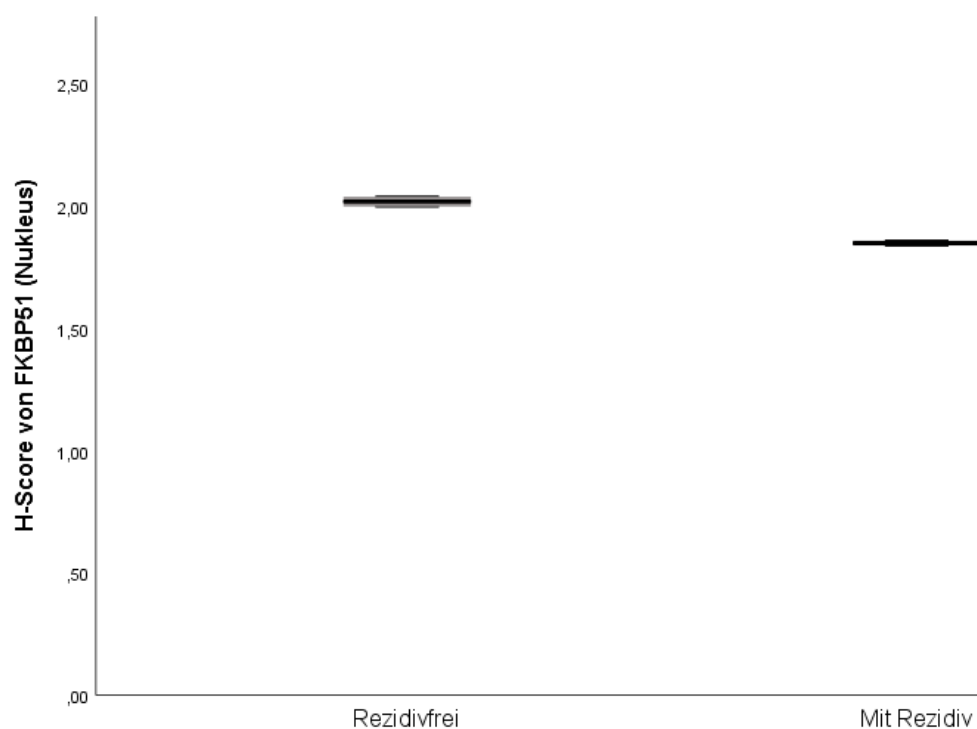
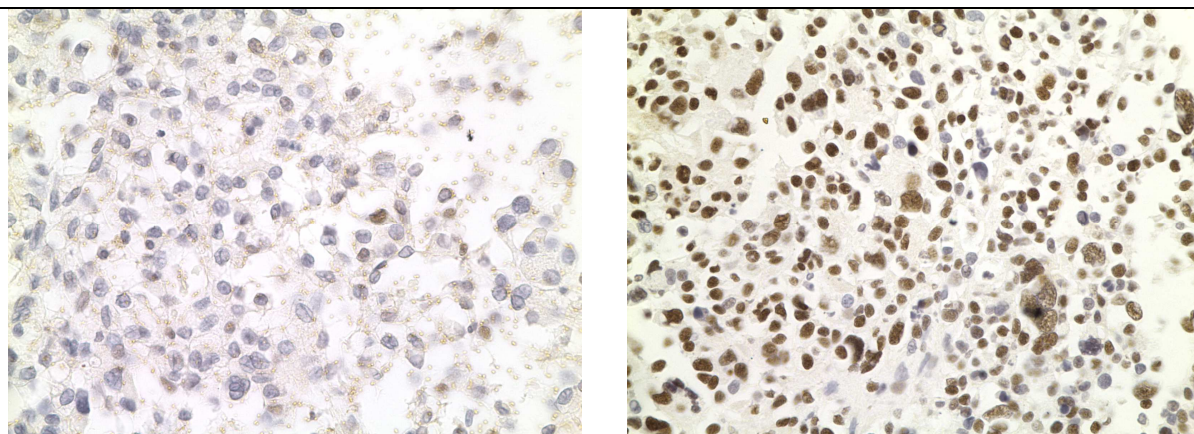


Abbildung 21. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).

4.1.4 GR

Es erwies sich nur die bereits unter 4.1.3 genannte positive Korrelation ($p = 0,013$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,478$) zwischen dem H-Score des GR ($n = 26$) und dem H-Score von FKBP51 ($n = 26$) als statistisch signifikant. Aufgrund zu geringer Fallzahlen war die Ermittlung einer Signifikanz für mögliche Zusammenhänge zwischen dem H-Score des GR und dem krankheitsbedingten Tod (ACC mit krankheitsbedingtem Tod $n = 2$, ACC ohne krankheitsbedingtem Tod $n = 3$), dem Auftreten eines Rezidivs (ACC ohne Rezidiv $n = 2$, ACC mit Rezidiv $n = 2$) und der Filialisierung (ACC ohne Metastasen $n = 2$, ACC mit Metastasen $n = 3$) nicht sinnvoll durchführbar. Ein krankheitsbedingter Tod schien bei höherer Expression des GR ($n = 2$, Mittelwert = 1,79, Standardabweichung = 0,08) öfter aufzutreten als bei niedriger Intensität in der Immunhistochemie ($n = 2$, Mittelwert = 0,78, Standardabweichung = 0,75).



Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (links) und mit Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression des GR.

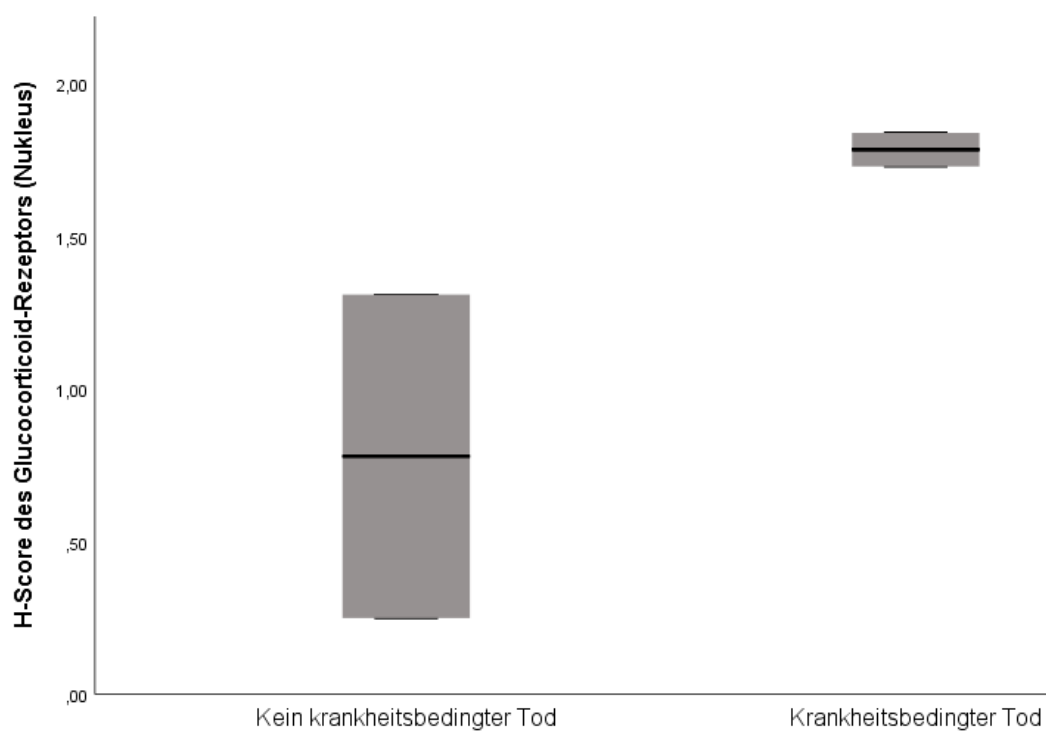


Abbildung 22. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von GR und dem Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (berücksichtigt wurden nur ACCs).

4.2 Ergebnisse der Analyse von Kohorte 2

Bei der Analyse konnten die in den unten stehenden Tabellen (Tabellen 16 und 17) aufgeführten p-Werte ermittelt werden. Signifikante Beziehungen ($p < 0,05$) wurden fett hervorgehoben. Die Tabellen mit den einzelnen Daten (z.B. Fallzahl, Mittelwert,

Standardabweichung) zum jeweiligen Parameter, die im Text bereits erwähnt werden, befinden sich als Zusatzmaterial im Anhang unter dem Punkt 8.1.2.

	Hsp90α (Intensität im Zytosol)	Hsp90β (Intensität im Zytosol)	FKBP51 (Intensität im Nukleus)	GR (Intensität im Nukleus)
Hsp90α (Intensität im Zytosol)	-	<0,001	0,021	0,658
Hsp90β (Intensität im Zytosol)	<0,001	-	0,078	0,002
FKBP51 (Intensität im Nukleus)	0,021	0,078	-	0,297
GR (Intensität im Nukleus)	0,658	0,002	0,297	-
Tabelle 16. Übersicht über die p-Werte der Korrelationen zwischen der Expression der Zielstrukturen untereinander bei der Kohorte 2.				

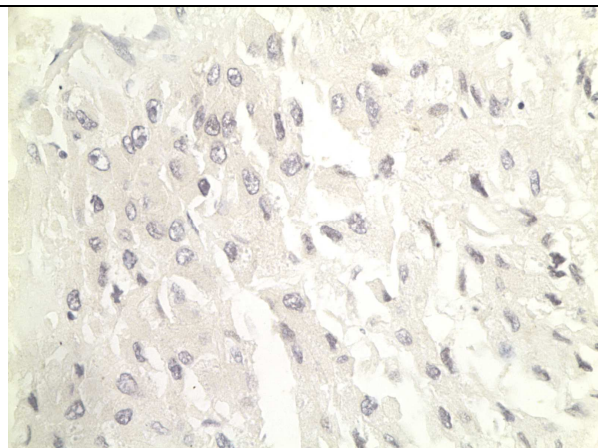
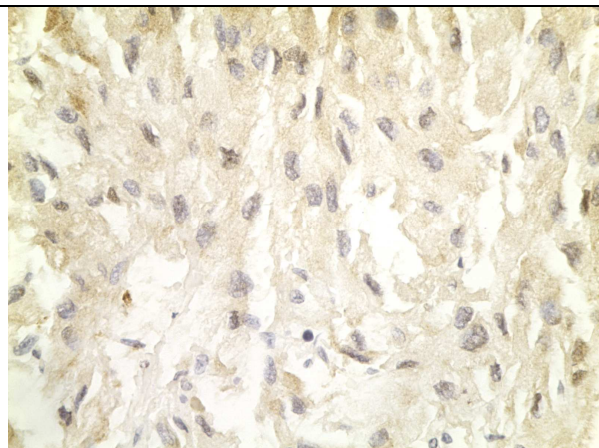
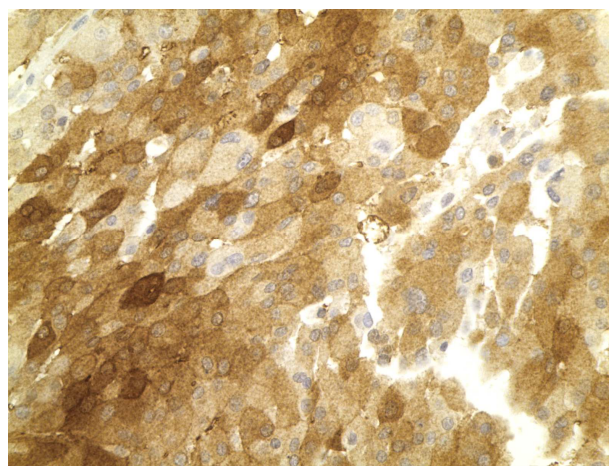
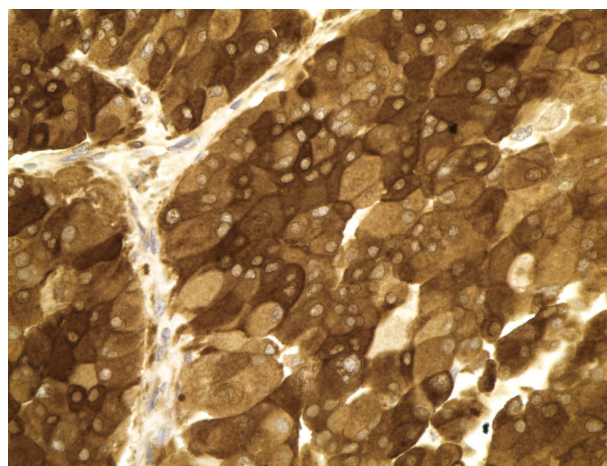
	Hsp90α (Intensität im Zytosol)	Hsp90β (Intensität im Zytosol)	FKBP51 (Intensität im Nukleus)	GR (Intensität im Nukleus)
Geschlecht	0,884	0,376	0,660	0,683
Krankheits- bedingter Tod	0,574	0,041	0,368	0,024
Metastasierung	0,589	0,078	0,377	0,414

Hormon- produktion	0,158	0,006	0,468	0,680
Cortisol- produktion	0,353	0,115	0,680	0,538
Androgen- produktion	0,665	0,030	0,095	0,917
Alter bei Diagnosestellung	0,212	0,523	0,628	0,090
Tumorgröße	0,081	0,675	0,239	0,112
Weiss-Score	0,654	0,753	0,610	0,211
Ki-67-Index	0,457	0,249	0,937	0,835
ENSAT-Staging	0,679	0,662	0,970	0,969
Tabelle 17. Übersicht über die p-Werte einiger Korrelationen bei der Kohorte 2.				

4.2.1 Hsp90α

Bei der Kohorte 2 fanden sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression von Hsp90α und Hsp90β ($p < 0,001$) sowie den H-Scores von Hsp90α und FKBP51 ($p = 0,021$).

Bei der Beziehung zwischen Hsp90α und Hsp90β handelte es sich um eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,383$). Somit war die Expression der einen Hsp90-Untereinheit umso größer je größer die der anderen Untereinheit war. Ebenso handelte es sich auch um einen positiven Zusammenhang (Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,259$) zwischen dem H-Score von Hsp90α und FKBP51. Je stärker die Expression von Hsp90α war, desto größer war auch die von FKBP51.

**A****B****C****D**

A: ACC (NLEI-4; Immunhistochmie: Hsp90 α). **B:** ACC (NLEI-4; Immunhistochemie: Hsp90 β). **C:** ACC (FR13B; Immunhistochemie: Hsp90 α). **D:** ACC (FR13B; Immunhistochemie: Hsp90 β).

Beispiele von ACCs mit niedriger Expression von Hsp90 α (**A**) und Hsp90 β (**B**) und hoher Expression von Hsp90 α (**C**) und Hsp90 β (**D**). Bei (**A**) und (**B**) sowie bei (**C**) und (**D**) handelte es sich jeweils um das gleiche ACC.

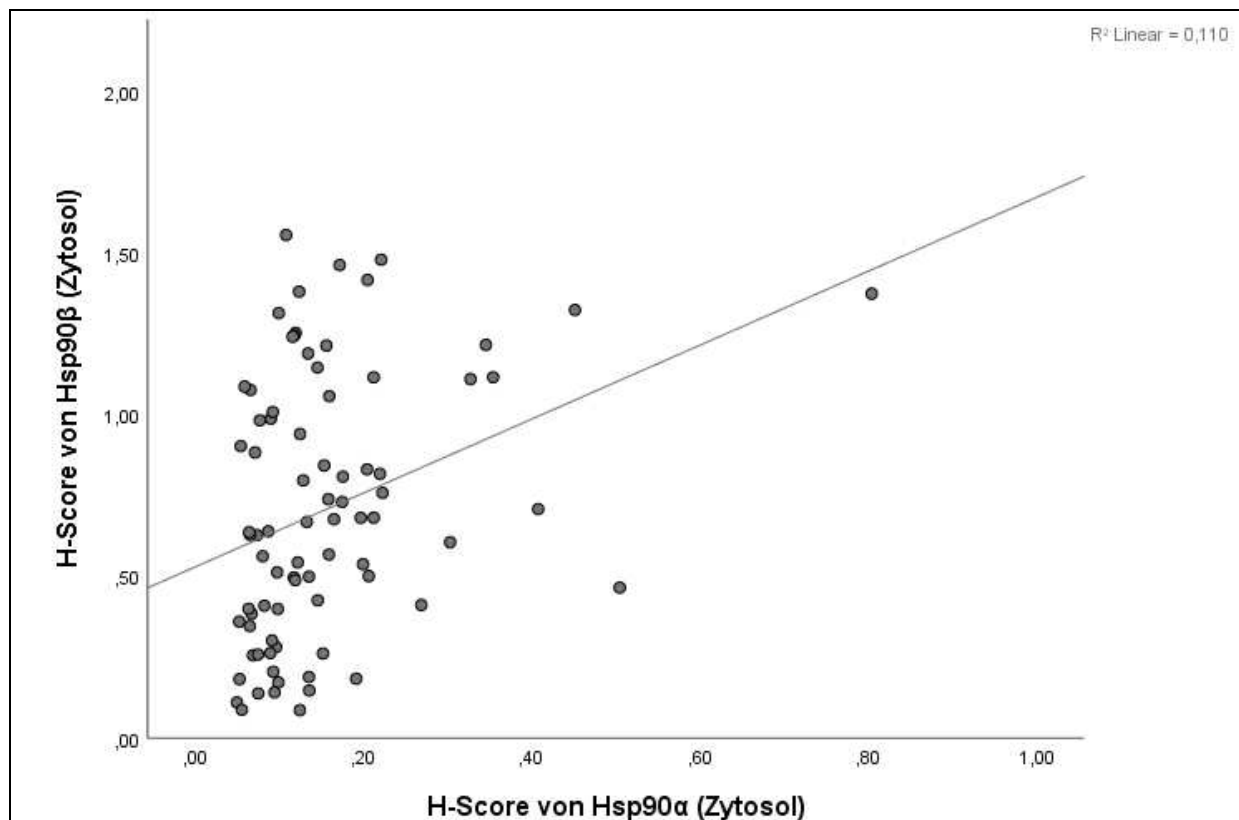
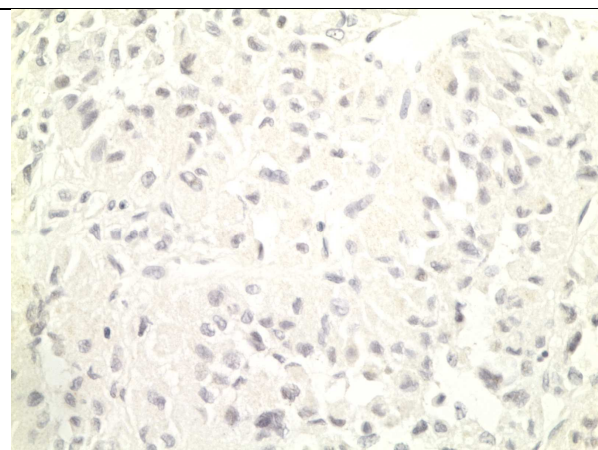
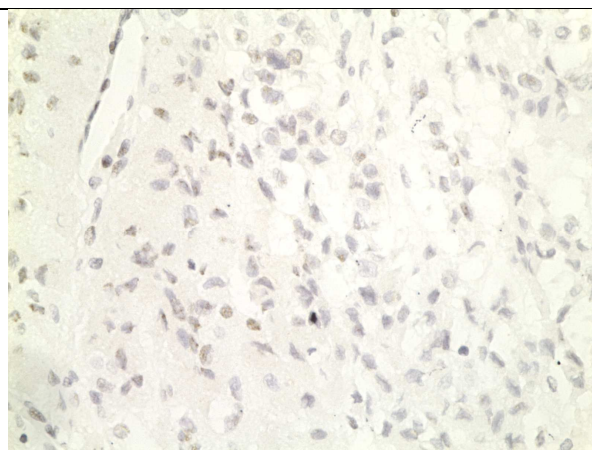


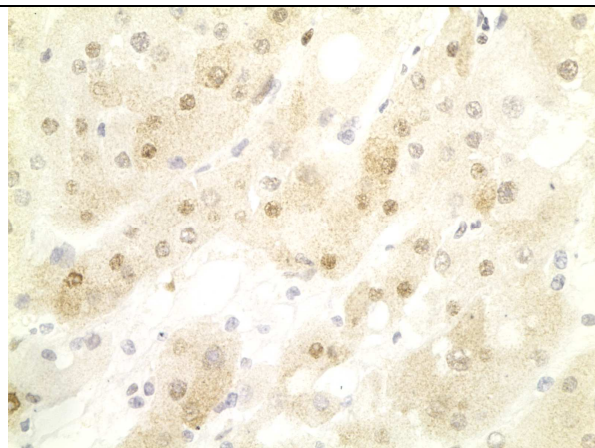
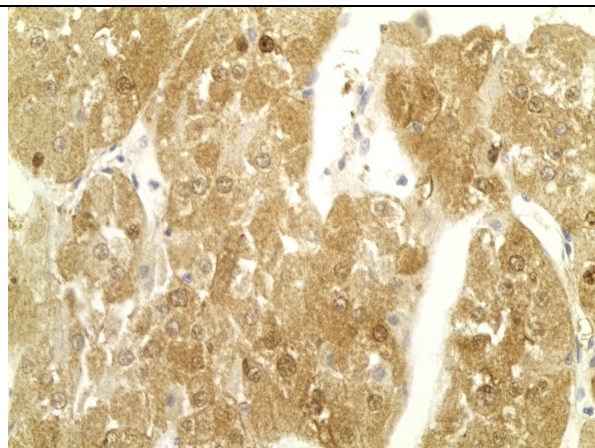
Abbildung 23. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90α und Hsp90β ($p < 0,001$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,383$).



A



B

**C****D**

A: ACC (NL-EI23; Immunhistochemie: Hsp90α). **B:** ACC (NL-EI23; Immunhistochemie: FKBP51).
C: ACC (FR18; Immunhistochemie: Hsp90α). **D:** ACC (FR18; Immunhistochemie: FKBP51).

Beispiele von ACCs mit niedriger Expression von Hsp90α (**A**) und FKBP51 (**B**) und hoher Expression von Hsp90α (**C**) und FKBP51 (**D**). Bei (**A**) und (**B**) sowie bei (**C**) und (**D**) handelte es sich jeweils um das gleiche ACC.

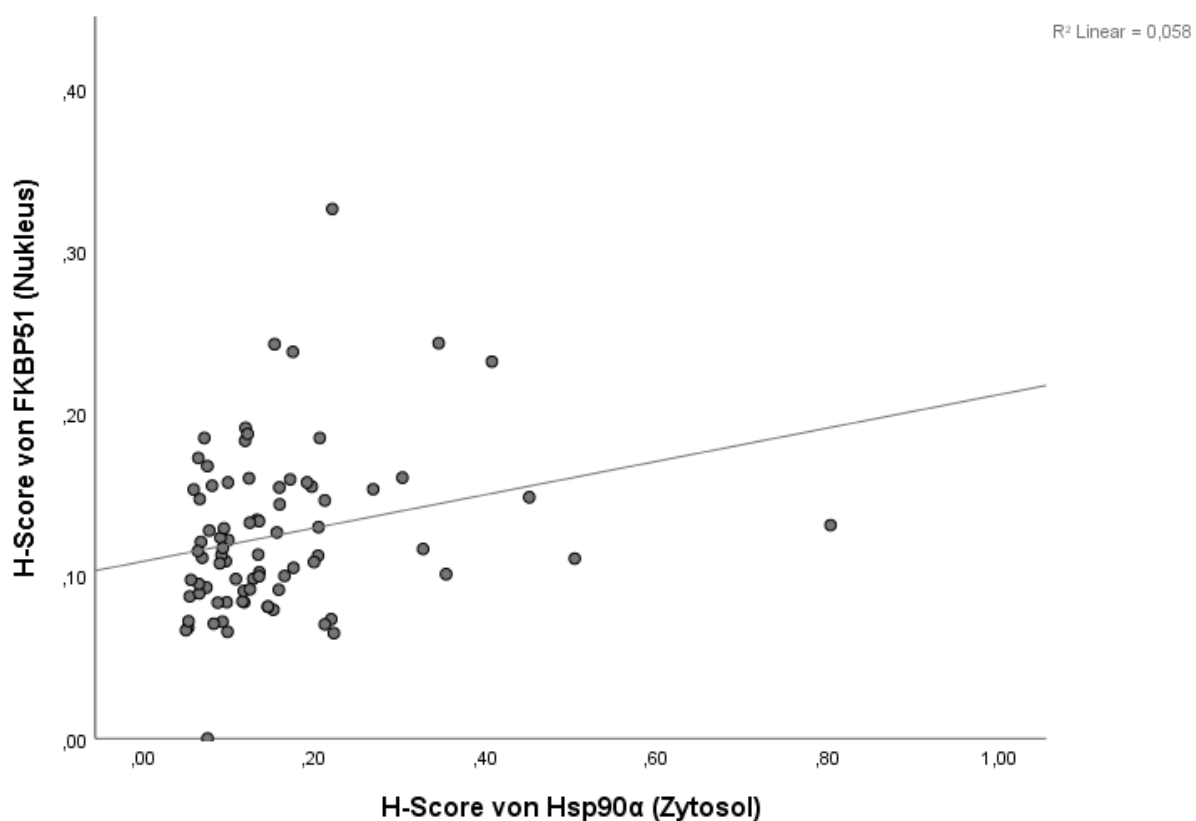


Abbildung 24. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von

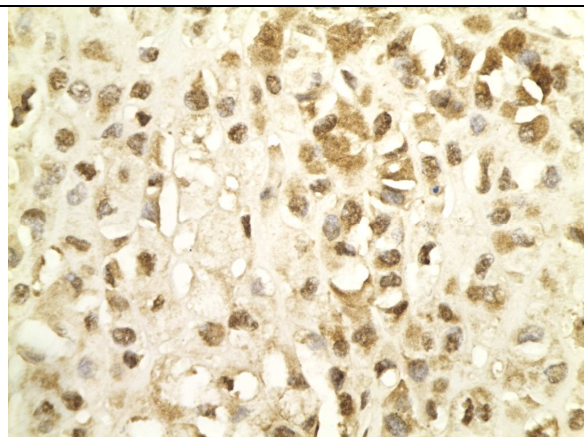
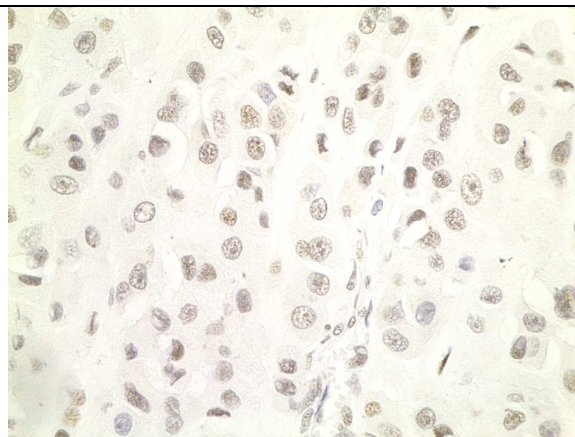
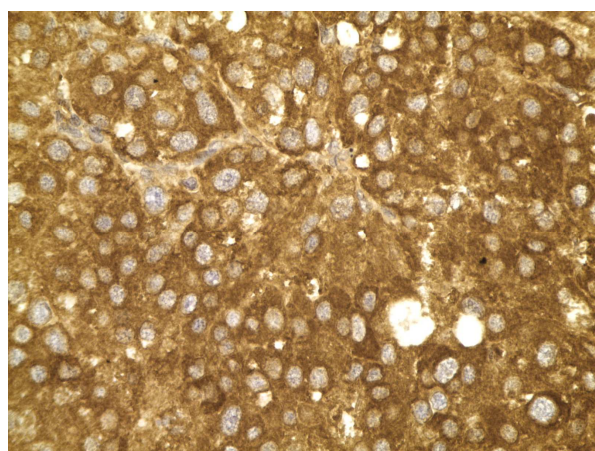
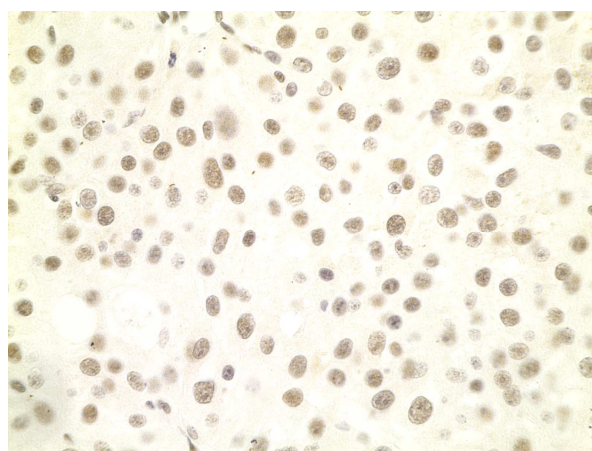
Hsp90α und FKBP51 ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,259$).

4.2.2 Hsp90β

Bei Hsp90β fanden wir neben der unter 4.2.1 bereits angesprochenen positiven signifikanten Korrelation zwischen dem H-Score von Hsp90α und Hsp90β ($p < 0,001$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,383$) außerdem signifikante Beziehungen zwischen der Expression von Hsp90β und des GR ($p = 0,002$) sowie dem krankheitsbedingten Tod ($p = 0,041$), der Hormonproduktion ($p = 0,006$) und der Androgenproduktion ($p = 0,030$).

Bei dem Zusammenhang zwischen Hsp90β und dem GR handelte es sich um eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,345$). Je höher also die Expression von Hsp90β war, desto höher war tendenziell auch diejenige des GR.

Die Analyse ergab, dass bei einem ACC mit hohem H-Score ($n = 37$, Mittelwert = 0,80, Standardabweichung = 0,41) von Hsp90β die Wahrscheinlichkeit für einen krankheitsbedingten Tod geringer war mit niedriger Expression ($n = 40$, Mittelwert = 0,62, Standardabweichung = 0,39). Darüber hinaus sahen wir, dass bei kleinem H-Score ($n = 45$, Mittelwert = 0,60, Standardabweichung = 0,36) häufiger eine Hormonaktivität des Tumors vorlag als bei höherer Signalintensität ($n = 33$, Signalintensität = 0,86, Standardabweichung = 0,42) in der Immunhistochemie. Eine vergleichbare Verteilung zeigte sich auch speziell bezüglich der Androgenproduktion der Tumore. ACCs mit verhältnismäßig starker Expression von Hsp90β ($n = 55$, Mittelwert = 0,77, Standardabweichung = 0,44) produzierten seltener Androgene als ACCs, welche über weniger Hsp90β verfügten ($n = 23$, Mittelwert = 0,55, Standardabweichung = 0,36).

**A****B****C****D**

A: ACC (NLEI-9; Immunhistochemie: Hsp90 β). **B:** ACC (NLEI-9; Immunhistochemie: GR). **C:** ACC (NLEI-1; Immunhistochemie: Hsp90 β). **D:** ACC (NLEI-1; Immunhistochemie: GR).

Beispiele von ACCs mit niedriger Expression von Hsp90 β (**A**) und GR (**B**) und hoher Expression von Hsp90 β (**C**) und GR (**D**). Bei (**A**) und (**B**) sowie bei (**C**) und (**D**) handelte es sich jeweils um das gleiche ACC.

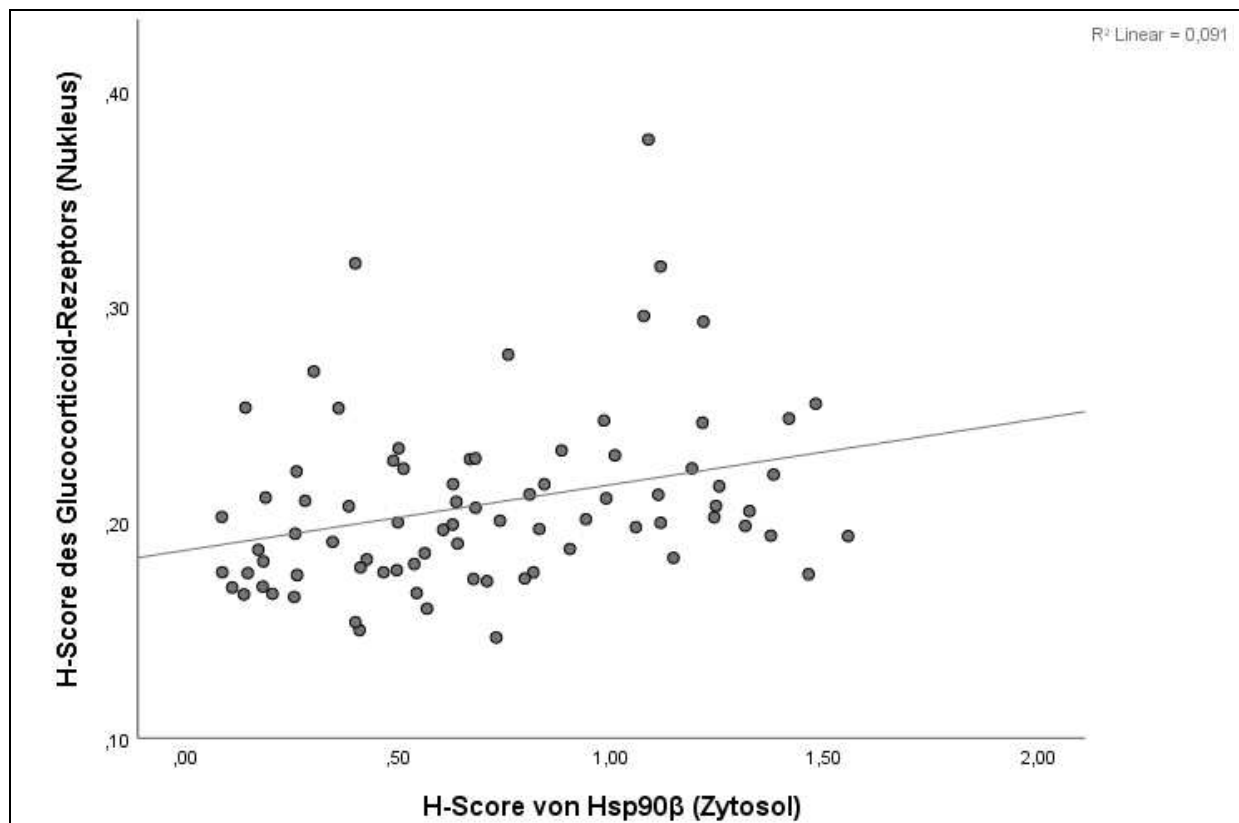
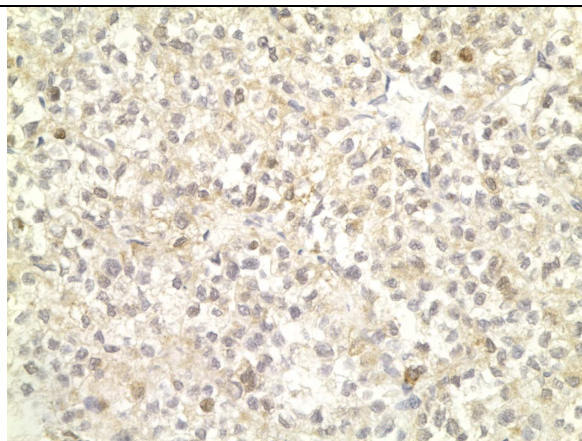
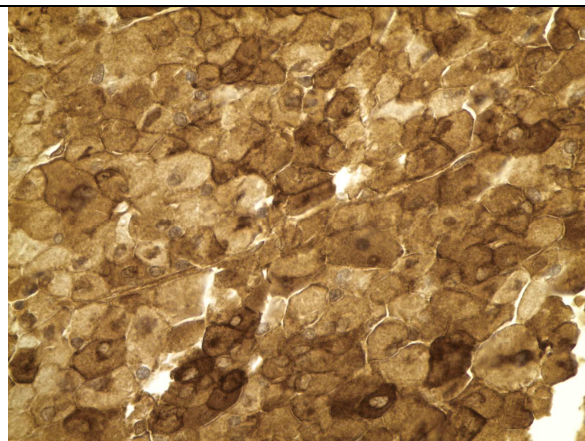
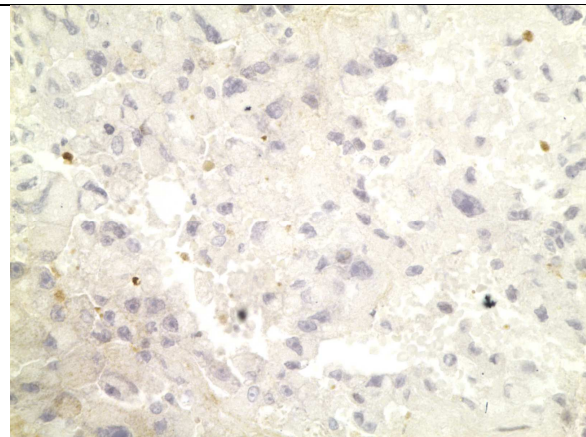
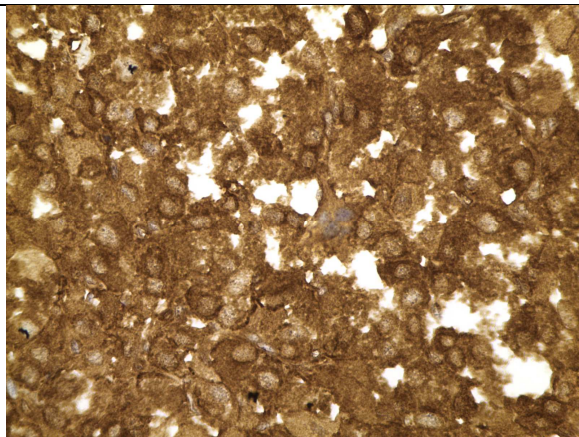
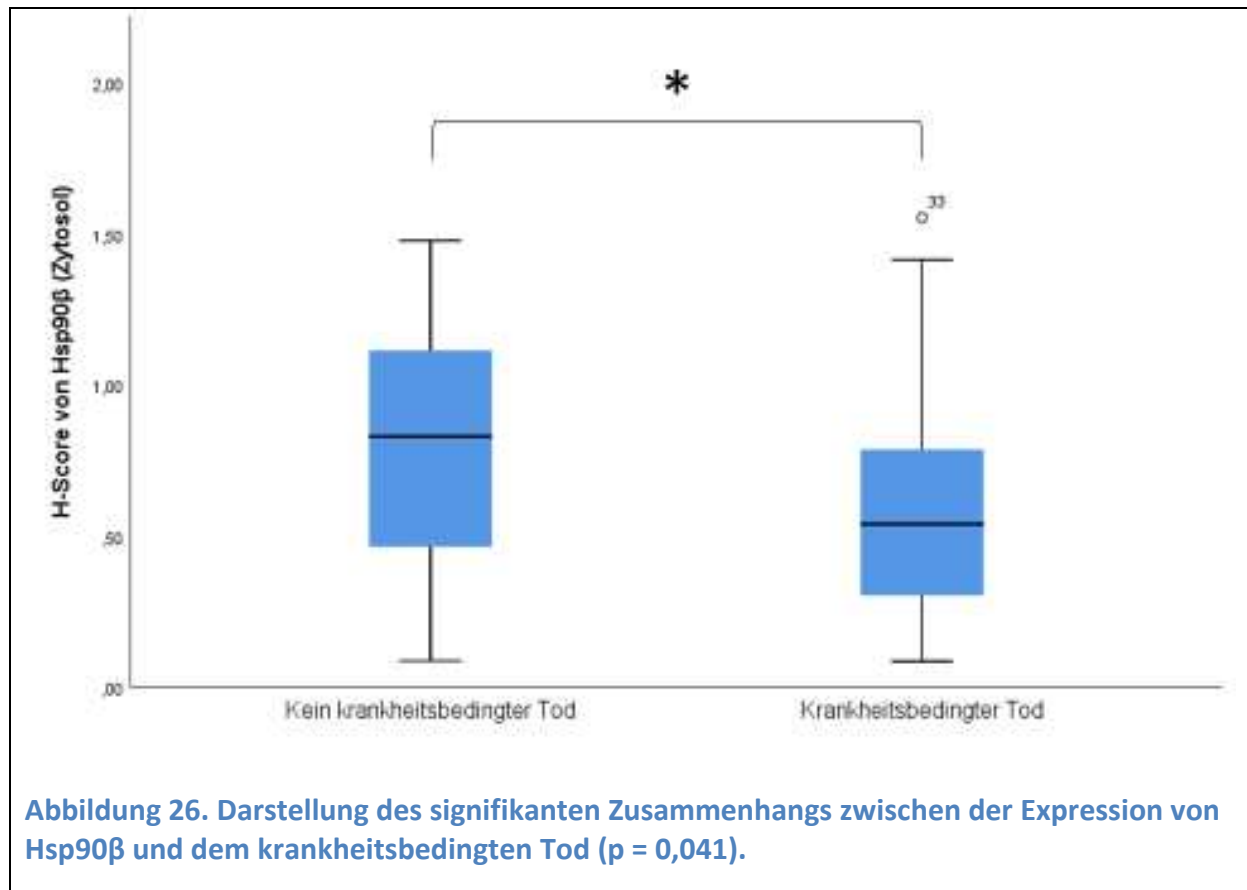


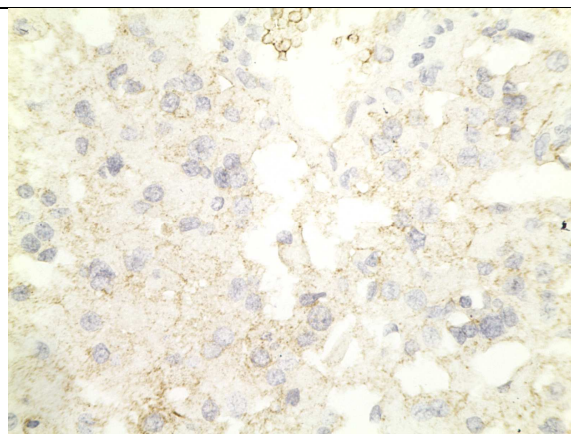
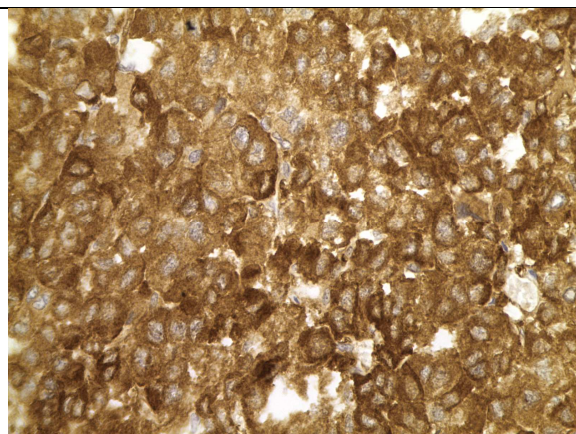
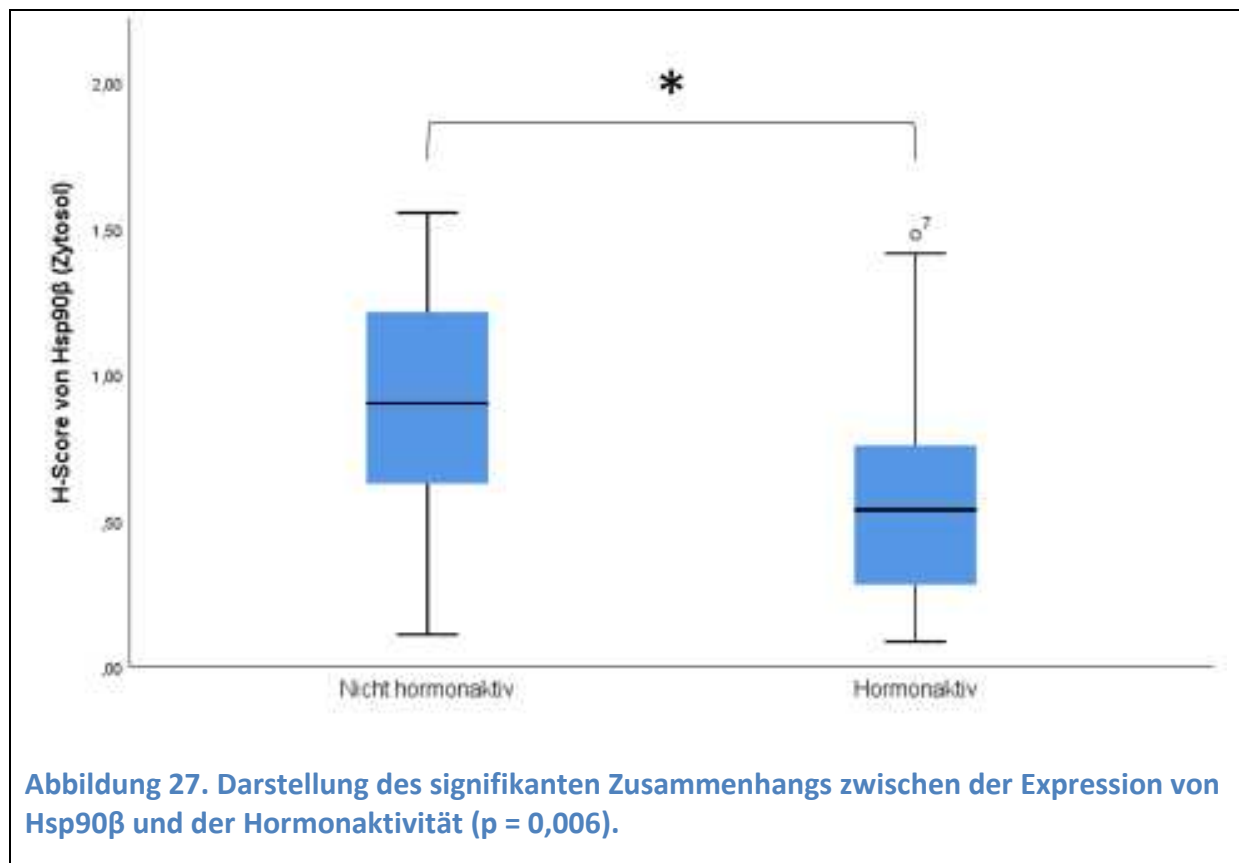
Abbildung 25. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β und dem GR ($p = 0,002$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,345$).



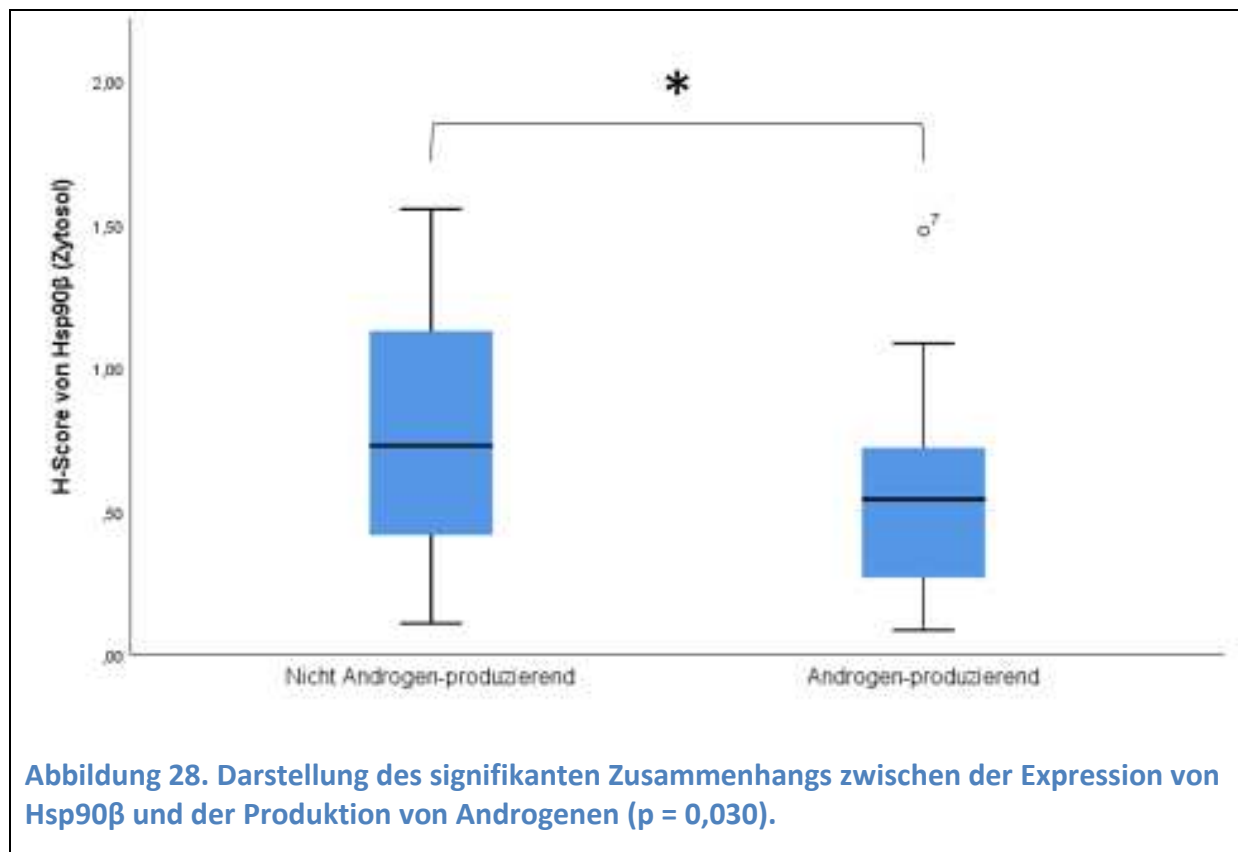
Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (links) und mit Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (rechts) mit hoher bzw. niedriger Expression von Hsp90 β .



Beispiele von ACCs ohne Hormonaktivität (links) und mit Hormonaktivität (rechts) mit hoher bzw. niedriger Expression von Hsp90β.



Beispiele von ACCs ohne Produktion von Androgenen (links) und mit Produktion von Androgenen (rechts) mit hoher bzw. niedriger Expression von Hsp90β.



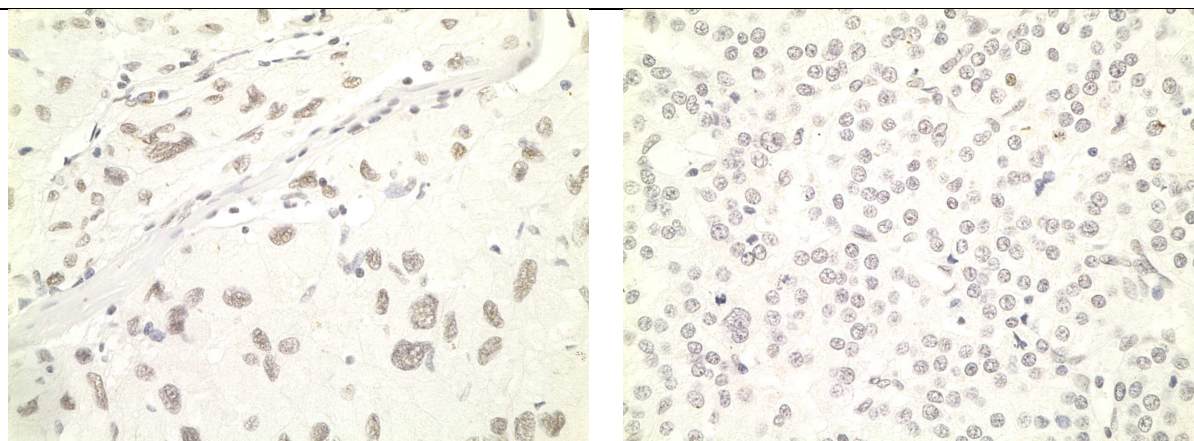
4.2.3 FKBP51

Neben der unter 4.2.1 genannten positiven signifikanten Korrelation zwischen der Expression von FKBP51 und Hsp90α ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,259$) fanden sich hier keine weiteren p-Werte unter 0,05 bei den Untersuchungen für die Expression von FKBP51 in ACCs bei der Kohorte 2.

4.2.4 GR

Bei der Analyse des H-Scores von GR fand sich die schon unter 4.2.2 beschriebene positive signifikante Korrelation zwischen der immunhistochemischen Signalintensität des GR und von Hsp90β ($p = 0,002$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,345$). Darüber hinaus erkannten wir eine signifikante Beziehung zwischen der Expression des GR und dem krankheitsbedingten Tod ($p = 0,024$). Weitere signifikante Zusammenhänge konnten nicht gefunden werden.

Die Berechnungen ergaben, dass ein krankheitsbedingter Tod bei ACCs mit verhältnismäßig hoher Expression des GR ($n = 37$, Mittelwert = 0,21, Standardabweichung = 0,03) eher seltener auftritt als bei niedrigem H-Score ($n = 40$, Mittelwert = 0,20, Standardabweichung = 0,04).



Beispiele von ACCs ohne Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (links) und mit Auftreten eines krankheitsbedingten Tods (rechts) mit intermediärer bzw. niedriger Expression des GR.

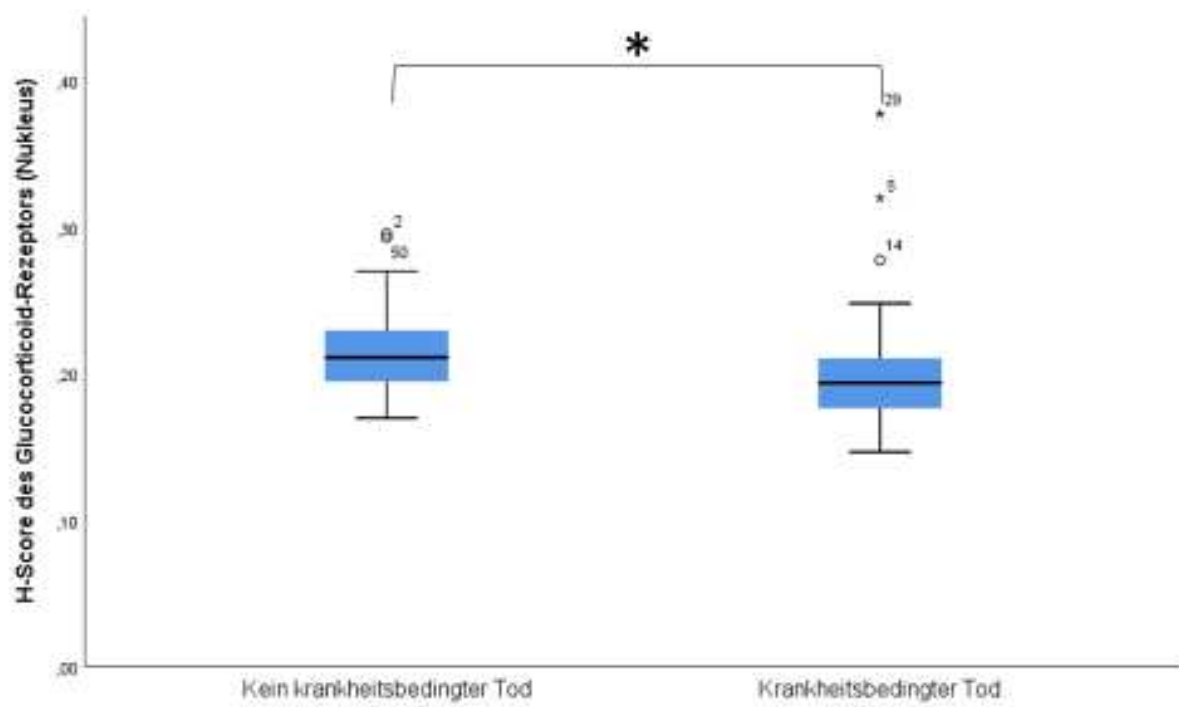


Abbildung 29. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression des GR und dem krankheitsbedingten Tod ($p = 0,024$).

4.2.5 Gesamtüberlebensraten

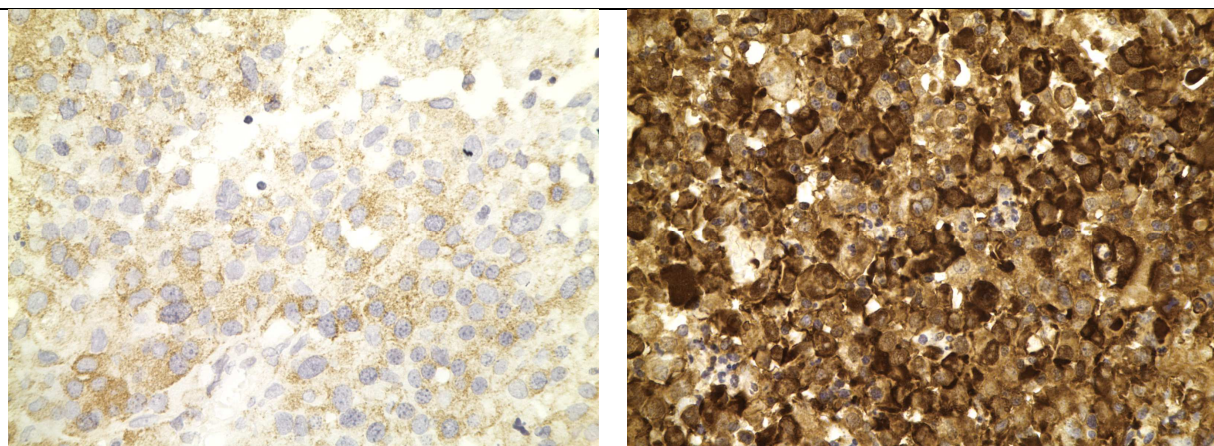
Weil bei der Kohorte 2 ausschließlich ACCs, also maligne Tumorerkrankungen, untersucht wurden, sind hier die Gesamtüberlebensraten von besonderem Interesse. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden. Signifikante Beziehungen ($p < 0,05$) wurden fett hervorgehoben (Tabelle 18).

Univariate Analyse	Hsp90α (Intensität im Zytosol)	Hsp90β (Intensität im Zytosol)	FKBP51 (Intensität im Nukleus)	GR (Intensität im Nukleus)
Gesamtüberleben	0,353	0,014	0,088	0,008
Tabelle 18. Übersicht über die p-Werte beim Vergleich der H-Scores mit dem Gesamtüberleben bei der Kohorte 2.				

Die univariate Analyse zeigte, dass signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression sowohl von Hsp90β ($p = 0,014$; Abbildung 30) als auch des GR ($p = 0,008$; Abbildung 31) und dem Gesamtüberleben bestehen. Demgegenüber konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Hsp90α und der Gesamtüberlebensrate sowie der Expression von FKBP51 und dem Gesamtüberleben gefunden werden.

Bei höherer Expression von Hsp90β ($n = 32$, H-Score $\geq 0,77$, Zensuren = 22, mittleres Überleben = 174,19 Monate, Standardabweichung = 34,41) fand sich eine verhältnismäßig längere durchschnittliche Überlebenszeit im Vergleich zu einem niedrigeren Vorkommen ($n = 48$, H-Score $< 0,77$, Zensuren = 18, mittleres Überleben = 91,82 Monate, Standardabweichung = 18,94).

Auch bei einem eher hohen H-Score des GR ($n = 63$, H-Score $\geq 0,18$, Zensuren = 34, mittleres Überleben = 136,11 Monate, Standardabweichung = 21,45) war die Gesamtüberlebenszeit länger als bei vergleichsweise niedriger Expression des GR ($n = 17$, H-Score $< 0,18$, Zensuren = 6, mittleres Überleben = 38,53 Monate, Standardabweichung = 8,77).



Beispiele von ACCs mit kurzem Überleben (1 Monat, links) und langem Überleben (107 Monate, rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression von Hsp90 β .

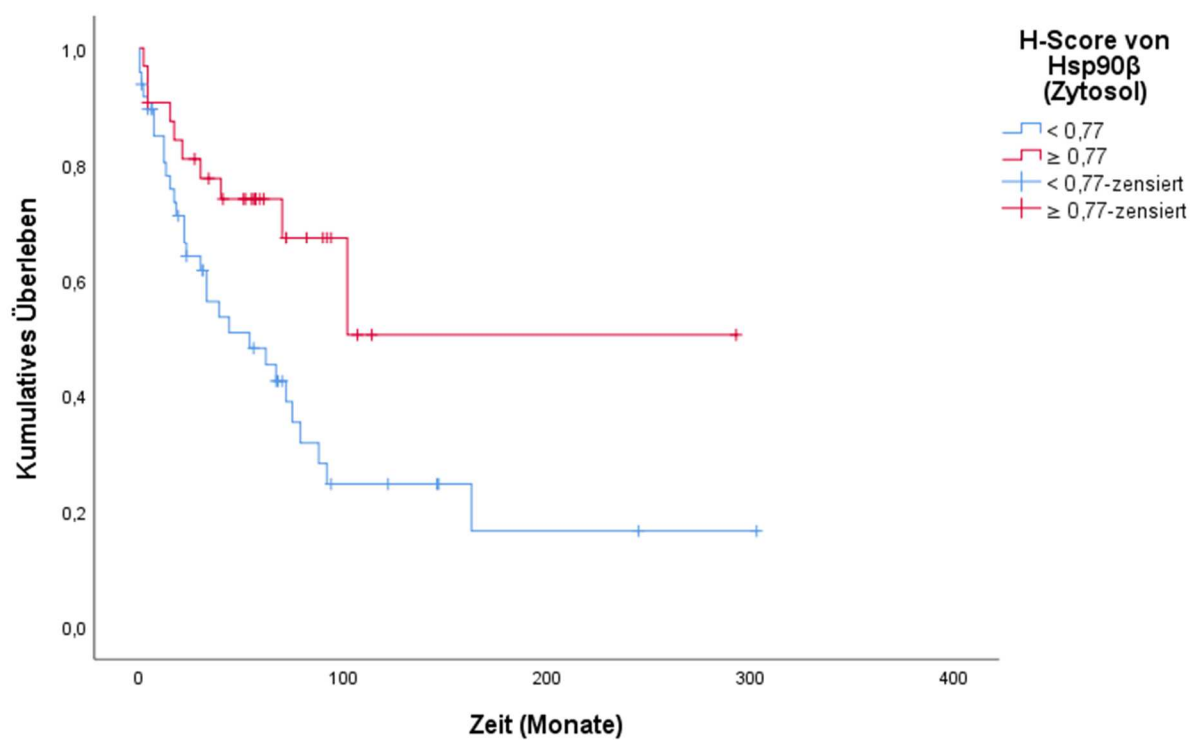
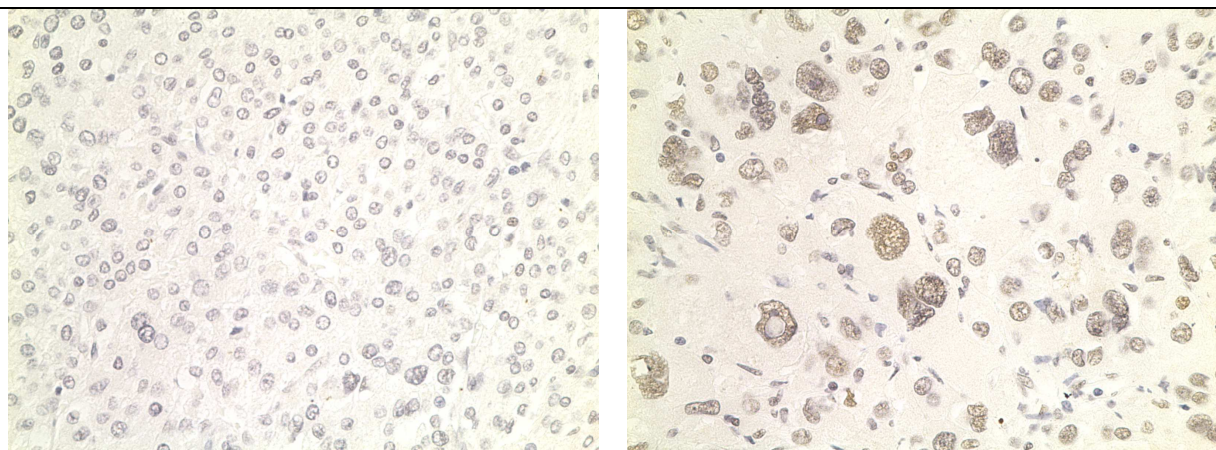


Abbildung 30. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β (Zytosol) und der Gesamtüberlebensrate unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven ($p = 0,014$).



Beispiele von ACCs mit kurzem Überleben (12 Monate, links) und langem Überleben (147 Monate, rechts) mit niedriger bzw. hoher Expression des GR.

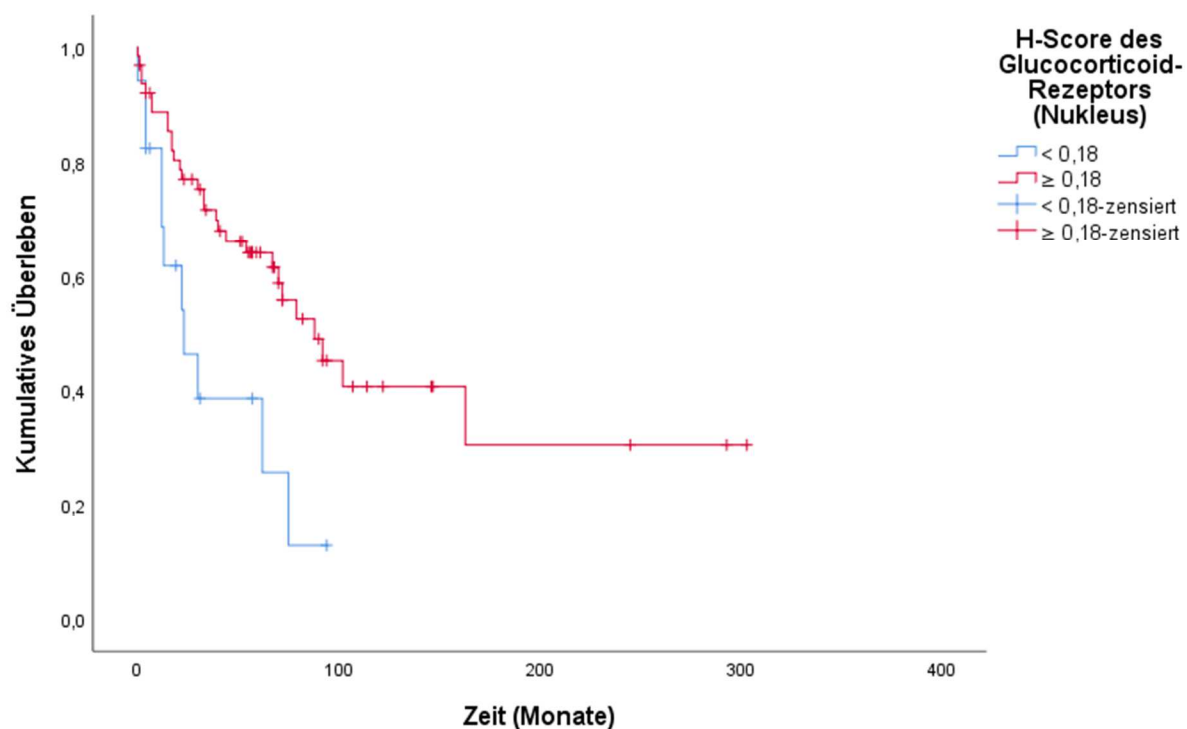


Abbildung 31. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von GR (Nukleus) und der Gesamtüberlebensrate unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven ($p = 0,008$).

5 Diskussion

5.1 Vorteile des Vorgehens bei Kohorte 1

Zunächst wurde von uns die Kohorte 1 analysiert. Hierbei handelte es sich um eine Gruppe aus 33 Tumoren, nämlich 18 Cortisol produzierende Adenome (14 mit Cushing-Syndrom und 4 mit subklinischem Cushing-Syndrom), 1 Androgen produzierendes Adenom, 8 Inzidentalome und 6 ACCs. Die Gewebeproben bildeten nach Möglichkeit den gesamten Tumor ab. Pro Gewebe wurden 2 Proben immunhistochemisch behandelt.

Vorteilhaft bei diesem Vorgehen war zunächst einmal die Trennung der verschiedenen Gewebe auf unterschiedliche Objektträger. Sollten Fehler bei der Durchführung der Immunhistochemie auftreten, so wäre nur ein Gewebe betroffen und einzelne fehlerhafte Färbungen könnten wiederholt werden. Bei der Verwendung von TMAs sähe es anders aus. Ein Fehler bei der Laborarbeit beträfe alle Gewebe, sodass ein Fehler wesentlich schwieriger erkannt würde und das vollständige Probenmaterial dabei verloren ginge.

Ein weiterer Gesichtspunkt besteht darin, dass durch das eigenständige (ohne Verwendung eines Gerätes) Auszählen der Zellen anhand der Fotos, die mit dem Mikroskop erstellt wurden, sowie deren Zuordnung in die entsprechenden Kategorien keine Artefakte mitgezählt wurden. Leider ist damit zu rechnen, dass bei der Durchführung der Immunhistochemie auch Fremdpartikel auf den Objektträgern landen, die trotz der in dem Protokoll enthaltenen Waschvorgänge haften bleiben, etwa Ablösungen von den mit Bleistift beschrifteten Objektträgern durch die Lösung aus Methanol und Wasserstoffperoxid zur Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität. Auch Mikroreste von Papiertüchern, die zum Abtrocknen der Objektträger verwendet wurden, verbleiben öfters auf dem Gewebe. Solche Artefakte sind in der Regel sehr dunkel und würden einem Scanner ein sehr intensives Signal vortäuschen, selbst wenn das Signal bei der zugrunde liegenden Probe negativ wäre. Außerdem könnten für das Projekt irrelevante Zellen (z.B. Fibroblasten, Immunzellen) angefärbt werden. Hierdurch wäre es möglich, dass die Ergebnisse relevant beeinflusst würden, da ein Scanner aktuell nicht in der Lage ist, den Schmutz bzw. die im Projekt nicht interessierenden Zelltypen vom tatsächlich stark positiven Signal relevanter Zellen (in

unserem Fall Tumorzellen) zu unterscheiden. Ein Mensch ist jedoch dazu fähig, Artefakte als solche zu erkennen und nicht mitzuzählen. Insofern können bei dieser Methode solche Fehlerquellen vermieden werden.

Ferner wurde bei dem Procedere für die Kohorte 1 ein möglichst vollständiges Gewebe im Labor bearbeitet und anschließend ausgewertet. Es ist bekannt, dass Tumorgewebe sehr heterogen sein können. Dies ist in vielfacher Hinsicht denkbar (z.B. bezüglich der Zellgröße, der Zelldifferenzierung und der mitotischen Aktivität bzw. des Ki-67-Proliferationsindex) und eben auch im Hinblick auf die Expression bestimmter molekularer Zielstrukturen. Infolgedessen können manche Areale bei der Untersuchung auf ein bestimmtes Zielmolekül vollkommen negativ sein und zugleich andere Bereiche eine hohe Signalintensität aufweisen. Bei der Verwendung von TMAs können die Ergebnisse dadurch relevant verfälscht werden und möglicherweise das Gegenteil der Realität abgebildet werden bzw. dieses Gegenteil nach Berechnung der p-Werte als statistisch signifikant angegeben werden. Dies ist bei diesem Vorgehen sehr unwahrscheinlich, da wir im Regelfall viel größere Gewebeausschnitte vorliegen hatten und bei der Auswahl der Fotos auf die Repräsentativität großen Wert legten.

5.2 Vorteile des Vorgehens bei Kohorte 2

Im Laufe des Projekts entschieden wir uns trotz der unter 5.1 erörterten Vorteile für ein anderes Procedere bei der Analyse der Gewebeproben von Kohorte 2. Diese bestand aus 80 ACCs, wobei pro ACC 3 Gewebeproben zur Verfügung standen. Die Gewebeproben aller ACCs sowie die Negativkontrollen befanden sich auf insgesamt 2 TMAs. Somit verwendeten wir insgesamt 8 TMAs, 2 pro Antikörper. Pro ACC und Antikörper wurden also 3 Proben der Immunhistochemie zugeführt.

Da es sehr aufwändig war, bei Kohorte 1 so viele Objektträger immunhistochemisch zu färben und die Fallzahl auch nach langem Arbeiten relativ niedrig war, wählten wir eine neue Vorgehensweise, um den Vorgang zu beschleunigen und insbesondere eine deutlich höhere Anzahl an Proben für unser Projekt analysieren zu können.

Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass man auch bei TMAs versucht, die Heterogenität des Gewebes möglichst gut abzubilden. Einerseits werden die kleinen Ausschnitte der zugrunde liegenden Proben von erfahrenen Pathologen ausgewählt, die hierbei vor allem auf die Repräsentanz achten. Andererseits waren bei den TMAs, die wir für unser Projekt einsetzen konnten, pro Gewebe eines Patienten drei dazu gehörige Ausschnitte enthalten. Dadurch wurde gewährleistet, dass – sofern erforderlich – möglicherweise sehr unterschiedliche Stellen eines Gewebes ausgewählt werden konnten. So kann man sagen, dass es auch bei TMAs umsetzbar ist, die Heterogenität eines Gewebes recht gut abzubilden trotz den im Endeffekt sehr kleinen Probeausschnitten. Deswegen darf man davon ausgehen, dass auch die Ergebnisse von Kohorte 2 die Realität zuverlässig abbilden.

Zudem ist die Auswertung mit einem Scanner viel standardisierter und somit Untersucher-unabhängiger als das selbstständige Zählen der Zellen und insbesondere das eigenständige Zuordnen zu den verschiedenen Signalintensitätsstufen. Wird die Analyse von einem Menschen durchgeführt, ist oftmals kein Verlass darauf, dass verschiedene Untersucher die gleichen Zellen auch in die gleichen Kategorien einordnen würden. Bei der Verwendung eines Gerätes kann man in aller Regel ohne Sorge darauf vertrauen, dass die Auswertung des vorliegenden Materials mit einem Höchstmaß an Standardisierung vorgenommen wird. Untersucher-abhängige Variabilitäten sind dadurch ausgeschlossen.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist der deutlich höhere Probendurchsatz, der durch einen TMA ermöglicht wird. Dies gilt einerseits in Bezug auf das immunhistochemische Anfärben der Objektträger als auch im Hinblick auf die Auswertung mit dem Scanner. Während wir viele Durchgänge benötigten, um die 33 Gewebe (pro Antikörper 33 Objektträger zu bearbeiten bei 2 Proben pro Objektträger ohne Negativkontrollen) von Kohorte 1 zu bearbeiten, waren wesentlich weniger Durchgänge für die 80 Gewebe der TMAs aus der Kohorte 2 (pro Antikörper 2 Objektträger zu bearbeiten bei 80 Proben pro Objektträger mit jeweils 15 Negativkontrollen auf 1 Objektträger) erforderlich. Zusätzlich lagen bei den TMAs pro Gewebe jeweils drei Proben vor, wohingegen wir bei den 33 Geweben lediglich zwei Gewebeschnitte pro Patient und Objektträger mit Hilfe der Antikörper immunhistochemisch analysierten. Zudem enthielten die TMAs bereits auch Negativkontrollen (wobei wir auch eigene Negativkontrollen und zusätzlich Positivkontrollen

verwendeten). Bei der Kohorte 1 war es hingegen erforderlich, dass weitere Objektträger mit behandelt werden mussten, die die Negativ- und Positivkontrollen enthielten. Außerdem kommt hinzu, dass die Auswertung mit einem Scanner wesentlich schneller möglich ist als das Erstellen der (pro Gewebe 30) Fotos mit dem Mikroskop und anschließende Auswählen der 10 repräsentativsten Fotos inklusive dem Zählen der Zellen und deren Zuordnung zu den unterschiedlichen Signalstufen.

Darüber hinaus besteht ein wesentlicher Vorteil der bei dem Vorgehen für die Kohorte 2 in der damit verbundenen höheren Fallzahl, die analysiert wurde. Die Laborarbeit für die 33 Gewebe war sehr aufwändig und letztlich ist die Anzahl doch relativ gering, umso mehr, da ja unter den 33 Geweben mehrere verschiedene Arten von Tumoren enthalten waren (z.B. nur 6 ACCs). Außer Frage steht jedenfalls, dass die bei der Kohorte 2 untersuchten 80 ACCs eindeutig eine bessere Aussagekraft haben. Auf den TMAs kamen jedoch keine anderen Tumortypen als ACCs vor, sodass beispielsweise bezüglich Cushing-Adenome anhand der TMAs keinerlei Aussagen getroffen werden konnten. Bei einem Projekt ist es einfach essentiell, dass die Fallzahl hoch genug ist, sodass die Ergebnisse gut verwertbar sind. Dieses Ziel wurde bei dem bei Kohorte 2 gewählten Vorgehen unter Verwendung der TMAs also unumstritten besser erreicht als bei dem Procedere für die Kohorte 1.

5.3 Beurteilung der Ergebnisse zur Hsp90 α -Expression

Es war eine sehr interessante Frage, inwiefern Hsp90 bzw. seine Isoformen Hsp90 α und Hsp90 β im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen stehen würden. Einerseits ist aus der Literatur bekannt, dass Hsp90 mit für die Bewältigung ungünstiger Lebensverhältnisse exogener oder endogener Genese verantwortlich ist. Hierfür gibt es viele Beispiele, u.a.:

- extreme Abweichungen vom Temperaturoptimum nach oben,
- relevante Verschiebungen des pH-Werts,
- die Anwesenheit hochreaktiver Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Superoxid-Anionen-Radikale (O₂^{·-}) sowie das Hydroxylradikal OH,
- Malnutrition und

- entzündliche inklusive infektiöse Prozesse [189].

Außerdem sorgt Hsp90 für eine Verbesserung der körpereigenen Abwehrkräfte durch Stimulierung einiger Zellen des spezifischen Immunsystems [189] [190] [191]. Zellen zu stabilisieren und die Immunantwort zu stärken sind Aspekte, die eher nahe legen, dass Hsp90 einer Tumorentstehung entgegenwirkt. Andererseits könnte es einer Krebszelle auch gelingen, Hsp90 als Schutzmechanismus zu gebrauchen. Immerhin wurden ja – wie bereits unter 1.3.4 besprochen – Inhibitoren von Hsp90 zur Tumorthherapie eingesetzt. Eine wesentliche Aufgabe von Hsp90 besteht darin, für die korrekte Faltung von Proteinen für wichtige Signaltransduktionswege zu sorgen. Zu diesen „Klienten“ gehören u.a. Kinasen zur Regulation der Zellproliferation [192] [193] [194], der GR [195] ebenso wie Proteine für die Initiation der RNA-Polymerase [196]. Deshalb wäre bei Fehlregulationen eine Tumorentstehung auf der Basis von mutiertem Hsp90 gut möglich. Im humanen Organismus existieren zwei verschiedene Isoformen von Hsp90, nämlich Hsp90 α und Hsp90 β . Die Level der α -Variante steigen infolge sehr hoher Temperaturen an, wohingegen die β -Form eine weitgehend konstante Baseline-Expression zeigt [197]. Es wurde bewiesen, dass Säugetiere für ihr Überleben auf das Vorhandensein von Hsp90 β zwingend angewiesen sind, während dies bei Hsp90 α nicht der Fall ist. Daraus konnte man ableiten, dass Hsp90 α als Funktion eher die Verbesserung der Bewältigung neuer ungünstigere Umweltbedingungen innehat. Hsp90 β indes verhindert ein Zusammenbrechen zellulärer Abläufe, die für den Fortbestand des Lebens unverzichtbar sind [198] [199] [200].

Die Prozesse im Rahmen von Krebserkrankungen stellen für den Körper selbstverständlich auch eine Form von Stress dar. Also wird die Expression von Hsp90 α stark induziert und das Verhältnis $\frac{Expression(Hsp90\alpha)}{Expression(Hsp90\beta)}$ steigt infolgedessen an. Für maligne Neoplasien ist Hsp90 sehr hilfreich zur, denn das Chaperon ist involviert in die Unterstützung des Überlebens mutierter Verbindungen, Angiogenese und Bildung von Filiae [87] [88] [100].

Schließlich sahen wir anhand der Ergebnisse unserer Analyse, dass Hsp90 α fast gar keine signifikanten Beziehungen zu den erfassten pathophysiologischen und klinischen Parametern zeigte. Der bei Kohorte 1 gefundene Zusammenhang zwischen einer höheren Expression von Hsp90 α und einer größeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs (bezogen nur auf ACCs) lässt darauf schließen, dass Hsp90 α eher auf ein höheres malignes Potential hindeutet. Dies würde zu der durch Tumorprozesse induzierbaren

Expression passen. Die Fallzahl war mit $n = 4$ jedoch sehr gering. In Bezug auf die Gesamtüberlebensraten der Patienten hatte Hsp90 α nach unseren Ergebnissen aus Kohorte 2 keinen relevanten Einfluss ($p = 0,353$). Etwas überraschend war zudem, dass es bei der Analyse von Kohorte 1 keine Auffälligkeiten in Bezug auf die drei anderen untersuchten Proteine gab, wohingegen bei der Kohorte 2 signifikante Korrelationen mit der Intensität von Hsp90 β und FKBP51 gefunden wurden. Die letztere Erkenntnis wäre recht gut nachvollziehbar, da Hsp90 β als in Säugetieren essentielles Protein stets vorkommt (ebenso wie nach unseren Überlegungen Hsp90 α in malignen Tumorzellen) und FKBP51 als Cochaperon von Hsp90 mit diesen typischerweise interagiert oder einfach ausgedrückt: Eine höhere Konzentration an Chaperonen (hier: Hsp90) benötigt eben entsprechend mehr Vorkommen von Cochaperonen (hier: FKBP51).

5.4 Beurteilung der Ergebnisse zur Hsp90 β -Expression

Der Hintergrund zu unserer Fragestellung bei Hsp90 wurde bereits in 5.3 besprochen. Hsp90 β war in unserem Projekt die untersuchte molekulare Zielstruktur, bei der wir die meisten signifikanten Zusammenhänge feststellen konnten. Daraus ergeben sich indirekte Hinweise, dass Hsp90 β für unsere Fragestellungen eine wesentlich wichtigere Rolle bei den untersuchten Nebennierentumoren spielen könnte als seine Isoform Hsp90 α . Besonders interessant ist aus unserer Sicht, dass wir keinerlei Zusammenhang zwischen Hsp90 α und den Gesamtüberlebensraten finden konnten, jedoch für Hsp90 β eine signifikante Korrelation mit einem besseren Gesamtüberleben gezeigt wurde. Bei geringer Expression von Hsp90 β war die Prognose für die Patienten ungünstiger. Darin kann man eine Bestätigung der Angaben aus der Literatur sehen, wonach Hsp90 β für das Überleben essentiell ist [198] [199] [200]. Es ist aber zu beachten, dass die gefundenen Zusammenhänge zwar recht zahlreich waren, teilweise jedoch zwischen der Kohorte 1 und der Kohorte 2 variierten. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Verknüpfung zwischen Hsp90 β und der hormonellen Aktivität:

- Laut den Resultaten von Kohorte 1 ist der Zusammenhang zwischen der Signalintensität von Hsp90 β und der hormonellen Aktivität statistisch signifikant ($p = 0,001$). Es fand sich eher eine Hormonsekretion bei Tumoren mit hohem H-Score von Hsp90 β als bei niedrigem. Allerdings war die Fallzahl gering.

- Gemäß unseren Untersuchungen anhand von Kohorte 2 sind die Beziehungen zwischen der Expression von Hsp90 β und der Hormonproduktion ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,006$). Bei höherer Expression von Hsp90 β war eine hormonelle Aktivität weniger wahrscheinlich als bei geringerer Expression. Dies steht im Widerspruch zum Ergebnis von Kohorte 1. Allerdings wurden bei Kohorte 1 verschiedene Tumoren analysiert, während dagegen im Falle der Kohorte 2 nur ACCs untersucht wurden. Die Fallzahl war zudem bei Kohorte 2 wesentlich höher.

Die Vorteile der jeweiligen Vorgehensweisen bei der Auswertung wurden bereits in 5.1 und 5.2 erörtert. Ferner darf man davon ausgehen, dass einige der signifikanten Zusammenhänge untereinander in Verbindung stehen. Beispielsweise erzielten wir bei der Kohorte 1 einige Ergebnisse, wonach bei höherer Expression von Hsp90 β folgende Aspekte wahrscheinlicher sind:

- Die Tumorphistologie (ACA oder ACC) ergab hierbei eher ein ACC als ein ACA ($p = 0,001$).
- Unter der Histologie und Funktionalität war das ACC unter den untersuchten Tumoren am häufigsten ($p = 0,030$).

Beide Aussagen sind Hinweise auf maligne Prozesse. Weiterhin waren in der Kohorte 1 nur wenige ACCs ($n = 6$) unter den insgesamt 33 Gewebeproben vertreten.

5.5 Beurteilung der Ergebnisse zur FKBP51-Expression

Wie oben beschrieben ist FKBP51 als Mitglied der FK506 bindenden Proteine ein Cochaperon vieler anderer Proteine, zu denen auch Hsp90 und andere Bestandteile des Steroid-Rezeptor-Komplexes zählen. Als eine wichtige Aufgabe von FKBP51 kann daher die Mitwirkung bei der Bewältigung ungünstiger Lebensverhältnisse angenommen werden [201]. Funktionell handelt es sich bei FKBP51 um einen Inhibitor des GR [173] [202]. Durch Stressoren wie starke Blutverluste, extrem hohe Temperaturen, Verbindungen mit Peroxidation bzw. Peroxygruppen, relevante Konzentrationen von Metallen, UV-Licht, Entzündungsmediatoren, erhöhte Osmolarität etc. steigt die Expression von FKBP51 im Zellkern rasch an [136]. Zudem vermittelt FKBP51 bei hoher Expression Signale zum

Verhindern der Apoptose. Im Rahmen maligner Tumorerkrankungen konnte man bereits hohe Expressionslevel von FKBP51 nachweisen [148] [203].

In unseren Untersuchungen konnten wir kaum relevante Zusammenhänge zwischen den ausgewählten klinischen Parametern und der nuklearen Expression von FKBP51 feststellen. Interessant war seine Korrelation bezüglich des Gesamtüberlebens. Hier fanden wir keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von FKBP51 und der Überlebensdauer. Da FKBP51 in niedrigen Spiegeln Apoptose eher begünstigt, wäre zu vermuten, dass hierbei das Tumorwachstum langsamer ablaufen würde und die Prognose eher etwas günstiger für die Patienten ausfallen müsste. Andererseits wird FK506 durch FKBP51 gebunden, sodass FKBP51 eine Immunantwort stimuliert, wodurch der Tumor bekämpft werden sollte. Darüber hinaus könnten die Mechanismen des Immunsystems auch dadurch verstärkt werden, indem FKBP51 die Sensitivität des GR herabsetzt und damit beispielsweise die immunsuppressiven Effekte von Cortisol vermindert. Eine eindeutige Bedeutung für FKBP51 bezüglich des Gesamtüberlebens ist auch in der Literatur bisher nicht gesichert.

5.6 Beurteilung der Ergebnisse zur Expression des GR

Glucocorticoide gehören zur Gruppe der Steroidhormone und haben zahlreiche essentielle Aufgaben im Organismus. Insbesondere wirken sie inhibierend auf Inflammation sowie Zellteilung und stellen vermehrt Glucose bereit [204]. Therapeutisch werden sie unter anderem bei Autoimmun- (z.B. Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes) und sonstigen entzündlichen Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Asthma bronchiale) eingesetzt [12]. Der GR vermittelt die Signale der Glucocorticoide [205]. Bereits im Jahre 2009 konnte von Tacon, L.J. et al. immunhistochemisch gezeigt werden, dass der GR in ACCs im Vergleich zu ACAs wesentlich stärker exprimiert wird ($p < 0,001$) [206].

Aus unserer Analyse geht hervor, dass die Expression des GR im Zusammenhang mit dem Auftreten eines krankheitsbedingten Todes steht, wobei hier nur ACCs in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. Aufgrund der zu geringen Fallzahl bei Kohorte 1 konnte jedoch nur für die Kohorte 2 eine sinnvolle Signifikanz berechnet werden. Die Ergebnisse selbst waren jedoch gegensätzlich. Gemäß Kohorte 1 bedeutete eine hohe

Expression des GR eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines krankheitsbedingten Todes, bei Kohorte 2 war es umgekehrt. Da die Effekte des GR sehr mannigfaltig sind, können hier lediglich Mutmaßungen angesprochen werden. Aufgrund der zentralen Rolle des GR für lebenswichtige Funktionen im Zellstoffwechsel können fehlerhafte Veränderungen des GR zu schweren Problemen für das Überleben von Tumorzellen führen. Weiterhin konnten wir auch darstellen, dass eine niedrigere Expression des GR mit einer schlechteren Prognose korreliert ist. Dies spricht eher für die Ergebnisse von Kohorte 2, die eine höhere Fallzahl aufweist. Jedoch erfolgte die Berechnung der Überlebensfunktionen anhand der gleichen Kohorte. Die Expression des GR fiel in unseren Proben relativ gering aus. Laut der Untersuchungen anhand von Kohorte 1 lag der Mittelwert der H-Scores der ACCs bei 1,31 und derjenige der ACAs bei 1,13 sowie bei Kohorte 2 (nur ACCs) bei 0,21 (möglicher Wertebereich der H-Scores: 0,00-3,00). Dennoch ist ein Vergleich mit der Publikation von Tacon, L.J. et al. eher nicht sinnvoll, da es nicht einheitlich definiert ist, ab wann ein Gewebe negativ ist. Der niedrigste H-Score der GR-Expression war bei der Kohorte 1 0,25 und bei Kohorte 2 0,15, was jeweils nicht als negativ gewertet wurde, da der H-Score oberhalb von 0,00 lag. Bei Tacon, L.J. et al. waren 40 von 41 als ACAs negativ gewertet worden.

5.7 Klinische Relevanz und Ausblick

Welchen Nutzen könnten die Ergebnisse unseres Projekts im klinischen Alltag bringen? Es wäre sicherlich vermessen, sich hiervon wesentliche Veränderungen zu erwarten. Wir wollten signifikante Zusammenhänge finden und damit beispielsweise Verbesserungen für die Einschätzung einer Prognose sowie Hinweise auf neue Therapiemöglichkeiten geben. Hier wird die Untersuchung bezüglich des Gesamtüberlebens interessant. Tatsächlich wäre es denkbar, ein aus einer Biopsie bzw. Operation erhaltenes Material eines ACCs in ein pathologisches Labor zu schicken und eine immunhistochemische Suche nach Hsp90 β und GR vorzunehmen. Immerhin hatten wir in beiden Fällen gezeigt, dass eine niedrigere Expression mit einer schlechteren Prognose für die Patienten in Verbindung steht. An den wichtigsten Prognosefaktoren wird dies aber nichts ändern. Weiterhin wird in erster Linie die Frage entscheidend sein, ob bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vorhanden sind.

Selbstverständlich wird auch der Erfolg der Chirurgen bezüglich des Resektionsstatus weitaus wichtiger sein als die Expression von Hsp90 β und dem GR.

Da die Therapiemöglichkeiten des ACCs so beschränkt sind und auch wenige Fortschritte in den letzten Jahrzehnten erzielt wurden, hätte es uns besonders gefreut, wenn wir hier vielversprechende Hinweise hätten geben können. Auch dann wären jedoch weitere Projekte erforderlich gewesen. Wir haben gesehen, dass die Prognose umso besser war, je höher Hsp90 β und der GR exprimiert waren. Hieraus wäre zu vermuten gewesen, dass ein therapeutisches Ansprechen von Hsp90-Inhibitoren unwahrscheinlich ist. Aus auf diese Arbeit anschließende Ergebnisse aktueller in vitro Arbeiten lässt sich hingegen ableiten, dass auch eine geringe Expression von Hsp90 ausreicht, relevante Effekte zu erreichen. So zeigten Siebert, C. et al. im Jahre 2019, dass Hsp90 β in ACCs überexprimiert wird, jedoch eine höhere Expression von Hsp90 β mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines krankheitsbedingten Todes und einer schlechteren Gesamtüberlebensrate assoziiert ist. Außerdem ergab das Projekt von Siebert, C. et al. eine gute antineoplastische Wirkung von den N-terminalen Hsp90-Inhibitoren Luminespib und Ganetespib in vitro gegenüber ACCs mit hoher Expression von Hsp90 β sowohl als Monotherapie als auch zusammen mit der leitliniengerechten Standardsystemtherapie Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin und Mitotan. Zellteilung, invasives Wachstum und antiapoptotische Effekte konnten so inhibiert werden. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Regulation der ERK1/2- und AKT-Signalkaskaden durch Luminespib und Ganetespib beeinflusst wurde [207].

6 Zusammenfassung

Nebennierentumore an sich sind keine seltene Erkrankung. Ihre Inzidenz liegt bei etwa 3 – 7 % [208] [209] – bis hin zu 9 % bei alten Menschen – [210] [211] [212]. Mit ungefähr 75 – 80 % sind die meisten der Neoplasien jedoch benigne und sezernieren keine Hormone, wobei infolge einer möglichen Hormonproduktion schwere Krankheitsfolgen auftreten können [213] [214] [215]. ACCs sind maligne Tumoren der Nebenniere und wesentlich seltener. Ihre Inzidenz liegt nur bei ungefähr 0,5 – 2 : 1.000.000 pro Jahr [216] [217] [218] [219] [220]. Sie zeigen ein sehr aggressives Verhalten und für die Patienten ist die Prognose meist schlecht [208] [209]. Vereinzelt treten immer wieder Fälle mit weniger fulminantem Verlauf auf. Dann führt eine Resektion des Tumors oft auch zur Heilung. Leider kommt es jedoch immer wieder vor, dass das ACC zwar wohl die Grenzen der Nebenniere überschritten und ein R0-Status durch operative Intervention erreicht wurde, aber der Patient die Krankheit dennoch nicht überwunden hat. Die unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen durch ACCs sind mit bestimmten molekularen und genetischen Veränderungen verknüpft, die prognostische Aussagen erlauben [221]. Fünf Jahre nach der Diagnosestellung leben noch zwischen 16 und 40 % der Patienten. Selbstverständlich spielt dabei auch eine Rolle, wie weit der Tumor bei Erstdiagnose bereits fortgeschritten war [222] [36]. Wenn bei einem Patienten ein ACC entdeckt wird, liegt meistens schon ein höheres Tumorstadium vor [208]. Bei einem großen Anteil ist aus diesem Grund eine chirurgische Entfernung nicht mehr möglich. Als übrige Optionen stehen noch die Radiotherapie sowie Zytostatika und adrenolytische Substanzen zur Verfügung [209].

Bei dem vorliegenden Projekt untersuchten wir mittels Immunhistochemie die Expression von vier molekularen Zielstrukturen: Hsp90 α , Hsp90 β , FKBP51 und GR. Die erhaltenen Signalintensitätsstufen verglichen wir mit erhobenen klinischen und pathologischen Daten (Geschlecht, krankheitsbedingter Tod, Metastasierung, Hormonproduktion etc.). Es wurden eine Kohorte 1 und eine Kohorte 2 analysiert. Erstere bestand aus 33 Tumoren, darunter 18 Cortisol produzierende Adenome (14 mit Cushing-Syndrom und 4 mit subklinischem Cushing-Syndrom), 1 Androgen produzierendem Adenom, 8 Inzidentalome und 6 ACCs. Die Gewebeproben bildeten im Idealfall den gesamten Tumor ab. Pro Gewebe wurde an 2 Proben eine Immunhistochemie durchgeführt. Daraufhin wurden unter dem Lichtmikroskop Fotos angefertigt und die Zellen visuell einer

Signalintensitätsstufe (0 = negativ, 1 = geringe Immunreaktivität, 2 = intermediäre Immunreaktivität, 3 = hohe Immunreaktivität) zugeordnet. Die Berechnungen und Erstellung der Abbildungen erfolgte mit „IBM SPSS Statistics“ (Version 25, Firma IBM®, Armonk, New York, USA). Die Kohorte 2 enthielt 80 ACCs und es lagen pro ACC 3 Gewebeproben vor. Die Gewebeproben aller ACCs sowie die Negativkontrollen befanden sich auf insgesamt 2 TMAs. Somit wurden 8 TMAs immunhistochemisch untersucht. Pro ACC und Antikörper wurden also 3 Proben analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Masanori Murakami am Helmholtz Zentrum München. Hierbei wurde zur Ermittlung der Immunreaktivität der MIRAX DESK-Scanner und zur statistischen Auswertung die Software „R“ (<https://www.r-project.org>, Günter Faes, Dormagen, Deutschland) verwendet.

Bei der Kohorte 1 fand sich insbesondere eine Überexpression von Hsp90 β in ACCs (n = 6, Mittelwert = 1,62, Standardabweichung = 0,43) gegenüber Inzidentalomen (p = 0,006, n = 8, Mittelwert = 0,84, Standardabweichung = 0,38), subklinischen Cushing-Adenomen (p = 0,013, n = 4, Mittelwert = 0,76, Standardabweichung = 0,36) und Cushing-Adenomen (p = 0,015, n = 14, Mittelwert = 0,98, Standardabweichung = 0,40). Gegenüber Androgen produzierenden Adenomen (n = 1, Mittelwert = 1,37) konnte wegen der sehr geringen Fallzahl keine sinnvolle Signifikanz berechnet werden. Dies steht im Einklang mit anderen Publikationen. So konnte beispielsweise auch bei Siebert, C. et al. im Jahre 2019 eine Überexpression von Hsp90 β in ACCs nachgewiesen werden [207].

Bezüglich der Kohorte 2 fanden sich Korrelationen zwischen der Expression von Hsp90 α und Hsp90 β (p < 0,001, Korrelationskoeffizient nach Spearman r_s = 0,383), Hsp90 α und FKBP51 (p = 0,021, Korrelationskoeffizient nach Spearman r_s = 0,259) sowie zwischen der Expression von Hsp90 β und dem GR (p = 0,002, Korrelationskoeffizient nach Spearman r_s = 0,345). Außerdem war bei höherer Expression von Hsp90 β das Auftreten eines krankheitsbedingten Todes weniger wahrscheinlich (p = 0,041, n (kein krankheitsbedingter Tod) = 37, Mittelwert (kein krankheitsbedingter Tod) = 0,80, Standardabweichung (kein krankheitsbedingter Tod) = 0,41, n (krankheitsbedingter Tod) = 40, Mittelwert (krankheitsbedingter Tod) = 0,62, Standardabweichung (krankheitsbedingter Tod) = 0,39) und eine hormonelle Aktivität (p = 0,006, n (nicht hormonaktiv) = 33, Mittelwert (nicht hormonaktiv) = 0,86, Standardabweichung (nicht hormonaktiv) = 0,42, n (hormonaktiv) = 45, Mittelwert (hormonaktiv) = 0,60, Standardabweichung (hormonaktiv) = 0,36) sowie eine

Androgenproduktion ($p = 0,030$, n (keine Androgenproduktion) = 55, Mittelwert (keine Androgenproduktion) = 0,77, Standardabweichung (keine Androgenproduktion) = 0,44, n (Androgenproduktion) = 23, Mittelwert (Androgenproduktion) = 0,55, Standardabweichung (Androgenproduktion) = 0,36) der ACCs traten seltener auf. Ferner ereignete sich bei höherer Expression des GR ein krankheitsbedingter Tod seltener ($p = 0,024$, n (kein krankheitsbedingter Tod) = 37, Mittelwert (kein krankheitsbedingter Tod) = 0,21, Standardabweichung (kein krankheitsbedingter Tod) = 0,03, n (krankheitsbedingter Tod) = 40, Mittelwert (krankheitsbedingter Tod) = 0,20, Standardabweichung (krankheitsbedingter Tod) = 0,04).

Besonders interessant waren bei der Kohorte 2 die Ergebnisse, dass eine höhere Expression von Hsp90 β ($p = 0,014$, n ($< 0,77$) = 48, Zensuren ($< 0,77$) = 18, Mittelwert ($< 0,77$) = 91,82 Monate, Standardabweichung ($< 0,77$) = 18,94 Monate, n ($\geq 0,77$) = 32, Zensuren ($\geq 0,77$) = 22, Mittelwert ($\geq 0,77$) = 174,19 Monate, Standardabweichung ($\geq 0,77$) = 34,41 Monate) und des GR ($p = 0,008$, n ($< 0,18$) = 17, Zensuren ($< 0,18$) = 6, Mittelwert ($< 0,18$) = 38,53 Monate, Standardabweichung ($< 0,18$) = 8,77 Monate, n ($\geq 0,18$) = 63, Zensuren ($\geq 0,18$) = 34, Mittelwert ($\geq 0,18$) = 136,11 Monate, Standardabweichung ($\geq 0,18$) = 21,45 Monate) mit einer längeren Gesamtüberlebensrate einhergingen. Die Expression von Hsp90 β und des GR wären gemäß unseren Ergebnissen somit als prognostische Marker für Patienten mit ACCs denkbar.

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. Penny, I. Finco und G. Hammer, „Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/progenitor biology and neoplasia,“ *Mol Cell Endocrinol*, pp. 42-54, 15 April 2017.
- [2] T. Wang und W. Rainey, „Human Adrenocortical Carcinoma Cell Lines,“ *Mol Cell Endocrinol*, pp. 58-65, 31 März 2012.
- [3] E. De Kloet, M. Joels und F. Holsboer, „Stress and the brain: from adaption to disease,“ *Nature Reviews: Neuroscience*, pp. 463-475, 2005.
- [4] S. Lupien, F. Maheu, M. Tu, A. Fiocco und T. Schramek, „The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition,“ *Brain and Cognition*, pp. 209-237, 2007.
- [5] C. McIntyre, J. McGaugh und C. Williams, „Interacting brain systems modulate memory consolidation,“ *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 1750-1762, 2012.
- [6] B. Roozendaal, S. Okuda, D. de Quervain und J. McGaugh, „Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions,“ *Neuroscience*, pp. 901-910, 2006.
- [7] B. Gibbison, G. Angelini und S. Lightman, „Dynamic output and control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness and major surgery,“ *British Journal of Anaesthesia*, pp. 347-360, 9 Mai 2013.
- [8] A. Burke und K. Miczek, „Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis,“ *Psychopharmacology (Berl)*, pp. 1557-1580, April 2014.
- [9] C. Finsterwald und C. Alberini, „Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies,“ *Neurobiol Learn Mem*, pp. 17-29, Juli 2014.
- [10] A. Jain, R. Wordinger, T. Yorio und A. Clark, „Role of the Alternatively Spliced Glucocorticoid Receptor Isoform GRbeta in Steroid Responsiveness and Glaucoma,“ *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, Bd. 30, Nr. 2, 3, 2014.
- [11] R. Oakley und J. Cidlowski, „The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease,“ *J Allergy Clin Immunol*, pp. 1033-1044, November 2013.
- [12] T. Rhen und J. Cidlowski, „Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs,“ *N Engl J Med*, pp. 1711-1723, 2005.
- [13] J. Busillo und J. Cidlowski, „The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore,“ *Trends Endocrinol Metab*, p. Epub 2013/01/15, 15 Januar 2013.

- [14] J. Miner, M. Hong und A. Negro-Vilar, „New and improved glucocorticoid receptor ligands,“ *Expert Opin Investig Drugs*, pp. 1527-1545, 2005.
- [15] D. Cuevas-Ramos und M. Fleseriu, „Treatment of Cushing's disease: a mechanistic update,“ *Journal of Endocrinology*, pp. 19-39, 2014.
- [16] E. Daniel und J. Newell-Price, „Therapy of endocrine disease: steroidogenesis enzyme inhibitors in Cushing's syndrome,“ *Eur J Endocrinol*, pp. 263-280, 2015.
- [17] M. Fleseriu und F. Castinetti, „Updates on the role of adrenal steroidogenesis inhibitors in Cushing's syndrome: a focus on novel therapies,“ *Pituitary*, pp. 643-653, Dezember 2016.
- [18] W. Miller und R. Auchus, „The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders,“ *Endocr Rev*, pp. 81-151, Februar 2011.
- [19] W. Miller, „Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis,“ *J Steroid Biochem Mol Biol*, pp. 18-37, Januar 2017.
- [20] M. Shikita und P. Hall, „Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. II. Subunit structure,“ *J Biol Chem*, pp. 5605-5609, August 1973.
- [21] B. Chung, K. Matteson, R. Voutilainen, T. Mohandas und W. Miller, „Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 8962-8966, Dezember 1986.
- [22] E. Baranowski, W. Arlt und J. Idkowiak, „Monogenic Disorders of Adrenal Steroidogenesis,“ *Horm Res Paediatr*, pp. 292-310, 2018.
- [23] P. Mishra, A. Singh, V. Kanaujia, R. Agarwal, P. Mishra, A. Guleria und A. Tripathi, „Intraocular pressure and its correlation with midnight plasma cortisol level in Cushing's disease and other endogenous Cushing's syndrome,“ *Indian J Ophthalmol*, pp. 826-829, 2017.
- [24] A. Kotlowska, T. Puzyn, K. Sworczak, P. Stepnowski und P. Szefer, „Metabolomic Biomarkers in Urine of Cushing's Syndrome Patients,“ *Int J Mol Sci*, p. 294, 2017.
- [25] N. Eckstein, B. Haas, M. Hass und V. Pfeifer, „Systemic therapy of Cushing's syndrome,“ *Orphanet Journal of Rare Diseases*, p. 122, 2014.
- [26] F. Van Haalen, L. Broersen, J. Jorgensen, A. Pereira und O. Dekkers, „Mortality remains increased in Cushing's disease despite biochemical remission: a systematic review and meta-analysis,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 143-149, 2015.
- [27] T. Psaras, M. Milian, V. Hattermann, T. Freiman, B. Gallwitz und J. Honegger, „Demographic factors and the presence of comorbidities do not promote early detection of Cushing's disease and acromegaly,“ *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, pp. 21-25, Januar 2011.

- [28] L. Weiss, X. Bertagna, G. Chrousos, A. Kawashima, P. Kleihues, C. Koch, T. Giordano, L. Medeiros, M. Merino, N. Ordonez und H. Sasano, „Adrenal Cortical Carcinoma,“ *Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs*, pp. 139-142, 2004.
- [29] P. Icard, P. Goudet, C. Charpenay, B. Andreassian, B. Carnaille, Y. Chapuis, P. Cougard, J. Henry und C. Proye, „Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French association of endocrine surgeons study group,“ *World J Surg*, pp. 891-897, 2001.
- [30] K. Sasaki, M. Desimone, H. Rao, G. Huang und R. Seethala, „Adrenocortical carcinosarcoma: a case report and review of the literature,“ *Diagn Pathol*, p. 51, 2010.
- [31] J. Luton, S. Cerdas, L. Billaud, G. Thomas, B. Guilhaume, X. Bertagna, M. Laudat, A. Louvel, Y. Chapuis, P. Blondeau, A. Bonnin und H. Bricaire, „Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy,“ *N Engl J Med*, pp. 1195-1201, 26 April 1990.
- [32] J. Lafemina und M. Brennan, „Adrenocortical carcinoma: past, present, and future,“ *J Surg Oncol*, pp. 586-594, 2012 Oktober 2012.
- [33] P. Correa und V. Chen, „Endocrine gland cancer,“ *Cancer*, pp. 338-352, 1 Januar 1995.
- [34] L. Fulawka, D. Patrzalek und A. Halon, „Adrenal cortical carcinoma with extension into the inferior vena cava - case report and literature review,“ *Diagnostic Pathology*, p. 51, 2014.
- [35] C. Ronchi, M. Kroiss, S. Sbiera, T. Deutschbein und M. Fassnacht, „Current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go?,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 1-11, 2014.
- [36] M. Fassnacht, S. Johanssen, W. Fenske, D. Weismann, A. Agha, F. Beuschlein, D. Führer, C. Jurowich, M. Quinkler, S. Petersenn, M. Spahn, S. Hahner, B. Allolio und G. A. R. Group, „Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively by specialized centers,“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 4925-4932, 2010.
- [37] A. Jouinot und J. Bertherat, „MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Adrenocortical carcinoma: differentiating the good from the poor prognosis tumors,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 215-230, 2018.
- [38] J. Galon, D. Franchimont, N. Hiroi, G. Frey, A. Boettner, M. Ehrhart-Bornstein, J. O'Shea, G. Chrousos und S. Bornstein, „Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells,“ *Faseb J*, pp. 61-71, 2002.
- [39] N. Lu, J. Collins, S. Grissom und J. Cidlowski, „Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor,“ *Mol Cell Biol*, pp. 7143-7160, 2007.
- [40] R. Ren, R. Oakley, D. Cruz-Topete und J. Cidlowski, „Dual Role for Glucocorticoids in Cardiomyocyte Hypertrophy and Apoptosis,“ *Endocrinology*, pp. 5346-5360, November 2012.

- [41] I. Grad und D. Picard, „The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones,“ *Mol Cell Endocrinol*, pp. 2-12, 2007.
- [42] W. Pratt und D. Toft, „Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones,“ *Endocr Rev*, pp. 306-360, 1997.
- [43] T. Kino, Y. Su und G. Chrousos, „Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology,“ *Cell Mol Life Sci*, pp. 3435-3448, November 2009.
- [44] L. Lewis-Tuffin und J. Cidlowski, „The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance,“ *Ann N Y Acad Sci*, pp. 1-9, Juni 2006.
- [45] P. Hauk, Q. Hamid, G. Chrousos und D. Leung, „Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens,“ *J Allergy Clin Immunol*, pp. 782-787, 2000.
- [46] O. Tliba, J. Cidlowski und Y. Amrani, „CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform,“ *Mol Pharmacol*, pp. 588-596, 2006.
- [47] J. Webster, R. Oakley, C. Jewell und J. Cidlowski, „Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 6865-6870, 2001.
- [48] N. Lu und J. Cidlowski, „Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes,“ *Mol Cell*, pp. 331-342, 2005.
- [49] M. Yudit, C. Jewell, R. Bienstock und J. Cidlowski, „Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta,“ *Mol Cell Biol*, pp. 4319-4330, 2003.
- [50] M. Beato, „Gene regulation by steroid hormones,“ *Cell*, pp. 335-344, 1989.
- [51] L. Freedman, „Anatomy of the steroid receptor zinc finger region,“ *Endocr Rev*, pp. 129-145, 1992.
- [52] B. Bukau, J. Weissman und A. Horwich, „Molecular chaperones and protein quality control,“ *Cell*, pp. 443-451, 2006.
- [53] F. Kriegenburg, L. Ellgaard und R. Hartmann-Petersen, „Molecular chaperones in targeting misfolded proteins for ubiquitin-dependent degradation,“ *FEBS J*, pp. 532-542, 2012.
- [54] F. Rappa, F. Farina, G. Zummo, S. David, C. Campanella, F. Carini, G. Tomasello, P. Damiani, F. Cappello und E. de Macario, „HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: An overview,“ *Anticancer Res*, pp. 5139-5150, 2012.

- [55] A. Khalil, N. Kabapy, S. Deraz und C. Smith, „Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets?“, *Biochem Biophys Acta*, pp. 89-104, 2011.
- [56] C. Caruso Bavisotto, F. Cappello, A. C. d. M. E. Macario, M. Logozzi, S. Fais und C. Campanella, „Exosomal HSP60: A potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment“, *Expert Rev Mol Diagn*, pp. 815-822, 2017.
- [57] X. Li, Q. Xu, X. Fu und W. Luo, „Heat shock protein 60 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer“, *PLoS ONE*, p. 107507, 2014.
- [58] T. Zininga, L. Ramatsui und A. Shonhai, „Heat Shock Proteins as Immunomodulators“, *Molecules*, Bd. 23, p. 2846, 2018.
- [59] L. Pearl, C. Prodromou und P. Workman, „The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment“, *Biochem J*, pp. 439-453, 2008.
- [60] P. Workman, F. Burrows, L. Neckers und N. Rosen, „Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress“, *Ann N Y Acad Sci*, pp. 202-216, 2007.
- [61] A. Laszlo, D. Thotala und D. Hallahan, „Membrane Phospholipids, EML4-ALK and Hsp90 as Novel Targets in Lung Cancer Treatment“, *Cancer J*, pp. 238-246, 2013.
- [62] K. Borkovich, F. Farrelly, D. Finkelstein, J. Taulien und S. Lindquist, „hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures“, *Mol Cell Biol*, pp. 3919-3930, 1989.
- [63] R. Aligue, H. Akhavan-Niak und P. Russell, „A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90“, *EMBO J*, pp. 6099-6106, 1994.
- [64] C. Chen, Y. Chen, K. Dai, P. Chen, D. Riley und W. Lee, „A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock“, *Mol Cell Biol*, pp. 4691-4699, 1996.
- [65] T. Cutforth und G. Rubin, „Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in Drosophila“, *Cell*, pp. 1027-1036, 1994.
- [66] I. Joab, C. Radanyi, M. Renoir, T. Buchou, M. Catelli, N. Binart, J. Mester und E. Baulieu, „Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones“, *Nature*, pp. 850-853.
- [67] H. Oppermann, W. Levinson und J. Bishop, „A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 1067-1071, 1981.
- [68] B. Sepehrnia, I. Paz, G. Dasgupta und J. Momand, „Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell“, *J Biol Chem*,

pp. 15084-15090, 1996.

- [69] L. Stancato, Y. Chow, K. Hutchison, G. Perdew, R. Jove und W. Pratt, „Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system,“ *J Biol Chem*, pp. 21711-21716, 1993.
- [70] L. Pearl und C. Prodromou, „Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery,“ *Annu Rev Biochem*, pp. 271-294, 2006.
- [71] L. Zhang, Fok, J.H. und F. Davies, „Heat shock proteins in multiple myeloma,“ *Oncotarget*, Bd. 5, Nr. 5, pp. 1132-1148, 2014.
- [72] Z. Xu, Z. Li, Y. Chen, M. Chen, L. Li und Y. Ma, „Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses,“ *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 15706-15723, 2012.
- [73] H. Wegele, L. Müller und J. Buchner, „Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding,“ *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, pp. 1-44, 2004.
- [74] J. Ou, M. Tan, A. Xie, J. Yu und L. Tan, „Heat Shock Protein 90 in Alzheimer's Disease,“ *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 13 Oktober 2014.
- [75] W. Obermann, H. Sonderrmann, A. Russo, N. Pavletich und F. Hartl, „In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis,“ *J Cell Biol*, pp. 901-910, 1998.
- [76] B. Panaretou, C. Prodromou, S. Roe, R. O'Brien, J. Ladbury, P. Piper und L. Pearl, „ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo,“ *EMBO J*, pp. 4829-4836, 1998.
- [77] P. Csermely, J. Kajtár, M. Hollósi, G. Jalsovszky, S. Holly, C. Kahn, P. J. Gergely, C. Söti, K. Mihály und J. Somogyi, „ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90),“ *J Biol Chem*, pp. 1901-1907, 1993.
- [78] M. Ali, S. Roe, C. Vaughan, P. Meyer, B. Panaretou, P. Piper, C. Prodromou und L. Pearl, „Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex,“ *Nature*, pp. 1013-1017, 2006.
- [79] M. Hessling, K. Richter und B. J., „Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90,“ *Nat Struct Mol Biol*, pp. 287-293, 2009.
- [80] S. Sato, N. Fujita und T. Tsuruo, „Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 10832-10837, 2000.
- [81] S. Chen, W. Sullivan, D. Toft und D. Smith, „Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP51 and FKBP51 with Hsp90 mutants,“ *Cell Stress Chaperones*, pp. 118-129, 1998.

- [82] J. Young, W. Obermann und F. Hartl, „Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90,“ *J Biol Chem*, pp. 18007-18010, 1998.
- [83] D. Smith, „Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes,“ *Cell Stress Chaperones*, pp. 109-121, April 2004.
- [84] M. Marcu, A. Chadli, I. Bouhouche, M. Catelli und L. Neckers, „The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone,“ *J Biol Chem*, pp. 37181-37186, 2000.
- [85] C. Söti, A. Rácz und P. Csermely, „A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket,“ *J Biol Chem*, pp. 7066-7075, 2002.
- [86] J. Trepel, M. Mollapour, G. Giaccone und L. Neckers, „Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer,“ *Nat Rev Cancer*, pp. 537-549, 2010.
- [87] M. Blagosklonny, „Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs,“ *Leukemia*, pp. 455-462, 2002.
- [88] M. Taipale, D. Jarosz und S. Lindquist, „HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights,“ *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 515-528, 2010.
- [89] P. Pandey, R. Farber, A. Nakazawa, S. Kumar, A. Bharti, C. Nalin, R. Weichselbaum, D. Kufe und S. Kharbanda, „Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3,“ *Oncogene*, pp. 1975-1981, 2000.
- [90] L. Whitesell und S. Lindquist, „HSP90 and the chaperoning of cancer,“ *Nat Rev Cancer*, pp. 761-772, 2005.
- [91] S. Iwasaki, M. Kobayashi, M. Yoda, Y. Sakaguchi, S. Katsuma, T. Suzuki und Y. Tomari, „Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes,“ *Mol Cell*, pp. 292-299, 2010.
- [92] L. Salmena, L. Poliseno, Y. Tay, L. Kats und P. Pandolfi, „A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?,“ *Cell*, pp. 353-358, 2011.
- [93] C. Cui, J. Yu, S. Huang, H. Zhu und Z. Huang, „Transcriptional regulation of gene expression by microRNAs as endogenous decoys of transcription factors,“ *Cell Physiol Biochem*, pp. 1698-1714, 2014.
- [94] L. Hongyu, L. Cheng, H. Qin, P. Zou, X. Desheng und T. Yongguang, „Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer,“ *Mol Cancer*, p. 64, 2018.
- [95] E. Pick, Y. Kluger, J. Giltneane, C. Moeder, R. Camp, D. Rimm und H. Kluger, „High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer,“ *Cancer Res*, pp. 2932-2937, 2007.

- [96] J. Wang, S. Cui, X. Zhang, Y. Wu und H. Tang, „High expression of heat shock protein 90 ist associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer,“ *PLoS One*, p. 62876, 2013.
- [97] M. Zácková, D. Moucková, T. Lopotová, Z. Ondráčková, H. Klamová und J. Moravcová, „Hsp90 - a potential prognostic marker in CML,“ *Blood Cells Mol Dis*, pp. 184-189, März 2013.
- [98] C. Li, W. Huang, J. Wu, S. Yu, T. Hu, Y. Uen, Y. Tian, C. Lin, D. Lu und F. H. H. Fang, „Heat Shock Protein 90 Overexpression Independently Predicts Inferior Disease-Free Survival with Differentiated Expression of the alpha and beta Isoforms in Gastrointestinal Stromal Tumors,“ *Clin Cancer Res*, p. 2008, 1 Dezember 2008.
- [99] L. Whitesell, E. Mimnaugh, B. De Costa, C. Myers und L. Neckers, „Inhibition of heat shock protein 90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 8324-8328, 1994.
- [100] D. Ciocca, A. Arrigo und S. Calderwood, „Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update,“ *Arch Toxicol*, pp. 19-48, Januar 2013.
- [101] G. Garg, A. Khandelwal und B. Blagg, „Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects,“ *Adv Cancer Res*, pp. 51-88, 10 Februar 2016.
- [102] L. Neckers, B. Blagg, T. Haystead, J. Trepel, L. Whitesell und D. Picard, „Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to rethink approaches for further clinical development,“ *Cell Stress Chaperones*, pp. 467-482, Juli 2018.
- [103] K. Jhaveri, T. Taldone, S. Modi und G. Chiosis, „Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers,“ *Biochem Biophys Acta*, pp. 742-755, 2012.
- [104] P. Chène, „ATPases as drug targets: learning from their structure,“ *Nat Rev Drug Discov*, pp. 665-673, 2002.
- [105] G. Brandt und B. Blagg, „Alternate strategies of Hsp90 modulation for the treatment of cancer and other diseases,“ *Curr Top Med Chem*, pp. 1447-1461, 2009.
- [106] H. Patel, S. Modi, G. Chiosis und T. Taldone, „Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment,“ *Expert Opin Drug Discov*, pp. 559-587, 2011.
- [107] T. Taldone, H. Patel, A. Bolaender, M. Patel und G. Chiosis, „Protein chaperones: a composition of matter review (2008 - 2013),“ *Expert Opin Ther Pat*, pp. 501-518, Mai 2014.
- [108] E. Creagh, D. Sheehan und T. Cotter, „Heat shock proteins - modulators of apoptosis in tumor cells,“ *Leukemia*, pp. 1161-1173, 14 Juli 2000.
- [109] J. Young, I. Moarefi und F. Hartl, „Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool,“ *J Cell*

- Biol*, pp. 267-273, 2001.
- [110] K. Richter und J. Buchner, „Hsp90: chaperoning signal transduction,“ *J Cell Physiol*, pp. 281-290, 2001.
- [111] C. Jolly und R. Morimoto, „Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death,“ *J Natl Cancer Inst*, pp. 1564-1572, 2000.
- [112] W. Guo, P. Reigan, D. Siegel und D. Ross, „Enzymatic reduction and glutathione conjugation of benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors: relevance for toxicity and mechanism of action,“ *Drug Metab Dispos*, pp. 2050-2057, 2008.
- [113] T. Schulte, S. Akinaga, S. Soga, W. Sullivan, B. Stensgard, D. Toft und L. Neckers, „Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin,“ *Cell Stress Chaperones*, pp. 100-108, 1998.
- [114] H. Kwon, M. Yoshida, Y. Fukui, S. Horinouchi und T. Beppu, „Potent and specific inhibition of p60v-src protein kinase both in vivo and in vitro by radicicol,“ *Cancer Res*, pp. 6926-6930, 1992.
- [115] W. Ying, „Preparation of triazoles and related compounds as Hsp90 inhibitors,“ 2008.
- [116] S. Modi, A. Stopeck, H. Linden, D. Solit, S. Chandarlapaty, N. Rosen, G. D'Andrea, M. Dickler, M. Moynahan, S. Sugarman, W. Ma, S. Patil, L. Norton, A. Hannah und C. Hudis, „HSP90 Inhibition is Effective in Breast Cancer: A Phase 2 Trial of Tanespimycin (17AAG) plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab,“ *Clin Cancer Res*, pp. 5132-5139, 1 August 2011.
- [117] C. Arteaga, „Why is this effective HSP90 inhibitor not being developed in HER2+ breast cancer?,“ *Clin Cancer Res*, p. Epub ahead of print, 2011.
- [118] S. Modi, A. Stopeck, M. Gordon, D. Mendelson, D. Solit, R. Bagatell, W. Ma, J. Wheler, N. Rosen, L. Norton, G. Cropp, R. Johnson, A. Hannah und C. Hudis, „Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study,“ *J Clin Oncol*, pp. 5410-5417, 2007.
- [119] S. Modi, S. Sugarman, A. Stopeck, H. Linden, W. Ma, K. Kersey, R. Johnson, N. Rosen, A. Hannah und C. Hudis, „Phase II trial of the Hsp90 inhibitor tanespimycin (Tan) + trastuzumab (T) in patients (pts) with HER2-positive metastatic breast cancer (MBC),“ *J Clin Oncol*, p. 1027, 2008.
- [120] P. Richardson, A. Chanan-Khan, M. Alsina, M. Albitar, D. Berman, M. Messina, C. Mitsiades und K. Anderson, „Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study,“ *Br J Haematol*, pp. 438-445, 2010.
- [121] P. Richardson, A. Badros, S. Jagannath, S. Tarantolo, J. Wolf, M. Albitar, D. Berman, M. Messina und K. Anderson, „Tanespimycin with bortezomib: activity in relapsed/refractory patients with multiple myeloma,“ *Br J Haematol*, pp. 428-437, 2010.

- [122] P. Richardson, C. Mitsiades, J. Laubach, S. Lonial, A. Chanan-Khan und K. Anderson, „Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers,“ *Br J Haematol*, pp. 367-379, 2011.
- [123] P. Richardson, A. Chanan-Khan, S. Lonial, A. Krishnan, M. Carroll, M. Alsina, M. Albitar, D. Berman, M. Messina und K. Anderson, „Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study,“ *Br J Haematol*, pp. 729-740, 2011.
- [124] C. Peng, J. Brain, Y. Hu, A. Goodrich, L. Kong, D. Grayzel, R. Pak, M. Read und S. Li, „Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells,“ *Blood*, pp. 678-685, 2007.
- [125] K. Wong, M. Koczywas, J. Goldman, E. Paschold, L. Horn, J. Lufkin, R. Blackman, F. Teofilovici, G. Shapiro und M. Socinski, „An open-label phase II study of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) as monotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC),“ *ASCO Meeting Abstracts*, p. 7500, 2011.
- [126] S. Pacey, R. Wilson, M. Walton, M. Eatock, A. Hardcastle, A. Zetterlund, H. Arkenau, J. Moreno-Farre, U. Banerji, B. Roels, H. Peachey, W. Aherne, J. de Bono, F. Raynaud, P. Workman und I. Judson, „A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors,“ *Clin Cancer Res*, pp. 1561-1570, 2011.
- [127] L. Neckers und P. Workman, „Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet?,“ *Clin Cancer Res*, pp. 64-76, 1 Januar 2012.
- [128] G. Baughman, G. Wiederrecht, N. Campbell, M. Martin und S. Bourgeois, „FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition,“ *Mol Cell Biol*, pp. 4395-4402, 1995.
- [129] C. Sinars, J. Cheung-Flynn, R. Rimerman, J. Scammell, D. Smith und J. Clardy, „Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 868-873, 2003.
- [130] U. Jinwal, J. 3. Koren, S. Borysov, A. Schmid, J. Abisambra, L. Blair, A. Johnson, J. Jones, C. Shults, J. 3. O'Leary, Y. Jin, J. Buchner, M. Cox und C. Dickey, „The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules,“ *J Neurosci*, pp. 591-599, 2010.
- [131] L. Ni, C. Yang, D. Gioeli, H. Frierson, D. Toft und B. Paschal, „FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells,“ *Mol Cell Biol*, pp. 1243-1253, 2010.
- [132] C. Kang, Y. Hong, S. Dhe-Paganon und H. Yoon, „FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions,“ *Neurosignals*, pp. 318-325, 2008.
- [133] L. Wang, „FKBP51 regulation of AKT/Protein Kinase B Phosphorylation,“ *Curr Opin Pharmacol*, pp. 360-364, August 2011.

- [134] K. Rees-Unwin, R. Craven, E. Davenport, S. Hanrahan, N. Totty, A. Dring, R. Banks, G. Morgan und F. Davies, „Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma,“ *Br J Haematol*, pp. 559-567, 2007.
- [135] L. Li, Z. Lou und L. Wang, „The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance,“ *British Journal of Cancer*, pp. 19-23, 2011.
- [136] L. Gallo, M. Lagadari, G. Piwien-Pilipuk und M. Galigniana, „The 90-kDa Heat-shock Protein (Hsp90)-binding Immunophilin FKBP51 Is a Mitochondrial Protein That Translocates to the Nucleus to Protect Cells against Oxidative Stress,“ *J Biol Chem*, pp. 30152-30160, 2011.
- [137] S. Le Bihan, V. Marsaud, C. Mercier-Bodard, E. Baulieu, S. Mader, J. White und J. Renoir, „Calcium/calmodulin kinase inhibitors and immunosuppressant macrolides rapamycin and FK506 inhibit progesterone- and glucocorticoid receptor-mediated transcription in human breast cancer T47D cells,“ *Mol Endocrinol*, pp. 986-1001, 1998.
- [138] M. Romano, R. Avellino, A. Petrella, R. Bisogni, S. Romano und S. Venuta, „Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells,“ *Eur J Cancer*, pp. 2829-2836, 2004.
- [139] R. Avellino, S. Romano, R. Parasole, R. Bisogni, A. Lamberti, V. Poggi, S. Venuta und M. Romano, „Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells,“ *Blood*, pp. 1400-1406, 2005.
- [140] S. Romano, A. D'Angelillo, R. Pacelli, S. Staibano, E. De Luna, R. Bisogni, E. Eskelinen, M. Mascolo, G. Calì, C. Arra und M. Romano, „Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells,“ *Cell Death Differ*, pp. 145-157, 2010.
- [141] L. Li, B. Fridley, K. Kalari, G. Jenkins, A. Batzler, S. Safgren, M. Hildebrandt, M. Ames, D. Schaid und L. Wang, „Gemcitabine and cytosine arabinoside cytotoxicity: association with lymphoblastoid cell expression,“ *Cancer Res*, pp. 7050-7058, 2008.
- [142] H. Pei, L. Li, B. Fridley, G. Jenkins, K. Kalari, W. Lingle, G. Petersen, Z. Lou und L. Wang, „FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt,“ *Cancer Cell*, pp. 259-266, 2009.
- [143] S. Romano, S. Staibano, A. Greco, A. Brunetti, G. Nappo, G. Ilardi, R. Martinelli, A. Sorrentino, A. Di Pace, M. Mascolo, R. Bisogni, M. Scalvenzi, B. Alfano und M. Romano, „FK506 binding protein 51 positively regulates melanoma stemness and metastatic potential,“ *Cell Death and Disease*, p. 578, 2013.
- [144] E. Binder, D. Salyakina, P. Lichtner, G. Wochnik, M. Ising, B. Pütz, S. Papiol, S. Seaman, S. Lucae, M. Kohli, T. Nickel, H. Künzel, B. Fuchs, M. Majer, A. Pfennig, N. Kern, J. Brunner, S. Modell, T. Baghai, T. Deiml und P. Zill, „Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment,“ *Nat Genet*, pp. 1319-1325, Dezember 2004.

- [145] E. Tatro, T. Nguyen, C. Bousman, E. Masliah, I. Grant, J. Atkinson und I. Everall, „Correlation of major depressive disorder symptoms with FKBP5 but not FKBP4 expression in human immunodeficiency virus-infected individuals,“ *Journal of neurovirology*, pp. 399-404, Oktober 2010.
- [146] T. Tajiri, H. Matsumoto, A. Niimi, I. Ito, T. Oguma, H. Nakaji, H. Inoue, T. Iwata, T. Nagasaki, Y. Kanemitsu, G. Petrova und M. Mishima, „Association of Eosinophilic Inflammation with FKBP51 Expression in Sputum Cells in Asthma,“ *PLoS ONE*, p. 65284, 2013.
- [147] J. Siekierka, S. Hung, M. Poe, C. Lin und N. Sigal, „A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin,“ *Nature*, pp. 755-757, 1989.
- [148] C. Storer, C. Dickey, M. Galigniana, T. Rein und M. Cox, „FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease,“ *Trends Endocrinol Metab*, pp. 481-490, 2011.
- [149] C. Kozany, A. März, C. Kress und F. Hausch, „Fluorescent probes to characterise FK506-binding proteins,“ *ChemBioChem*, pp. 1402-1410, 2009.
- [150] T. Davies, Y. Ning und E. Sánchez, „A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins,“ *J Biol Chem*, pp. 4597-4600, 2002.
- [151] V. Assimon, D. Southworth und J. Gestwicki, „Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to heat shock protein 71 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation,“ *Biochemistry*, pp. 7120-7131, 2015.
- [152] J. Cheung-Flynn, V. Prapapanich, M. Cox, D. Riggs, C. Suarez-Quian und D. Smith, „Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling,“ *Mol Endocrinol*, pp. 1654-1666, 2005.
- [153] B. Dunyak und J. Gestwicki, „Peptidyl-Proline Isomerases (PPlases): Targets for Natural Products and Natural Product-Inspired Compounds,“ *J Med Chem*, pp. 9622-9644, 10 November 2016.
- [154] D. Harrison, R. Strong, Z. Sharp, J. Nelson, C. Astle, K. Flurkey, N. Nadon, J. Wilkinson, K. Frenkel, C. Carter, M. Pahor, M. Javors, E. Fernandez und R. Miller, „Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice,“ *Nature*, pp. 392-395, 2009.
- [155] J. Huang und B. Manning, „A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes,“ *Biochem Soc Trans*, pp. 217-222, 2009.
- [156] D. Ehninger, „From genes to cognition in tuberous sclerosis: implications for mTOR inhibitor-based treatment approaches,“ *Neuropharmacology*, pp. 97-105, 2013.
- [157] K. Inoki, Y. Li, T. Zhu, J. Wu und K. Guan, „TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling,“ *Nat Cell Biol*, pp. 648-657, 2002.

- [158] B. Manning, A. Tee, M. Logsdon, J. Blenis und L. Cantley, „Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway,“ *Mol Cell*, pp. 151-162, 2002.
- [159] C. Johannessen, E. Reczek, M. James, H. Brems, E. Legius und K. Cichowski, „The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 8573-8578, 2005.
- [160] L. Ma, Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und P. Pandolfi, „Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis,“ *Cell*, pp. 179-193, 2005.
- [161] K. Inoki, T. Zhu und K. Guan, „TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival,“ *Cell*, pp. 577-590, 2003.
- [162] E. Klann und T. Dever, „Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity,“ *Nat Rev Neurosci*, pp. 931-942, 2004.
- [163] M. Costa-Mattioli, N. Sonenberg und J. Richter, „Translational regulatory mechanisms in synaptic plasticity and memory storage,“ *Prog Mol Biol Transl Sci*, pp. 293-311, 2009.
- [164] D. Sarbassov, D. Guertin, S. Ali und D. Sabatini, „Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex,“ *Science*, pp. 1098-1101, 2005.
- [165] D. Sarbassov, S. Ali, S. Sengupta, J. Sheen, P. Hsu, A. Bagley, A. Markhard und D. Sabatini, „Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB,“ *Mol Cell*, pp. 159-168, 2006.
- [166] M. Leslie, „Biomedicine a putative antiaging drug takes a step from mice to men,“ *Science*, p. 789, 2013.
- [167] D. Ehninger, F. Neff und K. Xie, „Longevity, aging and rapamycin,“ *Cell Mol Life Sci*, pp. 4325-4346, 2014.
- [168] T. Kino, H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki und H. Imanaka, „FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics,“ *J Antibiot (Tokyo)*, pp. 1249-1255, 1987.
- [169] J. Pattison und A. Krensky, „New insights into mechanisms of allograft rejection,“ *Am J Med Sci*, pp. 257-263, 1997.
- [170] C. Li und L. Li, „Tacrolimus in preventing transplant rejection in Chinese patients - optimizing use,“ *Dove Press journal, Drug Design, Development and Therapy*, pp. 473-485, 2015.
- [171] E. Binder, „The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders,“ *Psychoneuroendocrinology*, pp. 186-195, Dezember 2009.

- [172] J. Cheung-Flynn, P. Roberts, D. Riggs und D. Smith, „C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90,“ *J Biol Chem*, pp. 17388-17394, 2003.
- [173] G. Wochnik, J. Rüegg, G. Abel, U. Schmidt, F. Holsboer und T. Rein, „FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells,“ *J Biol Chem*, pp. 4609-4616, 2005.
- [174] D. Riggs, P. Roberts, S. Chirillo, J. Cheung-Flynn, V. Prapapanich, T. Ratajczak, R. Gaber, D. Picard und D. Smith, „The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo,“ *EMBO J*, pp. 1158-1167, 2003.
- [175] R. Hay, „SUMO: a history of modification,“ *Mol Cell*, pp. 1-12, 2005.
- [176] R. Geiss-Friedlander und F. Melchior, „Concepts in sumoylation: a decade on,“ *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 947-956, 2007.
- [177] M. Antunica-Noguerol, M. Budzinski, J. Druker, N. Gassen, M. Sokn, S. Senin, F. Aprile-Garcia, F. Holsboer, T. Rein, A. Liberman und E. Arzt, „The activity of the glucocorticoid receptor is regulated by SUMO conjugation to FKBP51,“ *Cell Death and Differentiation*, pp. 1579-1591, 2016.
- [178] W. Pratt, M. Galigniana, J. Harrell und D. DeFranco, „Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement,“ *Cell Signal*, pp. 857-872, 2004.
- [179] J. Schülke, G. Wochnik, I. Lang-Rollin, N. Gassen, R. Knapp, B. Berning, A. Yassouridis und T. Rein, „Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors,“ *PLoS ONE*, p. 11717, 2010.
- [180] C. Scheufler, A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. Hartl und I. Moarefi, „Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine,“ *Cell*, pp. 199-210, 2000.
- [181] J. Soroka, S. Wandinger, N. Mäusbacher, T. Schreiber, K. Richter, H. Daub und J. Buchner, „Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation,“ *Mol Cell*, pp. 517-528, 2012.
- [182] S. Wandinger, M. Suhre, H. Wegele und J. Buchner, „The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90,“ *EMBO J*, pp. 367-376, 2006.
- [183] T. J. Hinds, L. Stechschulte, H. Cash, D. Whisler, A. Banerjee, W. Youg, S. Khuder, M. Kaw, W. Shou, N. S.M. und E. Sanchez, „Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma),“ *J Biol Chem*, pp. 42911-42922, 2011.
- [184] J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Bärlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. Mihatsch, G. Sauter und O. Kallioniemi, „Tissue microarrays for high-throughput molecular

- profiling of tumor specimens," *Nat Med*, pp. 844-847, 1998.
- [185] J. Eckel-Passow, C. Lohse, Y. Sheinin, P. Crispen, C. Krco und E. Kwon, „Tissue microarrays: one size does not fit all," *Diagnostic Pathology*, p. 48, 2010.
- [186] O. Kallioniemi, U. Wagner, J. Kononen und G. Sauter, „Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer," *Human Molecular Genetics*, Bd. 10, Nr. 7, pp. 657-662, 2001.
- [187] L. Bubendorf, A. Nocito, H. Moch und G. Sauter, „Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies," *J Pathol*, pp. 72-79, 2001.
- [188] J. Packeisen, E. Korsching, H. Herbst, W. Boecker und H. Buerger, „Demystified . . . Tissue microarray technology," *J Clin Pathol: Mol Pathol*, pp. 198-204, 2003.
- [189] S. McNulty, C. Colaco, L. Blandford, C. Bailey, S. Baschieri und S. Todryk, „Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines - getting warmer," *Immunology*, pp. 407-415, 2013.
- [190] M. Tsan und B. Gao, „Heat shock proteins and immune system," *J Leukoc Biol*, pp. 905-910, 2009.
- [191] E. Chung, Y. Jeong, M. Lee, Y. L. S. Kim, S. Cho, W. Lee, M. Park und J. Ju, „Heat shock proteins 70 and 90 from *Clonorchis sinensis* induce Th1 response and stimulate antibody production," *Parasites & Vectors*, p. 118, 2017.
- [192] L. Pearl, „Hsp90 and Cdc37 - a chaperone cancer conspiracy," *Current opinion in genetics & development*, pp. 55-61, 2005.
- [193] Z. Horejsí, H. Takai, C. Adelman, S. Collis, H. Flynn, S. Maslen, J. Skehel, T. de Lange und S. Boulton, „CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability," *Molecular cell*, pp. 839-850, 2010.
- [194] H. Takai, Y. Xie, T. de Lange und N. Pavletich, „Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes," *Genes & development*, pp. 2019-2030, 2010.
- [195] W. Pratt, Y. Morishima, M. Murphy und M. Harrell, „Chaperoning of glucocorticoid receptors," *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 111-138, 2006.
- [196] W. Pratt, „The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors," *Proc Soc Exp Biol Med*, pp. 420-434, 1998.
- [197] M. Ammirate, A. Rosati, A. Gentilella, M. Festa, A. Petrella, L. Marzullo, M. Pascale, M. Belisario, A. Leone und M. Turco, „The activity of hsp90 alpha promotor is regulated by NF-kappa B transcription factors," *Oncogene*, pp. 1175-1178, 2008.
- [198] I. Grad, C. Cederroth, J. Walicki, C. Grey, S. Barluenga, N. Winssinger, B. De Massy, S. Nef und D. Picard, „The molecular chaperone Hsp90alpha is required for meiotic progression of

- spermatocytes beyond pachytene in the mouse," *PLoS one*, p. 15770, 2010.
- [199] A. Voss, T. Thomas und P. Gruss, „Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth," *Development*, pp. 1-11, 2000.
- [200] C. Prodromou, „Mechanisms of Hsp90 regulation," *Biochem J*, pp. 2439-2452, 2016.
- [201] C. Schiene-Fischer und C. Yu, „Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases," *FEBS Lett*, pp. 1-6, 2001.
- [202] A. Zannas, T. Wiechmann, N. Gassen und E. Binder, „Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications," *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, pp. 261-274, 2016.
- [203] G. Mazaira, M. Camisay, S. De Leo, A. Erlejman und M. Galigniana, „Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment," *Int J Cancer*, pp. 797-808, 2016.
- [204] S. Schmidt, J. Rainer, C. Ploner, E. Presul, S. Riml und R. Kofler, „Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance," *Cell Death Differ*, pp. 45-55, 2004.
- [205] I. Petta, L. Dejager, M. Ballegeer, S. Lievens, J. Tavernier, K. De Bosscher und C. Libert, „The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases," *Microbiol Mol Biol Rev*, pp. 495-522, 2016.
- [206] L. Tacon, P. Soon, A. Gill, A. Chou, A. Clarkson, J. Botling, P. Stalberg, B. Skogseid, B. Robinson, S. Sidhu und R. Clifton-Bligh, „The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors," *J Clin Endocrinol Metab*, pp. 4591-4599, November 2009.
- [207] C. Siebert, D. Ciato, M. Murakami, J. Monteserin-Garcia, S. Nölting, J. Maurer, A. Feuchtinger, A. Walch, H. Haak, J. Bertherat, M. Mannelli, M. Fassnacht, E. Korpershoek, M. Reincke, G. Stalla, C. Hantel und F. Beuschlein, „Heat Shock Protein 90 as a Prognostic Marker and Therapeutic Target for Adrenocortical Carcinoma," *Frontiers in Endocrinology*, Bd. 10, 19 Juli 2019.
- [208] T. Else, A. Kim, A. Sabolch, V. Raymond, A. Kandathil, E. Caoili, S. Jolly, B. Miller, T. Giordano und G. Hammer, „Adrenocortical carcinoma," *Endocr Rev*, pp. 282-326, 2014.
- [209] K. Basham, H. Hung, A. Lerario und G. Hammer, „Mouse models of adrenocortical tumors," *Mol Cell Endocrinol*, pp. 82-97, 5 Februar 2016.
- [210] R. Kloos, M. Gross, I. Francis, M. Korobkin und B. Shapiro, „Incidentally discovered adrenal masses," *Endocrine Reviews*, pp. 460-484, 1995.
- [211] G. Thompson und W. Young, „Adrenal incidentaloma," *Current Opinion in Oncology*, pp. 84-90,

2003.

- [212] J. Bezerra und A. Latronico, „MicroRNA Era: The Importance for Diagnosis and Prognosis of Adrenocortical Tumors,“ *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, p. 6 Seiten, 2014.
- [213] G. Arnaldi und M. Boscaro, „Adrenal incidentaloma,“ *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, pp. 405-419, 2012.
- [214] L. Nieman, „Approach to the patient with an adrenal incidentaloma,“ *J Clin Endocrinol Metab*, pp. 4106-4113, 2010.
- [215] E. Cyranska-Chyrek, M. Grzymislawska und M. Ruchala, „Diagnostic pitfalls of adrenal incidentaloma,“ *Endokrynologia Polska*, pp. 360-377, 2017.
- [216] E. Kebebew, E. Reiff, Q. Duh, O. Clark und A. McMillan, „Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: Have we made progress?,“ *World Journal of Surgery*, pp. 872-878, 2006.
- [217] S. Golden, K. Robinson, I. Saldanha, B. Anton und P. Ladenson, „Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review,“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 1853-1878, 2009.
- [218] M. Fassnacht, M. Kroiss und B. Allolio, „Update in adrenocortical carcinoma,“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 4551-4564, 2013.
- [219] T. Kerkhofs, R. Verhoeven, J. Van der Zwan, J. Dieleman, M. Kerstens, T. Links, L. Van de Poll-Franse und H. Haak, „Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993,“ *European Journal of Cancer*, pp. 2579-2586, 2013.
- [220] S. Creemers, L. Hofland, E. Korpershoek, G. Franssen, F. van Kemenade, W. de Herder und R. Feelders, „Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma,“ *Endocrine-Related Cancer*, pp. 43-69, 2016.
- [221] S. Faillot und G. Assie, „ENDOCRINE TUMOURS: The genomics of adrenocortical tumors,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 249-265, 2016.
- [222] M. Fassnacht, S. Johanssen, M. Quinkler, P. Bucskey, H. Willenberg, F. Beuschlein, M. Terzolo, H. Mueller, S. Hahner, B. Allolio, G. A. C. R. Group und E. N. f. t. S. o. A. Tumors, „Limited Prognostic Value of the 2004 International Union Against Cancer Staging Classification for Adrenocortical Carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification,“ *Cancer*, pp. 243-250, 15 Januar 2009.
- [223] K. Aaltonen, C. Ahlin, R. Amini, L. Salonen, M. Fjällskog, P. Heikkilä, H. Nevanlinna und C. Blomqvist, „Reliability of cyclin A assessment on tissue microarrays in breast cancer compared to conventional histological slides,“ *Br J Cancer*, pp. 1697-1702, 2006.

- [224] L. Abenavoli, N. Milic und M. Beaugrand, „Severe hepatitis induced by cyproterone acetate: role of corticosteroids. A case report,“ *Annals of Hepatology*, pp. 152-155, Januar-Februar 2013.
- [225] C. Anacker, K. O'Donnell und M. Meaney, „Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function,“ *Dialogues in Clinical Neuroscience*, Bd. 16, Nr. 3, 2014.
- [226] V. Anisimov, M. Zabezhinski, I. Popovich, T. Piskunova, A. Semenchenko, M. Tyndyk, M. Yurova, S. Rosenfeld und M. Blagosklonny, „Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice,“ *Cell Cycle*, pp. 4230-4236, 2011.
- [227] A. Banerjee, S. Periyasamy, I. Wolf, T. J. Hinds, W. Yong, W. Shou und E. Sanchez, „Control of glucocorticoid and progesterone receptor subcellular localization by the ligand-binding domain is mediated by distinct interactions with tetratricopeptide repeat proteins,“ *Biochemistry*, pp. 10471-10480, 2008.
- [228] P. Barnes, „Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease,“ *J Allergy Clin Immunol*, pp. 636-645, 2013.
- [229] X. Bertegna, C. Bertegna, J. Luton, J. Husson und F. Girard, „The new steroid analog RU 486 inhibits glucocorticoid action in man,“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 25-28, 1984.
- [230] L. Bevilacqua, V. Carli, M. Sarchiapone, D. George, D. Goldman, A. Roy und M. Enoch, „Interaction between FKBP5 and childhood trauma and risk of aggressive behavior,“ *Archives of general psychiatry*, pp. 62-70, Januar 2012.
- [231] B. Biller, A. Grossman, P. Stewart, S. Melmed, X. Bertagna, J. Bertherat, M. Buchfelder, A. Colao, A. Hermus, L. Hofland, A. Klibanski, A. Lacroix, J. Lindsay, J. Newell-Price, L. Nieman, S. Petersenn, N. Sonino und G. Stalla, „Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement,“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, pp. 2454-2456, 2008.
- [232] M. Blagosklonny, „An anti-aging drug today: from senescence-promoting genes to anti-aging pill,“ *Drug Discov Today*, pp. 218-224, 2007.
- [233] J. Brahm, M. Brahm, R. Segovia, R. Latorre, R. Zapata, J. Poniachik, E. Buckel und L. Contreras, „Acute and fulminant hepatitis induced by flutamide: case series report and review of the literature,“ *Ann Hepatol*, pp. 93-98, 2011.
- [234] D. Brent, N. Melhem, R. Ferrell, G. Emslie, K. Wagner, N. Ryan, B. Vitiello, B. Birmaher, T. Mayes, J. Zelazny, M. Onorato, B. Devlin, G. Clarke, L. DeBar und M. Keller, „Association of FKBP5 polymorphisms with suicidal events in the Treatment of Resistant Depression in Adolescents (TORDIA) study,“ *The American journal of psychiatry*, pp. 190-197, Februar 2010.
- [235] J. Brognard, E. Sierecki, T. Gao und A. Newton, „PHLPP and a second isoform, PHLPP2,

- differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms," *Mol Cell*, pp. 917-931, 2007.
- [236] R. Camp, L. Charette und D. Rimm, „Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma," *Lab Invest*, pp. 1943-1949, 2000.
- [237] C. Chen, Y. Liu, Y. Liu und P. Zheng, „mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells," *Sci Signal*, p. ra 75, 2009.
- [238] M. Chen, A. Silverstein, W. Pratt und M. Chinkers, „The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant," *J Biol Chem*, pp. 32315-32320, 1996.
- [239] G. Chrousos und T. Kino, „Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic," *Sci STKE*, p. pe48, 2005.
- [240] A. Clark und M. Belvisi, „Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor," *Pharmacol Ther*, pp. 54-67, 4 Januar 2012.
- [241] H. De Jonge, H. de Loor, K. Verbeke, Y. Vanrenterghem und D. Kuypers, „In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients," *Clin Pharmacol Ther*, pp. 366-375, 2012.
- [242] W. Denny, D. Valentine, P. Reynolds, D. Smith und J. Scammell, „Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding," *Endocrinology*, pp. 4107-4113, 2000.
- [243] A. Duina, J. Marsh, R. Kurtz, H. Chang, S. Lindquist und R. Gaber, „The peptidyl-prolyl isomerase domain of the CyP-40 cyclophilin homolog Cpr7 is not required to support growth or glucocorticoid receptor activity in *Saccharomyces cerevisiae*," *J Biol Chem*, pp. 10819-10822, 1998.
- [244] D. Ehninger und A. Silva, „Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and autism spectrum disorders," *Trends Mol Med*, pp. 78-87, 2011.
- [245] B. Fan, D. Wang, C. Tham, D. Lam und C. Pang, „Gene expression profiles of human trabecular meshwork cells induced by triamcinolone and dexamethasone," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, pp. 1886-1897, 2008.
- [246] A. Finka und P. Goloubinoff, „Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis," *Cell Stress Chaperones*, pp. 591-605, 2013.
- [247] I. Földesi, G. Falkay und L. Kovács, „Determination of RU 486 (mifepristone) in blood by radioreceptorassay; a pharmacokinetic study," *Contraception*, pp. 27-32, 1996.
- [248] G. Fons, S. Hasibuan, J. van der Velden und F. ten Kate, „Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium," *J Clin Pathol*, pp. 500-503, 2007.

- [249] B. Freeman, S. Felts, D. Toft und K. Yamamoto, „The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies,” *Genes Dev*, pp. 422-434, 2000.
- [250] B. Freeman und K. Yamamoto, „Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones,” *Science*, pp. 2232-2235, 2002.
- [251] G. Fries, N. Gassen und T. Rein, „The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease,” *Int J Mol Sci*, p. 2614, 2017.
- [252] F. Fung und Y. Linn, „Steroids in traditional Chinese medicine: what is the evidence,” *Singapore Med J*, pp. 115-120, März 2017.
- [253] R. Galhardo, P. Hastings und S. Rosenberg, „Mutation as a stress response and the regulation of evolvability,” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, pp. 399-435, 2007.
- [254] M. Galigniana, C. Radanyi, J. Renoir, P. Housley und W. Pratt, „Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus,” *J Biol Chem*, pp. 14884-14889, 2001.
- [255] T. Gao, F. Furnari und A. Newton, „PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth,” *Mol Cell*, pp. 13-24, 2005.
- [256] D. Gewirth, „Paralog specific Hsp90 Inhibitors - a brief history and a bright future,” *Curr Top Med Chem*, pp. 2779-2791, 2016.
- [257] P. Gold und G. Chrousos, „Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states,” *Mol Psychiatry*, pp. 254-275, 2002.
- [258] I. Grad, T. McKee, S. Ludwig, G. Hoyle, P. Ruiz, W. Wurst, T. Floss, C. 3. Miller und D. Picard, „The Hsp90 cochaperone p23 is essential for perinatal survival,” *Mol Cell Biol*, pp. 8976-8983, 2006.
- [259] M. Hager, C. Kolbitsch, W. Tiefenthaler, H. Haufe, R. Kemmerling und P. Lucia Moser, „Tissue microarrays from renal cell tumors: exclusion criteria and rate of exclusion,” *Scand J Urol Nephrol*, pp. 485-489, 2007.
- [260] D. Hapangama und J. Neilson, „Mifepristone for induction of labour,” *Cochrane Database Syst Rev*, p. CD002865, 2009.
- [261] A. Harst, H. Lin und W. Obermann, „Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation,” *Biochem J*, pp. 789-796, 2005.
- [262] O. Heikinheimo, K. Kontula, H. Croxatto, I. Spitz, T. Luukkainen und P. Lähteenmäki, „Plasma concentrations and receptor binding of RU 486 and its metabolites in humans,” *Journal of*

Steroid Biochemistry, pp. 279-284, 1987.

- [263] O. Heikinheimo, „Clinical pharmacokinetics of mifepristone,“ *Clinical Pharmacokinetics*, pp. 7-17, 1997.
- [264] K. Hutchison, L. Stancato, J. Owens-Grillo, J. Johnson, P. Krishna, D. Toft und W. Pratt, „The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90,“ *J Biol Chem*, pp. 18841-18847, 1995.
- [265] D. Jarosz, M. Taipale und S. Lindquist, „Protein homeostasis and the phenotypic manifestation of genetic diversity: principles and mechanisms,“ *Annual review of genetics*, pp. 189-216, 2010.
- [266] T. Jääskeläinen, H. Makkonen und J. Palvimo, „Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling,“ *Current opinion in pharmacology*, pp. 326-331, 11 August 2011.
- [267] S. Johanssen und B. Allolio, „Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 561-569, 2007.
- [268] J. Johnson, „Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins,“ *Biochemica et Biophysica Acta*, pp. 607-613, 2012.
- [269] R. Johnson, H. Kreis, R. Oberbauer, C. Brattström, K. Claesson und J. Eris, „Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure,“ *Transplantation*, pp. 777-786, 2001.
- [270] Journal of Pathology, *J Pathol*, pp. 22-3417, 2002.
- [271] S. Kacar, M. Akdogan, Y. Kosar, E. Parlak, N. Sasmaz, P. Oguz und G. Aydog, „Estrogen and cyproterone acetate combination-induced autoimmune hepatitis,“ *J Clin Gastroenterol*, pp. 98-100, 2002.
- [272] M. Kaeberlein, „Rapamycin and aging: When, for how long, and how much?,“ *J Genet Genomics*, pp. 459-463, 20 September 2014.
- [273] B. Kaplan, T. Srinivas und H. Meier-Kriesche, „Factors associated with long-term renal allograft survival,“ *Ther Drug Monit*, pp. 36-39, 2002.
- [274] K. Kaplan und R. Li, „A prescription for 'stress' - the role of Hsp90 in genome stability and cellular adaption,“ *Trends Cell Biol*, pp. 576-583, November 2012.
- [275] R. Kekkonen, O. Heikinheimo, E. Mandelin und P. Lähteenmäki, „Pharmacokinetics of mifepristone after low oral doses,“ *Contraception*, pp. 229-234, 1996.
- [276] L. Kettel, „Clinical applications of the antiprogestins,“ *Clinical Obstetrics and Gynecology*, pp. 921-934, 1995.

- [277] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet und K. Guan, „AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1,“ *Nat Cell Biol*, pp. 132-141, 2011.
- [278] N. Knops, E. Levtschenko, B. van den Heuvel und D. Kuypers, „From gut to kidney: transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation,“ *Int J Pharm*, pp. 14-35, 2013.
- [279] K. Koenen, G. Saxe, S. Purcell, J. Smoller, D. Bartholomew, A. Miller, E. Hall, J. Kaplow, M. Bosquet, S. Moulton und C. Baldwin, „Polymorphisms in FKBP5 are associated with peritraumatic dissociation in medically injured children,“ *Molecular psychiatry*, pp. 1058-1059, Dezember 2005.
- [280] S. Koide, „Mifepristone. Auxiliary therapeutic use in cancer and related disorders,“ *Journal of Reproductive Medicine*, pp. 551-560, 1998.
- [281] J. 3. J. U. Koren, Z. Davey, J. Kiray, K. Arulselvam und C. Dickey, „Bending tau into shape: the emerging role of peptidyl prolylisomerases in tauopathies,“ *Mol Neurobiol*, pp. 65-70, August 2011.
- [282] F. Kraemer, W. Shen und S. Azhar, „SNAREs and Cholesterol Movement for Steroidogenesis,“ *Mol Cell Endocrinol*, pp. 17-21, 5 Februar 2017.
- [283] A. Laenger, I. Lang-Rollin, C. Kozany, J. Zschocke, N. Zimmermann, J. Rüegg, F. Holsboer, F. Hausch und T. Rein, „XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells,“ *FEBS Lett*, pp. 1493-1498, 2009.
- [284] P. Lähteenmäki, O. Heikinheimo, H. Croxatto, I. Spitz, D. Shoupe, L. Birgersson und T. Luukkainen, „Pharmacokinetics and metabolism of RU 486,“ *Journal of Steroid Biochemistry*, pp. 859-863, 1987.
- [285] H. Lévesque, C. Trivalle, N. Manchon, J. Vinel, N. Moore, J. Hémet, H. Courtois, E. Bercoff und J. Bourreille, „Fulminant hepatitis due to cyproterone acetate,“ *Lancet*, pp. 215-216, 1989.
- [286] G. Lotz, H. Lin, A. Harst und W. Obermann, „Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone,“ *J Biol Chem*, pp. 17228-17235, 2003.
- [287] S. Lupien, B. McEwen, M. Gunnar und C. Heim, „Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition,“ *Nat Rev Neurosci*, pp. 434-445, Juni 2009.
- [288] J. Marsh, H. Kalton und R. Gaber, „Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in *cpr7Delta* cells,“ *Mol Cell Biol*, pp. 7353-7359, 1998.
- [289] H. McKeen, K. McAlpine, A. Valentine, D. Quinn, K. McClelland, C. Byrne, M. O'Rourke, S. Young, C. Scott, H. McCarthy, D. Hirst und T. Robson, „A novel FK506-like binding protein interacts with the glucocorticoid receptor and regulates steroid receptor signaling,“

Endocrinology, pp. 5724-5734, 2008.

- [290] R. Miller, D. Harrison, C. Astle, J. Baur, A. Boyd, R. de Cabo, E. Fernandez, K. Flurkey, M. Javors, J. Nelson, C. Orihuela, S. Pletcher, Z. Sharp, D. Sinclair, J. Starnes, J. Wilkinson, N. Nadon und R. Strong, „Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice,“ *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, pp. 191-201, 2011.
- [291] R. Miller, D. Harrison, C. Astle, E. Fernandez, K. Flurkey, M. Han, M. Javors, X. Li, N. Nadon, J. Nelson, S. Pletcher, A. Salmon, Z. Sharp, S. Van Roekel, L. Winkleman und R. Strong, „Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex-dependent and appears metabolically distinct from dietary restriction,“ *Aging Cell*, pp. 468-477, Juni 2014.
- [292] H. Moch, T. Kononen, O. Kallioniemi und G. Sauter, „Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology,“ *Adv Anat Pathol*, pp. 14-20, 2001.
- [293] C. Montagut, S. Sharma, T. Shioda, U. McDermott, M. Ulman, L. Ulkus, D. Dias-Santagata, H. Stubbs, D. Lee, A. Singh, L. Drew, D. Haber und J. Settleman, „Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma,“ *Cancer Res*, pp. 4853-4861, 2008.
- [294] R. Morimoto, „Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging,“ *Genes & development*, pp. 1427-1438, 2008.
- [295] B. Nankivell, R. Borrows, C. Fung, P. O'Connell, R. Allen und J. Chapman, „The natural history of chronic allograft nephropathy,“ *N Engl J Med*, pp. 2326-2333, 2003.
- [296] A. Nehmé, E. Lobenhofer, W. Stamer und J. Edelman, „Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells,“ *BMC Med Genomics*, p. 58, 2009.
- [297] N. Nicolaides, E. Charmandari, G. Chrousos und T. Kino, „Circadian endocrine rhythms: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its actions,“ *Ann N Y Acad Sci*, pp. 71-80, Mai 2014.
- [298] N. Nicolaides, E. Charmandari, G. Chrousos und T. Kino, „Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor,“ *BMC Endocrine Disorders*, p. 71, 2014.
- [299] F. Oberhammer, P. Nagy, R. Tiefenbacher, G. Fröschl, B. Bouzahzah, S. Thorgeirsson und B. Carr, „The antiandrogen cyproterone acetate induces synthesis of transforming growth factor beta 1 in the parenchymal cells of the liver accompanied by an enhanced sensitivity to undergo apoptosis and necrosis without inflammation,“ *Hepatology*, pp. 329-337, 1996.
- [300] J. 3. O'Leary, B. Zhang, J. 3. Koren, L. Blair und C. Dickey, „The role of FKBP5 in mood disorders: Action of FKBP5 on steroid hormone receptors leads to questions about its evolutionary importance,“ *CNS Neurol Disord Drug Targets*, pp. 1157-1162, Dezember 2013.

- [301] S. Olshansky, D. Perry, R. Miller und R. Butler, „In pursuit of the longevity dividend,“ *Scientist*, pp. 28-35, 2006.
- [302] B. Panaretou, G. Siligardi, P. Meyer, A. Maloney, J. Sullivan, S. Singh, S. Millson, P. Clarke, S. Naaby-Hansen, R. Stein, R. Cramer, M. Mollapour, P. Workman, P. Piper, L. Pearl und C. Prodromou, „Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1,“ *Mol Cell*, pp. 1307-1318, 2002.
- [303] I. Pashtan, S. Tsutsumi, S. Wang, W. Xu und L. Neckers, „Targeting Hsp90 prevents escape of breast cancer cells from tyrosine kinase inhibition,“ *Cell Cycle*, pp. 2936-2941, 2008.
- [304] S. Paul und S. Mahanta, „Association of heat-shock proteins in various neurodegenerative disorders: is it a master key to open the therapeutic door?,“ *Molecular and Cellular Biochemistry*, pp. 45-61, 2014.
- [305] K. Pazdrak, C. Straub, R. Maroto, S. Stafford, W. White, W. Calhoun und A. Kurosky, „Cytokine-Induced Glucocorticoid Resistance from Eosinophil Activation: Protein Phosphatase 5 Modulation of Glucocorticoid Receptor Phosphorylation and Signaling,“ *J Immunol*, pp. 3782-3791, 2016.
- [306] S. Petersenn, A. Beckers, D. Ferone, A. van der Lely, J. Bollerslev, M. Boscaro, T. Brue, P. Bruzzi, F. Casanueva, P. Chanson, A. Colao, M. Reincke, G. Stalla und S. Tsagarakis, „Outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to define remission and recurrence,“ *European Journal of Endocrinology*, pp. 227-239, 2015.
- [307] D. Picard, „Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation,“ *Cell Mol Life Sci*, pp. 1640-1648, 2002.
- [308] M. Posadas Salas und T. Srinivas, „Update on the clinical utility of once-daily tacrolimus in the management of transplantation,“ *Drug Des Devel Ther*, pp. 1183-1194, 1 September 2014.
- [309] T. Ratajczak, B. Ward und R. Minchin, „Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling,“ *Curr Top Med Chem*, pp. 1348-1357, 2003.
- [310] T. Reddy, J. Gertz, G. Crawford, M. Garabedian und R. Myers, „The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes,“ *Mol Cell Biol*, pp. 3756-3767, 18 Juli 2012.
- [311] M. Riebold, C. Kozany, L. Freiburger, M. Sattler, M. Buchfelder, F. Hausch, G. Stalla und M. Paez-Pereda, „A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease,“ *Nature Medicine*, Bd. 21, pp. 276-280, 2015.
- [312] D. Riggs, M. Cox, H. Tardif, M. Hessling, J. Buchner und D. Smith, „Noncatalytic role of the FKBP52 peptidyl-prolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling,“ *Mol Cell Biol*, pp. 8658-8669, 2007.

- [313] S. Romano, A. Sorrentino, A. Di Pace, G. Nappo, C. Mercogliano und M. Romano, „The Emerging Role of Large Immunophilin FK506 Binding Protein 51 in Cancer,“ *Current Medicinal Chemistry*, pp. 5424-5429, 2011.
- [314] A. Roy, E. Gorodetsky, Q. Yuan, D. Goldman und M. Enoch, „Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide,“ *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, pp. 1674-1683, Juli 2010.
- [315] A. Roy, C. Hodgkinson, V. DeLuca, D. Goldman und M. Enoch, „Two HPA axis genes, CRHBP and FKBP5, interact with childhood trauma to increase the risk for suicidal behavior,“ *Journal of psychiatric research*, pp. 72-79, Januar 2012.
- [316] M. Rubin, R. Dunn, M. Strawderman und K. Pienta, „Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis,“ *Am J Surg Pathol*, pp. 312-319, 2002.
- [317] S. Rutherford und S. Lindquist, „Hsp90 as a capacitor for morphological evolution,“ *Nature*, pp. 336-342, 1998.
- [318] P. Sahasrabudhe, J. Rohrberg, M. Biebl, D. Rutz und J. Buchner, „The Plasticity of the Hsp90 Co-chaperone System,“ *Mol Cell*, pp. 947-961, 2017.
- [319] M. Salas und T. Srinivas, „Update on the clinical utility of once-daily tacrolimus in the management of transplantation,“ *Dove Press journal, Drug Design, Development and Therapy*, pp. 1183-1194, 2014.
- [320] M. Salvadori und E. Bertoni, „Is it time to give up with calcineurin inhibitors in kidney transplantation?,“ *World J Transplant*, pp. 7-25, 2013.
- [321] T. Sangster, S. Lindquist und C. Queitsch, „Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance,“ *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, pp. 348-362, 2004.
- [322] I. Savidou, M. Deutsch, A. Soultati, D. Koudouras, G. Kafiri und S. Dourakis, „Hepatotoxicity induced by cyproterone acetate: A report of three cases,“ *World J Gastroenterol*, pp. 7551-7555, 14 Dezember 2006.
- [323] J. Seckl, „11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action,“ *Curr Opin Pharmacol*, pp. 597-602, 2004.
- [324] D. Selkoe und D. Schenk, „Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics,“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 545-584, 2003.
- [325] N. Shibuya, A. Suzuki, R. Sadahiro, M. Kamata, Y. Matsumoto, K. Goto, Y. Hozumi und K. Otani, „Association study between a functional polymorphism of FK506-binding protein 51 (FKBP5) gene and personality traits in healthy subjects,“ *Neuroscience letters*, pp. 194-197, 26 November 2010.

- [326] F. Shihab, U. Christians, L. Smith, J. Wellen und B. Kaplan, „Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: Pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes,“ *Transplant Immunology*, pp. 22-32, 2014.
- [327] T. Shimamura, D. Li, H. Ji, H. Haringsma, E. Liniker, C. Borgman, A. Lowell, Y. Minami, K. McNamara, S. Perera, S. Zaghlul, R. Thomas, H. Greulich, S. Kobayashi, L. Chirieac, R. Padera, S. Kubo, M. Takahashi und D. Tenen, „Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance,“ *Cancer Res*, pp. 5827-5838, 2008.
- [328] M. Starkman und D. Schteingart, „Schork MAdepressed mood and other psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: relationship to hormone levels,“ *Psychosom Med*, pp. 3-18, Februar 1981.
- [329] C. Stetler und G. Miller, „Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research,“ *Psychosom Med*, pp. 114-126, Februar-März 2011.
- [330] I. Supriyanto, T. Sasada, M. Fukutake, M. Asano, Y. Ueno, Y. Nagasaki, O. Shirakawa und A. Hishimoto, „Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population,“ *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, pp. 252-256, 15 Januar 2011.
- [331] J. Tan, „New Developments in Hormonal Therapy for Acne,“ *SkinTherapyLetter*, 15 Dezember 2015.
- [332] M. Tesic, J. Marsh, S. Cullinan und R. Gaber, „Functional interactions between Hsp90 and the co-chaperones Cns1 and Cpr7 in *Saccharomyces cerevisiae*,“ *J Biol Chem*, pp. 32692-32701, 2003.
- [333] Z. Thole, G. Masno, E. Salgueiro, P. Revuelta und A. Hidalgo, „Hepatotoxicity induced by antiandrogens: a review of the literature,“ *Urol Int*, pp. 289-295, 2004.
- [334] R. Tian, „Another role for the celebrity: Akt and insulin resistance,“ *Circ Res*, pp. 139-140, 2005.
- [335] N. Tritos, B. Biller und B. Swearingen, „Management of Cushing disease,“ *Nature Reviews Endocrinology*, Bd. 7, pp. 279-289, 2011.
- [336] A. Ulmann, G. Teutsch und D. Philibert, „RU 486,“ *Scientific American*, pp. 42-48, 1990.
- [337] A. Van der Lely, K. Foeken, R. van der Mast und S. Lamberts, „Rapid reversal of acute psychosis in the Cushing syndrome with the cortisol-receptor antagonist mifepristone (RU 486),“ *Annals of Internal Medicine*, pp. 143-144, 1991.
- [338] S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann und C. Libert, „New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation,“ *Endocrinology*, pp. 993-1007, 2013.

- [339] L. Varricchio, E. Masselli, E. Alfani, A. Battistini, G. Migliaccio, A. Vannucchi, W. Zhang, D. Rondelli, J. Godbold, B. Ghinassi, C. Whitsett, R. Hoffman und A. Migliaccio, „The dominant negative beta isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients,” *Blood*, pp. 425-436, 2011.
- [340] P. Wallemacq, V. Furlan, A. Möller, A. Schäfer, P. Stadler, I. Firdaous, A. Taburet, R. Reding, S. Clement De Clety, J. De Ville De Goyet, E. Sokal, L. Lykavieris, V. Van Leeuw, O. Bernard, J. Otte und N. Undre, „Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients,” *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, pp. 367-370, 1998.
- [341] S. Wang, I. Pashtan, S. Tsutsumi, W. Xu und L. Neckers, „Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors,” *Cell Cycle*, pp. 2050-2056, 2009.
- [342] G. Wiederrecht, S. Hung, H. Chan, A. Marcy, M. Martin, J. Calaycay, D. Boulton, N. Sigal, R. Kincaid und J. Siekierka, „Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506 protein as well as a protein complex,” *J Biol Chem*, pp. 21753-21760, 1992.
- [343] V. Willour, H. Chen, J. Toolan, P. Belmonte, D. Cutler, F. Goes, P. Zandi, R. Lee, D. MacKinnon, F. Mondimore, B. Schweizer, B. D. P. Group, N. G. I. B. D. Consortium und J. J. DePaulo, „Family-based association of FKBP5 in bipolar disorder,” *Molecular psychiatry*, pp. 261-268, März 2009.
- [344] G. Wochnik, J. Young, U. Schmidt, F. Holsboer, F. Hartl und T. Rein, „Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90,” *FEBS Lett*, pp. 35-38, 2004.
- [345] P. Xie, H. Kranzler, J. Poling, M. Stein, R. Anton, L. Farrer und J. Gelernter, „Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder,” *Neuropsychopharmacology*, pp. 1684-1692, Juli 2010.
- [346] N. Yang, D. Ray und L. Matthews, „Current concepts in glucocorticoid resistance,” *Steroids*, pp. 1041-1049, 2012.
- [347] L. Zhao, R. Li und Y. Gan, „Knockdown of Yin Yang 1 enhances anticancer effects of cisplatin through protein phosphatase 2A-mediated T308 dephosphorylation of AKT,” *Cell Death Dis*, Bd. 9, Nr. 7, p. 747, Juli 2018.
- [348] X. Zheng, Y. Liang, Q. He, R. Yao, W. Bao, L. Bao, Y. Wang und Z. Wang, „Current Models of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Activation by Growth Factors and Amino Acids,” *Int J Mol Sci*, Bd. 15, pp. 20753-20769, 2014.
- [349] R. Zhao, M. Davey, Y. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili und W. Houry, „Navigating the chaperone network: An integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone,” *Cell*, Bd. 120, pp. 715-727, 2005.
- [350] M. Fassnacht, M. Terzolo, B. Allolio, E. Baudin, H. Haak, A. Berruti, S. Welin, C. Schade-

Brittinger, A. Lacroix, B. Jarzab, H. Sorbye, D. Torpy, V. Stepan, D. Scheingart, W. Arlt, M. Kroiss, S. Leboulleux, P. Sperone und A. Sundin, „Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma,“ *New England Journal of Medicine*, pp. 2189-2197, 2012.

- [351] G. Knoll, M. Kokolo, R. Mallick, A. Beck, C. Buenaventura, R. Ducharme, R. Barsoum, C. Bernasconi, T. Blydt-Hansen, H. Ekberg, C. Felipe, J. Firth, L. Gallon, M. Gelens, D. Glotz, J. Gossmann, M. Guba, A. Morsy und R. Salgo, „Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: systematic review and meta-analysis of individual patient data,“ *BMJ*, p. 6679, 2014.
- [352] F. Neff, D. Flores-Dominguez, D. Ryan, M. Horsch, S. Schröder, T. Adler, L. Afonso, J. Aguilar-Pimentel, L. Becker, L. Garrett, W. Hans, M. Hettich, R. Holtmeier, S. Hölter, K. Moreth, C. Prehn, O. Puk, I. Rácz und B. Rathkolb, „Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging,“ *J Clin Invest*, pp. 3272-3291, 2013.

8 Anhang

8.1 Zusatzmaterial zu den Ergebnissen

8.1.1 Zusatzmaterial zu den Ergebnissen von Kohorte 1

	Rezidiv	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90α (0-3)	Rezidivfrei	2	0,00	0,00	Nicht sinnvoll bestimmbar
	Mit Rezidiv	2	1,48	0,20	
Tabelle 19. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90α und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).					

	Krankheits- bedingter Tod	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90α (0-3)	Kein krank- heitsbe- dingter Tod	2	0,00	0,00	Nicht sinnvoll bestimmbar
	Krankheits- bedingter Tod	3	1,21	0,48	
Tabelle 20. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90α und dem krankheitsbedingten Tod (berücksichtigt wurden nur ACCs).					

	Tumorhisto- logie (ACA vs. ACC)	Probenanzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90β (0-3)	ACA	26	0,90	0,39	0,001

	ACC	6	1,62	0,43	
Tabelle 21. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90β und der Tumorhistologie (ACA oder ACC).					

	Histologie und Funktionalität	Probenanzahl	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90 β (0-3)	Inaktives Nebennieren-Adenom	8	0,84	0,38	0,003
	Subklinisches Cushing-Adenom	4	0,76	0,36	
	Cushing-Adenom	14	0,98	0,40	
	ACC	6	1,62	0,43	
	Androgen produzierendes Adenom	1	1,37	Nicht sinnvoll bestimmbar	Nicht sinnvoll bestimmbar
Bonferroni		Art des Tumors (Diagnose)	Art des Tumors (Diagnose)		p-Wert
		Inaktives Nebennieren-Adenom	Subklinisches Cushing-Adenom		1
			Cushing-		1

			Adenom		
			ACC		0,006
		Subklinisches Cushing- Adenom	Inaktives Nebennieren- Adenom		1
			Cushing- Adenom		1
			ACC		0,013
		Cushing- Adenom	Inaktives Nebennieren- Adenom		1
			Subklinisches Cushing- Adenom		1
			ACC		0,015
		ACC	Inaktives Nebennieren- Adenom		0,006
			Subklinisches Cushing- Adenom		0,013
			Cushing- Adenom		0,015

Tabelle 22. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β sowie Histologie und Funktionalität.

	Hormon- aktivität (differenziert)	Probenanzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90 β (0-3)	Keine Hormon- aktivität	9	0,80	0,34	0,001
	Androgene	2	1,71	0,48	
	Cortisol	11	0,90	0,37	
	Cortisol + andere	4	1,57	0,28	
Bonferroni		Hormon- aktivität (differenziert)	Hormon- aktivität (differenziert)		p-Wert
		Keine Hormon- aktivität	Cortisol		1
			Androgene		0,016
			Cortisol + andere		0,007
		Androgene	Keine Hormon- aktivität		0,016
			Cortisol		0,037
			Cortisol + andere		1

		Cortisol	Keine Hormon- aktivität		1
			Androgene		0,037
			Cortisol + andere		0,018
		Cortisol + andere	Keine Hormon- aktivität		0,007
			Cortisol		0,018
			Androgene		1
Tabelle 23. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90β und der hormonellen Aktivität (differenziert).					

	Klinische Symptomatik	Probenanzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90 β (0-3)	Keine Symptome	11	0,89	0,36	0,008
	Cushing	9	0,84	0,39	
	Virilismus	2	1,33	0,06	
	Cushing + Virilismus	2	1,81	0,10	
Bonferroni		Klinische Symptomatik	Klinische Symptomatik		p-Wert

		Keine Symptome	Cushing		1
			Virilismus		0,654
			Cushing + Virilismus		0,014
		Cushing	Keine Symptome		1
			Virilismus		0,574
			Cushing + Virilismus		0,012
		Virilismus	Keine Symptome		0,654
			Cushing		0,574
			Cushing + Virilismus		1
		Cushing + Virilismus	Keine Symptome		0,014
			Cushing		0,012
			Virilismus		1

Tabelle 24. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der klinischen Symptomatik.

	Rezidiv	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von FKBP51 (0-3)	Kein Rezidiv	2	2,02	0,03	Nicht sinnvoll bestimmbar

	Rezidiv	2	1,85	0,01	
Tabelle 25. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).					

	Krankheits- bedingter Tod	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von GR (0-3)	Kein krank- heitsbe- dingter Tod	2	0,78	0,75	Nicht sinnvoll bestimm- bar
	Krankheits- bedingter Tod	2	1,79	0,08	
Tabelle 26. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von GR und dem krankheitsbedingten Tod (berücksichtigt wurden nur ACCs).					

8.1.2 Zusatzmaterial zu den Ergebnissen von Kohorte 2

	Krankheits- bedingter Tod	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90β (0-3)	Kein krank- heitsbe- dingter Tod	37	0,80	0,41	0,041
	Krankheits- bedingter Tod	40	0,62	0,39	

Tabelle 27. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90β und dem krankheitsbedingten Tod.

	Hormon- aktivität (ja oder nein)	Proben- anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
--	--	-------------------	------------	-------------------------	--------

H-Score von Hsp90 β (0-3)	Nicht hormonaktiv	33	0,86	0,42	0,006
	Hormonaktiv	45	0,60	0,36	

Tabelle 28. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β und der Hormonaktivität.

	Produktion von Androgenen	Proben-anzahl	Mittelwert	Standard-abweichung	p-Wert
H-Score von Hsp90 β (0-3)	Nicht Androgen-produzierend	55	0,77	0,44	0,030
	Androgen-produzierend	23	0,55	0,36	

Tabelle 29. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β und der Produktion von Androgenen.

	Krankheits-bedingter Tod	Proben-anzahl	Mittelwert	Standard-abweichung	p-Wert
H-Score von GR (0-3)	Kein krankheitsbe-dingter Tod	37	0,21	0,03	0,024
	Krankheits-bedingter Tod	40	0,20	0,04	

Tabelle 30. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von GR und dem krankheitsbedingten Tod.

H-Score von Hsp90 β (0-3)	Proben-anzahl	Zensuren	Mittelwert	Standard-abweichung	p-Wert
---------------------------------	---------------	----------	------------	---------------------	--------

< 0,77	48	18	91,82	18,94	0,014
≥ 0,77	32	22	174,19	34,41	
Gesamt	80	40	121,26	18,88	
Tabelle 31. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90β (Zytosol) und der Gesamtüberlebensrate.					

H-Score von GR (0-3)	Proben- anzahl	Zensuren	Mittelwert	Standard- abweichung	p-Wert
< 0,18	17	6	38,53	8,77	0,008
≥ 0,18	63	34	136,11	21,45	
Gesamt	80	40	121,26	18,88	
Tabelle 32. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von GR (Nukleus) und der Gesamtüberlebensrate.					

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Übersicht über die Nebennierenrinde, ihre Regulationsfaktoren und synthetisierten Hormone [2].	6
Abbildung 2. Übersicht über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [7].	8
Abbildung 3. Übersicht über die Steroidbiosynthese in der humanen Nebennierenrinde [2].	10
Abbildung 4. Schematische Darstellung des Aufbaus des GR [11].	14
Abbildung 5. Vermittlung Glucocorticoid-abhängiger Signalwege des GR [11].	16
Abbildung 6. Schematischer Aufbau von nicht-dimerisiertem Hsp90 [256].	19
Abbildung 7. Das Hsp90-Chaperon-System [71].	20
Abbildung 8. Schema der Wirkungsweise einiger Hsp90-Inhibitoren am Beispiel von Geldanamycin [87].	24
Abbildung 9. Schematischer Aufbau von FKBP51 [133].	26
Abbildung 10. Überblick über mit mTOR assoziierte Prozesse der Signaltransduktion [177].	30
Abbildung 11. Regulation des GR durch SUMO, Hsp90, FKBP51 und FKBP52 [177].	33
Abbildung 12. Vergleich traditioneller Untersuchungsverfahren (oben) und der TMA-Technologie (unten) [186].	44
Abbildung 13. Von den immunhistochemisch behandelten Gewebeproben zu den mit dem MIRAX DESK-Scanner ermittelten Ergebnissen der Signalintensität.	57
Abbildung 14. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90 α und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).	62
Abbildung 15. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90 α und dem Auftreten eines krankheitsbedingten Todes (berücksichtigt wurden nur ACCs).	63
Abbildung 16. Darstellung der signifikanten Korrelation zwischen dem H-Score von Hsp90 β und dem H-Score von FKBP51 ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,450$).	66
Abbildung 17. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der Tumorphistologie (ACA vs. ACC; $p = 0,001$).	67
Abbildung 18. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der Art des Tumors bzw. der Diagnose ($p = 0,030$).	69
Abbildung 19. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der klinischen Symptomatik ($p = 0,007$).	70
Abbildung 20. Darstellung der signifikanten Korrelation zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem H-Score von GR ($p = 0,013$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,478$).	72
Abbildung 21. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).	73
Abbildung 22. Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem H-Score von GR und dem Auftreten eines krankheitsbedingten Todes (berücksichtigt wurden nur ACCs).	74
Abbildung 23. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 α und Hsp90 β ($p < 0,001$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,383$).	78
Abbildung 24. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 α und FKBP51 ($p = 0,021$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,259$).	79
Abbildung 25. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β und dem GR ($p = 0,002$, Korrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,345$).	82
Abbildung 26. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β und dem krankheitsbedingten Tod ($p = 0,041$).	83

Abbildung 27. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β und der Hormonaktivität ($p = 0,006$).	84
Abbildung 28. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β und der Produktion von Androgenen ($p = 0,030$).	85
Abbildung 29. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression des GR und dem krankheitsbedingten Tod ($p = 0,024$).	86
Abbildung 30. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von Hsp90 β (Zytosol) und der Gesamtüberlebensrate unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven ($p = 0,014$). ..	88
Abbildung 31. Darstellung des signifikanten Zusammenhangs zwischen der Expression von GR (Nukleus) und der Gesamtüberlebensrate unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven ($p = 0,008$). ..	89

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die Ursachen der ACTH-abhängigen und ACTH-unabhängigen Form des Cushing-Syndroms [25].	11
Tabelle 2. Klassifikation der Tumorstadien des ACC nach ENSAT [222].	13
Tabelle 3. Überblick über C- und N-terminale Hsp90-Inhibitoren [101] [102].	22
Tabelle 4. Überblick über eine mögliche Klassifikation von Hsp90-Inhibitoren [107].	23
Tabelle 5. Übersicht über die Hauptfunktionen von FKBP51 [313].	27
Tabelle 6. Die Bedeutung von FKBP51 in Tumorgenese und Sensitivität auf Zytostatika [135].	28
Tabelle 7. Übersicht über verwendete allgemeine Laborgeräte.	37
Tabelle 8. Übersicht über verwendete Reagenzien.	40
Tabelle 9. Übersicht über Reagenzien für Immunhistochemie.	40
Tabelle 10. Übersicht über die Tumorarten von Kohorte 1.	45
Tabelle 11. Übersicht über die klinischen Daten von Kohorte 1.	47
Tabelle 12. Übersicht über die klinischen Daten von Kohorte 2.	47
Tabelle 13. Beispielhafte Übersicht über die Zuordnung verschiedener Signalintensitätsstufen in die entsprechenden Kategorien.	56
Tabelle 14. Übersicht über die p-Werte der Korrelationen zwischen der Expression der Zielstrukturen untereinander bei der Kohorte 1.	59
Tabelle 15. Übersicht über die p-Werte einiger Korrelationen bei der Kohorte 1.	60
Tabelle 16. Übersicht über die p-Werte der Korrelationen zwischen der Expression der Zielstrukturen untereinander bei der Kohorte 2.	75
Tabelle 17. Übersicht über die p-Werte einiger Korrelationen bei der Kohorte 2.	76
Tabelle 18. Übersicht über die p-Werte beim Vergleich der H-Scores mit dem Gesamtüberleben bei der Kohorte 2.	87
Tabelle 19. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 α und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).	131
Tabelle 20. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 α und dem krankheitsbedingten Tod (berücksichtigt wurden nur ACCs).	131
Tabelle 21. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der Tumorphistologie (ACA oder ACC).	132
Tabelle 22. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β sowie Histologie und Funktionalität.	133
Tabelle 23. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der hormonellen Aktivität (differenziert).	135
Tabelle 24. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen dem H-Score von Hsp90 β und der klinischen Symptomatik.	136
Tabelle 25. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von FKBP51 und dem Auftreten eines Rezidivs (berücksichtigt wurden nur ACCs).	137
Tabelle 26. Statistische Daten zu dem Zusammenhang zwischen dem H-Score von GR und dem krankheitsbedingten Tod (berücksichtigt wurden nur ACCs).	137
Tabelle 27. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β und dem krankheitsbedingten Tod.	137
Tabelle 28. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β und der Hormonaktivität.	138

Tabelle 29. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β und der Produktion von Androgenen.	138
Tabelle 30. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von GR und dem krankheitsbedingten Tod.	138
Tabelle 31. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Hsp90 β (Zytosol) und der Gesamtüberlebensrate.	139
Tabelle 32. Statistische Daten zu dem signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von GR (Nukleus) und der Gesamtüberlebensrate.	139

8.4 Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	Tanespimycin
ACA	Adrenocorticales Adenom (engl. adrenocortical adenoma)
ACC	Adrenocorticales Karzinom (engl. adrenocortical carcinoma)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
CYP11A1	Cholesterin-Seitenkette spaltendes Enzym
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
FK1	Erste FKBP-Domäne
FK2	Zweite FKBP-Domäne
FKBP51, FKBP5	FK506 bindendes Protein 51
FKBP52	FK506 bindendes Protein 52
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GREs	Glucocorticoid-response elements
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
Hsp	Hitzeschockprotein
MMP2	Matrix metalloprotease 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline)

PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase
SNP	Single-nucleotide Polymorphism
StAR	Steroidogenes akutes regulatorisches Protein
SUMO	Small ubiquitin-like modifiers
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris-buffered saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris-buffered saline) inklusive dem Detergenz Tween®20
TE	Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid
TMA	Tissue Microarray
TPR	Tetratricopeptide repeat
VDAC	Voltage dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8.5 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde am Klinikum der Universität München in der Medizinischen Klinik IV in der Sektion Endokrinologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein verfasst.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein, dass er mir diese Möglichkeit einer Doktorandentätigkeit in der experimentellen Endokrinologie gegeben hat. Durch seine umsichtige Reflexion, stets konstruktive Kritik und viele wichtige Ratschläge hat er wesentlich dazu beigetragen, dass dieses Projekt einen sehr guten Weg gegangen ist und erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus bedanke ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein, dass er mir weitere Gelegenheiten zur Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen eröffnet hat wie beispielsweise mehrfache Präsentationen bei Kongressen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Luis Gustavo Pérez-Rivas für seine sehr kompetente und zuverlässige Begleitung während der gesamten Doktorarbeit, von der Sammlung klinischer Daten über Labormethoden bis zur statistischen Analyse und Verbesserungsvorschlägen beim Verfassen der Doktorarbeit. Bei Fragen stand er mir immer zur Seite und auch in schwierigen Zeiten und unter hohem Zeitdruck war immer auf die Unterstützung meines Betreuers Herrn Dr. Luis Gustavo Pérez-Rivas Verlass.

Des Weiteren bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Masanori Murakami für die Auswertung der Immunhistochemie und vollständige statistische Analyse der Gewebeproben von Kohorte 2. Die Aufgaben wurden zeitnah und sorgfältig durchgeführt und bei Rückfragen erhielt ich stets hilfreiche Antworten.

Selbstverständlich bedanke ich mich auch bei allen, die uns Gewebeproben für unser Projekt zur Verfügung gestellt haben, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Fassnacht und Herrn Dr. Silviu Sbiera aus dem Universitätsklinikum Würzburg, bei Frau Dr. Esther Korpershoek von der Erasmus-Universität Rotterdam sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke von der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus der endokrinologischen Forschung an der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mich

bei Anliegen stets unterstützt haben und wesentliche Hilfestellungen bei der Laborarbeit und der Vorbereitung von Präsentationen gegeben haben. Auf Ihre Hilfe konnte ich mich immer verlassen und ohne sie wäre der Fortgang des Projekts nicht gesichert gewesen. Besonders bedanke ich mich bei den Mitdoktoranden Frau Dr. Sara Jung, Frau Claudia Siebert und Herrn Dr. Christian Gebhard, den technischen Assistenten Frau Brigitte Mauracher, Frau Petra Rank und Herrn Igor Shapiro, der Endokrinologie-Assistentin Frau Christina Brugger sowie der Graphikerin Frau Sibylle Gräfin Yorck von Wartenburg.

Ein Dankeschön geht auch an die „Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie“ für die Genehmigung zweier Poster-Präsentationen und die zweimalige Vergabe eines Reisekostenstipendiums.

Selbstverständlich danke ich auch ausdrücklich meiner Familie – insbesondere meinen Eltern Nadja Stuber und Robert Frei sowie meinem Bruder Johann Frei – für die Begleitung und kontinuierliche Unterstützung während des gesamten Projektverlaufs. Ohne die Ratschläge, ermutigenden Worte und Hilfsbereitschaft meiner Familie hätte meine Ausdauer für dieses Projekt wohl nicht ausgereicht.

Es freut mich sehr, dass ich in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein als Doktorand tätig sein durfte.

8.6 Veröffentlichungen

Aktuell (Stand November 2019) liegen folgende Teilveröffentlichungen des Projekts vor.

Artikel:

- Claudia Siebert, Denis Ciato, Masanori Murakami, Ludwig Frei-Stuber, Luis Gustavo Perez-Rivas, José Luis Monteserin-Garcia, Svenja Nölting, Julian Maurer, Annette Feuchtinger, Axel K. Walch, Harm R. Haak, Jérôme Bertherat, Massimo Mannelli, Martin Fassnacht, Esther Korpershoek, Martin Reincke, Günter K. Stalla, Constanze Hantel, Felix Beuschlein, „Heat Shock Protein 90 as a Prognostic Marker and Therapeutic Target for Adrenocortical Carcinoma“, *Frontiers in Endocrinology*, doi: 10.3389/fendo.2019.00487, veröffentlicht am 19. Juli 2019.

Poster:

- Ludwig Frei-Stuber, Luis Gustavo Pérez-Rivas, Günter Stalla, Martin Fassnacht, Martin Reincke und Felix Beuschlein, „Expression of Hsp90 α and Hsp90 β isoforms in adrenal tumors“, in: 60. Jahreskongress der „*Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie*“ (Würzburg, Poster-Präsentation am 16. März 2017).
- Ludwig Frei-Stuber, Masanori Murakami, Luis Gustavo Perez-Rivas, Matthias Kroiss, Martin Reincke, Axel Walch, Martin Fassnacht und Felix Beuschlein, „Expression of Hsp90 α , Hsp90 β , FKBP51 and GR in adrenal tumors“, in: 61. Jahreskongress der „*Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie*“ (Bonn, Poster-Präsentation am 15. März 2018).