

**Aus dem Lehrstuhl für Endokrinologie und Diabetologie  
der Universität Würzburg**

**Expression des Chemokinrezeptors CCR7 in normalen,  
benignen und malignen Nebennierengeweben und seine  
Auswirkung auf den Krankheitsverlauf beim  
Nebennierenkarzinom**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Katharina Other**

**aus Irmelshausen**

**Würzburg, März 2021**

**Referent:** Prof. Dr. Martin Fassnacht  
**Korreferent:** Prof. Dr. Nicolas Schlegel  
**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 07.12.2021

**Die Promovendin ist Ärztin**

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Nebenniere	1
1.2	Raumforderungen der Nebenniere	2
1.3	Das Nebennierenkarzinom	4
1.3.1	<i>Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild</i>	4
1.3.2	<i>Diagnostik und Stadieneinteilung</i>	5
1.3.3	<i>Prognosefaktoren und Therapieoptionen des ACC</i>	7
1.4	<b>Chemokine und Chemokinrezeptoren</b>	<b>10</b>
1.4.1	<i>Einfluss des Chemokin-Netzwerks auf maligne Tumore</i>	11
1.4.2	<i>Das Chemokin-Netzwerk als Angriffspunkt der Therapie</i>	12
1.5	<b>CC-Chemokinrezeptor 7 und seine Liganden CCL19 und CCL21</b>	<b>13</b>
1.5.1	<i>Die physiologische Bedeutung der CCR7-CCL19/21-Achse</i>	13
1.5.2	<i>Die Rolle von CCR7 in malignen Tumoren</i>	14
1.6	<b>Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	(Tumor-)Gewebe und klinische Daten	17
2.2	Material	19
2.3	Methoden	23
2.3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	23
2.3.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	26
2.3.3	<i>Histologische Methoden</i>	29
2.3.4	<i>Statistische Auswertung</i>	31
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
3.1	<b>Antikörper-Qualitätskontrolle</b>	<b>33</b>

<b>3.2</b>	<b>CCR7-Expression in unterschiedlichen Nebennierengeweben .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	<i>CCR7-Expression in der Nebenniere .....</i>	36
3.2.2	<i>CCR7-Expression in Cushing-, Conn- und hormoninaktiven Adenomen.....</i>	37
3.2.3	<i>CCR7-Expression im ACC und verschiedenen Metastasen.....</i>	39
<b>3.3</b>	<b>Assoziation der CCR7-Expression mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Assoziation der CCR7-Expression mit dem Krankheitsverlauf .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	<i>Gesamt- und krankheitsspezifisches Überleben .....</i>	45
3.4.2	<i>Progressions- und rezidivfreies Überleben .....</i>	47
3.4.3	<i>Einfluss von CCR7 auf die ACC-Metastasierung.....</i>	50
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>CC-Chemokinrezeptorexpression in Nebennierengeweben .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>CCR7 wird in der Nebenniere und Nebennierentumoren exprimiert</b>	<b>55</b>
4.2.1	<i>Unterschiedliche CCR7-Expression in anatomisch verschiedenen Nebennierenzonen.....</i>	55
4.2.2	<i>Unterschiedliche CCR7-Expression in verschiedenen Nebennierenadenomen.....</i>	56
4.2.3	<i>Unterschiedliche CCR7-Expression im ACC und ACC-Metastasen.....</i>	58
<b>4.3</b>	<b>Die CCR7-Expression beeinflusst den Verlauf einer Nebennierenkarzinomerkkrankung .....</b>	<b>60</b>
4.3.1	<i>CCR7 beeinflusst die Lymphknotenmetastasierung.....</i>	60
4.3.2	<i>Einfluss von CCR7 auf die Tumorprogression .....</i>	62
4.3.3	<i>Einfluss von CCR7 auf das Überleben.....</i>	64
<b>4.4</b>	<b>Methodenkritik und Limitationen .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>80</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>81</b>

# 1 EINLEITUNG

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich im Bereich der Krebsforschung durch Forschungsergebnisse und moderne Methoden neue Schwerpunkte entwickelt und Möglichkeiten ergeben, wobei unter anderem Chemokine und Chemokinrezeptoren, sowie deren Rolle in malignen Erkrankungen verstärkt in den Fokus gerückt sind [1, 2]. Durch ein detaillierteres Verständnis der Rolle der Chemokine in physiologischen und pathologischen Prozessen besteht die Hoffnung, neue Therapien gegen Tumore und deren Metastasen zu entwickeln und dadurch die Prognosen der Erkrankungen zu verbessern [3, 4].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht dabei die Expression des CC-Chemokinrezeptors 7 in Nebenniere und Nebennierenrindentumoren, mit besonderem Fokus auf das seltene Nebennierenkarzinom. Die Grundlagen zu diesen Themen und der aktuelle Wissensstand sollen auf den folgenden Seiten genauer beleuchtet werden.

## 1.1 Die Nebenniere

Die Nebenniere (*lat. glandula suprarenalis*) ist eine paarig angelegte, hormonproduzierende Drüse. Sie sitzt retroperitoneal dem oberen Nierenpol auf und besitzt eine ausgesprochen gute Blutversorgung, was auf die Bedeutung der Katecholamin- und Steroidhormonbiosynthese für den Organismus zurückzuführen ist. Die verschiedenen Hormone werden in zwei grundlegend unterschiedlichen Abschnitten des Organs synthetisiert, der Nebennierenrinde und dem Nebennierenmark. Bei Letzterem handelt es sich um Zellen nervalen Ursprungs, einer Art sympathischen Paraganglions, das Noradrenalin und Adrenalin bildet und bei Bedarf direkt ins Blut abgibt. Die Nebennierenrinde kann man dagegen in drei Zonen gliedern, die nicht nur mikroskopisch differenzierbar sind, sondern auch verschiedene Steroidhormone produzieren. Von außen nach innen findet man subkapsulär zunächst die Zona glomerulosa, den Synthesort der Mineralkortikoide, anschließend ohne klare Abgrenzung die Zona fasciculata (Glukokortikoide) und schließlich die Zona reticularis (Androgene). [5]

Trotz der histologisch klaren Trennung des Cortex und der Medulla besteht zwischen beiden eine rege Interaktion, sowohl parakrin als auch zell-zell vermittelt [6]. Es wurden bereits viele Zusammenhänge sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen beschrieben, wobei häufig die Rolle von Zytokinen u.a. in der ACTH-unabhängigen Glukokortikoidsynthese betont wird. Demzufolge ist meistens die Wirkung

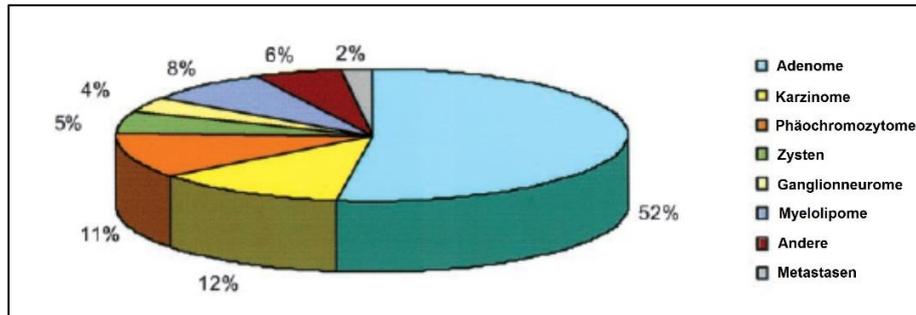
von Tumornekrosefaktoren oder Interleukinen näher untersucht. [7] Zwar wurde vereinzelt ein Einfluss der ebenfalls den Zytokinen zugehörigen Chemokinen (z. B. CXCL10) auf die Entwicklung einer primären Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) beschrieben [8], im Gegensatz zu anderen Zytokinen gibt es aber sehr wenig Erkenntnisse zu der Rolle des Chemokin-Netzwerks in der Nebennierenphysiologie.

## **1.2 Raumforderungen der Nebenniere**

Raumforderungen der Nebenniere sind mit einer Prävalenz von 3-10 % im Erwachsenenalter durchaus häufige Tumore, wobei man einen Anstieg der Häufigkeit mit zunehmendem Alter beobachten kann [9]. In den meisten Fällen wird die Neoplasie im Rahmen der Diagnostik anderer Erkrankungen zufällig in der Bildgebung entdeckt (sog. Inzidentalome). Oft wirft diese Entdeckung dann die Frage nach dem weiteren Vorgehen bezüglich dieser Raumforderung auf. Aus diesem Grund wurde 2016 die erste *Europäische Leitlinie zum Nebennieren-Inzidentalom* veröffentlicht, die detailliert das klinische Management bei diesen Patienten beschreibt [9]. Wesentliches Ziel sollte es sein, eine definitive Diagnose zu stellen, um eine Empfehlung für das weitere Vorgehen abgeben zu können. Es muss zunächst sowohl eine potenzielle Malignität ausgeschlossen als auch die funktionelle Aktivität (Hormonproduktion) des Tumors untersucht werden. [9, 10]

In den meisten Fällen handelt es sich bei Inzidentalomen, wie es Abbildung 1 zu entnehmen ist, um gutartige Erkrankungen, wie Adenome, Zysten oder Myelolypome. Maligne Raumforderungen (Metastasen, Nebennierenkarzinome, usw.) sind im Vergleich dazu weniger von Bedeutung. Dennoch wird das Nebennierenkarzinom aufgrund seiner zentralen Rolle in dieser Arbeit in Kapitel 1.3 ausführlicher behandelt.

Mit je nach Quelle 52 – 88 % sind drüsenbildende Tumore (Adenome) die häufigste gefundene Entität bei Neoplasien in der Nebenniere [9, 11, 12]. Man unterteilt sie weiter nach ihrer Hormonaktivität in endokrin-inaktive Adenome, kortisolproduzierende Cushing-Adenome, aldosteronproduzierende Conn-Adenome und die sehr seltenen androgen- oder östrogenproduzierenden Adenome.



**Abbildung 1: Histopathologische Verteilung von Inzidentalomen**

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [11]. Für diese Graphik wurden 380 klinisch unauffällige Neubildungen der Nebenniere histologisch aufgearbeitet. Die Zahlen variieren je nach Studie und Fallzahl. Man darf hier aber von einer recht genauen Annäherung ausgehen.

Endokrin-inaktive Tumore sind mit etwa 80 % am häufigsten [11]. In Folge der fehlenden Hormonproduktion ist der Patient meist symptomfrei und der Tumor bedarf in der Regel keiner Therapie. Besonders große Tumore können jedoch in seltenen Fällen Ursache abdomineller oder retroperitonealer Beschwerden sein [13]. Bei Raumforderungen >6 cm ist aufgrund bekannter Daten aber ohnehin mit größerer Wahrscheinlichkeit von einer malignen Entartung auszugehen, weswegen andere therapeutische Optionen in den Vordergrund rücken [9, 10]. Nach der aktuellen Leitlinie sind im Unterschied dazu bei einer Tumorgöße <4 cm ohne relevanten Hormonexzess und ausgeschlossener Malignität in der Bildgebung im Verlauf keine weiteren diagnostischen und therapeutischen Schritte notwendig [9].

Klinische Relevanz haben jedoch speziell das Cushing- und Conn-Adenom, da sie im Gegensatz zu den eben beschriebenen endokrin-inaktiven Adenomen zu Hormonexzessen und damit eindrücklichen Symptomen führen können. Aus diesem Grund wird bei allen Patienten mit Nebennieren-Inzidentalom die Durchführung einer Hormondiagnostik empfohlen. Dabei sollte Kortisol im Dexamethason-Hemmtest und bei vorhandener arterieller Hypertonie zusätzlich der Aldosteron-Renin-Quotient bestimmt werden. [9] Im Rahmen dieser Diagnostik findet man häufiger eine autonome Kortisolproduktion durch ein Cushing-Adenom als ein Conn-Adenom [12, 14]. Häufig fehlen dabei jedoch typische klinische Zeichen eines Hyperkortisolismus wie stammbetonte Adipositas, proximale Myopathie, Hirsutismus oder Striae rubrae, weswegen meist ein subklinisches Cushing-Syndrom diagnostiziert wird [14]. Aus diesem Grund muss über eine operative Therapie oft im Einzelfall entschieden werden, da eine komplexe Situation bezüglich des Hormonhaushalts und diversen Komorbiditäten vorliegen kann [9]. Bei Conn-Adenomen liegt die Schwierigkeit eher in der Diagnostik als in der Therapieentscheidung. Das aldosteronproduzierende

Adenom (APA) führt zu einem (primären) Hyperaldosteronismus, der auch als Conn-Syndrom bezeichnet wird. Dabei führt eine vermehrte Rückresorption von Natrium und Wasser zu einer schwer therapierbaren Hypertonie. Das Conn-Syndrom wird jedoch auch in ca. 60 % der Fälle von einer bilateralen Nebennierenhyperplasie hervorgerufen [15], für die eine operative Therapie nicht in Frage kommt. Goldstandard für die Differentialdiagnostik zwischen diesen beiden Pathologien ist neben der obligaten Bildgebung (CT oder MRT) eine Nebennierenvenen-Katheterisierung, die jedoch aufgrund einer eingeschränkten Spezifität nicht immer zu einer Diagnose führt [16]. Liegt zweifelsfrei ein APA vor, ist eine selektive Adenomektomie die Methode der ersten Wahl [15].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in der Praxis durchaus Probleme sowohl in der Diagnosestellung als auch der Therapieentscheidung ergeben. Genauere Testverfahren etwa in der Differentialdiagnostik des Conn-Syndroms wären wünschenswert und speziell eine präoperativ gesicherte Unterscheidung von endokrin-inaktiven Adenomen und Karzinomen hätte therapeutische Konsequenzen.

### **1.3 Das Nebennierenkarzinom**

Beim Nebennierenkarzinom (ACC, von engl. adrenocortical carcinoma) handelt es sich um eine seltene bösartige Neoplasie der Nebennierenrinde, deren Inzidenz zwischen 0,7 – 2,0 Erkrankungen pro eine Million Menschen pro Jahr liegt [17, 18]. Die Erkrankung tritt häufiger bei Frauen auf, wobei man sie über beide Geschlechter hinweg in jedem Lebensalter findet [18].

#### **1.3.1 Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild**

In der Mehrzahl der Erkrankungsfälle entwickelt sich der Tumor sporadisch. Die Entstehung des Malignoms aus einem Adenom (Adenom-Karzinom-Sequenz), wie sie für andere Karzinome und deren Pathogenese bekannt ist, konnte beim Nebennierenkarzinom nur in Einzelfällen beobachtet, aber nicht bestätigt werden [19, 20]. Es sind allerdings mittlerweile somatische Mutationen und Deregulierungen wichtiger Gene (bspw. Herabregulierung des Tumorsuppressorgens TP53, Überexpression des IGF-2, und Veränderungen im Wnt/ $\beta$ -Catenin-pathway) bekannt, die nachgewiesenermaßen in vielen Karzinomzellen der Nebenniere vorkommen und einen Anteil an der Entwicklung dieses Tumors zu haben scheinen [21-24]. Bei einem kleinen Teil der Nebennierenkarzinome liegt sogar eine Keimbahnmutation im Rahmen eines hereditären Tumorsyndroms vor [23, 25]. Diese Erkenntnisse und Anstrengungen

in der Forschung haben allerdings noch zu keinem therapeutischen Durchbruch geführt, was sich in einer weiterhin insgesamt ungünstigen 5-Jahres-Überlebensrate zeigt [26]. Die individuelle Prognose ist dabei von verschiedenen Kriterien abhängig, die in Kapitel 1.3.3 vertieft beschrieben werden.

Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung wird davon geprägt, ob der Tumor Hormone produziert oder hormoninaktiv ist. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, produzieren neben der Nebenniere in physiologischem Zustand auch Tumore des Cortex unter Umständen Hormone. Beim Nebennierenkarzinom liegt dabei deutlich häufiger als bei gutartigen Neoplasien eine hormonelle Überproduktion vor. Selbst bei klinisch unauffälligen Patienten wird bei sorgfältiger Hormondiagnostik in über 80 % eine pathologische Hypersekretion festgestellt. Dabei überwiegen häufig Hormonvorstufen, was die Symptomfreiheit erklärt. [23, 27, 28]

Typischerweise leiden die Patienten aber unter einem zügig fortschreitenden Cushing-Syndrom (ca. 60 %) [29]. Auch die erhöhte Synthese anderer Steroidhormone mit den bereits beschriebenen Symptomen kommt – wenn auch seltener – vor [30]. Der kleinere Anteil der hormoninaktiven Tumore fällt vor allem im fortgeschrittenen Stadium durch Beschwerden auf, die auf die raumfordernde Wirkung zurückzuführen sind. Dabei klagen die Patienten oftmals über Bauch- und Rückenschmerzen sowie andere abdominelle Leiden wie Völlegefühl und Übelkeit. Eine klassische B-Symptomatik, die im Rahmen anderer Malignome wiederholt auftritt, beobachtet man beim ACC selten. Etwa 10-15 % der Nebennierenkarzinome werden zufällig im Rahmen einer Bildgebung entdeckt (Inzidentalome) (s. Abbildung 1 in Kapitel 1.2). [27, 28, 30]

### **1.3.2 Diagnostik und Stadieneinteilung**

Zur Diagnosestellung und Staging eines Nebennierenkarzinoms werden diverse Untersuchungen durchgeführt. Die 2018 veröffentlichte europäische Leitlinie zum Nebennierenkarzinom empfiehlt, bei Verdacht auf ein vorliegendes ACC eine umfassende hormonelle Diagnostik vorzunehmen, sowie eine Routinediagnostik bestehend aus Thorax-CT sowie CT oder MRT des Abdomens durchzuführen, um Lungen- und Lebermetastasen zu detektieren [28]. Im Falle einer Operation wird das Gewebe darüber hinaus einer histopathologischen Überprüfung unterzogen [23].

Im Rahmen der bildgebenden Diagnostik gilt: je größer der Tumor, desto höher die Wahrscheinlichkeit einer Entartung [9, 10]. Einen weiteren Hinweis über die Eigenschaften des Tumors kann die Gewebedichtemessung

(ohne Kontrastmittel meist >25 Hounsfield-Units) und das Verhalten in der Kontrastmittelanreicherung bzw. -auswaschung geben [9, 27]. Für das Nebennierenkarzinom sind neben Lungen- und Lebermetastasen auch Lymphknotenmetastasen (ca. 20 % der Erkrankten) typisch [30-32]. Zusätzlich kann für die Staginguntersuchung oder bei unklaren Fällen aufgrund des starken Tracer-Uptakes des Karzinoms und dessen Metastasen eine FDG-PET-Untersuchung angewandt werden [33].

Über den Umfang der präoperativen hormonellen Diagnostik hat ENSAT ([www.ensat.org](http://www.ensat.org)) sowie die europäische Leitlinie zum Nebennierenkarzinom eine detaillierte Empfehlung abgegeben [28]. Hierdurch kann der adrenale Ursprung der Erkrankung im besten Fall bestätigt und das postoperative Risiko einer Nebennierenrindeninsuffizienz ermittelt werden [23]. Um eine potentielle autonome Hormonproduktion – und -exzesse zu finden, sollte unter anderem eine Analyse des Kortisollevels im Dexamethason-Hemmtest und eine Messung verschiedener Serumwerte (Kalium, DHEAS, ACTH, Androstendion, Testosteron, Estradiol u.v.m.) im 24h-Sammelurin durchgeführt werden [28]. Zusätzlich ist die Untersuchung von Steroidmetaboliten im Urin in den Fokus gerückt, wonach laut Libé et al. im Falle einer Erkrankung ACC-typische Steroidvorläufer nachgewiesen werden können [29, 34].

Um eine finale Diagnose stellen zu können, ist dennoch eine pathologische Untersuchung des Tumors nötig. Wegen der Gefahr der Tumorzellverschleppung wird allerdings von einer Feinnadelbiopsie strikt abgeraten. Folglich ist eine histopathologische Diagnosestellung erst nach der operativen Gewebegewinnung möglich. Aufgrund der Tatsache, dass ein Befund oft schwierig und nicht zweifelsfrei zu erheben ist, wird eine Diagnosebestätigung durch den Referenzpathologen der deutschen Nebennierenkarzinom-Studiengruppe (Prof. Saeger, Hamburg oder Prof. Rosenwald/Dr. Kircher, Würzburg) empfohlen. [23, 28]

Zunächst sollte der adrenokortikale Ursprung des Tumors bestätigt werden, was durch den Nachweis einer Steroidogenic Factor 1 (SF1) -Expression erleichtert wird [35]. Ist dies der Fall, gilt es die Dignität des Resektats einzuschätzen. Der am besten validierte Score zu diesem Zweck ist der Weiss-Score, der anhand der Zellarchitektur, des Zellkerns, der Mitoserate und sechs weiteren Kriterien eine Einteilung des Tumors in gutartig, unbestimmt und bösartig trifft [36]. Zu einem vollständigen histopathologischen Befund gehört aufgrund der starken prognostischen Aussagekraft außerdem der Resektionsstatus sowie die Ermittlung des Proliferationsmarkers Ki67 im vorliegenden

Gewebe [27, 37]. Hierauf wird in 1.3.3 „Prognosefaktoren und Therapieoptionen des ACC“ detaillierter eingegangen.

Das Ziel all dieser Verfahren ist, durch eine lückenlose Diagnostik und Tumorstaging das Erkrankungsstadium und die damit verknüpfte optimale Therapie sowie die Prognose zu ermitteln. Die offizielle UICC-TNM-Klassifikation, die sich an der bereits 1978 entwickelten Stadieneinteilung von Sullivan [38] orientiert, findet aufgrund verschiedener Schwächen keine Anwendung mehr [39]. Dagegen hat sich die Stadieneinteilung des *European Network for the Study of adrenal Tumors (ENSAT)* etabliert, die sich bezüglich der prognostischen Aussagekraft zwischen den verschiedenen Stadien als wesentlich prägnanter herausstellte [37, 40]. Das detaillierte Stagingsystem mit Einstufungskriterien ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: ENSAT-Stadieneinteilung des Nebennierenkarzinoms**

Stadium	TNM-Klassifikation	Kommentar
I	T1, N0, M0	T1: ≤ 5cm
II	T2, N0, M0	T2: > 5cm
III	T1-2, N1, M0	T3: Invasion ins Nachbargewebe T4: Invasion in Nachbarorgane o. Tumor-thrombus in V. renalis o. V. cava N1: positive Lymphknoten
	T3-4, N0-1, M0	
IV	T1-4, N0-1, M1	M1: Fernmetastasen

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [26, 27]. Aktuelles Stagingsystem des ACC, entwickelt und empfohlen durch das *European Network for the Study of adrenal tumors (ENSAT)*.

Entgegen früherer Meinung nimmt die Erkrankung in einem frühen, operativ heilbaren Tumorstadium einen wesentlich günstigeren Verlauf. Konkret liegt das 5-Jahres-Überleben im Tumorstadium I bei bis zu 80 %, im Stadium II bei 60 %, im Stadium III noch bei 35-50 % und schließlich im Falle einer Metastasierung (Stadium IV) bei 0-28 % [26, 29]. Ca. 30-50 % aller Nebennierenkarzinome werden allerdings erst im weit fortgeschrittenen Stadium erkannt [17, 40].

### 1.3.3 Prognosefaktoren und Therapieoptionen des ACC

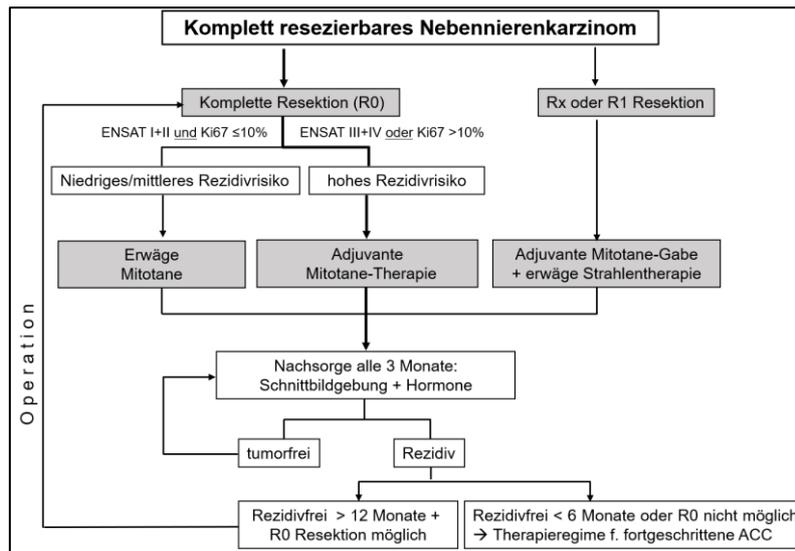
Bereits 2013 hatte die Würzburger Endokrinologie vorgeschlagen, die *ENSAT*-Tumorklassifikation (s. Tabelle 1 in Kap. 1.3.2) durch Hinzufügen weiterer Kriterien (z. B. Prognoseparameter) punktuell zu verbessern [23]. Die europäische Leitlinie greift dies auf und empfiehlt die Einbeziehung etablierter Prognosefaktoren (Weiss-Score, Ki67,

Resektionsstatus) [28]. In der jüngeren Vergangenheit wurden entsprechend weiterführende Scores, beispielsweise der *Helsinki-Score*, der eine Voraussage über die Metastasierungswahrscheinlichkeit trifft, ausgearbeitet und validiert [41, 42].

Es existieren bereits zahlreiche prognostische Marker, deren Aussagekraft in Studien geprüft wurde und die in der Klinik eingesetzt werden. Der im vorherigen Kapitel beschriebene Weiss-Score hat beispielsweise nicht nur einen diagnostischen Wert, denn ein Score >6 bedeutet gleichzeitig eine signifikant schlechtere Prognose [43]. Ein weiterer entscheidender prognostischer Parameter ist der Resektionsstatus des Tumors, denn eine R0-Resektion korreliert mit einer deutlich besseren Prognose [44]. Von Scollo et al. wurde diese Einschätzung nochmals bekräftigt und darüber hinaus die ENSAT-Stadieneinteilung erwartungsgemäß als wichtiger Prognosefaktor bestätigt [45]. Eine wichtige Rolle nimmt auch der Proliferationsindex Ki67 ein. In jeder vollständigen histopathologischen Analyse von ACC-Gewebe muss eine Angabe über diesen gemacht werden, da seine Aussagekraft über den Krankheitsverlauf mittlerweile durch zahlreiche Studien validiert und in den klinischen Alltag integriert ist [37, 43, 46]. Neben diesen bereits anerkannten und in der Klinik angewandten Faktoren gibt es eine große Zahl an Genen, Proteinen, klinischen und histopathologischen Eigenschaften, für die Einflüsse auf die Prognose des Nebennierenkarzinoms entdeckt wurden. Dazu zählen beispielsweise erhöhte Biomarkerwerte von TOP2A, EZH2 [47], BUB1 oder PINK1 [48], erhöhte Werte von Östradiolsulfat [49], eine niedrige SGK1-Expression [50], eine klinisch relevante Kortisolproduktion in Patienten mit R0-Resektionsstatus [51] oder verschiedene Mitoseraten in Karzinomzellen [52]. All diese Bemühungen, Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Erkrankung haben, sind Teil aktueller Forschung und führen schließlich auch zu einem besseren Verständnis der Erkrankung und Einschätzungsvermögen des Krankheitsverlaufs [53, 54].

In der Therapie des Nebennierenkarzinoms steht die operative en-block-Entfernung des Tumors im Vordergrund. Zusätzlich zur Adrenalektomie sollten mittels Lymphadenektomie benachbarte Lymphknotenregionen reseziert werden, da Patienten mit operativ entfernten Lymphknoten einen Überlebensvorteil haben [55, 56]. Die Operation sollte von erfahrenen Chirurgen vorgenommen werden. Handelt es sich um einen Tumor mit hohem Rezidivrisiko (ENSAT Stadium III oder R1-Resektion oder Ki67 >10 %) wird eine adjuvante Mitotane-Therapie empfohlen, da sich das rezidivfreie Überleben nach radikaler Tumorresektion mit anschließender Mitotane-Monotherapie als signifikant verlängert zeigte [57]. In Abbildung 2 ist das Management für ein solches ACC dargestellt.

Für fortgeschrittene und nicht R0-resektable Nebennierenkarzinome kommen neben verschiedenen Lokaltherapien (Strahlentherapie, Chemoembolisation, etc.) auch Kombinationen aus Mitotane und EDP (Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin) in Frage. In jedem Fall ist eine individuelle Beratung in einem multidisziplinären Tumorboard obligat. Für weiterführende Details bezüglich der komplexen Therapiestrategien verweise ich auf die Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Endokrinologie von 2018 und die Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Medizinische Onkologie von 2020. [28, 58]



**Abbildung 2: Therapiealgorithmus bei resezierbaren Nebennierenkarzinomen**

Quelle: Darstellung und Übersetzung in Anlehnung an [28]. Therapieoptionen bei fortgeschrittenem ACC sind u.a. in der europäischen Leitlinie nachzulesen [28].

Es ist unbestritten, dass die Therapieerfolge speziell in fortgeschrittenen Tumorstadien sehr begrenzt sind. Aus diesem Grund liegt ein Fokus der Nebennierenkarzinomforschung darauf, Fortschritte in der gezielten Krebstherapie (engl. *targeted therapy*) zu erzielen. Mit dieser Absicht wurden bereits verschiedene molekulare Therapieansätze in kleinen Patientenkohorten getestet. Neben dem Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren [59] und Antikörpern bzw. *small molecules* mit inhibierender Wirkung auf den IGF-1-Rezeptor [60, 61] wurde auch der EGF-Rezeptor als möglicher therapeutischer Angriffspunkt untersucht [62, 63]. Bisher konnte jedoch kein bedeutender Erfolg erzielt werden.

Diese Aufzählung entspricht nur einer kleinen Auswahl an Studien, die *targeted therapy* im Nebennierenkarzinom untersuchen. Die Entwicklung einer chemokinrezeptorbasierten Therapie spielte aber bisher in der Forschung keine Rolle, da die Effekte des Chemokin-Netzwerks im ACC allgemein nicht genauer erforscht sind. Blickt man hingegen auf andere Arbeiten, die Wechselwirkungen von

Chemokinrezeptoren in verschiedenen Karzinomen untersucht haben (s. Kapitel 1.4.1), bieten deren Ergebnisse im Hinblick auf den Krankheitsverlauf und der gezielten Tumortherapien durchaus Potential und eine interessante Arbeitsgrundlage.

## 1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Untergruppe der Zytokine, die unter anderem von Endothelzellen, Leukozyten und Fibroblasten sezerniert werden und deren Wirkung hauptsächlich auf der Auslösung einer zielgerichteten Zellwanderung (Chemotaxis) beruht (**chemotaktische Zytokine**) [64]. Sie werden anhand ihrer Aminosäuresequenz am Amino-Terminus in vier Unterfamilien unterteilt: CC-, CXC-, CX3X- und XC-Chemokine (das C steht für die Aminosäure Cystein, das X für eine andere Aminosäure). Entsprechend ihrer Untergruppen, dem Buchstaben L für Ligand und einer fortlaufenden Nummerierung setzt sich die systematische Nomenklatur zusammen. [65]

Eine weitere Unterteilung ist auch auf funktioneller Ebene möglich. Einige Chemokine werden konstitutiv produziert, wobei deren Aufgabe vor allem in der Regulation der Zellmigration und des Immunsystems liegt. Andere Chemokine werden nur während inflammatorischer Prozesse ausgeschüttet und dienen somit vorwiegend der Anlockung von Immunzellen zum Ort der Entzündungsreaktion. Diese induzierbaren, inflammatorischen Chemokine stellen die größere Anzahl. [66, 67]

Eine Gemeinsamkeit aller Chemokine liegt jedoch in ihrer Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die in der Oberflächenmembran von Zellen (hauptsächlich Leukozyten) sitzen [66]. Aktuell sind etwas über 20 humane Chemokinrezeptoren bekannt, deren Namen sich von der zugehörigen Untergruppe ihrer (Haupt-)Liganden ableiten [68]. Durch Unterschiede in den Rezeptor-Ligand-Affinitäten entstehen Bindungen, die durch die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden diverse Zellreaktionen bewirken [69]. Chemokinrezeptoren, die konstitutiv produzierte Chemokine binden, kommen dabei schwerpunktmäßig auf anderen Zellen vor. Sie haben prinzipiell andere Funktionen in physiologischen Prozessen als die Rezeptoren, die inflammatorische Chemokine binden. Beide Gruppen haben jedoch gemein, dass sie ihre Wirkung vorwiegend durch die Induktion einer gezielten Leukozytenmigration entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung der sekundären lymphatischen Organe oder des Entzündungsherds entfalten. [67]

Neben dieser wichtigen Aufgabe im Immunsystem des Menschen wurden Chemokine in weiteren physiologischen Prozessen als Schlüsselmoleküle nachgewiesen.

Beispielsweise spielen laut verschiedener Studien chemotaktische Zytokine in der Organogenese von Gehirn [70], Niere [71] und der korrekten Ausbildung und Organisation sekundärer lymphatischer Organe [72, 73] eine große Rolle. Außerdem konnte bei einigen Molekülen ein regulatorischer Einfluss auf die Angiogenese gefunden werden [74-76]. Bei entsprechender Fehlregulation dieser Mechanismen kann man sich nicht nur für diverse physiologische Prozesse (z. B. Organisation des Immunsystems, Wundheilung), sondern auch problemlos für Pathologien wie bspw. chronischen Entzündungsreaktionen eine umfassende Bedeutung erschließen.

#### **1.4.1 Einfluss des Chemokin-Netzwerks auf maligne Tumore**

Neben den bereits beschriebenen vielfältigen physiologischen Aufgaben der Chemokine und Chemokinrezeptoren wurde auch in verschiedenen pathologischen Prozessen der Einfluss dieser Moleküle entdeckt. Für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) dienen zum Beispiel die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Co-Rezeptoren für eine erfolgreiche Fusion mit der Zielzelle [77, 78].

Für diese Arbeit von viel größerer Bedeutung ist aber die Beteiligung des Chemokin-Netzwerks an Vorgängen der Tumorbilogie. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte in Studien Assoziationen zwischen Chemokinrezeptorexpression und Tumorwachstum, Tumorangiogenese, Fernmetastasierung und Überlebensraten festgestellt werden [4].

Karzinomzellen sind vergleichbar mit Leukozyten dazu in der Lage, Chemokinrezeptoren zu exprimieren [79, 80]. Das hat zur Folge, dass sie eine Sensibilität für Chemokinsignale und deren Wirkung auf die Zelle entwickeln. Findet im Tumor beispielsweise eine Aktivierung der CXCL8-CXCR1/CXCR2-Achse statt, die unter natürlichen Bedingungen angiogenetische und antiapoptotische Effekte hat, ermöglicht sie dem Tumor ein verstärktes Wachstum und Vaskularisation [74]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben infolgedessen bereits einen Zusammenhang zwischen hochregulierten CXCL8-Level und schlechterer Prognose in Tumoren (bspw. nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) und Prostatakarzinom) gefunden [81, 82].

In erster Linie wird die Expression von Chemokinrezeptoren auf entarteten Zellen aber mit der Metastasierung des Tumors in Verbindung gebracht. Aufgrund ihrer ursprünglichen Funktion, Zellen anhand eines Konzentrationsgradienten in Richtung der Zielregion zu lotsen, werden chemokinrezeptorexprimierende Tumorzellen diesem Mechanismus entsprechend ebenfalls zu diesen Zielregionen gesteuert [83]. In der Literatur wird in diesem Rahmen häufig CXCR4 genannt, der physiologischerweise überwiegend auf Lymphozyten zu finden ist und dort chemotaxisaktivierend wirkt [80,

82]. Eine hohe Konzentration seines Liganden CXCL12 findet man in Organen, die bei näherer Betrachtung als typische Metastasierungsorte vieler Karzinome in Erscheinung treten (Lunge, Leber, Lymphknoten, Peritoneum, Knochenmark...). Müller et al. konnten 2001 auf Grundlage dieser Überlegungen eine Verbindung zwischen der Entwicklung von Brustkrebsmetastasen und der CXCR4-Expression aufzeigen [79]. Abgesehen vom Mammakarzinom wurden schlechtere Überlebenschancen und vermehrte Metastasierung in Zusammenhang mit der CXCR4-Produktion noch in vielen weiteren anderen malignen Tumoren gefunden (Pankreas-, Colon, Prostatakarzinom, NSCLC, Malignes Melanom etc.) [1]. Auch auf das Nebennierenkarzinom konnte ein Einfluss von CXCR4 (positive Korrelation mit Prognosefaktor Ki67) aber auch von CXCR7 (Korrelation mit der Tumorgroße) gefunden werden [84].

#### **1.4.2 Das Chemokin-Netzwerk als Angriffspunkt der Therapie**

Bereits im vorherigen Kapitel wurde erwähnt, dass das Chemokin-Netzwerk auch in Erkrankungen eine Rolle spielt. Auf dieser Grundlage können Therapieansätze entwickelt werden, die sich diese Verknüpfungen zunutze machen und Chemokine oder – Rezeptoren als Angriffspunkte dienen. Hier soll nur kurz ein Einblick in das weite Feld der *targeted therapy* mit Fokus auf das Chemokin-Netzwerk gegeben werden, um das vielversprechende Entwicklungspotential aufzuzeigen.

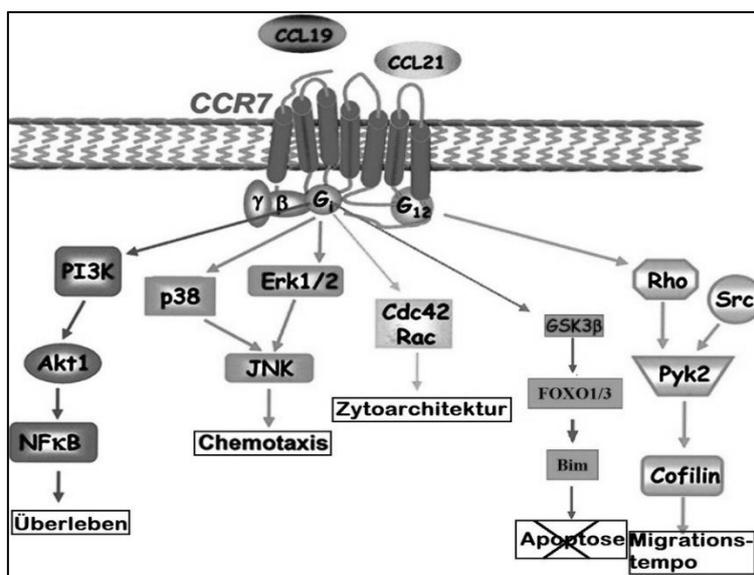
In der HIV-Therapie existieren bereits Medikamente, die durch CCR5-Rezeptor-Blockade die Fusion des HI-Virus mit der Wirtszelle verhindern können [85]. Neben diesem Beispiel aus der Virologie gibt es Ansätze, Chemokinrezeptorantagonisten in der Tumordiagnostik und -therapie einzusetzen. Bereits 1996 beschrieb Arenberg et al. in einem NSCLC-Mausmodell eine Reduzierung des Tumorwachstums nach Inhibierung von CXCL8 [86]. Auch durch eine Blockade von CXCR4 konnte beim Mammakarzinom eine Reduzierung der Metastasierungsrate herbeigeführt werden [79, 87]. Seit einigen Jahren sind nun Phase I-III Studien angelaufen, in denen Antikörper gegen CXCR4 (Einsatz gegen u.a. Multiples Myelom, AML), CCR2 (Knochenmetastasen) und CCR4 (Lymphome) als Tumorthapeutikum eingesetzt werden [1]. An dieser Stelle möchte ich noch einmal auf die Therapie des ACC verweisen (s. Kapitel 1.3.3), bei dem bereits einige Patientengruppen mit einer gezielten Tumorthherapie behandelt wurden. Klinisch wurden bisher jedoch weder CXCR4- noch andere Chemokinrezeptorinhibitoren therapeutisch beim ACC eingesetzt [4].

## 1.5 CC-Chemokinrezeptor 7 und seine Liganden CCL19 und CCL21

An den CC-Chemokinrezeptor 7 binden zwei verschiedene Liganden, CCL19 und CCL21, die beide zu den homöostatisch (s. Kapitel 1.4) exprimierten Chemokinen zählen [3]. CCR7 wird von reifen, antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC), B-Zellen und T-Zellen auf der Zellmembran exprimiert, während CCL19 und CCL21 vor allem in Lymphknoten produziert werden [3, 88].

### 1.5.1 Die physiologische Bedeutung der CCR7-CCL19/21-Achse

Durch die Interaktion mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 werden über intrazelluläre Signaltransduktion verschiedene Reaktionen in der Zelle ausgelöst. Dabei unterscheiden sich die beiden Moleküle teilweise in den vermittelten Signalwegen, was die Grundlage der Vielfältigkeit und Komplexität der CCR7-Aktivierung ist [89, 90]. Abbildung 3 stellt eine Auswahl der ausgelösten Signalkaskaden mit ihren jeweiligen Effekten am Beispiel einer dendritischen Zelle anschaulich dar.



**Abbildung 3: CCR7-Signalkaskaden in dendritischen Zellen**

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [91]. Zu sehen ist eine Auswahl von vereinfacht dargestellten Signalkaskaden, die durch eine Ligandenbindung an CCR7 ausgelöst werden. Neben der Beeinflussung des Migrationstempos und der Chemotaxis wird über unterschiedliche Wege auch eine Kontrolle über das Leben der Zelle entfaltet.

Die Rezeptor-Liganden-Paare sind Schlüsselmoleküle im Lebenszyklus von Immunzellen, die CCR7 exprimieren (DC, T- und B-Lymphozyten). CCR7 beeinflusst dabei unter anderem deren Reifungsprozess und Überleben, denn durch Hemmung der Glykogensynthasekinase 3β [92] und die Aktivierung von PI3K/Akt1 [91] entfaltet die

CCR7-CCL19/21-Achse eine antiapoptotische Wirkung auf die betroffene Zelle. Neben diesen allgemeinen Effekten auf Zellen wurde in verschiedenen Experimenten außerdem nachgewiesen, dass die Entwicklung einer normalen Lymphknotenarchitektur und die funktionale Organisation der Follikel von CCR7-Level kontrolliert werden [73, 93].

Im Vordergrund steht die vermittelte Fähigkeit, einerseits im Körper im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen bis in die Peripherie zu zirkulieren und andererseits im Anschluss aus der Körperperipherie zurück in lymphatische Organe (v.a. Lymphknoten) zu migrieren. Durch Anregung mehrerer Signalkaskaden wurde der Einfluss der CCR7-Aktivierung auf die Zellwanderung belegt [89, 94]. Unterstrichen wird dies durch ein Experiment mit CCR7 negativen Mäusen, in denen CCR7 negative Zellen nicht mehr in der Lage waren entlang der Blut- oder Lymphgefäße in den Lymphknoten zu wandern [95]. Damit ist eine CCR7-Expression die Grundlage für eine funktionierende Chemotaxis antigenpräsentierender Zellen und aktivierter Lymphozyten in das lymphatische Zielorgan, um die adaptive Immunantwort zu gewährleisten.

### **1.5.2 Die Rolle von CCR7 in malignen Tumoren**

Die Tatsache, dass eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren auf maligne entarteten Zellen abnorm exprimiert werden und Folgen auf den Krankheitsverlauf haben, wurde in Kapitel 1.4.1 bereits beschrieben. Auch der CC-Chemokinrezeptor 7 konnte auf der Zellmembran vieler Tumorzellen nachgewiesen werden. Man fand seine Expression sowohl (erwartungsgemäß) auf Lymphomen als auch auf vielen verschiedenen Karzinomen (Mamma-, Prostata-, Magen-, Colonkarzinom, NSCLC, Melanom, Karzinome des Kopf-Halsbereiches) [96-98].

Führt man sich noch einmal die physiologischen Prozesse vor Augen, in denen CCR7 involviert ist, liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen seiner Anwesenheit und der lymphatischen Metastasierung zu vermuten. Wie in Abbildung 3 in Kapitel 1.5.1 zu sehen ist, wird sowohl die Chemotaxis als auch das Überleben von Zellen beeinflusst, was beides Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bildung von Metastasen sind. Vor allem über die Interaktion von CCL21 mit seinem Rezeptor wird analog zur Leukozytenmigration die Einwanderung und Ansiedelung der Krebszellen in den Lymphknoten angeregt. [97]

Die Auswirkungen einer Einflussnahme dieser chemotaktischen Moleküle auf die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) dient als Paradebeispiel: CCL21 und CCL19 werden hier von hochendothelialen Venolen ausgeschüttet und schaffen die

Voraussetzung zur epithelialen-mesenchymalen Migration der Tumorzellen. Die ist eine der Ursachen dafür, dass es bei höherer CCR7-Expression klinisch zu vermehrter Lymphadenopathie im Rahmen der Erkrankung kommt [96, 99]. 2001 ließ dann eine experimentelle Studie an Mammakarzinomzellen aufhorchen, in der zum einen CCR7 nachgewiesen wurde und dessen Expression zum anderen in vitro mit Pseudopodienbildung einherging [79]. Folglich mündete dieser Vorgang in einen chemotaktischen Prozess, der einer erhöhten Invasivität des Tumors gleichzusetzen ist. In vivo konnten diese Ergebnisse unter anderem an einem Mausmodell bestätigt werden, in dem Mäusen entweder CCR7-positive oder CCR7-negative Brustkrebszellen eingesetzt wurden. In den CCR7(-)-Mäusen fand man zwar Lungen- aber keine Lymphknotenmetastasen, wohingegen in CCR7(+)-Mäusen vermehrt Lymphknotenmetastasen auftraten. Zusätzlich wuchs der CCR7(+)-Tumor schneller als der Kontrolltumor [100]. Die Rolle der CCR7/CCL21-Achse im Mammakarzinom wird aktuell weiter intensiv untersucht [101]. Auch im malignen Melanom konnte mithilfe eines Mausmodells nachgewiesen werden, dass CCR7 alleine eine erhöhte Invasivität und Metastasierungsrate bewirkt [102]. Dass die in vitro und an Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse reproduzierbar sind, lässt sich am Beispiel zweier am Magenkarzinom erkrankten Patientengruppen zeigen. Sowohl Mashino et al. als auch Zhou et al. fanden eine Korrelation zwischen erhöhter Lymphgefäßinvasion, Lymphknotenmetastasierung und CCR7-Expression der Tumorzellen. Darüber hinaus verkürzte sich das Gesamtüberleben der CCR7(+)-gemessenen Patienten signifikant. [103, 104]

Man kann also zu dem Schluss kommen, dass es sich beim CC-Chemokinrezeptor 7 um einen Stoff handelt, der großen Einfluss auf die Metastasenbildung und damit den klinischen Verlauf von Karzinomen hat. Im Falle des seltenen Nebennierenkarzinoms stehen bisher jedoch keine publizierten Daten zur Verfügung, da weder in normalen Nebennierengewebe noch im ACC die CCR7-Produktion genauer untersucht wurde. Erste Vor-Experimente der Würzburger Endokrinologie, in der in einer Art Screening Nebennieren und Nebennierenkarzinome nach Chemokin(-rezeptor)-Expression abgesucht wurden, lassen aber eine Aktivität des Rezeptors vermuten [105].

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Zum Einfluss des Chemokin-Netzwerks in der Nebennierenrinde ist bisher kaum etwas bekannt. Basierend auf den in den Vorkapiteln beschriebenen Informationen zu Chemokinrezeptoren bei anderen Tumoren war es das Ziel, im Rahmen dieser Promotionsarbeit detailliertere Informationen zu sammeln, in welchem Umfang der CC-Chemokinrezeptor 7 im gesunden Nebennierengewebe, in benignen Tumoren der Nebenniere und im Nebennierenkarzinom vorkommt.

Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Ist CCR7 in der normalen Nebenniere auf mRNA- und Proteinebene exprimiert und wenn ja, gibt es eine unterschiedliche Protein-Expression in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde?
- 2) Wie ist CCR7-mRNA und -Protein in den unterschiedlichen benignen Nebennierenadenomen (cortisolproduzierend, aldosteronproduzierend, endokrin-inaktiv) exprimiert?
- 3) Wie verhält sich hierzu die Expression von CCR7 im Nebennierenkarzinom (ACC)?

Nach dem Nachweis einer variablen Expression von CCR7 in Nebennierenkarzinomen wurde dieser Aspekt im Weiteren noch etwas genauer beleuchtet:

- 4) Gibt es einen Unterschied in der Expression von CCR7 zwischen Primärtumor, Lokalrezidiv, Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen?
- 5) Korreliert die Expression von CCR7 mit der Hormonsekretion der ACC oder anderen klinischen Parametern?
- 6) Hat die CCR7-Expression einen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung?
- 7) Hat die CCR7-Expression einen Einfluss auf die Tumorprogression?
- 8) Hat die CCR7-Expression einen Einfluss auf die (Lymphknoten-)Metastasierung?

In Abhängigkeit von diesen Ergebnissen wäre dann ggf. auch ein Einsatz von CCR7 im Rahmen der Diagnostik oder gar Therapie von Nebennierentumoren denkbar.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 (Tumor-)Gewebe und klinische Daten

Die Untersuchungen waren durch ein Ethikvotum (Antragsnummern AZ-93/02 und AZ-88/11) genehmigt.

Insgesamt wurden 256 Gewebe immunhistochemisch, 37 Gewebe molekularbiologisch auf RNA-Ebene (qPCR) und 11 Gewebe proteinbiochemisch mittels *Western Blot* Verfahren untersucht (s. Tabelle 2).

Nicht paraffiniertes Gewebe stammt aus der Tumorbank des Schwerpunktes Endokrinologie der Klinik und Poliklinik I der Uniklinik Würzburg. Das für die immunhistochemische Färbung verwendete Gewebe stammt aus unterschiedlichen Pathologien in ganz Deutschland, wo sie in Paraffin eingebettet wurden.

**Tabelle 2: Übersicht untersuchtes Gewebe**

Gewebe		
<i>Immunhistochemie (n=256)</i>	<i>qPCR (n=37)</i>	<i>Western Blot (n=11)</i>
<b>Normale Nebennieren</b> 4	<b>Normale Nebennieren</b> 4	<b>Normale Nebennieren</b> 1
<b>ACC</b> 128 Primarii 13 Rezidive	<b>ACC</b> 9 Primarii	<b>ACC</b> 4 Primarii Hela-Zelllinie
<b>Adenome</b> 18 CPA 20 APA 21 EIA	<b>Adenome</b> 10 CPA 11 APA 3 EIA	
<b>ACC-Metastasen</b> 29 Lk-Metastasen 7 Lungenmetastasen 3 Lebermetastasen 9 Weichteilmetastasen		
<b>Anderes Gewebe</b> Tonsille, Ovar, Magen, Lunge		<b>Anderes Gewebe</b> Magen, Lunge, Rectumfett, Schilddrüse, Struma

Zu den 128 Patienten, deren ACC-Primarius-Gewebe immunhistochemisch gefärbt wurde, wurden pseudonymisierte Daten aus dem Deutschen Nebennieren-Karzinom-Register erhoben. Zu acht dieser Gewebe waren entweder keine oder nicht ausreichend klinische Daten verfügbar, wurden in der statistischen Auswertung Duplikate gefunden oder hatten die Patienten ihre schriftliche Einwilligung zur Nutzung ihrer Daten zurückgezogen. Sie wurden ausgeschlossen und folglich 120 Patienten in die

Auswertung für die Überlebensanalysen eingeschlossen. Tabelle 3 zeigt die Charakteristika dieser Kohorte von 120 Patienten mit ACC.

**Tabelle 3: Charakteristika der Patientenkohorte**

<b>Alter bei Diagnose in Jahren</b>	
Median (Spanne)	49,7 (16-87)
n fehlend (%)	0 (0)
<b>Geschlecht – n (%)</b>	
Männlich	42 (35)
Weiblich	78 (65)
fehlend	0 (0)
<b>Tumorstadium (ENSAT) – n (%)</b>	
I-II	53 (44)
III	35 (29)
IV	27 (23)
fehlend	5 (4)
<b>Hormonproduktion – n (%)</b>	
Glukokortikoide (selektiv)	18 (15)
Mineralkortikoide (selektiv)	4 (3)
Androgene/-vorläufer (selektiv)	8 (7)
Gluko. + andere Steroidhormone	30 (25)
Androgene + Mineralkortikoide	1 (1)
endokrin inaktiv	16 (13)
fehlend	43 (36)
<b>Resektionsstatus – n (%)</b>	
R0	59 (49)
R1/RX	15 (13)
R2	23 (19)
fehlend	23 (19)
<b>Tumorgröße in cm</b>	
Median (Spanne)	10,4 (2,5-26)
n fehlend (%)	4 (3)
<b>Weiss-Score</b>	
Median (Spanne)	5 (2-10)
n fehlend (%)	21 (18)
<b>MIB1 (Ki67) Index</b>	
Median (Spanne)	10 (1-80)
n fehlend (%)	15 (13)
<b>Metastasierung – n (%)</b>	
Lymphknotenmetastasierung bei ED	19 (16)
fehlend	20 (17)
Lymphknotenmetastasierung im Verlauf	36 (30)
fehlend	51 (43)
Fernmetastasierung	91 (76)
fehlend	7 (6)
<b>Krankheitsspezifisches Überleben in Monaten</b>	
Median (Spanne)	49 (1-264)
n fehlend (%)	5 (4)
<b>Progressionsfreie Zeit in Monaten</b>	
Median (Spanne)	13 (1-220)
n fehlend (%)	3 (2)

## 2.2 Material

Alle Materialien können den folgenden Tabellen entnommen werden.

**Tabelle 4: Verwendete Zelllinie**

Zelllinie	
HeLa	Cell Line Service (CLS), Heidelberg

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper**

Primärantikörper			
<i>Epitop</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-CCR7	Rabbit, monoclonal [Y59]	- Immunhistochemische Färbung - <i>Western Blot</i>	Abcam (Cambridge, UK), #ab32527
Anti-GAPDH	Rabbit, polyclonal	- <i>Western Blot</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), #G9545
Anti-β-Actin	Rabbit, monoclonal (D6A8)	- <i>Western Blot</i>	Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA) #8457
Negativkontrolle	Rabbit, Ig-Fraktion	- Immunhistochemische Färbung (Isotyp-Kontrollantikörper)	Dako (Carpinteria, CA, USA), #IS600
Sekundärantikörper			
<i>Epitop</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Rabbit	Goat polyclonal, HRP-linked	- <i>Western Blot</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA), #111-035-144

**Tabelle 6: Verwendete Primer**

Oligonukleotidprimer		
<i>Bezeichnung</i>		<i>Hersteller</i>
CCR7-Sonden-Primer-Mix	TaqMan® Gene Expression Assay HS 01013469_m1,	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), #4453320
β-Actin-Sonden-Primer-Mix	TaqMan® Gene Expression Assay HS 99999903_m1	
GAPDH-Sonden-Primer-Mix	TaqMan® Gene Expression Assay HS 99999905_m1	

**Tabelle 7:      Verwendete Kits**

<b>Kits</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
RNeasy mini Kit (#74106)	Qiagen (Hilden)
RNase-free DNase Set (#79254)	
QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205313)	
Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix (#4369016)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (#34075)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Bicinchoninic Acid Kit (#BCA-1)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Histologische Methoden</b>	
Liquid DAB+Substrate Chromogen System (#K3468)	Dako (Carpinteria, CA, USA)
ADVANCE™ HRP (#K4068)	

**Tabelle 8:      Verwendete Geräte**

<b>allgemein genutzte Geräte</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)
Plattformschüttler	Heidolph Instruments (Schwabach)
pH-Meter inoLab®	Xylem Analytics Germany Sales (Weilheim)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg), Brand (Wertheim)
Vortexer	LMS Medical Supplies (Portsmouth, VA, USA) Biosan (Riga, Lettland)
Waage	Kern® (Balingen-Frommern)
Magnetrührer (MMS-3000)	Biosan (Riga, Lettland)
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
TissueLyser II (#85300)	Qiagen (Hilden)
NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
C1000™ Thermalcycler	BioRad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA)
CF69™ Real-Time PCR Detection System	
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	
Thermoschüttler TS-100	Biosan (Riga, Lettland)
Ultraschall (Sonopuls GM 70)	Bandelin (Berlin)
Biophotometer Plus	Eppendorf (Hamburg)
PowerPac Basic™	BioRad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA)
Mini PROTEIN® Tetra Cell	

Blot Tank	
C-DiGit® Blot Scanner	LiCor Biosciences (Lincoln, NE, USA)
<b>Histologische Methoden</b>	
Schnellkochtopf	Rommelsbacher (Dinkelsbühl)
Heraeus Trockenschrank UT 5050E	Heraeus (Hanau)
Halbautomatisches Rotationsmikrotom (CUT 5062)	SLEE medical (Mainz)
Mikroskop DM IL	Leica Microsystems (Wetzlar)

**Tabelle 9:        Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Handschuhe (Peha-soft® nitrile)	Hartmann (Heidenheim a. d. Brenz)
Pipettenspitzen, Biosphere Filter Tips	Sarstedt (Nümbrecht)
Caps steril, unsteril	Eppendorf (Hamburg)
Destilliertes Wasser	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
Stainless Steel Beads 5mm (#69989)	Qiagen (Hilden)
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	
RIPA buffer (#R0278)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Proteaseinhibitor (#P8340)	
Whatman® Cellulose Filter Paper	
Glycin	
Chlorwasserstoff	
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	
Bromphenolblau	
Phosphatase Inhibitor Cocktail B (#sc-45045)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail C (#sc-45065)	
Mini-Protean TGX™ Gel 12 % (#456-1043)	BioRad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA)
Foam Pads (Schwämme)	
Dithiothreitol (DTT)	
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#26619)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PVDF-blotting Membran, P0,45 µm	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Magermilchpulver	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tween® 20	
TRIS (Trisaminomethan)	
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Küvetten (#67.742)	Sarstedt (Nümbrecht)
Western Sure Pen	LiCor Biosciences (Lincoln, NE, USA)

<b>Histologische Methoden</b>	
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Ethanol	Honeywell (Morristown, NJ, USA)
Deckgläser 24 x 60 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Objektträger	
Entellan® neu	Merck KGaA (Darmstadt)
Citronensäure	
Natronlauge	
Natriumchlorid	
Wasserstoffperoxid	
Humanalbumin Serum (#H4522)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Tabl.	
Sodiumhydroxid (NaOH) Tabl.	
Xylol	Th. Geyer (Renningen)
Fettstift Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

**Tabelle 10: Verwendete Lösungen und Puffer**

<b>Lösungen und Puffer</b>		
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe / Komponenten</b>	<b>Menge / Erläuterung</b>
10 x TBS-Puffer	TRIS NaCl H <sub>2</sub> O	24 g 87,66 g 1000 ml
1 x TBST-Puffer	Tween® 20 10 x TBS H <sub>2</sub> O	0,5 ml 100 ml damit auf 1 Liter auffüllen
10 x Runningpuffer	TRIS Glycin SDS H <sub>2</sub> O	30 g 144 g 10 g 1000 ml Für Gebrauch 1:10 verdünnen
10 x Transferpuffer	TRIS Glycin H <sub>2</sub> O  + Methanol	32,5 g 144 g 1000 ml Für Gebrauch 1:10 verdünnen + 10 %
Blockingpuffer	Magermilchpulver 1 x TBST	5 %
Strippingpuffer	Glycin HCl (37 %) 20 % SDS H <sub>2</sub> O	1,8 gr auf pH 2 einstellen 50 ml Auf 1 Liter auffüllen

SDS-Ladepuffer	20 % SDS Glycerin Bromophenolblau TRIS-HCl pH 6,8 DTT	10 ml 20 ml 0,04 g 10 ml 10 mM
<b>Histologische Methoden</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe / Komponenten</b>	<b>Menge / Erläuterung</b>
Citronensäuremonohydratpuffer	Citronensäure Natriumhydroxydplättchen NaOH H <sub>2</sub> O	840 mg 2 Stck. Titrieren bis pH 6,5 400 ml

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

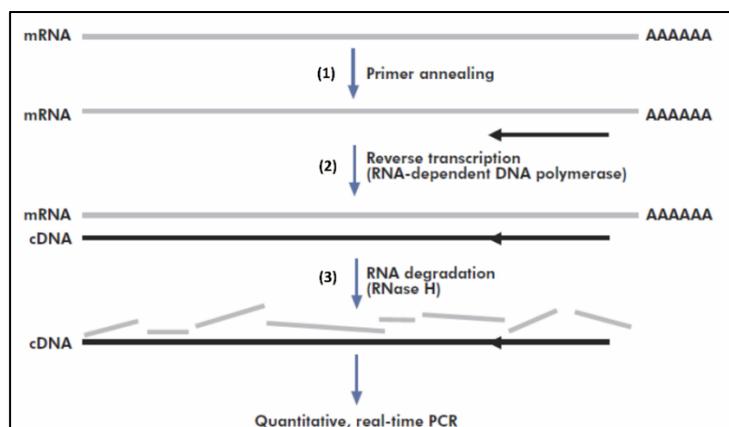
#### 2.3.1.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von mRNA

Zur Isolierung von RNA musste das Gewebe zuerst zerkleinert werden. Dafür wurden die Proben mittels *TissueLyser II* und *stainless steel beads* 45 s mit einer Frequenz von 30/s geschreddert. Im Anschluss wurde zur Gewinnung von mRNA aus dem zerkleinerten Gewebe (ACCs, Adenome, normale NN) mit dem *RNeasy mini Kit* gearbeitet und der Versuch ausschließlich nach Protokoll des Herstellers Qiagen (RNeasy Mini Handbook 06/2012) durchgeführt. Die benötigten Reagenzien waren alle im Kit enthalten, wobei zusätzlich durchgehend auf die Verwendung von RNase-freiem Wasser und RNA-freiem Arbeitsmaterial geachtet wurde. Der im Protokoll als optional beschriebene Schritt des Verdauens von genomischer DNA durch DNase-I wurde durchgeführt (s. „DNase Set“ Tabelle 7). Die isolierte RNA wurde im Anschluss bei - 20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Um die Konzentration der isolierten RNA zu bestimmen, wurden 2 µl der Probe bei einer Lichtwellenlänge von 260-280 nm im Spektralphotometer gemessen. Proben mit einer ratio <1,6 wurden verworfen, da diese für eine Verunreinigung mit anderen Substanzen spricht, was zu Fehlern beim Umschreiben der RNA in DNA führen kann.

### 2.3.1.2 Umschreibung der mRNA in cDNA

Um die Expression bestimmter Gene untersuchen zu können, musste die gewonnene RNA zuvor in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, da diese in der PCR vervielfältigt werden kann. Das Enzym, das zu dieser Modifikation des Erbguts fähig ist, ist die Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), die natürlicherweise in Retroviren vorkommt und die Umschreibung einsträngiger RNA in cDNA in 5'→3' Richtung katalysiert (s. Abbildung 4 für Details). Für die Durchführung dieses Versuchs wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* verwendet. Nach Anleitung des Herstellers (QuantiTect Reverse Transcription Handbook 03/2009) wurde 1 µg der zu untersuchenden RNA-Probe jeweils nach Protokoll mit DNA-bereinigendem Puffer und RNA-freiem Wasser vermischt und bei 42 °C für 5 min inkubiert. Danach wurde der *Reverse-transcription master mix* – bestehend aus einer Reversen Transkriptase, einem Random-Primermix und Puffer - hinzu pipettiert und ebenfalls bei 42 °C, diesmal für 15 min, inkubiert und schließlich die Inaktivierung des Enzyms und damit das Ende der reversen Transkription durch Erhitzung auf 95 °C herbeigeführt. Die nun entstandene cDNA konnte direkt für die Durchführung einer qPCR verwendet und so analysiert werden.



**Abbildung 4: cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase**

Quelle: [106]. Es wird skizzenhaft das Prinzip der cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase dargestellt. Nach der Anlagerung des Primers an die mRNA **(1)** bindet dort die RNA-abhängige DNA-Polymerase und synthetisiert einen zur mRNA komplementären DNA-Strang. **(2)** Durch eine RNase H-Aktivität des Enzyms wird der mRNA-Strang anschließend abgebaut. **(3)** Nicht dargestellt ist die anschließende Ergänzung des DNA-Einzelstrangs zu einem Doppelstrang.

### 2.3.1.3 Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine der Grundlagen der molekularbiologischen Forschung und wurde unter anderem mit einem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [107]. Durch eine Kettenreaktion können unendlich viele Kopien

selbst kleinster DNA-Abschnitte erzeugt werden. Dabei dient ein DNA-Abschnitt als Matrize, der in n-fachen zyklischen Temperaturveränderungen durch das Vorhandensein einer DNA-Polymerase, Nukleotiden und Primern unendlich vervielfacht werden kann. In jedem neuen Zyklus stehen die gerade synthetisierten Amplifikate für die weitere PCR zur Verfügung, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung des Erbgutabschnitts kommt. Im Detail bestehen die Zyklen aus folgenden Schritten:

Denaturierung: Auftrennung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C

Annealing: Anlagerung der Primer an komplementäre DNA-Abschnitte bei 60 °C

Elongation: Synthese des cDNA-Strangs in 5'→3'-Richtung bei 60-72 °C

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte PCR, die *real-time PCR* (oder auch *quantitative PCR*, *qPCR*) angewendet, bei der die Quantifizierung der ursprünglichen DNA-Menge in Echtzeit während eines Amplifikationszyklus möglich ist. Die neu entstandenen DNA-Abschnitte wurden dafür mittels Fluoreszenzsignalen, welche von eingebauten TaqMan-Sonden nach Hydrolyse durch die Polymerase abgegeben wurden, quantifiziert und daraus die relative DNA-Ausgangskonzentration berechnet. Kombiniert mit der unter Kapitel 2.3.1.2 beschriebenen reversen Transkription (RT) der RNA in DNA wird das Vorgehen auch qRT-PCR genannt. Mit dieser ist es möglich, die mRNA-Expression bestimmter Zielgene zu messen.

Zur gezielten Amplifikation der Gensequenz des Chemokinrezeptors CCR7 musste ein synthetisch hergestellter Oligonukleotidprimer eingesetzt werden, der an den Abschnitten anlagerte, welche die eingesetzte hitzebeständige Taq-Polymerase vervielfältigen sollte. Im Falle des CCR7-Rezeptorgens wurde ein kommerziell erhältlicher Primer-Sonden-Mix (s. Tabelle 6) verwendet. Außerdem wurden zur Kontrolle die Referenzgene (*housekeeping gene*)  $\beta$ -Actin und GAPDH analysiert, da diese ubiquitär und kontinuierlich transkribiert werden.

Im verwendeten Kit *Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix* befanden sich bis auf die beschriebenen Primer und die DNA-Proben alle benötigten Substanzen inklusive der Taq-Polymerase, den Nukleotiden und der TaqMan-Sonde. Die Probenvorbereitung und Durchführung der PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. In Tabelle 11 ist das modifizierte PCR-Programm zu sehen, nach dem die Amplifikation der DNA in 40 Zyklen ablief.



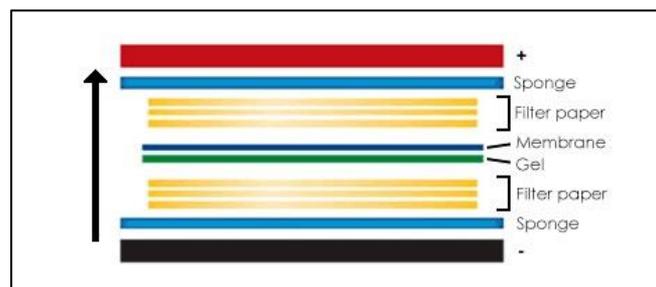
Laemmli. Diese ist etabliert und eignet sich gut zur Analyse von Proteinen mit Molekülmassen zwischen 5 – 250 kDa [108].

20 µg der isolierten Proteine wurden nach der Konzentrationsmessung (s. Kapitel 2.3.2.1) mit SDS-Ladepuffer vermischt und 5 min bei 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Moleküle aufzubrechen, sowie deren Eigenladung zu überdecken. Nach dieser Vorbereitung wurden 25 µl jeder Probe in eine eigene Tasche des Gels pipettiert. Darüber hinaus wurde als Größenmarker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* verwendet, von welchem 5µl in die erste und/oder letzte Tasche des Gels gefüllt wurden. Durch das entstehende charakteristische Bandenprofil des Größenmarkers, war eine Zuordnung der Banden zu bestimmten Proteingrößen möglich. Die Elektrophoresekammer (*Mini PROTEIN® Tetra Cell*) mit eingespanntem Gel wurde vor der Taschenbeladung mit Runningpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde zur Proteintrennung für ca. 1 h eine Spannung von 150 V (*PowerPac Basic™*) erzeugt.

### 2.3.2.3 Proteintransfer durch *Western Blot*

Um die Proteine zu fixieren und darstellen zu können, wurden sie nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (s. Tabelle 9) transferiert. Diese Methode bezeichnet man als *Western Blot* [109], wobei in dieser Arbeit mit dem Tank-Blot-System (wet-blotting-system) gearbeitet wurde.

Die PVDF-Membran wurde vor dem Aufbau des „Blot-Sandwiches“ 2 min in Methanol aktiviert und 5 min in Transferpuffer inkubiert. Auch das Whatman-Filter-Papier und die Schwämme wurden in Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurden die einzelnen Bausteine des *Western Blots* zusammengesetzt. Der genaue Aufbau ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Aufbau des *Western Blots* in der Blotting Apparatur**

Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an [110]. Der schwarze Pfeil am linken Rand gibt die Blottingrichtung vor. Neben jeweils einem Schwamm pro Seite werden die Membran und das Gel beidseits von einer dreilagigen Filterpapierlage eingerahmt.

Beim Zusammenbau müssen Luftblasen vermieden und die Reihenfolge des Aufbaus streng beachtet werden, da die negativ geladenen Proteine in Richtung des Pluspols

geblottet werden und eine fehlerhafte Reihenfolge ein Blotten der Proteine auf Filterpapier zur Folge hätte.

Der Blot Tank mit eingefügter Blottingkassette wurde anschließend mit Transferpuffer und einem Eispaket zur Kühlung befüllt.

Abschließend erfolgte der Proteintransfer im Kühlraum bei konstant 100 V über 60 min.

#### 2.3.2.4 Immundetektion der transferierten Proteine

Durch eine Immundetektion (indirekte Methode), welche im Anschluss an den *Western Blot* durchgeführt wurde, konnten die auf der PVDF-Membran fixierten Proteine visualisiert werden. Hierbei macht man sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze: Das freiliegende, gesuchte Epitop wird durch einen spezifischen Primärantikörper gebunden, an welchen sich wiederum ein Sekundärantikörper, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet, anlagert. Zusätzlich ist der Sekundärantikörper an ein Enzym gekoppelt - in dieser Arbeit handelte es sich um das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) -, welches eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert und in Folge die Protein-Antikörper-Komplexe sichtbar werden.

Die genaue Behandlung der beladenen Membranen erfolgte im Detail nach dem in Tabelle 12 dargestellten Protokoll.

**Tabelle 12: Protokoll Immundetektion**

Inkubationsschritt	Dauer	Verwendete Substanzen
Blockieren	1 h (RT)	Blockingpuffer (s. Tabelle 10)
Waschen	2 mal 10 s	TBS (vgl. Tabelle 10)
Primärantikörper	über Nacht (4 °C)	Antikörper <sup>1,2,3</sup> (s. Tabelle 5) in Blockingpuffer
Waschen	4 mal 15 min	TBST (vgl. Tabelle 10)
Sekundärantikörper	1 h (RT)	Antikörper in Blockingpuffer
Waschen	3 mal 15 min 1 mal 15 min	TBST TBS
Entwickeln	5 – 12 min	<i>SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat</i> (s. Tabelle 7)

1: CCR7-Antikörper in 1:5000 Verdünnung; 2: beta-Actin-Antikörper in 1:1000 Verdünnung; 3: GAPDH-Antikörper in 1:5000 Verdünnung

Die Luminiszenzdetektion während der Entwicklung erfolgte mit dem Gerät *C-DiGit® Blot Scanner* (s. Tabelle 8).

### **2.3.3 Histologische Methoden**

#### **2.3.3.1 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die meisten Tumorgewebe stammen aus unterschiedlichen Pathologien in ganz Deutschland, wo sie in Paraffin eingebettet wurden. Das Fixieren von in Würzburg gewonnenem Gewebe sowie das Eindecken in Paraffin führten Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Uni Würzburg durch. Auch die verwendeten tissue microarrays wurden in der Pathologie der Uniklinik Würzburg hergestellt. Im endokrinologischen Labor wurden von einer erfahrenen MTA Schnitte mit einer Dicke von 2 µm mithilfe eines Mikrotoms (CUT 5062, SLEE) angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und getrocknet.

#### **2.3.3.2 Ak-Qualitätskontrolle durch Positiv- und Negativkontrollen und Ak-Verdünnungsetablierung**

Der verwendete CCR7-Antikörper wurde zuerst auf Selektivität überprüft. Dazu wurden Positiv- und Negativkontrollen unter Verwendung des CCR7-Antikörpers immunhistochemisch gefärbt sowie proteinbiochemisch (*Western Blot*) bearbeitet. Als Positivkontrolle diente Gewebe, das laut Antikörper-Datenblatt und „The Human Protein Atlas“ ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) gesichert die Zielproteine exprimiert. „The Human Protein Atlas“ diente ebenfalls als Referenzquelle bei der Auswahl der Negativkontrollen. Die Ergebnisse dieser Antikörperprüfung sind unter Kapitel 3.1 dargestellt.

Zur Evaluierung der passenden Antikörperkonzentration im Verdünnungsmedium (PBS) wurden Verdünnungsreihen hergestellt und die immunhistochemische Färbung nach Protokoll an ausgewähltem, stets gleichem Gewebe durchgeführt. Es erfolgte eine mikroskopische Beurteilung jedes Verdünnungsschritts mit dem Ergebnis, dass eine Ak-Verdünnung von 1:3000 als Arbeitsverdünnung ausgewählt wurde.

#### **2.3.3.3 Immunhistochemische Färbung und Auswertung**

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 2 mal 12 min in Xylol entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte eine sukzessive Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 100 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol) mit anschließendem Waschen in H<sub>2</sub>O. Der Antigendemaskierung, realisiert durch 13-minütiges Kochen (Dampfkochtopf, Rommelsbacher) in Citronensäurepuffer, folgte eine ca. 20-minütige Abkühlungsphase und das erneute Waschen in H<sub>2</sub>O. Als nächstes wurden die Schnitte zur Hemmung der endogenen Peroxidase 10 min mit einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung (in MeOH) behandelt und danach 1 h bei RT mit humanem AB-Serum (1:5 verdünnt mit PBS)

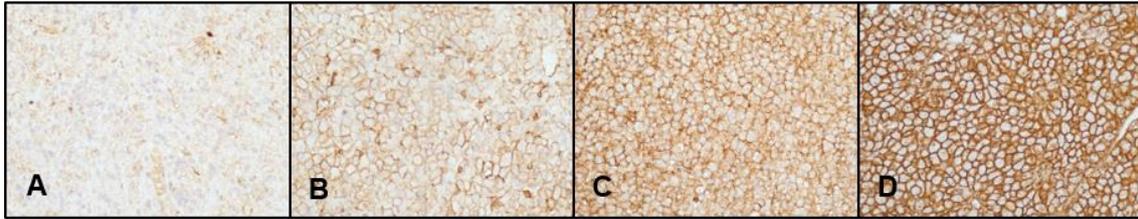
inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen CCR7 (s. Tabelle 5) wahlweise 1 h bei RT oder üN bei 4 °C aufgetragen. Die beiden verschiedenen Inkubationsmethoden wurden vorher verglichen und liefern übereinstimmende Ergebnisse. Nach Bindung des Primärantikörpers an das Epitop wurden die Schnitte fünfmal in PBS gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde unter Benutzung des Kits *ADVANCE™ HRP* ein Brückenantikörper (*Advance™ HRP Link*) für 20 min auf die Schnitte pipettiert, erneut in PBS gewaschen (15 min) und schließlich der HRP-Enzym Komplex (*Advance™ HRP Enzyme*) ebenfalls 20 min aufgetragen. Da das Enzym lichtempfindlich ist, wurde darauf geachtet, möglichst im Dunkeln zu arbeiten. Einem weiteren 15-minütigem Waschen in PBS folgte eine 10-minütige Inkubation der Schnitte mit einem Chromogen (*Liquid DAB+Substrate Chromogen System*). Die chemische Farbreaktion, welche die Epitop-Antikörperbindung sichtbar macht, wurde durch Leitungswasser beendet.

Zur Kontrastbildung wurden die Schnitte 2 min in eine Hämalaulösung nach Mayer gestellt, um eine Unterscheidung der vorwiegend membranständigen immunhistochemischen Färbung von den Kernen der Zellen zu vereinfachen. Diesem Schritt folgte für 5 min das Bläuen in Leitungswasser, um überschüssiges Hämatoxylin abzuwaschen. Abschließend wurden die Schnitte für ca. 20 min bei 56 °C getrocknet und mit Entellan eingedeckt.

Zur Kontrolle wurde in allen Färbedurchläufen jeweils eine Negativkontrolle angefertigt, bei der anstatt des CCR7-Antikörpers ein Isotyp-Kontrollantikörper (s. Tabelle 5) aufgetragen wurde. Die übrigen Arbeitsschritte wurden identisch ausgeführt. Als Negativkontrollen fungierten verschiedene Schnitte von Nebennierenkarzinomen.

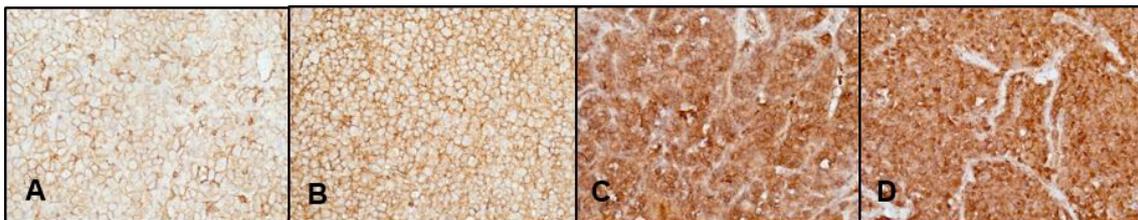
Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung wurden lichtmikroskopisch von zwei Untersuchern (Ursula Sauer und Katharina Other) unabhängig voneinander beurteilt. Bei Diskrepanzen in der Einschätzung der Färbung erfolgte eine zweite gemeinsame Beurteilung oder alternativ eine Auswertung durch einen Dritten (Stefanie Hahner). Kein Prüfer hatte zu diesem Zeitpunkt Informationen zu den klinischen Daten.

Für die Berechnung eines semiquantitativen H-Scores wurde - wie in früheren Arbeiten beschrieben [111, 112] - folgendermaßen vorgegangen: Mikroskopisch wurde die durchschnittliche Färbeintensität (s. Abbildung 6 und Abbildung 7) beurteilt und mit einem Wert zwischen 0 und 3 bewertet, wobei 0 als negativ, 1 als schwach positiv, 2 als mäßig positiv und 3 als stark positiv gewertet wurde.



**Abbildung 6: Färbeintensitäten der Membran**

Immunhistochemische Färbung von CCR7 in nebennierenspezifischen Geweben, 10-fache Vergrößerung. **(A)** Membranfärbung negativ; **(B)** Membranfärbung schwach positiv; **(C)** Membranfärbung mäßig positiv; **(D)** Membranfärbung stark positiv.



**Abbildung 7: Färbeintensitäten des Zytoplasmas**

Immunhistochemische Färbung von CCR7 in nebennierenspezifischen Geweben, 10-fache Vergrößerung. **(A)** Zytoplasmafärbung negativ; **(B)** Zytoplasmafärbung schwach positiv; **(C)** Zytoplasmafärbung mäßig positiv; **(D)** Zytoplasmafärbung stark positiv.

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen ermittelt und die Werte einem proportionalen Score zugewiesen:

- 0 wenn 0 % positiv
- 0,1 wenn <10 % positiv
- 0,5 wenn <50 % positiv
- 1 wenn >50 % positiv.

Dieser proportionale Wert wurde schließlich mit dem Wert der Färbeintensität multipliziert und der semiquantitative H-Score berechnet. [111, 112]

Sowohl die Membran- als auch die Zytoplasmafärbung wurde einzeln bewertet.

### 2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit den Statistikprogrammen GraphPad Prism (Version 7, La Jolla, CA, USA) und IBM SPSS Statistics (Version 24, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse wurden ebenfalls mithilfe dieser Programme graphisch dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde unabhängig der verwendeten Testverfahren auf 0,05 festgelegt.

Zuerst wurden die Daten hinsichtlich der statistischen Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzhomogenität (Bartlett-Test) untersucht. Im Falle von metrischen Daten wurde zum Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte t-Test herangezogen. Für einen Vergleich mehrerer Gruppen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test und Dunn's-Test durchgeführt. Binär oder ordinalskalierte Daten wurden mithilfe des Exakten Tests nach Fisher oder des  $\chi^2$ -Tests analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Balkendiagramme, Box-Plots oder Tabellen erstellt.

Die Überlebenszeiten wurden durch Anwendung des Kaplan-Meier-Verfahrens (Darstellung entsprechend in einer Kaplan-Meier-Kurve) berechnet. Die Überlebenszeiten der Gruppen wurden durch Einsatz des Log-rank-Tests miteinander verglichen und der entsprechende Risikoquotient (Hazard Ratio (HR)) zweier Gruppen ebenfalls mit diesem Signifikanztest berechnet. Eine multivariate Analyse wurde mithilfe einer Cox-Regression durchgeführt.

Das Gesamtüberleben (engl. overall survival) wurde als Zeit von der erstmaligen dokumentierten ACC-Diagnosestellung bis zum Versterben der Patienten bzw. dem Zeitpunkt des letzten Follow-Ups definiert. Für die Berechnung des krankheitsspezifischen Überlebens galt die gleiche Definition, es wurden aber lediglich diejenigen verstorbenen Patienten eingeschlossen, deren Todesursache das Nebennierenkarzinom war.

Das progressionsfreie Überleben beschreibt die Zeit ab der ersten durchgeführten Therapie gegen das Nebennierenkarzinom (Operation, Chemotherapie) bis zum ersten dokumentierten Nachweis eines Krankheitsprogresses bzw. dem Tod des Patienten. Die Definition des rezidivfreien Überlebens war identisch mit dem Unterschied, dass nur Patienten, die R0 reseziert wurden, in die Auswertung einbezogen wurden.

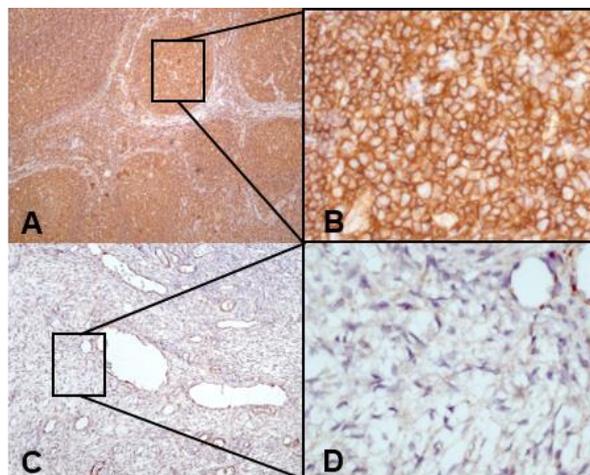
### 3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Promotion war einerseits, die Expression von CCR7 in Geweben der Nebenniere genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die CCR7-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene dargestellt. Andererseits sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen CCR7-Expression und Klinik des Nebennierenkarzinoms besteht. Zuerst musste jedoch die Funktion des verwendeten Antikörpers methodisch zweifelsfrei bewiesen werden.

#### 3.1 Antikörper-Qualitätskontrolle

Wie in Kapitel 2.3.3.2 erklärt, erfolgte eine Funktionskontrolle des verwendeten CCR7-Antikörpers, da dessen Spezifität und Funktion durch Referenzarbeiten und die Angaben des Herstellers nicht zweifelsfrei nachgewiesen war. Die Ergebnisse der Ak-Qualitätskontrolle wurden mittels *Western Blot*-Analysen und immunhistochemischer Färbungen erzielt und sind im Folgenden dargestellt.

Zunächst wurde das Färbeverhalten des Antikörpers durch Positiv- und Negativkontrollen überprüft (s. Abbildung 8). Als Positivkontrolle diente Tonsillengewebe, das als lymphatisches Organ hohe CCR7-Level aufweist. Als Negativkontrolle wurde Gewebe eines Ovars gefärbt.

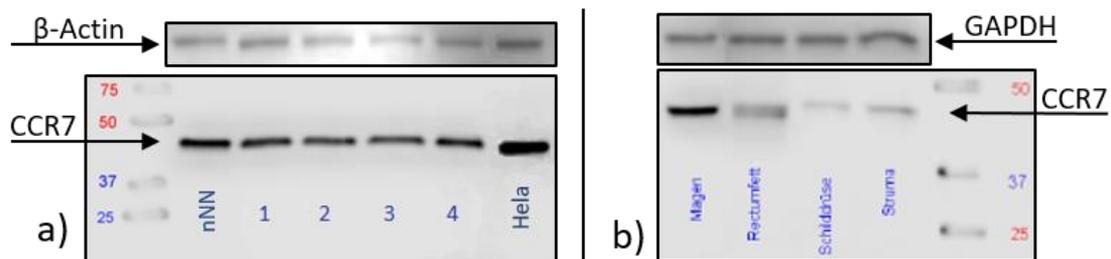


**Abbildung 8: Immunhistochemische Positiv- und Negativkontrolle**

Immunhistochemische Färbung von CCR7. (A) und (B): 2,5- bzw. 40-fache Vergrößerung einer Tonsille. Die Tonsille diente als positive Färbekontrolle. (C) und (D): 10- bzw. 40-fache Vergrößerung eines Ovars. Das Ovar diente als negative Färbekontrolle.

Weiterhin wurden die Eigenschaften des Antikörpers im *Western Blot*-Verfahren überprüft. Der Rezeptor sollte in der Gelelektrophorese bei 48 kDa laufen. Abbildung 9

zeigt die proteinbiochemische Positiv- und Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen eingesetzt. Darüber hinaus sind die CCR7-Proteinbanden einer gesunden Nebenniere und verschiedener Nebennierenkarzinome abgebildet. Die Gewebe der Schilddrüse (Struma und gesunde Schilddrüse) und Rectumfett dienten als Negativkontrollen bzw. in diesem Fall als Kontrollen, die laut Referenzquellen (s. Kapitel 2.3.3.2) wenig CCR7 exprimieren. Dies erklärt mitunter auch die leicht positiven Banden an entsprechenden Stellen in Abbildung 9b.

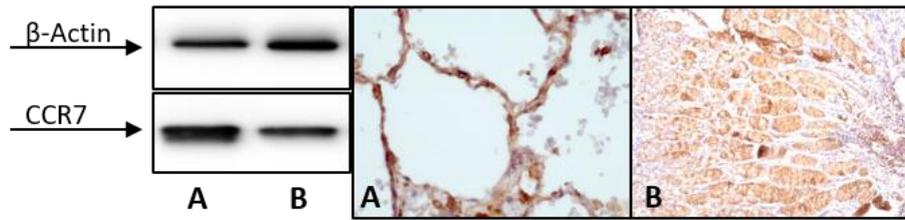


**Abbildung 9: Proteinbiochemische Positiv- und Negativkontrolle**

*Western Blot*-Analyse der Expression von CCR7. **a) Positivkontrolle.**  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle (oberer Pfeil). HeLa-Zellen wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Weiterhin sind Gewebe einer normalen Nebenniere (nNN) und verschiedener ACCs (Nummer 1-4) abgebildet. **b) Negativkontrolle.** GAPDH diente als Ladekontrolle. Rectumfett und Gewebe der Schilddrüse (gesunde Schilddrüse und Struma) wurden als Negativkontrolle ausgewählt.

Abschließend wurde eine weitere Antikörperfunktionskontrolle durch Vergleich der Ergebnisse zweier Methoden (Immunhistochemie und *Western Blot*) durchgeführt. Dazu wurde Gewebe jeweils mit beiden Methoden auf das Vorhandensein von CCR7 analysiert und die Ergebnisse auf Übereinstimmung hin bewertet. Eine immunhistochemische Färbung der im Immunoblot in Abbildung 9a verwendeten Gewebe (ACCs und normale Nebenniere) bestätigen die Ergebnisse der *Western Blot*-Analyse. Die ermittelten H-Scores für ACC Nr.1–4 lagen zwischen 1,25 und 2, was einem (teilweise mäßig) positiven Färbeverhalten und demnach korrelierendem Nachweis von CCR7 im oben gezeigten *Western Blot* entspricht. Die mikroskopische Aufnahme der immunhistochemisch gefärbten Nebenniere (Abbildung 12) unterstützt die Stärke der CCR7-Bande im Immunoblot.

Zwei weitere Gewebe (Lunge und Magen) wurden anhand eines Vergleichs zweier Methoden analysiert, um die Funktion des Antikörpers zweifelsfrei nachzuweisen. Die jeweils ermittelten Immunoblot-Banden und die mikroskopischen Aufnahmen der Gewebe nach der Färbung sind in Abbildung 10 zu sehen.



**Abbildung 10: Funktionskontrolle des Ak durch methodischen Vergleich**

**Links:** *Western Blot*-Nachweis von CCR7 in (A) Lungengewebe und (B) Magengewebe.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

**Rechts:** Immunhistochemischer Nachweis von CCR7 in (A) Lungengewebe, 40-fache Vergrößerung und (B) Magengewebe, 20-fache Vergrößerung.

**Vergleich:** *Western Blot*-Analyse und immunhistochemische Färbung durch den Anti-CCR7-Antikörper zeigen an gleichem Gewebe korrelierende Ergebnisse in der Darstellung der CCR7-Expression.

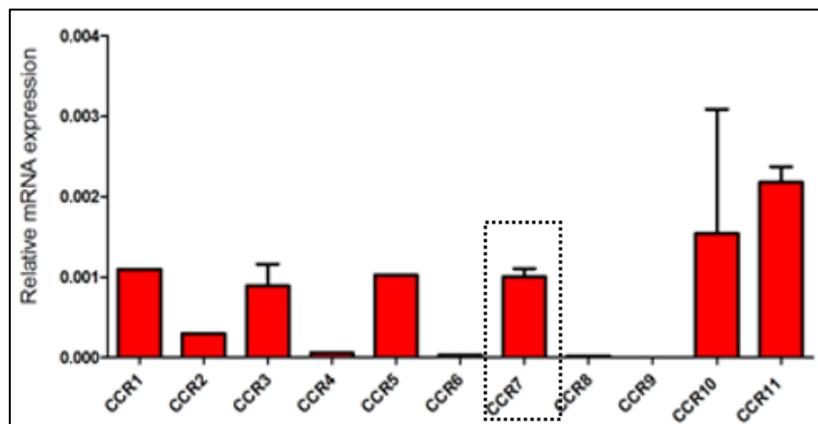
Dabei ist wie bei den Ergebnissen der ACC- und nNN-Analyse eine Korrelation zwischen Stärke der CCR7-Bande im *Western Blot* und der Intensität der immunhistochemischen Färbung zu erkennen. Der Antikörper erfüllte somit alle Voraussetzungen, die der Versuchsaufbau an ihn stellte.

## 3.2 CCR7-Expression in unterschiedlichen Nebennierengeweben

Verschiedene Gewebe der Nebenniere wurden mittels *real-time* PCR und immunhistochemischer Färbung auf CC-Chemokinrezeptor 7 untersucht. Ziel der Überprüfung war es, einen Nachweis zu erbringen, ob die mRNA und das Protein von CCR7 in diesen Geweben gebildet werden und darüber hinaus Expressionsunterschiede aufzuzeigen.

### 3.2.1 CCR7-Expression in der Nebenniere

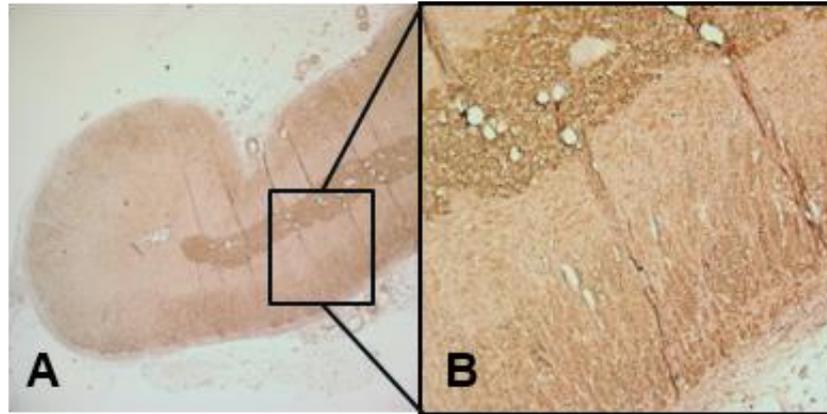
In der Untersuchung von vier gesunden Nebennieren mithilfe der *real-time* PCR wurde mRNA von verschiedenen Chemokinrezeptoren nachgewiesen (s. Abbildung 11). Von CCR10 und CCR11 wurden in diesen Nebennieren die höchsten mRNA-Werte gemessen, wobei CCR11 mit einer relativen mRNA-Menge von 0,002 deutlich am stärksten vorhanden war.



**Abbildung 11: CC-Chemokinrezeptoren in der normalen Nebenniere**

Durch *real-time* PCR ermittelte relative mRNA-Expression verschiedener Chemokinrezeptoren in normalen Nebennierengeweben (n=4). Der für uns interessante Balken mit der Abbildung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist umrandet.

Um festzustellen, ob sich die CCR7-mRNA-Expression auf Proteinebene niederschlägt, wurden vier gesunde Nebennieren immunhistochemisch mit dem CCR7-Antikörper behandelt. Die gefärbten Nebennieren zeigten eine Positivität gegenüber CCR7. Mikroskopisch konnte man Expressionsunterschiede feststellen, die sich mit der anatomischen Struktur der Nebenniere decken. In Abbildung 12 ist eine Mikrofotografie einer exemplarischen Nebenniere zu sehen.



**Abbildung 12: CCR7-Expression in der normalen Nebenniere**

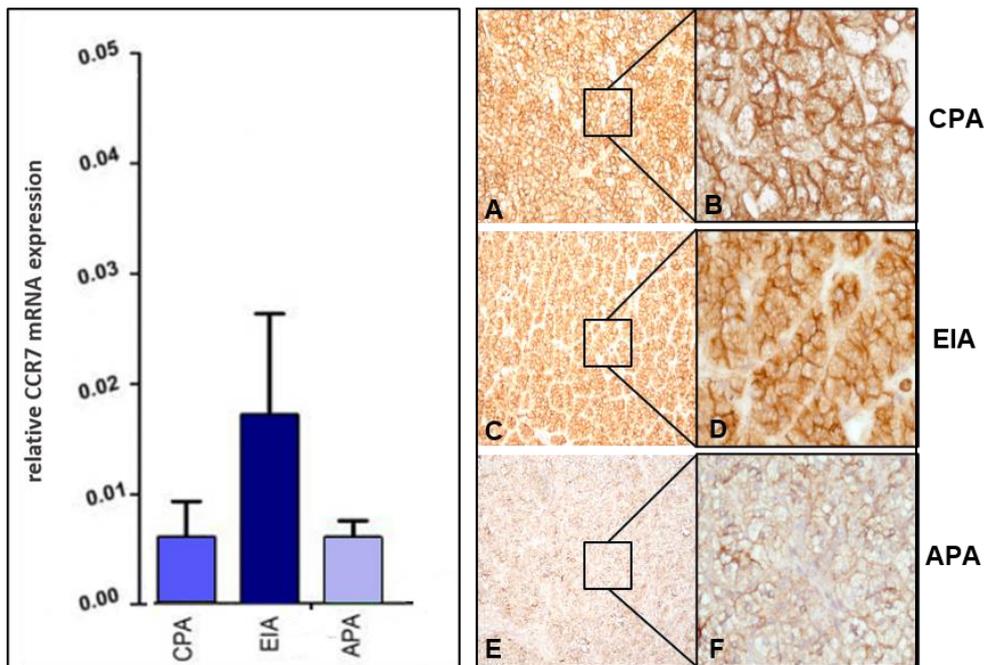
Immunhistochemischer Nachweis von CCR7 in der normalen Nebenniere. **(A)** 2,5-fache Vergrößerung. **(B)** 10-fache Vergrößerung. In **(A)** erkennt man bereits Expressionsunterschiede zwischen Rinde und Mark. In der Vergrößerung **(B)** wird deutlich, dass die Rindenzonen von peripher in Richtung Nebennierenmark abfallende CCR7-Level aufweisen.

In Abbildung 12 erkennt man eine starke Färbung in der äußeren Rindenzone der Nebennierenrinde. In der Zona glomerulosa und fasciculata imponierte mikroskopisch ein vermehrter Nachweis von CCR7, in der Zona reticularis nahm er dagegen ab. Darüber hinaus fiel eine starke Färbung der Zellen des Nebennierenmarks auf, die gerade im Kontrast zur inneren Zone der Nebennierenrinde herausstach. Das Färbemuster mit intensiver CCR7-Darstellung im Nebennierenmark und äußerer Rindenzone im Verhältnis zu inneren Rindenzonen war in allen gefärbten normalen Nebennieren zu sehen.

### **3.2.2 CCR7-Expression in Cushing-, Conn- und hormoninaktiven Adenomen**

In drei Nebennierenadenomen (EIA, CPA, APA) wurde eine Messung der mRNA und des Proteins von CCR7 durchgeführt (s. Abbildung 13). In den cortisolproduzierenden Adenomen (CPA, n=10) und aldosteronproduzierenden Adenomen (APA, n=11) wurde eine relative mRNA-Expression von ca. 0,006 gemessen. Etwa doppelt so viel und damit deutlich mehr mRNA konnte in den drei endokrin-inaktiven Adenomen ermittelt werden. Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten der Adenome zeigten verschiedene CCR7-Level in den Geweben. In Abbildung 13 sind auf der rechten Seite exemplarisch drei verschiedenen Adenome mit zwei Vergrößerungen abgebildet. CPA und EIA wiesen eine starke Expression auf, bei APA fand man mehrheitlich eine geringe Färbung durch den CCR7-Antikörper.

Bei vergleichender Betrachtung der mRNA-Ebene (Abbildung 13 links) und der Proteinebene (Abbildung 13 rechts) konnte eine Differenz festgestellt werden. Während die CCR7-mRNA-Menge in den gemessenen APA noch verhältnismäßig hoch war, wurde immunhistochemisch eine schwache Intensität der CCR7-Färbung festgestellt. Im Gegensatz dazu war eine starke CCR7-Protein-Expression in den gefärbten CPA zu finden, obwohl die mRNA-Expression sehr niedrig war.

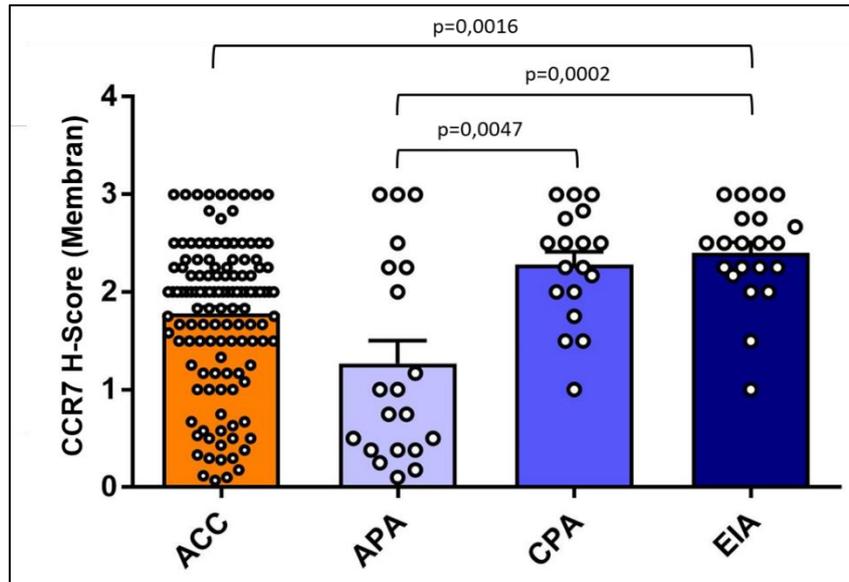


**Abbildung 13: CCR7-Expression in Adenomen der Nebenniere**

**Links:** Durch *real-time* PCR ermittelte relative mRNA-Expression von CCR7. Graphisch dargestellt sind cortisolproduzierende Adenome (CPA, n=10), endokrin-inaktive Adenome (EIA, n=3), aldosteronproduzierende Adenome (APA, n=11).

**Rechts:** Immunhistochemische Färbung von CCR7 an verschiedenen Adenomen der Nebenniere. (A) und (B): CPA, 10- bzw. 40-fache Vergrößerung. (C) und (D): EIA, 10- bzw. 40-fache Vergrößerung. (E) und (F): APA, 10- bzw. 40-fache Vergrößerung.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass charakteristische CCR7-Expressionsunterschiede in unterschiedlichen Nebennierengeweben vorliegen, wurde die immunhistochemisch dargestellte CCR7-Protein-Expression mittels H-Score quantifiziert und die Mittelwerte der ermittelten H-Scores miteinander verglichen (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14: CCR7-H-Scores in ACA und ACC**

Verteilung der ermittelten H-Scores in Geweben von Nebennierenkarzinomen (n=128), aldosteronproduzierenden Adenomen (APA, n=20), cortisolproduzierenden Adenomen (CPA, n=18) und endokrin-inaktiven Adenomen (EIA, n=21). Kruskal-Wallis-Test:  $p < 0,0001$ . Dunn's-Test: CPA vs. APA  $p = 0,0047$ , EIA vs. APA  $p = 0,0002$ , ACC vs. EIA  $p = 0,0016$ . Andere Ergebnisse sind nicht signifikant.

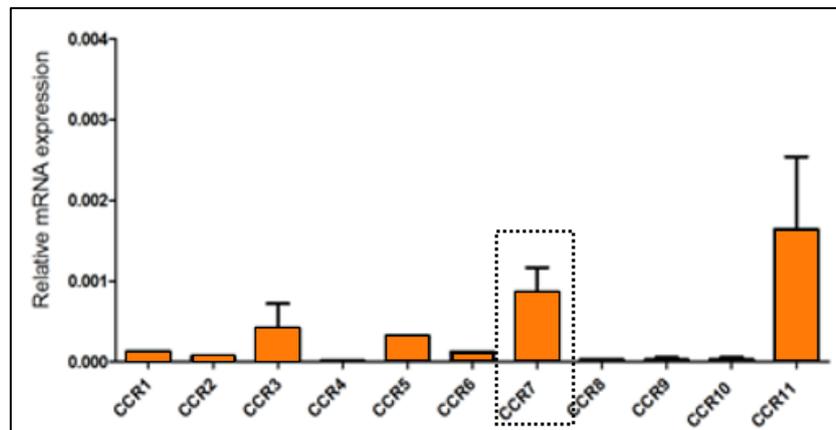
Der Eindruck, den die Mikrofotografie geschaffen hat, bestätigt sich in der statistischen Analyse. Die gefärbten APA (n=20, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,3 \pm 1,0$ ) produzierten verglichen mit den verwendeten CPA (n=18, Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,3 \pm 0,6$ ) signifikant weniger CCR7 ( $p = 0,0047$ ). Die untersuchten EIA (n=21, Mittelwert  $\pm$  SD von  $2,4 \pm 0,5$ ) exprimierten signifikant mehr CCR7 in ihrer Membran als die APA ( $p = 0,0002$ ).

Nach Quantifizierung der CCR7-Protein-Expression in ACC-Primärtumoren (n=128, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$ ) konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu endokrin-inaktiven Adenomzellen signifikant geringere CCR7-Level auftraten ( $p = 0,0016$ ). Die anderen ermittelten Expressionsdifferenzen unterschieden sich nicht signifikant.

### 3.2.3 CCR7-Expression im ACC und verschiedenen Metastasen

Die mRNA- und Protein-Expression von CCR7 wurde auch in Nebennierenkarzinomen (ACC) und verschiedenen Metastasen des Nebennierenkarzinoms untersucht. Zunächst wurde in neun ACC-Geweben die relative mRNA-Expression verschiedener CC-Chemokinrezeptoren mithilfe einer *real-time* PCR berechnet (s. Abbildung 15). Die CCR7- bzw. CCR11-mRNA-Expression war vergleichbar mit der in der normalen Nebenniere (etwa 0,001 bzw. 0,002). Unterschiede wurden jedoch bei der Messung der mRNA-Konzentration der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR5 und CCR10

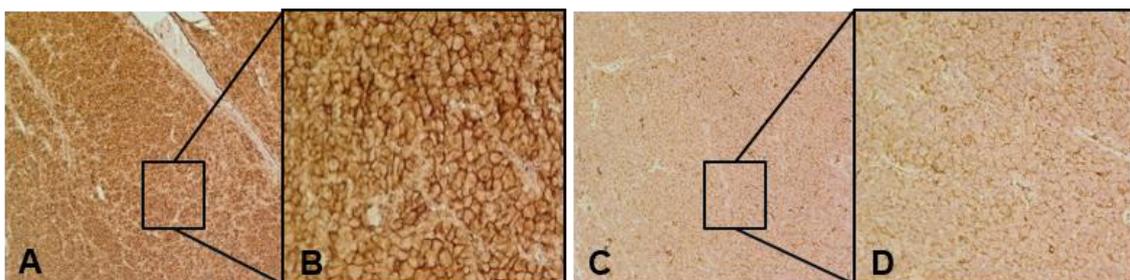
gefunden. Im Gegensatz zur physiologisch intakten Nebenniere waren diese Rezeptoren im ACC kaum oder nicht mehr auf mRNA-Ebene nachweisbar.



**Abbildung 15: CC-Chemokinrezeptoren im Nebennierenkarzinom**

Durch *real-time* PCR ermittelte relative mRNA-Expression verschiedener Chemokinrezeptoren im Nebennierenkarzinom (n=9). Der für uns interessante Balken mit der Abbildung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist umrandet.

Im Anschluss an die molekularbiologische Untersuchung wurden 128 Paraffinschnitte von ACC-Primärtumoren immunhistochemisch gefärbt. CCR7 wurde in malignen Nebennierentumoren unterschiedlich stark exprimiert. Kein ACC-Gewebe zeigte ein 100 % negatives Ergebnis. In Abbildung 16 sind Mikrofotografien zweier Nebennierenkarzinome zu sehen, die in den gezeigten Ausschnitten einerseits eine stark positive und andererseits eine schwach positive CCR7-Expression aufwiesen.



**Abbildung 16: CCR7-Expression im Nebennierenkarzinom**

Immunhistochemische Färbung von CCR7 an zwei verschiedenen Nebennierenkarzinomen. (A) und (B): 10- bzw. 40-fache Vergrößerung eines ACC mit starker CCR7-Expression. (C) und (D): 10- bzw. 40-fache Vergrößerung eines ACC mit schwacher CCR7-Expression.

Die Stärke der CCR7-Protein-Expression in den Nebennierenkarzinomgeweben wurde mittels semiquantitativem H-Score berechnet und dabei sowohl die CCR7-Expression in der Membran als auch im Zytoplasma beurteilt und unabhängig voneinander bewertet. Einer Auswertung des CCR7-Vorkommens im Zytoplasma liegt die Überlegung zugrunde, dass ein internalisierter und damit inaktiver Rezeptor dort nicht seine Wirkung

entfaltet, was Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Lymphknotenmetastasierung, Tumorprogress) nehmen könnte (vgl. Kapitel 3.4).

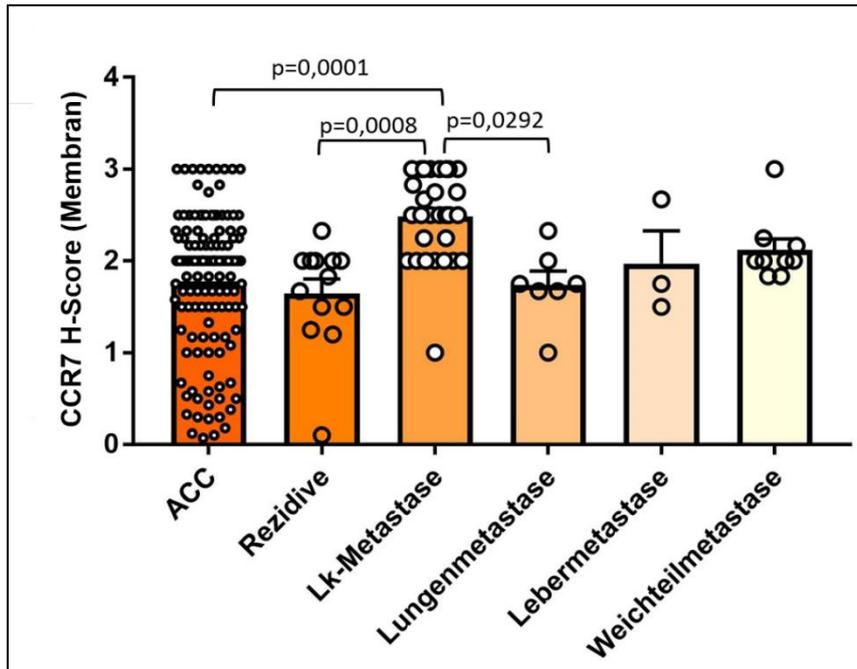
Bei der Betrachtung der Membranfärbung zeigten 20 (15,6 %) der 128 gefärbten Gewebe einen H-Score kleiner 1, 38 (29,7 %) einen H-Score, der größer oder gleich 1 aber gleichzeitig kleiner 2 war. 61 ACC-Gewebe (47,7 %) waren stärker gefärbt, ihnen wurde ein H-Score zwischen 2 und 3 zugeordnet. Lediglich 9 (7 %) der Schnitte erhielten einen H-Score von 3 (s. Tabelle 13).

Bei Betrachtung des Zytoplasmas wurden nur 127 Schnitte ausgewertet, da bei einem ACC das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis so auf Seite des Zellkerns verschoben war, dass kein Zytoplasma bewertbar war. Verglichen mit der Membranfärbung zeigten sich im Zytoplasma geringere H-Scores. Nur 7 (5,5 %) der behandelten Gewebe hatten eine größere Menge des CC-Chemokinrezeptors 7 ins Zytoplasma internalisiert (H-Score 2 bis kleiner 3). Die übrigen ACC wiesen einen geringen CCR7-Level auf (52 Gewebe (40,9 %) H-Score kleiner 1 und 68 Gewebe (53,5 %) H-Score zwischen 1 und kleiner 2) (s. Tabelle 13).

**Tabelle 13: H-Score-Verteilung im Nebennierenkarzinom**

<b>H-Score Membran</b>	<b>n (%)</b>	<b>H-Score Zytoplasma</b>	<b>n (%)</b>
<1	20 (15,6)	<1	52 (40,9)
≥1 - <2	38 (29,7)	≥1 - <2	68 (53,5)
≥2 - <3	61 (47,7)	≥2 - <3	7 (5,5)
3	9 (7,0)	3	0 (0,0)

Um die Hypothese zu überprüfen, ob Unterschiede in der Expression des Rezeptors in verschiedenen Nebennierengeweben vorliegen, wurden mehrere ACC-Metastasen auf deren CCR7-Level überprüft. Insgesamt wurden 13 Lokalrezidive eines Primarius, 29 Lymphknotenmetastasen, 9 Weichteilmastasen, 7 Lungenmetastasen und 3 Lebermetastasen immunhistochemisch untersucht (s. Abbildung 17).



**Abbildung 17: CCR7-H-Scores im ACC und ACC-Metastasen**

Verteilung der ermittelten H-Scores und damit der CCR7-Expression in Geweben des Nebennierenkarzinoms (ACC, n=128), Rezidiven (n=13), Lymphknotenmetastasen (Lk, n=29), Lungenmetastasen (n=7), Lebermetastasen (n=3) und Weichteilmetastasen (n=9). Kruskal-Wallis-Test:  $p < 0,0001$ . Dunn's-Test: Lk vs. ACC  $p = 0,0001$ , Lk vs. Rezidiv  $p = 0,0008$ , Lk vs. Lungenmetastase  $p = 0,0292$ .

Primärtumore wiesen eine sehr heterogene CCR7-Expression auf (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$ ), dagegen wurde in nahezu allen getesteten Lymphknotenmetastasen CCR7 stark exprimiert (Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,5 \pm 0,5$ ). Eine Lk-Metastase fiel durch eine schwächere Membranfärbung auf, es lagen aber leider keine ausreichenden klinischen Daten zu dieser Metastase vor. Die Expressionsstärken von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen wichen signifikant voneinander ab ( $p = 0,0001$ ). In den untersuchten Lokalrezidiven (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,6 \pm 0,6$ ), Weichteilmetastasen (Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,1 \pm 0,4$ ) und Lungenmetastasen (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,4$ ) wurde - zumindest im Vergleich zu den Lymphknotenmetastasen - im Mittel eine deutlich geringere Rezeptorexpression gefunden. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=3) kann das ermittelte Ergebnis bei der Auswertung der CCR7-Expression in Lebermetastasen des ACC (Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,0 \pm 0,6$ ) nur als Stichprobe gewertet werden. Eines der ACC-Rezidive zeigte fast keine CCR7-Expression (Membran-H-Score 0,1). Es handelte sich um den Tumor eines 12-jährigen Kindes, welches nicht einmal 6 Monate nach Diagnose verstarb.

### **3.3 Assoziation der CCR7-Expression mit klinischen und histopathologischen Eigenschaften**

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die CCR7-Expression auf eine Korrelation mit klinischen oder histopathologischen Eigenschaften der ACC – wie beispielsweise der Hormonsekretion oder der Prognosefaktoren Ki67 und Weiss-Score – hin zu überprüfen. CCR7 ist in vielen physiologischen Prozessen der Zellen involviert und beeinflusst unter anderem das Zellwachstum, weswegen die klinischen Daten zum Tumorstadium, Tumorgröße (jeweils bei Diagnose) und Resektionsstatus des Tumors in die Auswertung eingeschlossen wurden.

Das Patientenkollektiv mit zugeordneten gefärbten ACC-Geweben wurde in zwei Gruppen eingeteilt. Als Trennungskriterium wurde die Stärke der CCR7-Expression in den Zellmembranen des Tumors, bewertet mittels H-Score, gewählt. Dabei wurde ein H-Score kleiner zwei ( $<2$ ) als niedrige CCR7-Expression angesetzt. ACC-Gewebe mit einem H-Score größer oder gleich zwei ( $\geq 2$ ) in der Membranfärbung galten dagegen als stark CCR7-exprimierende Tumore. Der Gruppe mit einer niedrigen CCR7-Expression waren 55 ACC-Patienten zugehörig, die Patientengruppe mit starker CCR7-Expression umfasste 65 Erkrankte (s. Tabelle 14). Nicht zu allen Patienten konnten alle klinischen Daten erhoben werden. Die Anzahl der jeweils fehlenden Variablen sind in Tabelle 3 in Kapitel 2.1 aufgeführt.

Die beiden Gruppen unterschieden sich in keinem der untersuchten Parameter wie Alter, Geschlecht, Tumorgröße, Tumorstadium, Hormonsekretionsmuster und Resektionsstatus signifikant. (s. Tabelle 14)

Auch bei der Analyse der histopathologischen Faktoren Weiss-Score und Ki67-Index konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der niedrigen und hohen CCR7-Expression gefunden werden. (s. Tabelle 14)

**Tabelle 14: CCR7-Expression und klinische bzw. histopathologische Faktoren**

<b>CCR7-Expression in der Membran</b>			
<b>Variable</b>	<b>Niedrig (H-Score &lt;2)</b>	<b>Hoch (H-Score ≥2)</b>	<b>p</b>
<b>Alter bei Diagnose in Jahren – n</b>	55	65	
Median (Spanne)	50 (24-81)	50 (16-87)	0,91
<b>Geschlecht – n (%)</b>			
Männlich	20 (36)	22 (34)	0,77 <sup>x</sup>
Weiblich	35 (64)	43 (66)	
<b>Tumorstadium (ENSAT) – n (%)</b>			
I-II	28 (53)	25 (40)	0,48 <sup>x</sup>
III	13 (24)	22 (36)	
IV	12 (23)	15 (24)	
<b>Hormonproduktion – n (%)</b>			
Glukokortikoide (selektiv)	8 (24)	10 (23)	0,65 <sup>x</sup>
Mineralkortikoide (selektiv)	3 (9)	1 (2)	
Androgene/-vorläufer (selektiv)	3 (9)	5 (11)	
Gluko. + andere Steroidhormone	11 (33)	19 (43)	
Androgene + Mineralkortikoide	0 (0)	1 (2)	
endokrin inaktiv	8 (24)	8 (18)	
<b>Resektionsstatus – n (%)</b>			
R0	27 (55)	32 (67)	0,55 <sup>x</sup>
R1/RX	10 (20)	5 (10)	
R2	12 (25)	11 (23)	
<b>Tumorgroße in cm – n</b>	54	62	
Median (Spanne)	10,5 (3,5-26)	10,5 (2,5-20)	0,88
<b>Weiss-Score – n</b>	47	52	
Median (Spanne)	6,0 (4-10)	6,0 (2-9)	0,57
<b>MIB1 (Ki67) Index – n</b>	50	55	
Median (Spanne)	10 (1-80)	10 (1-50)	0,34
R0 = komplette Tumorresektion, R1/RX = mikroskopisch unvollständige oder unklare Resektion R2 = makroskopisch unvollständige Resektion; p bewertet mittels t-test, <sup>x</sup> p bewertet mittels $\chi^2$ -Test			

### **3.4 Assoziation der CCR7-Expression mit dem Krankheitsverlauf**

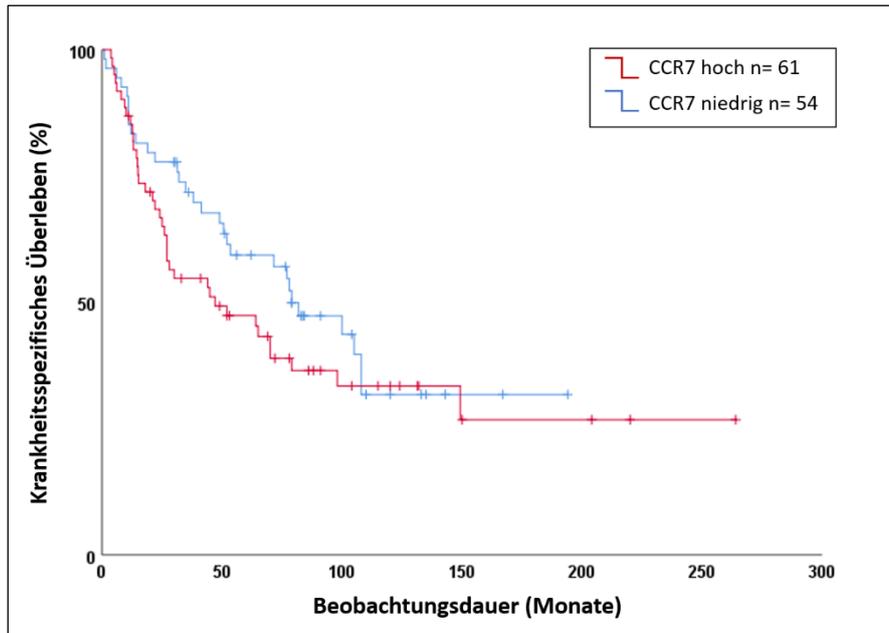
Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die CCR7-Expression in ACC eine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf (speziell auf Tumorprogress und (Lymphknoten-)Metastasierung) hat und die Prognose beeinflusst.

Dafür wurden Daten bezüglich des Überlebens und der Metastasierung während der Erkrankung erhoben und in die Auswertung einbezogen und anschließend das Patientenkollektiv anhand des CCR7-Nachweises im ACC-Gewebe (quantifiziert mittels H-Score) in zwei Gruppen aufgeteilt. Für die Auswertung der CCR7-Expression in der Membran galt ein H-Score kleiner zwei ( $<2$ ) als niedrige Rezeptorexpression, Gewebe mit einem H-Score gleich oder größer zwei ( $\geq 2$ ) wurde der zweiten Gruppe mit starkem CCR7-Nachweis zugeteilt. Auch die Rezeptorexpression im Zytoplasma wurde untersucht, wobei ein H-Score Wert kleiner eins ( $<1$ ) als niedrig, ein Wert gleich oder größer eins ( $\geq 1$ ) als hoch galt und das Patientenkollektiv entsprechend aufgeteilt wurde. Die Absicht hinter der Überprüfung der zytoplasmatischen Rezeptorexpression war, herauszufinden, ob eine größere Menge an internalisiertem und damit inaktivem Rezeptor einen protektiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der ACC-Patienten hat, da er nicht mehr in der Membran verbaut war.

#### **3.4.1 Gesamt- und krankheitsspezifisches Überleben**

Zur Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens wurde mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers die mediane Überlebenszeit in beiden Gruppen berechnet und Überlebenskurven erstellt. Alle Patienten, die beim letzten Follow-Up 2020 noch am Leben waren und alle Patienten, die am ACC verstorben waren, wurden in diese Auswertung eingeschlossen (Membranfärbung  $n=115$ , Zytoplasmafärbung  $n=114$ ).

In Abbildung 18 sind die Gruppen anhand der CCR7-Expression in der Membran getrennt aufgetragen. Diese Unterteilung diente der Überprüfung, ob eine hohe CCR7-Expression in der Membran (und damit ein „aktiver“ Rezeptor“) negativen Einfluss auf das Überleben hat.

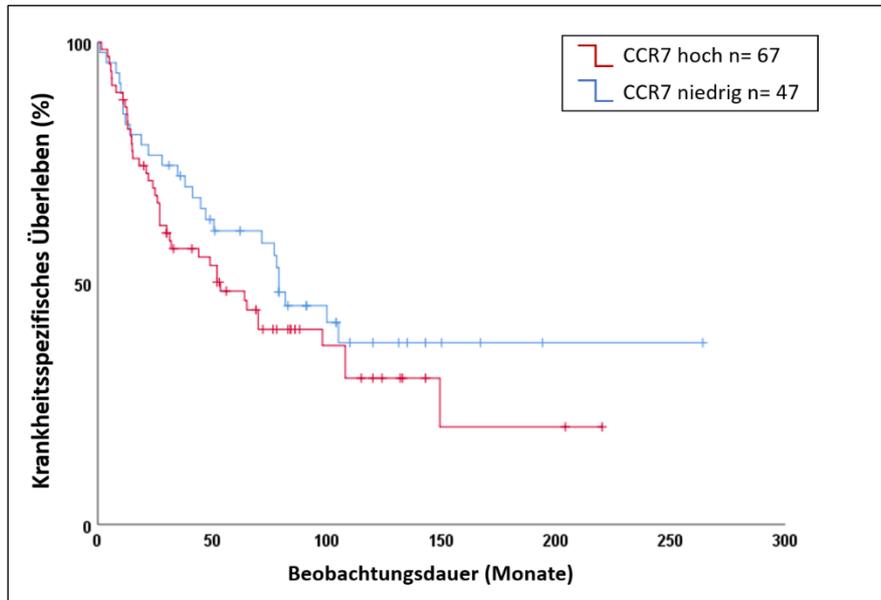


**Abbildung 18: Krankheitsspezifisches Überleben mit CCR7 in der Membran**

Das krankheitsspezifische Überleben zweier Patientengruppen, deren Unterschied in der CCR7-Expression in der Membran liegt, ist hier graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die unterschiedliche Sterberate war nicht signifikant ( $p=0,25$  mittels log-rank-Test, HR: 1,33 (95 % CI: 0,82-2,14) für die Gruppe mit hohem CCR7 verglichen mit einer niedrigen CCR7-Expression)

Objektiv war der Einfluss der CCR7-Expression in der Membran auf das krankheitsspezifische Überleben nicht signifikant ( $p=0,25$ ). Betrachtet man Abbildung 18, erkennt man, dass zu Beginn der erfassten Zeitspanne beide Gruppen vergleichbare Eventraten (in diesem Fall den Tod des Patienten) zeigten. Im Verlauf beobachtete man bei Patienten mit höheren H-Score-Werten tendenziell ein kürzeres krankheitsspezifisches Überleben bzw. ein höheres relatives Risiko zu versterben (Hazard Ratio (HR): 1,33 (95 % CI: 0,82-2,14)). Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit hochexprimierenden ACC war mit 47 Monaten kürzer als die der niedrigexprimierenden ACC (79 Monate).

Die Überlebenszeitanalyse der Patientenkohorte, aufgeteilt anhand der CCR7-Expression im Zytoplasma, zeigte entgegen der Hypothese ähnliche Ergebnisse (vgl. Abbildung 19). Das mediane Überleben lag mit 53 Monaten bei Patienten mit hohen zytoplasmatischen CCR7-Werten niedriger als bei Patienten mit niedrigen CCR7-Werten (medianes Überleben 79 Monate) und das Patientenkollektiv mit hoher CCR7-Expression hatte ein leicht höheres relatives Risiko am ACC zu versterben. (HR: 1,34 (95 % CI: 0,82-2,19)). Der Einfluss von CCR7 auf das krankheitsspezifische Überleben zeigte sich nicht signifikant ( $p=0,25$ ).



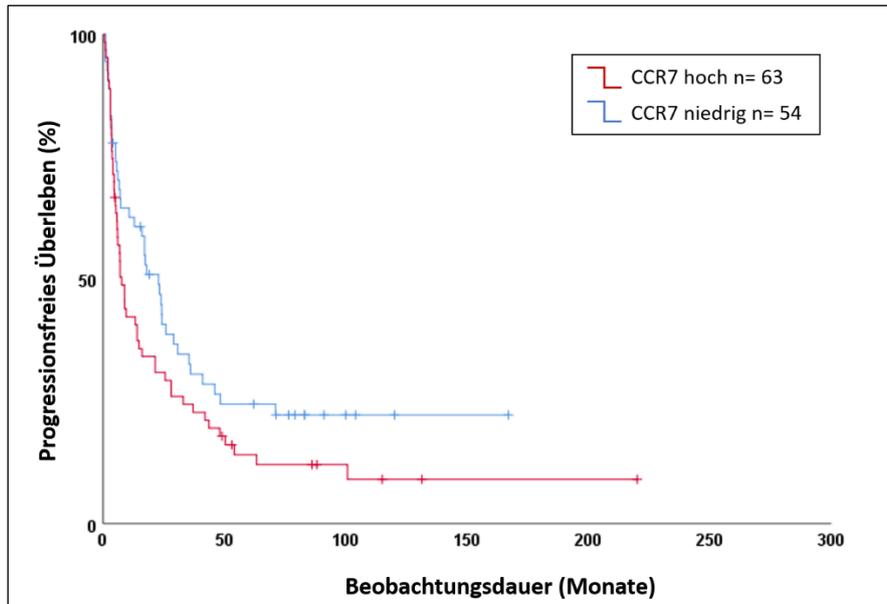
**Abbildung 19: Krankheitsspezifisches Überleben mit CCR7 im Zytoplasma**

Das krankheitsspezifische Überleben zweier Patientengruppen, deren Unterschied in der CCR7-Expression im Zytoplasma liegt, ist hier graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Sterberate unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,25$  mittels log-rank-Test). Das HR lag bei 1,34 (95 % CI: 0,82-2,19) für die Gruppe mit hohem CCR7 verglichen mit einer niedrigen CCR7-Expression.

Auch das Gesamtüberleben wurde weiter analysiert, die entsprechenden Überlebenskurven sind hier nicht abgebildet. Die Tendenz, dass Patienten mit Tumoren, die mehr CCR7 produzieren, eine etwas schlechtere Prognose haben, wurde auch in dieser Analyse festgestellt. Sowohl die mediane Überlebenszeit (Membran: 52 Monate (CCR7 hoch) vs. 78 Monate (CCR7 niedrig); Zytoplasma: 52 Monate (CCR7 hoch) vs. 79 Monate (CCR7 niedrig)) als auch die Sterberate (Membran-HR: 1,24 (95 % CI: 0,79-1,95) bei hohem CCR7; Zytoplasma-HR: 1,48 (95 % CI: 0,93-2,36) bei hohem CCR7) vermittelten dieses Ergebnis. Jedoch hatten weder die zytoplasmatische ( $p=0,1$ ) noch die membranöse CCR7-Expression ( $p=0,35$ ) einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs.

### 3.4.2 Progressions- und rezidivfreies Überleben

Für die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurden alle Patienten (Membranfärbung:  $n=117$  bzw. Zytoplasmafärbung:  $n=116$ ) eingeschlossen, zu denen die relevanten Informationen zur Erhebung der progressionsfreien Zeit (Definition siehe Kapitel 2.3.4, S. 31) verfügbar waren. Die folgende Abbildung 20 zeigt die Überlebenskurven, die sich nach Unterteilung des Patientenkollektivs anhand des CCR7-Nachweises in der Membran ergeben.



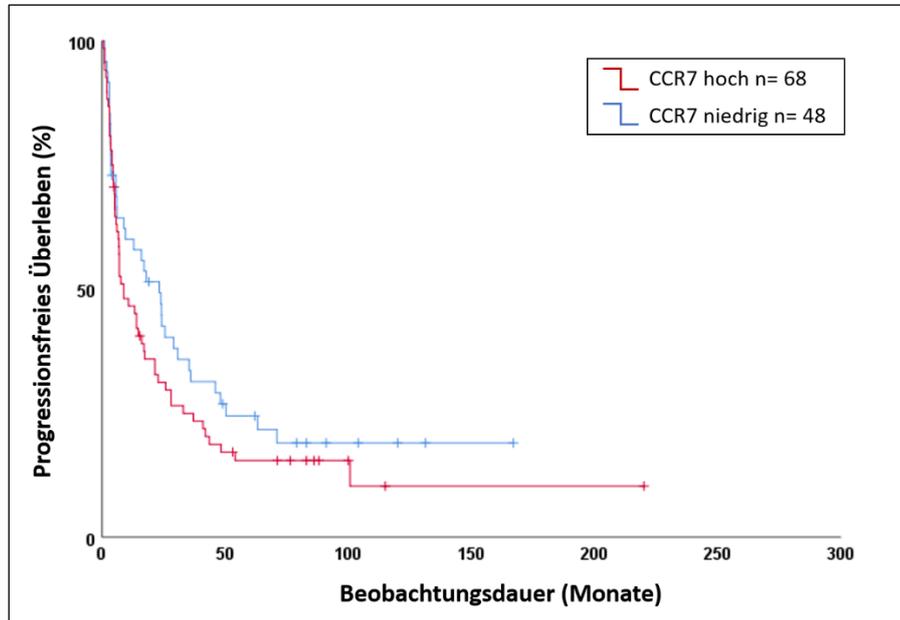
**Abbildung 20: Progressionsfreies Überleben mit CCR7 in der Membran**

Das progressionsfreie Überleben zweier Patientengruppen, deren Unterschied in der CCR7-Expression in der Membran liegt, ist hier graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Der Unterschied in der Progressionsrate bzw. progressionsfreien Zeit war nicht statistisch signifikant ( $p=0,08$  mittels log-rank-Test). Das HR lag bei 1,44 (95 % CI: 0,96-2,17) für die Gruppe mit hohem CCR7 verglichen mit einer niedrigen CCR7-Expression.

Zu Beginn konnte man in diesem Fall eine identische Krankheitsprogression beobachten, egal ob das ACC-Gewebe eine hohe oder niedrige CCR7-Dichte in der Membran aufwies. Nach wenigen Monaten war die Tendenz erkennbar, dass Patienten mit hoher CCR7-Expression früher Ereignisse entwickelten als Patienten mit niedriger CCR7-Expression, das relative Risiko einen Tumorprogress zu erleiden war für Patienten mit starker CCR7-Expression höher als bei der Vergleichskohorte (HR: 1,44 (95 % CI: 0,96-2,17)). Die mediane (progressionsfreie) Überlebenszeit war mit 8 Monaten kürzer als bei der Gruppe mit niedriger Rezeptorexpression (23 Monate). Der Unterschied der progressionsfreien Überlebenszeiten war nicht statistisch signifikant ( $p=0,08$ ).

Die ACC-Patienten wurden auch anhand einer niedrigen oder hohen CCR7-Konzentration im Zytoplasma unterteilt und mittels Kaplan-Meier-Schätzers analysiert (s. Abbildung 21). Das mediane progressionsfreie Überleben von Patienten mit hoher ACC-CCR7-Zytoplasmainternalisierung lag bei 9 Monaten, bei Patienten mit niedriger Internalisierung lag es bei 23 Monaten. Bei Betrachtung der ermittelten Überlebenskurven zeigte sich ebenfalls eine identische Progressionsrate zu Beginn der Zeiterfassung. Im Verlauf ließ sich die Tendenz erkennen, dass Patienten mit hohen CCR7-Leveln in der Membran ein höheres Risiko haben, einen Krankheitsprogress zu

erleiden (HR: 1,30 (95 % CI: 0,86-1,97)), verglichen mit der Patientengruppe mit niedriger CCR7-Konzentration). Der zytoplasmatische CCR7-Nachweis hat keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorprogressionsrate ( $p=0,21$ ).

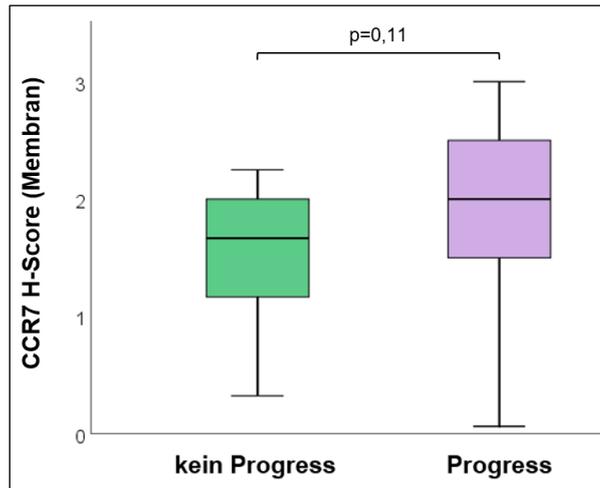


**Abbildung 21: Progressionsfreies Überleben mit CCR7 im Zytoplasma**

Das progressionsfreie Überleben zweier Patientengruppen, deren Unterschied in der CCR7-Expression im Zytoplasma liegt, ist hier graphisch als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Der Unterschied in der Progressionsrate bzw. -zeit war statistisch nicht signifikant ( $p=0,21$  mittels log-rank-Test). Das HR lag bei 1,30 (95 % CI: 0,86-1,97) für die Gruppe mit hohem CCR7 verglichen mit niedrigem CCR7-Nachweis.

Mit dem Ziel, weitere Hinweise auf die Bedeutung der CCR7-Expression auf den Progress der Nebennierenkarzinomerkrankung zu erhalten, wurden die ACC der Patientenkohorte erneut in zwei Gruppen unterteilt, diesmal nach dem Kriterium „Progress“ ( $n=95$ ) oder „kein Progress“ ( $n=22$ ) und deren mittlere CCR7-Expression in der Membran (quantifiziert mittels H-Score) berechnet.

Das Gewebe der „Progress“-Patienten exprimierte mehr CCR7 (Mittelwert  $\pm$  SD  $1,8 \pm 0,8$ ) als das ACC-Gewebe der Patienten ohne Krankheitsprogress (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,5 \pm 0,6$ ). Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant ( $p=0,11$ ). Betrachtet man das Ergebnis der Auswertung, das in Abbildung 22 graphisch dargestellt ist, fällt auf, dass kein einziges Gewebe der Patienten ohne Tumorprogress einen H-Score größer oder gleich 2,5 aufwies.



**Abbildung 22: CCR7-Expression verknüpft mit der Tumorprogression im ACC**

Verteilung der ermittelten H-Scores in Geweben von Nebennierenkarzinomen, zu denen Informationen über den Krankheitsprogress verfügbar waren (n=117). ACC von Patienten, die einen Krankheitsprogress erlebten, exprimierten nicht signifikant mehr CCR7 als die ACC-Gewebe der Patienten ohne Tumorprogression (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$  vs.  $1,5 \pm 0,6$ ;  $p=0,11$ ).

Das rezidivfreie Überleben wurde ebenfalls untersucht. Die Überlebenskurve des rezidivfreien Überlebens ist in dieser Arbeit nicht dargestellt. Die Auswertung zeigte weder bezüglich der Membran-CCR7-Expression noch der CCR7-Zytoplasmainternalisierung einen statistisch signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Aufgeteilt nach CCR7-Membrannachweis betragen die medianen Überlebenszeiten 23 Monate (CCR7 niedrig) und 9 Monate (CCR7 hoch) und das relative Risiko einer Entwicklung eines Rezidivs war bei Patienten mit hohen CCR7-Leveln leicht erhöht (HR: 1,33 (95 % CI: 0,73-2,43)). Ähnliche Ergebnisse lieferte die zytoplasmatische Auswertung: mediane rezidivfreie Zeit: 24 Monate (CCR7 niedrig) vs. 16 Monate (CCR7 hoch) und Hazard Ratio: 1,27 (95 % CI: 0,69-2,34) für Patienten mit hoher Expression.

### 3.4.3 Einfluss von CCR7 auf die ACC-Metastasierung

Die Ergebnisse, die gewonnen wurden, um die Hypothese zu überprüfen, ob die CCR7-Expression die Metastasierung des Nebennierenkarzinoms beeinflusst, sind hier dargestellt. Grundlage der Einschätzung der CCR7-Expression war in diesem Fall immer der ermittelte H-Score der Membran. Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen unterteilt, einmal anhand des CCR7-Nachweises (s. Tabelle 15), einmal anhand der klinischen Angaben über die Metastasierung (s. Abbildung 23 und Abbildung 24).

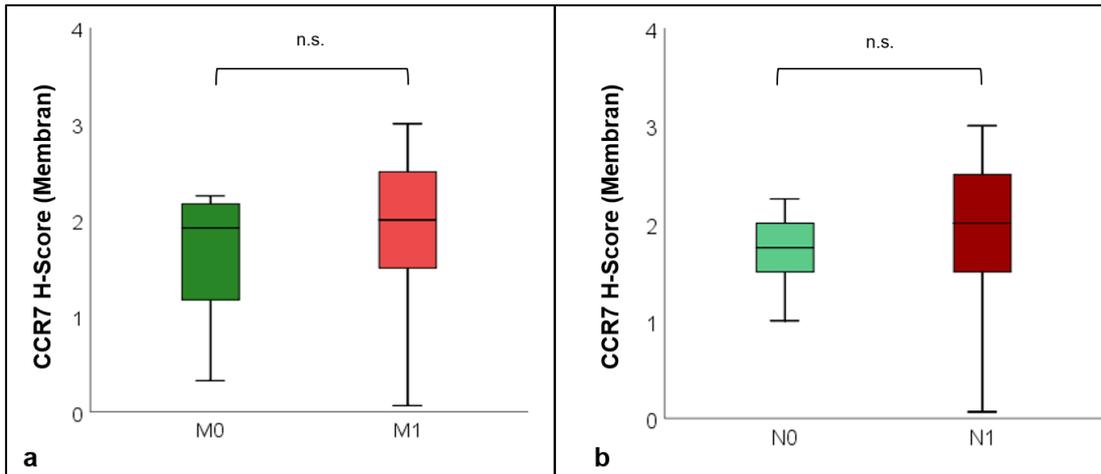
**Tabelle 15: CCR7-Expression des Primärtumors und Metastasierung**

CCR7-Expression in der Membran			
Variable	Niedrig (H-Score <2)	Hoch (H-Score ≥2)	p
<b>Fernmetastasen gesamt – n (%)</b>			
Ja	40 (78)	51 (82)	0,64
Nein	11 (22)	11 (18)	
<b>Lymphknotenmet. gesamt – n (%)</b>			
Ja	21 (55)	30 (65)	0,38
Nein	17 (45)	16 (35)	
<b>Lymphknotenmet. bei ED – n (%)</b>			
Ja	6 (12)	13 (25)	0,13
Nein	43 (88)	38 (75)	
<b>Lymphknotenmet. im Verlauf – n (%)</b>			
Ja	17 (50)	19 (54)	0,81
Nein	17 (50)	16 (46)	
p bewertet mittels Exakter Test nach Fisher			

Wie in Tabelle 15 zu sehen ist, hatten Patienten mit hohen CCR7-Leveln prozentual immer eine höhere Anzahl an Metastasen. Es konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der Fernmetastasen, der Gesamtrate der Lymphknotenmetastasierung oder der Lymphknotenmetastasen bei Diagnose bzw. im Verlauf der Erkrankung zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

91 Patienten entwickelten während ihrer Karzinomkrankung Fernmetastasen. Die ACC-Primariusgewebe dieser Patienten hatten im Mittel eine leicht höhere CCR7-Expression (H-Score Mittelwert  $\pm$  SD 1,8  $\pm$  0,8) als die Patienten, bei denen im Krankheitsverlauf keine Fernmetastasen gefunden wurden (n=22, Mittelwert  $\pm$  SD: 1,6  $\pm$  0,6). Dieser geringe Unterschied in der Rezeptorexpression war nicht signifikant, s. Abbildung 23a.

In der Patientengruppe mit Lymphknotenmetastasen im Krankheitsverlauf (n=51) wurde, verglichen mit den 33 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen, eine höhere CCR7-Expression nachgewiesen (Mittelwert  $\pm$  SD bei N1-Patienten: 1,9  $\pm$  0,8; Mittelwert  $\pm$  SD bei N0-Patienten: 1,7  $\pm$  0,6; p=0,20). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 23b graphisch dargestellt.

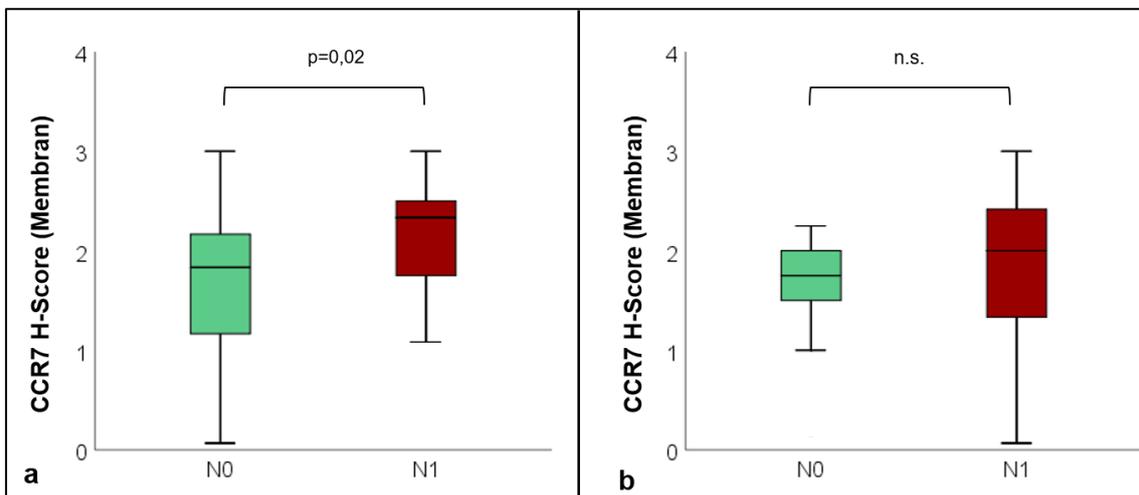


**Abbildung 23: Fernmetastasierung und Lymphknotenmetastasierung**

Verteilung der ermittelten H-Scores in ACC-Gewebe, zu denen Informationen über **a)** die Fernmetastasierung (n=113) bzw. über **b)** die Lymphknotenmetastasierung (n=84) vorhanden waren. **a) M1:** Fernmetastasen entwickelt, n=91, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$ . **M0:** keine Fernmetastasen entwickelt n=22, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,6 \pm 0,6$ . p=0,27.

**b) N1:** Lymphknotenmetastasen vorhanden, n=51, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,9 \pm 0,8$ . **N0:** keine Lymphknotenmetastasen vorhanden, n=33, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,6$ . p=0,20.

Der Einfluss von CCR7 auf die Lymphknotenmetastasierung wurde detaillierter untersucht und das Patientenkollektiv anhand des Kriteriums, ob Lymphknotenmetastasen bei Primärdiagnose oder während eines Follow-Up nachweisbar waren, unterteilt (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Lymphknotenmetastasen bei Diagnose und Follow-Up**

Verteilung der ermittelten H-Scores in ACC-Gewebe, zu denen Informationen über **a)** die Lymphknotenmetastasierung bei ACC-Primärdiagnose (n=100) bzw. über **b)** die Lymphknotenmetastasierung bei Follow-Up (n=69) vorhanden waren.

**a) N1:** Lymphknotenmetastasen bei Diagnose vorhanden, n=19, Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,1 \pm 0,7$ . **N0:** keine Lymphknotenmetastasen bei Diagnose vorhanden, n=81, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,8$ . p=0,02.

**b) N1:** Lymphknotenmetastasen im Verlauf vorhanden, n=36, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$ . **N0:** keine Lymphknotenmetastasen im Verlauf vorhanden, n=33, Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,6$ . p=0,58.

Hinsichtlich der Lymphknotenmetastasierung bei Diagnose des Nebennierenkarzinoms wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der CCR7-Expression der ACC-Gewebe nachgewiesen ( $p=0,02$ ). Die Patientengruppe mit vorhandenen Lymphknotenmetastasen (N1,  $n=19$ ) bildete signifikant mehr CCR7 (Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,1 \pm 0,7$ ) als die Patientengruppe ohne Lymphknotenmetastasen (N0,  $n=85$ , Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,8$ ), s. Abbildung 24a.

In Abbildung 24b ist die Unterteilung des Patientenkollektivs anhand der neu entwickelten Lymphknotenmetastasen während eines Follow-Ups dargestellt. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0,  $n=33$ , Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,7 \pm 0,6$ ) wiesen geringere CCR7-Level als Patienten mit Lymphknotenmetastasen im Verlauf ihrer Erkrankung (N1,  $n=36$ , Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,8 \pm 0,8$ ) auf, was jedoch nicht statistisch signifikant war ( $p=0,58$ ).

## 4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die CCR7-Expression in verschiedenen Nebennierengeweben ermittelt und überprüft, ob diese einen Einfluss auf die Klinik des Nebennierenkarzinoms hat. In der Literatur finden sich bisher lediglich Untersuchungen, die das Vorhandensein und Wirkung von CCR7 in anderen Organen oder Malignomen betrachten. Um die hier vorliegenden Ergebnisse trotzdem in einen wissenschaftlichen Kontext zu setzen, fließen nachfolgend auch Arbeiten in diese Diskussion ein, die sich mit CCR7 in anderen Malignomen oder anderen Chemokinrezeptoren in der Nebenniere beschäftigen.

### 4.1 CC-Chemokinrezeptorexpression in Nebennierengeweben

Bei der Messung von CC-Chemokinrezeptor-mRNA war es das Ziel, einen ersten Eindruck über das Vorhandensein von Chemokinrezeptoren in Nebennieren- und Nebennierenkarzinomgewebe zu erhalten. Es wurde nicht nur CCR7, sondern auch mRNA anderer Chemokinrezeptoren nachgewiesen. Vor allem in der Nebenniere konnten CCR1, CCR3, CCR5 und CCR10 in ähnlichen Konzentrationen wie CCR7 gefunden werden. Diese Rezeptoren sind eigentlich vor allem auf Leukozyten zu finden und haben viele verschiedene Liganden [69]. Neben der Rolle in der Regulierung des Immunsystems sind vor allem CCR3 und CCR5 in ihrer Funktion als Corezeptoren für das HI-Virus erforscht [78]. Da sie im verwendeten Nebennierenkarzinomgewebe allerdings nicht mehr oder kaum noch nachweisbar waren, werden weitere Untersuchungen benötigt, um zu klären, in welchem Maß und zu welcher Funktion diese Chemokinrezeptoren in der Nebenniere exprimiert werden.

Im Nebennierenkarzinom waren dagegen lediglich CCR7 und CCR11 in größeren mRNA-Mengen nachweisbar. Beim CC-Chemokinrezeptor 11 handelt es sich um einen atypischen Chemokinrezeptor, an den u.a. CLL19 und CLL21 (und damit die gleichen Liganden wie an CCR7) binden [113]. In der Literatur wird dieser Rezeptor unter anderem mit der Modulation der CCR7-Aktivität und in Malignomen mit geringerer Lymphknotenmetastasierung sowie längerem Gesamtüberleben des Patientenkollektivs in Verbindung gebracht [114-116]. Diese mutmaßlich gegensätzliche Wirkung und deren simultanes Vorkommen in ACC lässt eine Wechselwirkung der beiden Rezeptoren vermuten.

## **4.2 CCR7 wird in der Nebenniere und Nebennierentumoren exprimiert**

Bisher wurde der CC-Chemokinrezeptor 7 überwiegend auf reifen, antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC), B-Zellen und T-Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde eine Heraufregulierung seiner Expression in vielen Karzinomen entdeckt [1, 4]. Für diese Arbeit wurde das Ziel formuliert, detailliertere Informationen über die Expression von CCR7 in gesundem Nebennierengewebe und benignen Tumoren zu sammeln sowie eine eventuelle Heraufregulierung des Rezeptors im ACC – vergleichbar derer in anderen Malignomen – zu dokumentieren. Im Folgenden werden die zu dieser Zielstellung gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

### **4.2.1 Unterschiedliche CCR7-Expression in anatomisch verschiedenen Nebennierenzonen**

Auf mRNA-Ebene ließ sich CCR7 in der Nebenniere nachweisen. Darüber hinaus lässt die deutliche Positivität des Gewebes in der immunhistochemischen Färbung den Schluss zu, dass die nachgewiesene Rezeptor-mRNA auch intensiv über die Translation in Protein umgesetzt wird. Bei genauer Betrachtung der gefärbten Nebennieren fallen verschiedene Einzelheiten auf. Zum einen imponiert das Nebennierenmark durch seine sehr starke CCR7-Expression. Zum anderen lässt sich eine deutlich geringere Anfärbung der Zellen in der Zona reticularis notieren. Zellen der Zona glomerulosa und fasciculata bauen dagegen wieder verstärkt CCR7 in ihre Membranen ein. Der zonenspezifische CCR7-Nachweis in Nebennierenmark- und rinde weisen auf eine physiologische Funktion des Rezeptors hin, jedoch wurde weder die Expression noch die Funktion von CCR7 in der Nebenniere bisher erforscht.

Der Chemokinrezeptor CXCR4, welcher CCR7 in seinen physiologischen (v.a. Mobilisierung und zielgerichtete Wanderung von Zellen) und tumorspezifischen (v.a. Metastasierung) Effekten sehr ähnelt, wurde bezüglich der zonenspezifischen Expression in Nebennierenzellen bereits genauer untersucht. Die CXCR4-Expression korrelierte stark mit der CYP11B2-Expression (Aldosteronsynthese) und wurde passend dazu vor allem in der Zona glomerulosa und aldosteronproduzierenden Tumoren gefunden. [117] Diese Entdeckung spricht dafür, dass sowohl CCR7 als auch CXCR4 in der Nebenniere eine physiologische Funktion haben, auch wenn man diese aus den bisherigen Untersuchungen nicht ableiten kann.

Da sowohl die CCR7-CCL19/21-Achse als auch die Nebenniere durch Katecholamin- sowie Glukokortikoidproduktion eine wichtige Rolle in der Immunreaktion des Körpers spielen, kann man eine Verbindung dieser Elemente vermuten. Eine Arbeit von Yang et al. weist einen Einfluss von Adrenalin auf die CCR7-Expression in dendritischen Zellen nach, wobei Adrenalin zu einer signifikanten Reduktion der CCR7-Expression führte [118]. Dies wirft die Frage auf, ob CCR7 im Nebennierenmark Teil der komplexen Regulationsmechanismen für die Synthese und Sekretion von Katecholaminen ist. Beispielsweise könnten CCL19 und CCL21 im Rahmen einer Immunreaktion des Körpers durch eine CCR7-Aktivierung in Zellen des Nebennierenmarks eine erhöhte Adrenalinausschüttung bewirken. Gleichzeitig würde die CCR7-Expression durch den erhöhten Adrenalin Spiegel sinken und die CCL19/21-vermittelte Katecholaminsekretion limitiert werden (negativer Feedback-Mechanismus). Auf die in der Literatur bereits bekannten Wechselwirkungen zwischen Glukokortikoiden und der CCR7-CCL19/21-Achse wird in Kapitel 4.2.2 detaillierter eingegangen.

#### **4.2.2 Unterschiedliche CCR7-Expression in verschiedenen Nebennierenadenomen**

Der Nachweis von CCR7-mRNA in Nebennierenadenomen lieferte unerwartet hohe Werte. Innerhalb der Entitäten variierte der mRNA-Nachweis, wobei endokrin-inaktive Adenome die größte Menge an CCR7 vorzuweisen hatten. Ob diese Heraufregulierung der Rezeptorsynthese im Kontext der üblichen Tumormutationen zu sehen ist oder ihr eine bestimmte Ursache bzw. Wirkung zu Grunde liegt, ist durch die getätigten Experimente nicht zu beantworten und erfordert weitere Untersuchungen.

Befasst man sich nun mit dem CCR7-Nachweis auf Proteinebene und vergleicht die Proteinexpression in den Zonen der Nebenniere mit der Proteinexpression in den entsprechenden Adenomen, fallen unterschiedliche Entwicklungen auf. Im Gegensatz zur Zona glomerulosa, die vorwiegend das Hormon Aldosteron produziert und in der immunhistochemischen Färbung als stärkster CCR7-Expressionsort in der Nebennierenrinde zu erkennen war, konnte man in APA mit Abstand am wenigsten CCR7 nachweisen. Möglicherweise waren nicht die aldosteronproduzierenden Zellen für die starke Färbung in der Zona glomerulosa verantwortlich, sondern hormoninaktive Zellen der Nebennierenrinde. Diese Zellen bilden die Grundlage für endokrin-inaktive Adenome, die in den hier vorgestellten Experimenten die stärkste CCR7-Expression im Bereich der Adenome auf Proteinebene aufwiesen. Die Frage nach dem Ursprung der CCR7-Quelle könnte man durch eine komplementäre Färbung der Gewebe mit

CYP11B1 bzw. CYP11B2 (Aldosteronsynthasen) klären. Ein 11 $\beta$ -Hydroxylase-Nachweis in CCR7-exprimierenden Zellen wäre ein Hinweis auf aldosteronproduzierende Zellen als Ursprung von CCR7 in der Zona glomerulosa, bei CYP11B1/B2-Negativität wären endokrin-inaktive Zellen der wahrscheinlichere Expressionsort. Eine andere Erklärung wäre, dass aldosteronproduzierende Zellen ihre Fähigkeit verlieren, aus CCR7-mRNA das Protein zu translatieren, sobald es zur Adenombildung kommt. Denn legt man den Fokus auf die Interpretation der unterschiedlichen CCR7-Expression in den benignen Nebennierentumoren, stellt man fest, dass die gemessenen relativen mRNA-Level nicht oder nur zum Teil mit der immunhistochemisch bestimmten CCR7-Proteinexpression in den entsprechenden Geweben korrelierten. Während in APA und CPA auf mRNA Ebene vergleichbare Ergebnisse nachweisbar waren, wurde in APA auf Proteinebene weniger CCR7 gefunden, als ausgehend von der mRNA-Menge in Relation zu CPA vorherzusehen war. Statistisch konnte sogar ein signifikanter Unterschied in der CCR7-Proteinexpression zwischen APA und CPA und zwischen APA und EIA berechnet werden.

Statt einer mangelnden mRNA-Translation in aldosteronproduzierenden Adenomen könnte die Ursache dieses Unterschieds zwischen APA und CPA auch eine vermehrte Proteinbiosynthese der CCR7-mRNA in cortisolproduzierenden Adenomen sein. Diese Vermutung wird durch die Angleichung der CCR7-Proteinlevel – trotz verhältnismäßig geringerem mRNA-Nachweis – an die der endokrin-inaktiven Adenome nahegelegt (H-Score CPA Mittelwert  $\pm$  SD:  $2,3 \pm 0,6$ ; H-Score EIA Mittelwert  $\pm$  SD  $2,4 \pm 0,5$ ). Bisher gibt es in der Literatur wenige Hinweise auf eine Wechselwirkung von Glukokortikoiden und der CCR7-CCL19/21-Achse, die eine Hochregulierung der CCR7-Expression erklären könnten. Eine Arbeit publizierte einen Zusammenhang zwischen der Abnahme der CCL21-Konzentration und damit der CCR7-Effekte nach therapeutischer Gabe von synthetischen Kortikosteroiden und ACTH in Patienten mit Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom, eine andere Arbeit zeigte dagegen auf, dass Hydrocortison in vitro keinen Effekt auf die CCR7-Expression in bestimmten menschlichen T-Zellen hat [119, 120]. Die vielfältigen Effekte von Glukokortikoiden auf die Immunreaktion und die bekannten Zusammenhänge zwischen Zytokinen und Glukokortikoidsynthese [7] lassen aber die Annahme zu, dass Einflüsse auf den CCR7-Haushalt zum Beispiel durch Hochregulierung der Expression und damit hoher Level in CPA vorhanden sein könnten.

### **4.2.3 Unterschiedliche CCR7-Expression im ACC und ACC-Metastasen**

CCR7 konnte im Nebennierenkarzinom (ACC) sowohl auf mRNA-Ebene als auch als CCR7-Protein nachgewiesen werden, wobei die Rezeptorexpression auf Proteinebene von Tumor zu Tumor sehr unterschiedlich war. Manche Tumore (45 % von 128 Geweben) zeigten fast keinen bis wenig Einbau des Rezeptors in die Membran. Die anderen Tumore (55 % von 128 Geweben) wiesen eine stärkere bzw. starke Heraufregulierung des CC-Chemokinrezeptors 7 auf. Der von fast negativ bis stark positiv variierende CCR7-Nachweis ist möglicherweise auf die Zellen zurückzuführen, die den Ursprung des malignen Tumors bilden. Sowohl die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der gesunden Nebenniere, als auch die (molekularbiologische und immunhistochemische) Auswertung der Nebennierenadenome geben Hinweise auf eine hormonabhängige Entwicklung der CCR7-Expression (s. 4.2.1 und 4.2.2). Es zeigten sich bei der Unterteilung der ACC nach Hormonsekretion jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im CCR7-Nachweis. Beispielsweise gehörten je 8 endokrin-inaktive ACC den Gruppen mit niedriger und hoher CCR7-Expression an, die Verteilung bei cortisolproduzierenden Malignomen fiel ähnlich aus (wenig CCR7: n=8; viel CCR7: n=10). Auch bei ACC, die selektiv Androgene sezernierten, wurden 3 ACC mit niedrigen und 5 ACC mit hohen CCR7-Leveln gefunden, was vorerst nicht mit dem niedrigen Nachweis an CCR7 in der Zona reticularis in der gesunden Nebenniere in Einklang zu bringen ist. Damit ist von hormonunabhängigen Auslösern der CCR7-Expression im Nebennierenkarzinom auszugehen. Die große Spannweite an CCR7-Intensität spricht am wahrscheinlichsten dafür, dass es sich um zufällige Ausprägungen der Expression im Rahmen der sporadischen Tumormutationen handelt.

Bei Vergleich der H-Scores (als Maß für die CCR7-Expression) von ACC und Nebennierenadenomen (ACA) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der CCR7-Menge in EIA und ACC festgestellt. Die endokrin-inaktiven Tumore wiesen wesentlich höhere CCR7-Werte auf als der maligne Nebennierentumor, wobei die einzelnen Scores der ACC-Gewebe stark variierten. Es stellt sich die Frage, ob man sich diese Expressionsunterschiede in der Diagnostik zunutze machen könnte, wobei die Aussagekraft der Ergebnisse aufgrund der hier bearbeiteten Fallzahlen (EIA n=21) als limitiert betrachtet werden muss. Tatsächlich ist die Differentialdiagnose zwischen Nebennierenkarzinomen ohne hormonelle Aktivität und endokrin-inaktiven Adenomen nicht trivial. Nach der *Europäischen Leitlinie zum Nebennieren-Inzidentalom* wird bei

funktionell inaktiven Neoplasien der Nebenniere u.a. die durch die Bildgebung erworbenen Informationen über Größe und Homogenität des Tumorgewebes als Entscheidungshilfe über die nachfolgende Therapie herangezogen [9]. Molekulare Marker zur Bestimmung der Dignität sind zwar bekannt, aber in der nichtinvasiven Diagnostik nicht etabliert, da sie erst postoperativ nach Gewinnung des Tumorgewebes vorliegen können [23, 48]. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern möglicherweise die Grundlage, mithilfe eines CCR7-Liganden die Dignität eines hormonell inaktiven Nebennierentumors einzuschätzen. Der Nachweis einer starken CCR7-Expression würde die Unterscheidung zwischen ACC und EIA nicht vereinfachen, da beide Entitäten eine Heraufregulierung von CCR7 aufweisen können. Bei Nachweis einer geringen oder negativen CCR7-Aktivität könnte jedoch von einer Malignität ausgegangen werden, da endokrin-inaktive Tumore durchweg eine starke CCR7-Expression zeigten. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Bluemel et al., die den CXCR4-Liganden <sup>68</sup>Ga-pentixafor in der Diagnostik des Nebennierenkarzinoms einsetzten [121].

Neben den ACC-Geweben wurde auch in ACC-Rezidiven und ACC-Metastasen (Lymphknoten-, Lungen-, Leber-, Weichteilmetastasen) nach dem Chemokinrezeptor CCR7 gesucht. Auffällig ist besonders die starke Proteinexpression in Zellen der Lymphknotenmetastasen, die signifikant mehr CCR7 in ihre Zellmembranen einbauen als die Primärtumore, die ACC-Rezidive und die untersuchten Lungenmetastasen. Diese Entdeckung unterstützt die Hypothese, dass CCR7 im Prozess der Lymphknotenmetastasierung des Nebennierenkarzinoms eine Rolle spielt. Ähnlich wie in anderen Malignomen haben Karzinomzellen, die viel CCR7 in ihrer Membran aufweisen, einen stärkeren Drang und die Fähigkeit entlang des Konzentrationsgefälles ihrer Liganden CCL19 und CCL21 in Richtung lymphatischer Gefäße und Lymphknoten zu wandern als Karzinomzellen mit geringen CCR7-Leveln [122-124]. In den Lymphknoten angekommen, kommt es schließlich zur Entstehung eines Tochtergeschwulst der CCR7-positiven Zellen. Die Analyse der CCR7-Expression in Lymphknotenmetastasen anderer Tumore ergab teils bestätigende, teils widersprechende Ergebnisse. Strien et al. analysierten die Lymphknotenmetastasen von Brustkrebspatienten und fanden eine CCR7-Positivität von lediglich 46 % [125], wohingegen beispielsweise Irino et al. hohe CCR7-mRNA-Level in Lymphknotenmetastasen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus in einem Mausmodell nachwiesen [122]. Weder Leber noch Lunge zeichnen sich durch (hohe) CCL19 oder CCL21-Level aus [88, 126], weshalb eine Metastasierung in diese Organe

mutmaßlich nicht CCR7-gesteuert ist und die Filiae in dieser Arbeit geringere oder zufällig erhöhte CCR7-Level aufweisen.

### **4.3 Die CCR7-Expression beeinflusst den Verlauf einer Nebennierenkarzinomerkrankung**

Neben der Sammlung von Informationen und Daten zur Expression und Vorkommen des CC-Chemokinrezeptors 7 in nebennierenspezifischen Geweben, ist es die Absicht dieser Arbeit, den Einfluss des Rezeptors auf den Verlauf einer Nebennierenkarzinomerkrankung zu beleuchten. Die Ergebnisse aus den Experimenten bieten reichlich Spielraum für eine Diskussion der Rolle von CCR7 im Nebennierenkarzinom (ACC) und eine Einordnung dieser in den aktuellen Stand der Forschung zu CCR7 in anderen malignen Tumoren.

#### **4.3.1 CCR7 beeinflusst die Lymphknotenmetastasierung**

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob der CC-Chemokinrezeptor 7 einen Einfluss auf die Metastasierung – speziell die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen – im Nebennierenkarzinom hat. Die Hypothese, dass die CCR7-Aktivität nicht mit der Wanderung von Tumorzellen in Organe, die kein CCL19 oder CCL21 exprimieren, in Zusammenhang steht, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht zweifelsfrei bestätigen. Die Höhe der CCR7-Expression im Primariusgewebe korrelierte jedoch nicht mit der Abwesenheit oder dem Nachweis von Fernmetastasen (Lunge, Leber, etc.) und die immunhistochemisch untersuchten Metastasen zeigten keine signifikant hohen CCR7-Level verglichen mit den anderen Geweben, die für einen positiven oder negativen Einfluss des Rezeptors sprechen.

Im vorherigen Abschnitt 4.2.3 sind schon die hohen CCR7-Level in Lymphknotenmetastasen diskutiert worden, die bereits einen Hinweis auf die Relevanz von CCR7 bezüglich der Entstehung einer Tochtergeschwulst in Lymphknoten vermuten lassen. Bei Betrachtung der klinischen Daten der Patienten in Verbindung mit den jeweiligen CCR7-Werten der Primärtumoren konnte außerdem ein Unterschied in der Membrankonzentration des Chemokinrezeptors herausgearbeitet werden. Patienten, die bei Diagnosestellung ihrer ACC-Erkrankung bzw. dem anschließenden Staging bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen, hatten signifikant höhere CCR7-Level in ihrem Primärtumor als Patienten ohne nachgewiesene Lymphknotenmetastasen. Bei Entwicklung von Lymphknoten-Filiae im Verlauf der Tumorerkrankung konnte dagegen kein Unterschied in der CCR7-Synthese festgestellt werden. Betrachtet man den

gesamten Krankheitsverlauf und eine etwaige aufgetretene Metastasierung in die Lymphknoten, konnte man ebenfalls keine signifikante Differenz der CCR7-Level im ACC nachweisen. Diese Ergebnisse suggerieren, dass der Chemokinrezeptor 7 die Lymphknotenmetastasierung im Nebennierenkarzinom beeinflusst, indem eine hohe CCR7-Expression vor allem zu einer frühen, schnellen Tumorzellabsiedlung in den Lymphknoten führt. Eine Metastasenbildung in den Lymphknoten im Verlauf der Erkrankung scheint dagegen nicht speziell von CCR7 vorangetrieben zu werden. Bezüglich eines Zusammenhangs der CCR7-Expression auf die spätere Lk-Metastasenbildung wäre es allerdings auch denkbar, dass ACC, welche in den immunhistochemischen Untersuchungen wenig CCR7 aufwiesen, im weiteren Krankheitsverlauf durch Tumorveränderungen vermehrt CCR7 exprimierten und anschließend davon getrieben Lymphknotenmetastasen bildeten, die erst nach Krankheitsprogress in Nachfolgeuntersuchungen nachgewiesen werden konnten. Dieser Effekt, der CCR7 als Trigger der Lymphknotenmetastasierung im ACC wiederholt nahelegen würde, wäre durch die vorgenommenen Untersuchungen und den Zeitpunkt der Gewebegewinnung nicht abgebildet und nicht auszuschließen. Außerdem sind lediglich zu 57 % der Patienteninformationen über (Lymphknoten-)Metastasierungen im Verlauf verfügbar. Auch bezüglich der Lymphknotenmetastasierung bei ACC-Erstdiagnose waren bei 17 % der Patienten keine Daten zu erheben. Dem liegt vor allem zu Grunde, dass speziell in der Vergangenheit häufig keine Lymphknotenresektionen durchgeführt wurden und damit möglicherweise weitere Tumore (mit hoher CCR7-Expression) Lymphknotenmetastasen hatten, diese aber nicht entfernt und detektiert wurden.

Andere wissenschaftliche Arbeiten mit der Intention, die Wirkung von CCR7 auf die Lymphknotenmetastasierung von Karzinomen zu untersuchen, liefern vergleichbare Ergebnisse. Die Arbeitsgruppen um Irino et al. und Cunningham et al. beispielsweise erbrachten in Mausmodellen den Nachweis, dass CCR7-positive Tumorzelllinien des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms (Irino et al.) und Mammakarzinoms (Cunningham et al.) vorwiegend und vor allem schneller in Lymphknoten metastasieren als CCR7-negative Zelllinien [100, 122]. Ergebnisse aus Analysen von Patientenkohorten, die an einem Pankreaskarzinom [127], an einem Magenkarzinom [103, 128] oder an einem Mammakarzinom [101, 129] erkrankt sind und deren immunhistochemisch gemessene CCR7-Level in den Primärtumoren wie in der vorliegenden Arbeit mit den klinischen Daten verknüpft wurden, wiesen ebenfalls eine positive Korrelation zwischen hoher CCR7-Expression und der Rate an

Lymphknotenmetastasen nach und unterstützen damit den hier gezeigten Effekt von CCR7.

Sollten sich die Ergebnisse bezüglich der frühen Lymphknotenmetastasierung beim ACC bei hohen CCR7-Werten in zukünftigen Überprüfungen bestätigen, wäre es konsequent, diese Erkenntnisse in die Debatte über eine standardisiert durchgeführte Lymphknotendissektion einfließen zu lassen. Eine Lymphadenektomie bei Adrenalektomie ist zwar aktuell laut Leitlinien empfohlen, wird aber häufig – gerade in nicht spezialisierten Zentren – noch nicht durchgeführt [28, 55]. Da hohe CCR7-Werte für einen aggressiven Tumorprogress durch Ausbreitung des Karzinoms in die lymphatischen Gefäße und Lymphknoten sprechen, könnte man eine Testung des operativ gewonnenen Gewebes auf CCR7 in Erwägung ziehen, um bei starker Positivität eine Lymphadenektomie im Anschluss durchzuführen. Eine immunhistochemische Färbung mittels CCR7-Antikörper dauert allerdings mehrere Stunden und ist daher aktuell nicht im Rahmen der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik realisierbar.

#### **4.3.2 Einfluss von CCR7 auf die Tumorprogression**

Die Progression eines Tumors beschreibt die Größenzunahme der Neoplasie oder die Entwicklung eines Rezidivs oder (neuer) Metastasen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Frage formuliert, ob der CC-Chemokinrezeptor 7 einen Einfluss auf die Tumorprogression eines Nebennierenkarzinoms hat und CCR7 ein Indikator einer höheren Invasivität und Aggressivität ist. Aus den Ergebnissen zur ACC-Metastasierung (s. Kapitel 3.4.3 bzw. Kapitel 4.3.1) lässt sich ein Einfluss von CCR7 auf die Progression des Nebennierenkarzinoms ableiten. Die Patientengruppe mit einem Tumorprogress im Krankheitsverlauf zeigte jedoch verglichen mit der Patientengruppe, die von einer Tumorprogression verschont blieb, keine signifikant höhere CCR7-Expression im Primärtumor. Betrachtet man jedoch die Zeit, die den Erkrankten bis zu einem Progress blieb, ließ sich eine klare Tendenz erkennen, auch wenn keine statistische Signifikanz vorlag (mediane (progressionsfreie) Überlebenszeit 8 Monate (CCR7 hoch) vs. 23 Monate (CCR7 niedrig)). Patienten mit hohen CCR7-Membranwerten entwickelten früher Ereignisse als Patienten mit niedrigen Werten; das relative Risiko, einen Tumorprogress zu erleiden, war für Patienten mit starker CCR7-Expression höher als bei der Vergleichskohorte. Die progressionsfreie Zeit zeigte sich also abhängig von (membranständigem) CCR7 verkürzt. Das gleiche Bild zeichnete die Auswertung der CCR7-Expression im Zytoplasma. Auch hier war die progressionsfreie Zeit bei Patienten mit hohen CCR7-Leveln verglichen mit Patienten mit niedrigen Werten kürzer, wobei der

Unterschied sich ebenfalls nur als Tendenz und nicht als signifikant darstellte. Dieser Umstand ist aber trotzdem bemerkenswert, da hierdurch die Hypothese widerlegt wird, dass die Internalisierung des Rezeptors ins Zytoplasma eine protektive Wirkung hat. In dieser Analyse wurde allerdings nicht berücksichtigt, ob bei hohen zytoplasmatischen Werten auch automatisch die aktive, in die Membran eingebaute Form des Rezeptors geringer ist, da er inaktiv, ins Zellinnere internalisiert vorliegt. Oder ob hohe zytoplasmatische Werte auch meist hohe CCR7-Level in der Membran bedingen, weil der Rezeptor sich im steten Ein- und Ausbau befindet.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten nicht in den Kontext zu anderen Arbeiten gesetzt werden, da keine vergleichbaren Untersuchungen, welche die progressionsfreie Zeit in Karzinomen in Abhängigkeit von der CCR7-Expression bestimmt haben, zu finden waren. In der Literatur gibt es lediglich Arbeiten, die eine Beeinflussung der Tumorprogression durch eine Beziehung von CCR7 und erhöhter Lymphknotenmetastasierung schlussfolgern [130, 131].

Ein weiterer zu diskutierender Faktor, der für den ACC-Progress verantwortlich sein könnte, ist ein potentiell schnelleres Tumorwachstum. Aufgrund der physiologischen Wirkung von CCR7 auf Leukozyten, die neben der Chemotaxis auch anti-apoptische Effekte einschließt, kann eine positive Korrelation der CCR7-Expression mit der Zunahme des Karzinomgewebes in Erwägung gezogen werden. Studien am Prostatakarzinom entdeckten einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und CCR7-Expression [132, 133]. Für die hier untersuchten Nebennierenkarzinomgewebe konnte allerdings kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Tumorgröße bei Diagnose bzw. des Tumorwachstums durch eine erhöhte Aktivität des Chemokinrezeptors gefunden werden. Auch auf die rezidivfreie Zeit in den Patientengruppen hatte die CCR7-Expression (sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma) keinen Einfluss. Lokale Tumorrezidive zeigten fast durchweg eine mäßige bis leicht erhöhte CCR7-Expression, die signifikant schwächer war als in Lk-Metastasen. Ein einzelnes Rezidiv fiel allerdings durch einen sehr schwachen CCR7-Nachweis (H-Score 0,1) auf. Dabei handelte es sich um einen 12-jährigen männlichen Patienten, der nicht einmal 6 Monate nach Diagnosestellung verstarb. Er war der jüngste Patient, dessen Gewebe gefärbt wurde. Er wurde dem ENSAT Stadium 4 zugeteilt und es ist lediglich etwas über vorhandene Lungenmetastasen bekannt. Das für ACC ungewöhnlich junge Alter könnte im Zusammenhang mit der auffällig niedrigen CCR7-Expression stehen. Der ACC-Primarius konnte jedoch nicht gefärbt werden und es ist keine Aussage über dessen CCR7-Expression möglich. Die 4 nächstälteren Patienten (16-20 Jahre) wiesen alle

hohe CCR7-Werte (H-Score  $\geq 2$ ) im Primariusgewebe auf und erlitten ebenfalls alle einen Tumorprogress.

Zusammenfassend scheint die progressionsfreie Zeit bei einer CCR7-Heraufregulierung nicht aufgrund eines Progresses durch Tumorwachstum oder Rezidiv-Bildung verkürzt, sondern einzig und allein eine Konsequenz der erhöhten Metastasierungsrate zu sein.

### **4.3.3 Einfluss von CCR7 auf das Überleben**

Eine weitere Hypothese, die in dieser Arbeit überprüft werden sollte, betrifft den vermuteten negativen Einfluss von CCR7 auf die Prognose der Krebserkrankung, also auf das Überleben der ACC-Patienten. Aufgrund der bereits beschriebenen vielfältigen Wirkungen des untersuchten Rezeptors auf physiologische Prozesse in der Zelle, liegt der Gedanke nahe, dass eine Überexpression von CCR7 durchaus Effekte auf die Prognose einer Nebennierenkarzinomerkrankung haben könnte. Auch die bisher in dieser Arbeit diskutierten Beobachtungen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen hochreguliertem CCR7 und einer kürzeren progressionsfreien Zeit bzw. der signifikant (früheren) Lymphknotenmetastasierung weisen auf einen negativen Einfluss auf die Erkrankung hin. Schließlich ist an eine frühere Metastasierung und damit einhergehend einen aggressiven Erkrankungsverlauf meist eine kürzere Überlebenszeit geknüpft. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse in dieser Arbeit aber keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit hoher und Patienten mit niedriger CCR7-Expression hinsichtlich des Gesamt- als auch des krankheitsspezifischen Überlebens. Es ist jedoch durchweg die Tendenz erkennbar, dass Patienten mit starker CCR7-Expression kürzere Überlebenszeiten haben. Ob sich diese Tendenz bei Betrachtung von größeren Fallzahlen zu einem signifikanten Unterschied entwickelt, gilt es zukünftig zu untersuchen. Wie auch bei der Analyse der progressionsfreien Zeit wurden die zytoplasmatischen und membranständigen Rezeptorkonzentrationen unabhängig voneinander ausgewertet. Ziel war die Überprüfung eines positiven Effekts der Internalisierung des Rezeptors in die Zelle, da somit hypothetisch weniger CCR7 in seinem aktiven Zustand in der Zellmembran zur Verfügung steht. Doch vergleichbar mit den Ergebnissen bezüglich der progressionsfreien Zeit gibt es auch beim Gesamtüberleben und dem krankheitsspezifischen Überleben keinen Hinweis auf einen Vorteil für Patienten mit hohen zytoplasmatischen CCR7-Werten. Es stellen sich sogar gegensätzliche Wirkungen, nämlich tendenziell kürzere Überlebenszeitspannen, dar. Eine mögliche Erklärung ist der schnelle Einbau der bereits synthetisierten, im Zytoplasma schwimmenden Rezeptoren in die Membran, womit hohe zytoplasmatische

Werte mit hohen Rezeptorkonzentrationen in der Membran einhergehen würden. Dies wurde in dieser Arbeit nicht überprüft.

Ordnet man diese Erkenntnisse in den Stand der CCR7-Forschung an anderen Karzinomen ein, findet man kontroverse Standpunkte bezüglich der CCR7-Wirkung auf die Prognose und das Gesamtüberleben der Tumorpatienten. Während einige Autoren eine schlechtere Prognose bei Nachweis hoher CCR7-Werte im Magenkarzinom beschreiben [103, 128], fand Kwak et al. in seiner Patientenpopulation einen entgegengesetzten, positiven Effekt auf das Gesamtüberleben [134]. Auch bei einer Erkrankung an einem Mammakarzinom ist die Beeinflussung der Überlebenschancen durch CCR7 nicht abschließend geklärt, da es widersprüchliche Ergebnisse in Form von Berichten über positivere Prognosen [129], negative Prognosen [104, 135] und von der CCR7-Expression unabhängige Prognosen [136] gibt.

Abschließend kann man festhalten, dass eine starke CCR7-Expression – unabhängig ob im Zytoplasma oder der Membran – im Falle einer Nebennierenkarzinomerkrankung tendenziell einen negativen Einfluss auf das Überleben hat. Als eine verlässliche Ergänzung zu etablierten Prognosefaktoren (ki67-index, Weiss-Score, ENSAT-Stadium, Resektionsstatus) zur Abschätzung des Verlaufs des Nebennierenkarzinoms ist CCR7 aber eher nicht geeignet, da die Effektstärke zu gering ist.

#### **4.4 Methodenkritik und Limitationen**

Diese Arbeit weist einige diskussionswürdige methodische Limitationen auf. Als erster Kritikpunkt ist die Anzahl an ausgewerteten Nebennierenkarzinomen zu nennen, was die statistische Aussagekraft der Ergebnisse mindert. Verglichen mit anderen Tumorentitäten und vergleichbaren Untersuchungen wurde weniger Gewebe analysiert und Patientendaten ausgewertet. Vor allem die Interpretation der Daten der mRNA-Analyse ist aufgrund der niedrigen Fallzahl sehr eingeschränkt. An dieser Stelle muss man jedoch betonen, dass es sich beim Nebennierenkarzinom mit einer Inzidenz von 0,5 – 2,0 Erkrankungen pro eine Million Menschen pro Jahr [17] um eine seltene Erkrankung handelt, welche die Sammlung großer Daten erschwert. Gleiches gilt für die niedrige Fallzahl der entsprechenden Lymphknoten- und Fernmetastasen des Nebennierenkarzinoms. Allerdings ist die vorliegende Arbeit mit insgesamt 128 ACC-Tumorproben weltweit eine der größten Serien für eine molekularbiologische Untersuchung, so dass die Fallzahl in Anbetracht der Seltenheit der Erkrankung auch als Stärke aufgefasst werden kann.

Die niedrige Anzahl der untersuchten Nebennierenadenome und normalen, gesunden Nebennieren ist dem Umstand geschuldet, dass deren Untersuchung auf Chemokinrezeptoren lediglich zur Einordnung bisheriger Daten und zur Vollständigkeit der Darstellung der CCR7-Expression im Nebennierengewebe getätigt wurde, wohingegen der Fokus dieser Arbeit auf der Analyse von CCR7 im malignen Nebennierengewebe lag. Um die Ergebnisse der Untersuchungen zu bestätigen, sollten diese aber ohne Frage mit größeren Fallzahlen wiederholt werden, um die statistische Aussagekraft zu verbessern. Durch eine strukturelle standardmäßige Aufarbeitung von operativ gewonnenen Nebennierengeweben für experimentelle Studien und durch eine konsequente prospektive Datenerfassung, wie es im Deutschen Nebennieren-Karzinom-Register praktiziert wird, könnte die Abhängigkeit von retrospektiven – meist unvollständigen – Daten verringert werden.

Neben den niedrigen Fallzahlen kann die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von CCR7 kritisch bewertet werden. Eine Begutachtung der Schnitte durch Personen ist schlussendlich immer untersucherabhängig und subjektiv. Eine Interpretation der CCR7-Expression durch ein auf Membranfärbungen spezialisiertes Computerprogramm wäre der Auswertung durch Personen aufgrund der Unbeeinflussbarkeit vorzuziehen. In dieser Arbeit wurde aber durch Nutzung eines etablierten H-Scores sowie die Verblindung gegen klinische Daten und Ergebnisse der anderen Begutachter eine objektive Grundlage geschaffen.

Des Weiteren entsteht eine gewisse Limitation der Aussagekraft der Ergebnisse dadurch, dass eine Lymphadenektomie bei Adrenalektomie nicht immer simultan durchgeführt wird. Es ist damit zu rechnen, dass ACC-Patienten perioperativ bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen, jedoch aufgrund des fehlenden histopathologischen Nachweises in der Gruppe der Patienten geführt werden, die keine Lymphknotenmetastasen haben. Dies kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, inwiefern die CCR7-Expression im ACC-Primarius die Metastasierung beeinflusst.

Abschließend soll neben den eben diskutierten Kritikpunkten auch noch eine Stärke dieser Arbeit Erwähnung finden. Es wurden anhand einer klar definierten Fragestellung Untersuchungen durchgeführt und Ergebnisse ermittelt, wodurch eine stark hypothesengetriebene Arbeit entstanden ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund und Ziele:** Die Bindung des Chemokinrezeptors CCR7 mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 initiiert neben immunmodulatorischen auch antiapoptotische Effekte und beeinflusst die Geschwindigkeit der Zellmigration. Ein Zusammenhang zwischen CCR7-Expression und Lymphknotenmetastasierung sowie Gesamtüberleben ist für verschiedene Tumor-Entitäten dokumentiert. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig die CCR7-Expression in der Nebenniere, bei Nebennierenadenomen (ACA) und beim Nebennierenkarzinom (ACC) untersucht.

**Methoden:** Es wurden insgesamt 252 Nebennierengewebe (ACC n=128, ACC-Metastasen n=61, ACA n=59, normale Nebennieren n=4) mittels immunhistochemischer Färbung und 37 Gewebe (ACC n=9, ACA n=24, normale Nebennieren n=4) mittels quantitativer real-time PCR auf CCR7-Expression hin untersucht. Anschließend wurden die Beziehungen zwischen CCR7-Level (dargestellt durch einen semiquantitativen H-Score) und ACC-Metastasierung, dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben der Patienten und verschiedenen klinischen bzw. histopathologischen Parametern wie ENSAT-Stadium, Hormonsekretion und Ki67-Index analysiert.

**Ergebnisse:** CCR7 konnte in allen untersuchten Nebennierengeweben in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. In der gesunden Nebenniere fand sich eine starke CCR7-Expression in den äußeren Rindenzonen und dem Nebennierenmark. In den ACA zeigten sich vor allem in endokrin-inaktiven Adenomen (EIA, H-Score Mittelwert 2,4) und cortisolproduzierenden Adenomen (CPA, H-Score Mittelwert 2,3) hohe CCR7-Werte. EIA wiesen damit signifikant höhere CCR7-Level verglichen mit ACC und aldosteronproduzierenden Adenomen (APA) auf, deren H-Score Mittelwerte bei 1,8 bzw. 1,3 lagen. CPA hatten eine signifikante höhere CCR7-Expression als APA ( $p < 0,005$ ).

Bei den Nebennierenkarzinomen fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der CCR7-Membran-Expression von Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren (H-Score Mittelwert: 2,5 vs. 1,8;  $p < 0,001$ ), sowie zwischen Lymphknotenmetastasen und Lokalrezidiven (H-Score Mittelwert: 2,5 vs. 1,6;  $p < 0,001$ ) und Lymphknotenmetastasen und Lungenmetastasen (H-Score Mittelwert: 2,5 vs. 1,7;  $p = 0,03$ ). Hinweise für eine Korrelation zwischen CCR7-Expression und der Tumorgröße, der Hormonproduktion oder verschiedener Prognosefaktoren (ENSAT-Stadium, Weiss-Score, Ki67-Index) fanden sich nicht. Patienten mit Lymphknotenmetastasen bei Diagnose des ACC wiesen in ihren Primärtumoren signifikant höhere CCR7-Level auf als Patienten ohne

Lymphknotenmetastasen (H-Score Mittelwert: 2,1 vs. 1,7;  $p=0,02$ ). Die CCR7-Expression hatte in diesem Patientenkollektiv keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- oder das progressionsfreie Überleben. In der Tendenz erlitten Patienten mit hoher CCR7-Expression einen früheren Tumorprogress (HR: 1,44 (95 % CI: 0,96-2,17)).

**Schlussfolgerung:** CCR7 ist regelhaft in den unterschiedlichen Nebennierengeweben exprimiert. Entsprechend der Beobachtungen bei anderen Karzinomerkrankungen, war eine hohe CCR7-Expression mit tendenziell kürzerer progressionsfreier Zeit und einer frühen Lymphknotenmetastasierung assoziiert. Die postoperative Bestimmung der CCR7-Expression im Tumorgewebe könnte deshalb in Zukunft Hinweise auf die Notwendigkeit einer Lymphadenektomie – falls noch nicht in der ersten OP durchgeführt – im Rahmen der Therapieplanung liefern. Um zu klären, welche weitere Rolle CCR7 in der gesunden Nebenniere und den Nebennierentumoren spielt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Vela, M., et al., *Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges*. Front Immunol, **2015**. 6: p. 12.
2. Green, M.R., *Targeting targeted therapy*. N Engl J Med, **2004**. 350(21): p. 2191-3.
3. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, **2004**. 4(7): p. 540-50.
4. Mollica Poeta, V., et al., *Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, **2019**. 10: p. 379.
5. L.-R., R., *Nebenniere, in Taschenbuch Histologie*, L.-R. R., Editor. **2006**, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 421-426.
6. Ehrhart-Bornstein, M., et al., *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*. Endocr Rev, **1998**. 19(2): p. 101-43.
7. Kanczkowski, W., M. Sue, and S.R. Bornstein, *Adrenal Gland Microenvironment and Its Involvement in the Regulation of Stress-Induced Hormone Secretion during Sepsis*. Front Endocrinol (Lausanne), **2016**. 7: p. 156.
8. Bratland, E., A. Hellesen, and E.S. Husebye, *Induction of CXCL10 chemokine in adrenocortical cells by stimulation through toll-like receptor 3*. Mol Cell Endocrinol, **2013**. 365(1): p. 75-83.
9. Fassnacht, M., et al., *Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, **2016**. 175(2): p. G1-g34.
10. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. Ann Intern Med, **2003**. 138(5): p. 424-9.
11. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. Endocr Rev, **2004**. 25(2): p. 309-40.
12. Bittner, J.G.t. and L.M. Brunt, *Evaluation and management of adrenal incidentaloma*. J Surg Oncol, **2012**. 106(5): p. 557-64.
13. Gruber, M. and S.R. Bornstein, *Inzidentalome, in Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*, H. Lehnert, Editor. **2015**, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 254-259.
14. Slawik, M. and M. Reincke, *Zufällig entdeckte Nebennierenraumforderungen, in Praktische Endokrinologie*, B. Allolio and H. Schulte, Editors. **2010**, Elsevier Verlag: München. p. 264-269.
15. Diederich, S., *Mineralkortikoidhochdruck/Primärer Hyperaldosteronismus, in Praktische Endokrinologie*, B. Allolio and H. Schulte, Editors. **2010**, Elsevier Verlag: München. p. 231-237.
16. Kempers, M.J., et al., *Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism*. Ann Intern Med, **2009**. 151(5): p. 329-37.
17. Kerkhofs, T.M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993*. Eur J Cancer, **2013**. 49(11): p. 2579-86.
18. Kebebew, E., et al., *Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress?* World J Surg, **2006**. 30(5): p. 872-8.
19. Belmihoub, I., et al., *From benign adrenal incidentaloma to adrenocortical carcinoma: an exceptional random event*. Eur J Endocrinol, **2017**. 176(6): p. K15-k19.
20. Bernard, M.H., et al., *A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis*. J Clin Endocrinol Metab, **2003**. 88(3): p. 998-1001.
21. Zheng, S., et al., *Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma*. Cancer Cell, **2016**. 29(5): p. 723-736.

22. Assie, G., et al., *Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma*. Nat Genet, **2014**. 46(6): p. 607-12.
23. Fassnacht, M., M. Kroiss, and B. Allolio, *Update in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, **2013**. 98(12): p. 4551-64.
24. Borges, K.S., et al., *Wnt/ $\beta$ -catenin activation cooperates with loss of p53 to cause adrenocortical carcinoma in mice*. Oncogene, **2020**. 39(30): p. 5282-5291.
25. Varley, J.M., et al., *Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors*. Am J Hum Genet, **1999**. 65(4): p. 995-1006.
26. Fassnacht, M., et al., *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification*. Cancer, **2009**. 115(2): p. 243-50.
27. Fassnacht, M., *Nebennierenkarzinom*, in *Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*, H. Lehnert, Editor. **2015**, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 259-262.
28. Fassnacht, M., et al., *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, **2018**. 179(4): p. G1-g46.
29. Libe, R., *Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment*. Front Cell Dev Biol, **2015**. 3: p. 45.
30. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Nebennierenrindenkarzinom*, in *Praktische Endokrinologie*, H. Schulte and B. Allolio, Editors. **2010**, Elsevier Verlag: München. p. 225-230.
31. King, D.R. and E.E. Lack, *Adrenal cortical carcinoma: a clinical and pathologic study of 49 cases*. Cancer, **1979**. 44(1): p. 239-44.
32. Gaujoux, S. and M.F. Brennan, *Recommendation for standardized surgical management of primary adrenocortical carcinoma*. Surgery, **2012**. 152(1): p. 123-32.
33. Boland, G.W., et al., *Characterization of adrenal masses by using FDG PET: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test performance*. Radiology, **2011**. 259(1): p. 117-26.
34. Arlt, W., et al., *Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors*. J Clin Endocrinol Metab, **2011**. 96(12): p. 3775-84.
35. Sbiera, S., et al., *High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors*. J Clin Endocrinol Metab, **2010**. 95(10): p. E161-71.
36. Weiss, L.M., *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. Am J Surg Pathol, **1984**. 8(3): p. 163-9.
37. Beuschlein, F., et al., *Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection*. J Clin Endocrinol Metab, **2015**. 100(3): p. 841-9.
38. Sullivan, M., M. Boileau, and C.V. Hodges, *Adrenal cortical carcinoma*. J Urol, **1978**. 120(6): p. 660-5.
39. Fassnacht, M., C. Wittekind, and B. Allolio, *[Current TNM classification systems for adrenocortical carcinoma]*. Pathologe, **2010**. 31(5): p. 374-8.
40. Lughezzani, G., et al., *The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation*. Eur J Cancer, **2010**. 46(4): p. 713-9.
41. Pennanen, M., et al., *Helsinki score-a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas*. Hum Pathol, **2015**. 46(3): p. 404-10.
42. Duregon, E., et al., *Validation of the prognostic role of the "Helsinki Score" in 225 cases of adrenocortical carcinoma*. Hum Pathol, **2017**. 62: p. 1-7.

43. Libe, R., et al., *Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study*. *Ann Oncol*, **2015**. 26(10): p. 2119-25.
44. Bilimoria, K.Y., et al., *Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors*. *Cancer*, **2008**. 113(11): p. 3130-6.
45. Scollo, C., et al., *Prognostic Factors for Adrenocortical Carcinoma Outcomes*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2016**. 7: p. 99.
46. Morimoto, R., et al., *Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas*. *Endocr J*, **2008**. 55(1): p. 49-55.
47. Ip, J.C., et al., *Immunohistochemical validation of overexpressed genes identified by global expression microarrays in adrenocortical carcinoma reveals potential predictive and prognostic biomarkers*. *Oncologist*, **2015**. 20(3): p. 247-56.
48. de Reynies, A., et al., *Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival*. *J Clin Oncol*, **2009**. 27(7): p. 1108-15.
49. Sun, N., et al., *Prognostic Relevance of Steroid Sulfation in Adrenocortical Carcinoma Revealed by Molecular Phenotyping Using High-Resolution Mass Spectrometry Imaging*. *Clin Chem*, **2019**. 65(10): p. 1276-1286.
50. Ronchi, C.L., et al., *Low SGK1 expression in human adrenocortical tumors is associated with ACTH-independent glucocorticoid secretion and poor prognosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, **2012**. 97(12): p. E2251-60.
51. Berruti, A., et al., *Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer*. *Eur Urol*, **2014**. 65(4): p. 832-8.
52. Miller, B.S., et al., *Proposal for modification of the ENSAT staging system for adrenocortical carcinoma using tumor grade*. *Langenbecks Arch Surg*, **2010**. 395(7): p. 955-61.
53. Ettaieb, M., et al., *Past, Present and Future of Epigenetics in Adrenocortical Carcinoma*. *Cancers (Basel)*, **2020**. 12(5).
54. Mizdrak, M., T. Tičinović Kurir, and J. Božić, *The Role of Biomarkers in Adrenocortical Carcinoma: A Review of Current Evidence and Future Perspectives*. *Biomedicines*, **2021**. 9(2).
55. Reibetanz, J., et al., *Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma*. *Ann Surg*, **2012**. 255(2): p. 363-9.
56. Nilubol, N., D. Patel, and E. Kebebew, *Does Lymphadenectomy Improve Survival in Patients with Adrenocortical Carcinoma? A Population-Based Study*. *World J Surg*, **2016**. 40(3): p. 697-705.
57. Terzolo, M., et al., *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. *N Engl J Med*, **2007**. 356(23): p. 2372-80.
58. Fassnacht, M., et al., *Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, **2020**. 31(11): p. 1476-1490.
59. Zhuang, J., et al., *Sunitinib monotherapy instead of mitotane combination therapy for the treatment of refractory adrenocortical carcinoma*. *Int J Urol*, **2015**. 22(11): p. 1079-81.
60. Lerario, A.M., et al., *The combination of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) antibody cixutumumab and mitotane as a first-line therapy for patients with recurrent/metastatic adrenocortical carcinoma: a multi-institutional NCI-sponsored trial*. *Horm Cancer*, **2014**. 5(4): p. 232-9.

61. Fassnacht, M., et al., *Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study*. *Lancet Oncol*, **2015**. 16(4): p. 426-35.
62. Gagliano, T., et al., *Inhibition of epithelial growth factor receptor can play an important role in reducing cell growth and survival in adrenocortical tumors*. *Biochem Pharmacol*, **2015**. 98(4): p. 639-48.
63. Quinkler, M., et al., *Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine*. *J Clin Endocrinol Metab*, **2008**. 93(6): p. 2057-62.
64. L.-R., R., *Das Immunsystem*, in *Taschenbuch Histologie*, L.-R. R., Editor. **2006**, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 299.
65. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, **2000**. 12(2): p. 121-7.
66. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med*, **1998**. 338(7): p. 436-45.
67. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. *Trends Immunol*, **2004**. 25(2): p. 75-84.
68. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. *Nat Immunol*, **2008**. 9(9): p. 970-80.
69. Stone, M.J., et al., *Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network*. *Int J Mol Sci*, **2017**. 18(2).
70. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**. 95(16): p. 9448-53.
71. Wurm, S., et al., *CCR7 Is Important for Mesangial Cell Physiology and Repair*. *J Histochem Cytochem*, **2017**: p. 22155417737975.
72. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. *Nature*, **2000**. 406(6793): p. 309-14.
73. Fan, L., et al., *Cutting edge: ectopic expression of the chemokine TCA4/SLC is sufficient to trigger lymphoid neogenesis*. *J Immunol*, **2000**. 164(8): p. 3955-9.
74. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. *Science*, **1992**. 258(5089): p. 1798-801.
75. Strieter, R.M., et al., *Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**. 210(1): p. 51-7.
76. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. *Nature*, **1998**. 393(6685): p. 591-4.
77. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*, **1996**. 272(5263): p. 872-7.
78. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu Rev Immunol*, **1999**. 17: p. 657-700.
79. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. *Nature*, **2001**. 410(6824): p. 50-6.
80. Balkwill, F., *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. *Semin Cancer Biol*, **2004**. 14(3): p. 171-9.
81. Arenberg, D.A., et al., *The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer*. *J Leukoc Biol*, **1997**. 62(5): p. 554-62.
82. Salazar, N., et al., *Chemokines and chemokine receptors as promoters of prostate cancer growth and progression*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **2013**. 23(1): p. 77-91.

83. Korbecki, J., et al., *CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands*. *Int J Mol Sci*, **2020**. 21(20).
84. Chifu, I., et al., *Impact of the Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7 on Clinical Outcome in Adrenocortical Carcinoma*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2020**. 11: p. 597878.
85. Jacovina, A. and M. New, *Chemokine (C-C motif) receptor 5 entry inhibitors: new class of drugs for acquired immune deficiency syndrome*. *Mt Sinai J Med*, **2008**. 75(3): p. 297-8.
86. Arenberg, D.A., et al., *Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice*. *J Clin Invest*, **1996**. 97(12): p. 2792-802.
87. Liang, Z., et al., *Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4*. *Cancer Res*, **2004**. 64(12): p. 4302-8.
88. Yoshida, R., et al., *Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7*. *J Biol Chem*, **1997**. 272(21): p. 13803-9.
89. Hauser, M.A. and D.F. Legler, *Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes*. *J Leukoc Biol*, **2016**. 99(6): p. 869-82.
90. Rodríguez-Fernández, J.L. and O. Criado-García, *The Chemokine Receptor CCR7 Uses Distinct Signaling Modules With Biased Functionality to Regulate Dendritic Cells*. *Front Immunol*, **2020**. 11: p. 528.
91. Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, and J.L. Rodriguez-Fernandez, *The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells*. *J Immunol*, **2006**. 176(9): p. 5153-9.
92. Escribano, C., C. Delgado-Martin, and J.L. Rodriguez-Fernandez, *CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta*. *J Immunol*, **2009**. 183(10): p. 6282-95.
93. Muller, G., U.E. Hopken, and M. Lipp, *The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity*. *Immunol Rev*, **2003**. 195: p. 117-35.
94. Riol-Blanco, L., et al., *The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed*. *J Immunol*, **2005**. 174(7): p. 4070-80.
95. Bromley, S.K., S.Y. Thomas, and A.D. Luster, *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. *Nat Immunol*, **2005**. 6(9): p. 895-901.
96. Till, K.J., et al., *The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes*. *Blood*, **2002**. 99(8): p. 2977-84.
97. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. *Nat Rev Immunol*, **2011**. 11(9): p. 597-606.
98. Baran, K., et al., *An assessment of the relationship between the expression of CCR7/CCL19 axis and selected regulatory miRNAs in non-small cell lung cancer*. *Mol Biol Rep*, **2019**. 46(5): p. 5389-5396.
99. Du, H., et al., *CXCR4 and CCR7 Expression in Primary Nodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma-A Clinical and Immunohistochemical Study*. *Am J Med Sci*, **2019**. 357(4): p. 302-310.
100. Cunningham, H.D., et al., *Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice*. *Transl Oncol*, **2010**. 3(6): p. 354-61.

101. Rizeq, B. and M.I. Malki, *The Role of CCL21/CCR7 Chemokine Axis in Breast Cancer Progression*. *Cancers (Basel)*, **2020**. 12(4).
102. Wiley, H.E., et al., *Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma*. *J Natl Cancer Inst*, **2001**. 93(21): p. 1638-43.
103. Zhou, S., et al., *CCR7 expression and intratumoral FOXP3+ regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer*. *PLoS One*, **2013**. 8(9): p. e74430.
104. Mashino, K., et al., *Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma*. *Cancer Res*, **2002**. 62(10): p. 2937-41.
105. Stürmer, A., et al., *Chemokine receptor expression in the adrenal cortex and in adrenocortical tumours*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **2009**. 115(S 1): p. P02\_075.
106. Qiagen, *QuantiTect Reverse Transcription Handbook 03/2009*. **2009**.
107. N., N. *The Nobel Prize in Chemistry 1993*. [cited **2017** 15.09.]; Available from: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/).
108. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, **1970**. 227(5259): p. 680-5.
109. Burnette, W.N., "Western blotting": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, **1981**. 112(2): p. 195-203.
110. N., N. *Western Blotting Fundamental Principle, How Western Blots Work*. [cited **2017** 07.09.]; Available from: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/western-blot-principle>.
111. Olausson, K.A., et al., *DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy*. *N Engl J Med*, **2006**. 355(10): p. 983-91.
112. Al-Haddad, S., et al., *Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer*. *Am J Pathol*, **1999**. 155(6): p. 2057-66.
113. Gosling, J., et al., *Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK*. *J Immunol*, **2000**. 164(6): p. 2851-6.
114. Zeng, X.H., et al., *Coexpression of atypical chemokine binders (ACBs) in breast cancer predicts better outcomes*. *Breast Cancer Res Treat*, **2011**. 125(3): p. 715-27.
115. Hou, T., et al., *Atypical chemokine receptors predict lymph node metastasis and prognosis in patients with cervical squamous cell cancer*. *Gynecol Oncol*, **2013**. 130(1): p. 181-7.
116. Zhu, Y., et al., *CCX-CKR expression in colorectal cancer and patient survival*. *Int J Biol Markers*, **2014**. 29(1): p. e40-8.
117. Heinze, B., et al., *Targeting CXCR4 (CXC Chemokine Receptor Type 4) for Molecular Imaging of Aldosterone-Producing Adenoma*. *Hypertension*, **2018**. 71(2): p. 317-325.
118. Yang, H., et al., *Bisoprolol reverses epinephrine-mediated inhibition of cell emigration through increases in the expression of  $\beta$ -arrestin 2 and CCR7 and PI3K phosphorylation, in dendritic cells loaded with cholesterol*. *Thromb Res*, **2013**. 131(3): p. 230-7.
119. Besedovsky, L., et al., *Cortisol increases CXCR4 expression but does not affect CD62L and CCR7 levels on specific T cell subsets in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2014**. 306(11): p. E1322-9.
120. Pranzatelli, M.R., et al., *CCR7 signaling in pediatric opsoclonus-myoclonus: upregulated serum CCL21 expression is steroid-responsive*. *Cytokine*, **2013**. 64(1): p. 331-6.
121. Bluemel, C., et al., *Investigating the Chemokine Receptor 4 as Potential Theranostic Target in Adrenocortical Cancer Patients*. *Clin Nucl Med*, **2017**. 42(1): p. e29-e34.

122. Irino, T., et al., *CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, **2014**. 14: p. 291.
123. Emmett, M.S., et al., *CCR7 mediates directed growth of melanomas towards lymphatics*. Microcirculation, **2011**. 18(3): p. 172-82.
124. Zhang, S., et al., *Lymphatic Metastasis of NSCLC Involves Chemotaxis Effects of Lymphatic Endothelial Cells through the CCR7-CCL21 Axis Modulated by TNF- $\alpha$* . Genes (Basel), **2020**. 11(11).
125. Strien, L., et al., *Different Expression Patterns of CXCR4, CCR7, Maspin and FOXP3 in Luminal Breast Cancers and Their Sentinel Node Metastases*. Anticancer Res, **2017**. 37(1): p. 175-182.
126. Hedrick, J.A. and A. Zlotnik, *Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines*. J Immunol, **1997**. 159(4): p. 1589-93.
127. Guo, J., et al., *Effect of CCR7, CXCR4 and VEGF-C on the lymph node metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncol Lett, **2013**. 5(5): p. 1572-1578.
128. Ma, H., et al., *CCR7 enhances TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and is associated with lymph node metastasis and poor overall survival in gastric cancer*. Oncotarget, **2015**. 6(27): p. 24348-60.
129. Li, X., et al., *High Expression of CCR7 Predicts Lymph Node Metastasis and Good Prognosis in Triple Negative Breast Cancer*. Cell Physiol Biochem, **2017**. 43(2): p. 531-539.
130. Chen, B., et al., *High CCR6/CCR7 expression and Foxp3+ Treg cell number are positively related to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, **2013**. 30(3): p. 1380-90.
131. Zhao, B., et al., *The chemotactic interaction between CCL21 and its receptor, CCR7, facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, **2011**. 18(6): p. 821-8.
132. Chen, Y., et al., *CC-chemokine receptor 7 is overexpressed and correlates with growth and metastasis in prostate cancer*. Tumour Biol, **2015**. 36(7): p. 5537-41.
133. Chi, B.J., et al., *Silencing of CCR7 inhibits the growth, invasion and migration of prostate cancer cells induced by VEGFC*. Int J Clin Exp Pathol, **2015**. 8(10): p. 12533-40.
134. Kwak, M.K., et al., *Expression of chemokine receptors in human gastric cancer*. Tumour Biol, **2005**. 26(2): p. 65-70.
135. Liu, Y., et al., *Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis*. J Exp Clin Cancer Res, **2010**. 29: p. 16.
136. Cassier, P.A., et al., *Prognostic value of the expression of C-Chemokine Receptor 6 and 7 and their ligands in non-metastatic breast cancer*. BMC Cancer, **2011**. 11: p. 213.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	ACA	<i>engl.</i> adrenocortical adenoma
ACC	<i>engl.</i> adrenocortical carcinoma	Ak	Antikörper
APA	aldosteronproduz. Adenom		
BCA Assay	Bicinchoninic acid Assay	bspw.	beispielsweise
		bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius	ca.	circa
CCL	CC-Chemokinligand	CCR	CC-Chemokinrezeptor
cDNA	komplementäre DNA	CI	Konfidenzintervall
cm	Centimeter	CPA	cortisolproduzierendes Adenom
Da	Dalton	DC	<i>engl.</i> dendritic cell
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	DTT	Dithiothreitol
EIA	endokrininaktives Adenom		
ENSAT	European Network for the Study of adrenal tumors		
etc.	<i>lat.</i> et cetera, und die übrigen	et al.	<i>lat.</i> et alii, und andere
g	Gramm		
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase		
h	Stunde	HCl	Chlorwasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	HR	Hazard Ratio (Risikoquotient)
HRP	horseradish, Meerrettichperoxidase		
IGF-1/2	Insulin-like Growth Factor ½	IQR	<i>eng.</i> interquartile range
kDa	Kilodalton	kg	Kilogramm
L	Liter	lat.	Lateinisch
Lk	Lymphknoten		
M0	keine Fernmetastasen	M1	Fernmetastasen vorhanden
mA	Milliampere	MeOH	Methanol
mg	Milligramm	min	Minuten
ml	Milliliter	mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA	µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter	µm	Mikrometer
N0	keine Lymphknotenmetastasen	N1	Lymphknotenmetas. vorhanden
NaCl	Natriumchlorid	NaOH	Natriumhydroxid
nNN	normale Nebenniere	NSCLC	<i>engl.</i> Non-small cell lung cancer
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	PBS	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	PVDF	Polyvinylidenfluorid

qPCR real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

---

RIPA Buffer *engl.* Radioimmunoprecipitation assay buffer

---

RNA Ribonukleinsäure RNAse Ribonuklease

Rpm Umdrehung pro Minute (Zentrifuge) RT Raumtemperatur

---

s Sekunde s. siehe

S. Seite SD Standardabweichung

SDS Natriumlaurylsulfat SEM Standardfehler

s.u. siehe unten

---

TBS(T) Tris-buffered saline with Tween20 TRIS Trisaminomethan

---

u.a. unter anderem üN über Nacht

usw. und so weiter u.v.m. und viele mehr

---

V Volt v.a. vor allem

vgl. vergleiche

---

WHO Weltgesundheitsorganisation

---

z. B. zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Histopathologische Verteilung von Inzidentalomen .....	3
Abbildung 2:	Therapiealgorithmus bei resezierbaren Nebennierenkarzinomen.....	9
Abbildung 3:	CCR7-Signalkaskaden in dendritischen Zellen.....	13
Abbildung 4:	cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase.....	24
Abbildung 5:	Aufbau des <i>Western Blots</i> in der Blotting Apparatur.....	27
Abbildung 6:	Färbeintensitäten der Membran .....	31
Abbildung 7:	Färbeintensitäten des Zytoplasmas.....	31
Abbildung 8:	Immunhistochemische Positiv- und Negativkontrolle.....	33
Abbildung 9:	Proteinbiochemische Positiv- und Negativkontrolle .....	34
Abbildung 10:	Funktionskontrolle des Ak durch methodischen Vergleich .....	35
Abbildung 11:	CC-Chemokinrezeptoren in der normalen Nebenniere .....	36
Abbildung 12:	CCR7-Expression in der normalen Nebenniere .....	37
Abbildung 13:	CCR7-Expression in Adenomen der Nebenniere.....	38
Abbildung 14:	CCR7-H-Scores in ACA und ACC .....	39
Abbildung 15:	CC-Chemokinrezeptoren im Nebennierenkarzinom.....	40
Abbildung 16:	CCR7-Expression im Nebennierenkarzinom.....	40
Abbildung 17:	CCR7-H-Scores im ACC und ACC-Metastasen.....	42
Abbildung 18:	Krankheitsspezifisches Überleben mit CCR7 in der Membran.....	46
Abbildung 19:	Krankheitsspezifisches Überleben mit CCR7 im Zytoplasma.....	47
Abbildung 20:	Progressionsfreies Überleben mit CCR7 in der Membran.....	48
Abbildung 21:	Progressionsfreies Überleben mit CCR7 im Zytoplasma .....	49
Abbildung 22:	CCR7-Expression verknüpft mit der Tumorprogression im ACC.....	50
Abbildung 23:	Fernmetastasierung und Lymphknotenmetastasierung.....	52
Abbildung 24:	Lymphknotenmetastasen bei Diagnose und Follow-Up .....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	ENSAT-Stadieneinteilung des Nebennierenkarzinoms .....	7
Tabelle 2:	Übersicht untersuchtes Gewebe .....	17
Tabelle 3:	Charakteristika der Patientenkohorte .....	18
Tabelle 4:	Verwendete Zelllinie .....	19
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper .....	19
Tabelle 6:	Verwendete Primer .....	19
Tabelle 7:	Verwendete Kits .....	20
Tabelle 8:	Verwendete Geräte.....	20
Tabelle 9:	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 10:	Verwendete Lösungen und Puffer.....	22
Tabelle 11:	Verwendetes PCR-Programm .....	26
Tabelle 12:	Protokoll Immundetektion .....	28
Tabelle 13:	H-Score-Verteilung im Nebennierenkarzinom .....	41
Tabelle 14:	CCR7-Expression und klinische bzw. histopathologische Faktoren .....	44
Tabelle 15:	CCR7-Expression des Primärtumors und Metastasierung .....	51

## **Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt Prof. Martin Fassnacht, der sich meiner Promotion angenommen hat und ich diese dank seiner klaren und gewinnbringenden Anleitung erfolgreich abschließen konnte.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Stefanie Hahner, die mir ermöglichte, eine Doktorarbeit im Fachgebiet der Endokrinologie zu beginnen.

Danke auch an das Team um Dr. Heinze und Dr. Ronchi im endokrinologischen Forschungslabor, vor allem Katja Marienfeld und Ursula Sauer, ohne die ich viele Stunden mehr dort verbracht hätte. In den Tiefen des ENSAT-Registers konnte ich mich auf die Unterstützung von Michaela Haaf verlassen – vielen Dank!

Mein größter Dank geht an meine Familie. Dank eurer bedingungslosen Unterstützung konnte ich diesen Weg gehen. Oft wiederholt und so wahr:

„Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken, verstehst du?“ (Beppo Straßenkehrer aus: „Momo“ von Michael Ende)