

Aus dem Lehrstuhl für Endokrinologie und Diabetologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. M. Fassnacht

**Individualisierte Chemotherapie mit Streptozotocin  
beim Nebennierenrindenzarzinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Alfred Maukner  
aus Bad Mergentheim

Würzburg, Februar 2023

Referent: PD Dr. rer. nat. S. Sbiera  
Koreferent: Prof. Dr. med. N. Schlegel  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2023

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Die Nebenniere</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Nebennierentumore</b> .....	<b>3</b>
1.2.1.	Adrenales Inzidentalom.....	3
1.2.2.	Hormonsezernierende Adenome der Nebennierenrinde.....	7
1.2.2.1.	Das Aldosteron-produzierende Adenom.....	8
1.2.2.2.	Das Cortisol-produzierende Adenom.....	9
1.2.3.	Das adrenokortikale Karzinom .....	11
<b>1.3.</b>	<b>Diagnostik des ACC</b> .....	<b>14</b>
1.3.1.	Bildgebende Verfahren .....	14
1.3.2.	Hormonelle Diagnostik.....	16
1.3.3.	Histopathologie und Tumorklassifikation.....	17
<b>1.4.</b>	<b>Therapie des ACCs</b> .....	<b>19</b>
1.4.1.	Operative Therapie .....	19
1.4.2.	Medikamentöse Therapie.....	20
1.4.2.1.	Adrenostatische /-lytische Therapie.....	21
1.4.2.2.	Zytostatische Therapie .....	23
1.4.2.3.	Symptomatische Therapie.....	24
<b>1.5.</b>	<b>FIRM-ACT Studie</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6.</b>	<b>Streptozotocin [STZ]</b> .....	<b>28</b>
<b>1.7.</b>	<b>Glucose Transporter-2 [GLUT-2]</b> .....	<b>29</b>
<b>1.8.</b>	<b>O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT]</b> .....	<b>30</b>
<b>1.9.</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
2.1.	Patientendaten .....	35
2.2.	Material .....	37
2.3.	Herstellung der Schnittpräparate .....	39
2.4.	Hämatoxylin-Eosin [HE] Färbung .....	40
2.5.	DNA-Isolierung aus FFPE Gewebe .....	41
2.6.	Spektroskopische Kontrolle DNA.....	43
2.7.	Citratpuffer .....	44
2.8.	Immunhistochemische Färbung GLUT 2 .....	44
2.9.	Auswertung Immunhistochemische GLUT 2 Färbung.....	45

2.10.	<b>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.....</b>	<b>47</b>
2.11.	<b>Kapillargelelektrophorese .....</b>	<b>48</b>
2.12.	<b>Elektropherogramm / MLPA-Auswertung .....</b>	<b>49</b>
2.12.1.	Untersuchte Reparaturmechanismen.....	49
2.13.	<b>Datenerhebung und statistische Berechnung.....</b>	<b>52</b>
3.	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
3.1.	<b>Kohorten Daten .....</b>	<b>54</b>
3.2.	<b>GLUT-2 Expression.....</b>	<b>56</b>
3.3.	<b>Methylierungsstatus .....</b>	<b>60</b>
4.	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
4.1.	<b>Daten und Versuchsaufbau: .....</b>	<b>66</b>
4.2.	<b>GLUT-2 Expression als Voraussetzung .....</b>	<b>67</b>
4.3.	<b>Ergebnisse der MLPA .....</b>	<b>69</b>
4.4.	<b>Ausblick.....</b>	<b>74</b>
4.5.	<b>Stärken und Schwächen.....</b>	<b>78</b>
5.	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
6.	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>

## **Appendix**

- I. Abkürzungsverzeichnis**
- II. Abbildungsverzeichnis**
- III. Tabellenverzeichnis und MGMT Datentabelle**
- IV. Danksagung**
- V. Lebenslauf**



# Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig angelegte endokrine Drüsen. Sie befinden sich retroperitoneal und sitzen dem Oberpol der Nieren auf. Niere und Nebenniere sind von einer gemeinsamen Kapsel umgeben (s. Abb. 1).

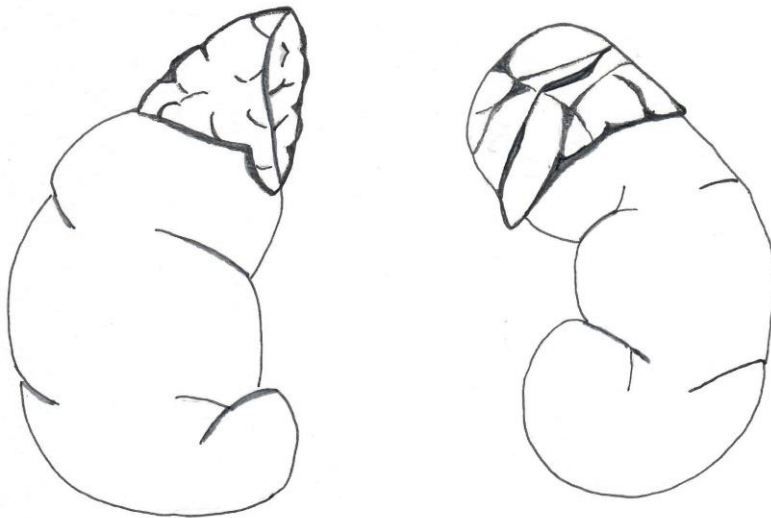


Abbildung 1 Selbsterstellte Zeichnung der Nebennierenanatomie modifiziert nach F. Paulsen u. J. Waschke [1]

Anatomisch lässt sich die Nebenniere in ein Nebennierenmark [NNM] und eine Nebennierenrinde [NNR] einteilen [2]. Beide Anteile haben einen unterschiedlichen Ursprung während der embryonalen Entwicklung.

Das Mark entwickelt sich aus Sympathikoblasten, welche aus der Neuralleiste (Neuroektoderm) einwandern. Dadurch entsprechen die Markzellen modifizierten sympathischen Ganglienzellen, die Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin) produzieren. Aus dem Mesoderm entwickelt sich die NNR, welche sich in

## Einleitung

drei Zonen unterteilen lässt [3-6]. Direkt unter der Kapsel von außen betrachtet (s. Abb. 2) befindet sich eine schmale Schicht, die Zona glomerulosa. Dort werden vor allem Mineralkortikoide wie Aldosteron hergestellt [3]. Reguliert wird die Freisetzung durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Aldosteron bewirkt in der Niere eine vermehrte Rückresorption von Natrium sowie eine vermehrte Kaliumausscheidung und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und des Elektrolythaushaltes.

An die Zona glomerulosa angrenzend befindet sich die Zona fasciculata, welche den größten Teil der Rinde einnimmt. Kennzeichnend für die Zellen der Zona fasciculata sind die reichlichen Lipidtröpfchen im Zytoplasma [3]. Diese werden für die Synthese von Glukokortikoiden wie Cortisol benötigt. Die Freisetzung folgt einem zirkadianen Rhythmus mit Höhepunkt in den Morgenstunden. Kontrolliert wird die Freisetzung dabei über Steuerhormone des Hypothalamus und der Hypophyse durch die kortikotrope Achse.

Die Zona reticularis liegt dem Mark direkt an. Sie sezerniert Androgen-Vorstufen wie Dehydroepiandrosteron [DHEA], Dehydroepiandrosteron-Sulfat [DHEA-S] und Androstendion, welche in anderen Geweben zu Sexualhormonen weiterverarbeitet werden [7].



## Einleitung

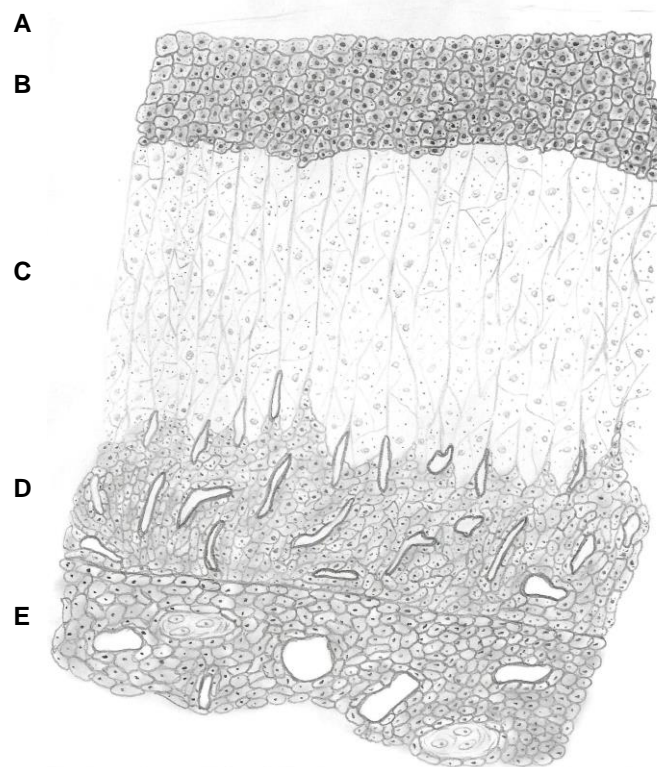


Abbildung 2 Selbsterstellte Zeichnung der Histologie der Nebenniere, A: Kapsel, B: Zona glomerulosa, C: Zona fasciculata, D: Zona reticularis und E: Nebennierenmark. Modifiziert nach [8]

### 1.2. Nebennierentumore

#### 1.2.1. Adrenales Inzidentalom

In ungefähr 3 % der durchgeführten Autopsiestudien konnten Raumforderungen bei verstorbenen Patienten (Alter > 50 Jahre) in der Nebenniere entdeckt werden. Die Prävalenz steigt mit dem Lebensalter und beträgt ab 70 Jahren 7 % [9, 10].

Seit der Einführung moderner bildgebender Verfahren wie Computertomographie [CT] und Magnetresonanztomographie [MRT] steigt die Anzahl zufällig

## Einleitung

entdeckter Raumforderungen der Nebennieren an und beträgt beispielsweise ca. 5 % bei durchgeführten CTs, welche nicht primär die Nebennieren untersuchen sollten. Diese werden auch als adrenale Inzidentalome bezeichnet [11]. Adrenale Inzidentalome können mittels CT, MRT oder Ultraschall festgestellt werden.

Zum Zeitpunkt der Durchführung bestehen keinerlei klinische Hinweise auf eine Erkrankung der Nebennieren [12-14]. Oft handelt es sich dabei um endokrin inaktive Adenome der Nebennierenrinde, sofern Patienten nicht primär an einem anderen Tumorleiden erkrankt sind. Generell können sich Raumforderungen aus dem Gewebe der Nebennierenrinde (Tabelle 1) und des Markes (Tabelle 2) entwickeln oder auch durch andere Umstände entstehen (Tabelle 3).

*Tabelle 1 Raumforderungen der NNR*

<b>Nebennierenrinde</b>	
Hormonaktives Adenom	Conn-Adenom (Aldosteron)
	Cushing-Adenom (Cortisol)
	Androgen produzierendes Adenom
Noduläre Hyperplasie	
Hormoninaktives Adenom	
Nebennierenrindenkarzinom	

*Tabelle 2 Raumforderungen des NNM*

<b>Nebennierenmark</b>
Phäochromozytom
Myelolipom
Ganglioneurom

## Einleitung

Tabelle 3 Sonstige Raumforderungen der Nebenniere

<b>Andere Raumforderungen</b>	
Maligne	Metastasen
	Lymphom
	Neuroblastom
Benigne	Lipom
	Angiomyolipom
	Fibrom
	Zysten
	Entzündliche Infiltrate
	Granulome

Bei Patienten mit bekannter Tumorerkrankung wie Lungen-, Brust- und gastrointestinalen Karzinomen finden sich häufig Metastasen in der Nebenniere [15, 16]. In einer 30-jährigen Studie (Lam et al.) im Zeitraum von 1971 bis 2000 konnten insgesamt 464 Patienten mit Metastasen in der Nebenniere eingeschlossen werden. Dabei erfolgte die histologische Untersuchung mittels postmortalen Autopsien (n = 435), anhand von Adrenalektomie-Präparaten (n = 21) und (n = 8) Feinnadelaspirationen. Unter den erkrankten Patienten war der Primarius in Lunge (n = 149), Magen (n = 60), Ösophagus (n = 51), Leber/Gallengängen (n = 45), Pankreas (n = 29), Kolon (n = 23), Niere (n = 18) oder Brust (n = 12) lokalisiert bzw. handelte es sich um hämatologische Neoplasien (n = 33) und maligne Melanome (n = 3). Von den Patienten zeigten lediglich 4,3 % (n = 20) klinische Symptome, die mit einer Raumforderung der Nebenniere in Verbindung standen. Bei 25 % der Fälle (n = 5) präsentierte sich ein Morbus Addison (Primäre Nebenniereninsuffizienz). Bei den symptomatischen Patienten konnten 65 % (n = 13) der Nebennierenraumforderungen schon mittels radiologischen Untersuchungen dargestellt werden [17].

## Einleitung

Wie von Fassnacht *et al.* [18] beschrieben und im Jahr 2022 aktualisiert [19], ist es sinnvoll, beim Vorhandensein eines Inzidentalomes eine systematische Diagnostik durchzuführen. Da je nach Ursache des Tumors ein Beobachtendes Abwarten bis hin zu einer Adrenaektomie erforderlich sein kann. Dazu ist es wichtig, die Raumforderung zu charakterisieren. Liegen klinische Hinweise auf einen Hormonexzess (Cortisol, Aldosteron, Androgene) vor, ist eine hormonelle Diagnostik mit Bestimmung der diagnostischen Paare wie Cortisol und Adrenocorticotropes Hormon oder Aldosteron und Renin erforderlich. Subklinische Hormonsekretionen, welche klinisch initial inapparent verlaufen können, sind ebenfalls zu beachten.

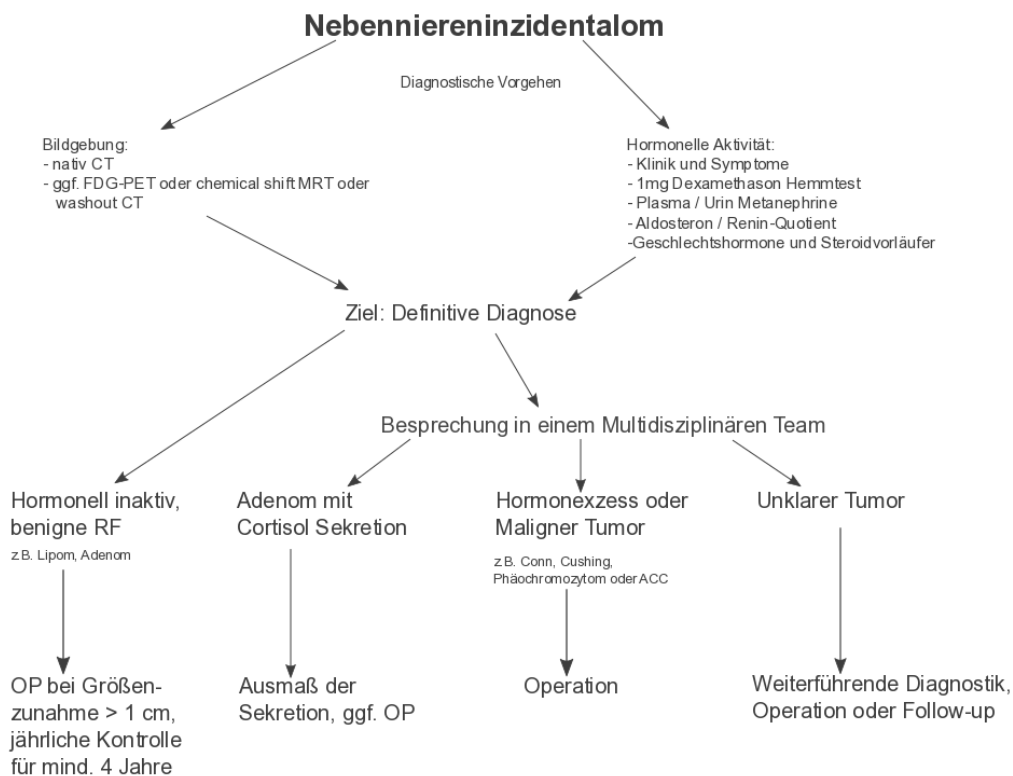


Abbildung 3 Vorgehen Nebenniereninzidentalom modifiziert nach Fassnacht *et al.* [18, 20], RF [Raumforderung, OP [Operation].

## Einleitung

Erste Hinweise zur Dignität kann ein Nativ-CT liefern. Ein Großteil der Adenome sind im Nativ-CT klein ( $< 2$  cm), gut und scharf abgegrenzt sowie größenkonstant abbildbar [21-23]. Eine mittlere Dichte des Nebennierentumors von  $< 10$  Hounsfield Units [HU] ist hochspezifisch für das Vorliegen eines Adenoms. Dies liegt an der großen Menge intrazytoplasmatischer Lipide, denn je nach Lipidanteil ist die Dichte der Raumforderung im Vergleich zu Weichteilgewebe, welches kein Fett enthält, verringert [24].

10 % bis 40 % der Adenome weisen eine mittlere Dichte von  $> 10$  HU auf [25, 26]. Untypisch für benigne Raumforderungen sind Nekrosen, Einblutungen und Kalzifizierungen [27]. Auch invasives Wachstum, heterogene Erscheinung und eine Größe über 6 cm sind hinweisend für eine Malignität [28, 29]. Sollte ein Nativ-CT nicht ausreichend Informationen liefern, können Adenome auch hinsichtlich ihrer Eigenschaft des Kontrastmittelverhaltens untersucht werden. So geben lipidarme als auch lipidreiche Adenome Kontrastmittel schneller ab als normales Nebennierenrindengewebe oder nicht hypervaskularisierte Tumore. Dies wird als sogenanntes „wash-out“ bezeichnet [30]. Adenome der Nebenniere zeigen im Verlauf kein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung [31]. Bei Größenzunahme besteht jedoch das Risiko einer Schmerzentstehung sowie ein erhöhtes Risiko für das Eintreten von retroperitonealen Blutungen.

### 1.2.2. Hormonsezernierende Adenome der Nebennierenrinde

Die hormonsezernierenden Adenome der Nebennierenrinde zeichnen sich durch eine unphysiologische Sekretion von Hormonen aus.

Dadurch werden sie meist symptomatisch durch die entsprechende Freisetzung der Hormone. Mit bis zu 13 % ist der Primäre Hyperaldosteronismus eine der häufigsten Ursachen für einen sekundären Hypertonus [32]. Wohingegen 7 % bis 10 % der adrenalen Cushing Syndrome durch Adenome verursacht werden [33].

## Einleitung

### 1.2.2.1. Das Aldosteron-produzierende Adenom

Das Conn-Adenom (auch Aldosteronom) zeichnet sich durch eine autonome Sekretion von Aldosteron aus (Primärer Hyperaldosteronismus). Benannt wurde das Adenom nach seinem Erstbeschreiber Jerome W. Conn durch seine Arbeit „Primary aldosteronism, a new clinical syndrome“ aus dem Jahr 1955 [34].

Damit verbunden ist ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Mortalität, vor allem in westlichen Ländern.

43 % – 52 % der Patienten mit einem Mineralkortikoidexzess leiden an einem Aldosteron produzierenden Adenom [35, 36]. Dieser Exzess führt jedoch bei weniger als einem Drittel der Patienten zur klassischen klinischen Trias: Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose. Weitere Symptome sind Muskelschwäche, Obstipation, EKG-Veränderungen, Polyurie und Polydipsie.

Der Verdacht auf ein Conn-Syndrom sollte bei Patienten mit Hypokaliämie und Hypertonie sowie bei Patienten mit einem schwer medikamentös einstellbaren Hypertonus oder dem Befund einer Nebennierenraumforderung genauer abgeklärt werden. Zur Diagnostik und als Screeningverfahren hat sich die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten aus Patientenblut etabliert. Jedoch muss beachtet werden, dass zahlreiche Medikamente die Sekretion und damit auch den Aldosteron-Renin-Quotienten beeinflussen können. Darunter fallen vor allem ACE-Hemmer, Sartane und Aldosteronantagonisten, aber auch Beta-blocker und Diuretika müssen rechtzeitig vor einer Bestimmung pausiert werden. Bei einem erhöhten Quotienten sollte ein Bestätigungstest mittels Kochsalzbelastungstest oder Fludrocortison-Hemmtest durchgeführt werden. Zusätzlich sollte ein Nativ-CT oder MRT des Abdomens erfolgen [37].

Ist nur eine Nebenniere für die autonome Sekretion von Aldosteron verantwortlich, kann eine Adrenalektomie als kurativer Therapieansatz des Primären Hyperaldosteronismus und der arteriellen Hypertonie durchgeführt werden [38]. Mit Hilfe bildgebender Verfahren lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf eine abnorme Sekretion von Aldosteron ermitteln. Für diesen Fall bietet sich die selektive Blutentnahme mittels Nebennierenvenenkatheter an [39]. Hierdurch

## Einleitung

kann bei eindeutigen Ergebnissen festgestellt werden, welche der beiden Nebennieren für die autonome Sekretion verantwortlich ist und anschließend eine gezielte Adrenalectomie durchgeführt werden. Als konservative Therapie bietet sich eine medikamentöse Aldosteron-Blockade an, um den Exzess an Aldosteron symptomatisch zu behandeln.

### 1.2.2.2. Das Cortisol-produzierende Adenom

Durch die autonome Funktion des Adenoms sind Corticotropin-Releasing Hormon [CRH] und Adrenocorticotropes Hormon [ACTH] supprimiert. Der Cortisol-Sekretion liegt keine Stimulation mehr über die kortikotrope Achse zu Grunde. Bei einem klassischen Cortisol-Exzess kommt es bei den Patienten zu der Entwicklung von Cushing typischen Stigmata (Vollmondgesicht, Stiernacken, Stammfettsucht, Steroidakne, Striae rubrae) und körperlichen Veränderungen (Adynamie, arterielle Hypertonie, diabetogene Stoffwechsellage, Osteoporose, Myopathie mit Muskelschwund) [37]. Diese Symptome sind nicht spezifisch und ermöglichen keine sichere Unterscheidung zwischen Übergewicht und Cortisol-Exzess. Dennoch sind Ekchymosen, Myopathie der proximalen stammnahen Muskulatur und Hypertension häufiger bei Patienten mit Hypercortisolismus anzutreffen [40].

Differentialdiagnostisch abzuklären ist ein exogenes/iatrogenes Cushing von den endogenen Formen, die sich in ACTH-abhängig oder -unabhängig unterteilen lassen. Das Cortisol-produzierende Adenom gehört dabei zu den ACTH-unabhängigen Formen (Primärer Hypercortisolismus). Im Durchschnitt zeigen sich ungefähr 8 % der adrenalen Inzidentalome durch eine Cortisolsekretion aus, die zum Großteil nicht zu den typischen Cushing-Stigmata führt, sondern zu einem subklinischen Cushing-Syndrom [41, 42]. Bei dieser (mögliche) autonome Cortisolsekretion (im englischen Sprachraum [MACS] mild au-

## Einleitung

tonomous cortisol secretion) steht nicht primär der Exzess an Glukokortikoiden im Vordergrund, sondern die gestörte physiologische Regulation [19]. Die sezernierten Mengen sind sehr variabel, aber nicht stark erhöht, sodass der Großteil der (mögliche) autonome erst durch eine fehlende Supprimierbarkeit im Dexamethason-Hemmtest auffällt [10]. Die unphysiologische Sekretion von Cortisol kann auch in geringen Mengen zu einem Zustand der Insulinresistenz als Vorstufe des metabolischen Syndroms führen. Nicht nur der Blutzuckerhaushalt wird durch Cortisol beeinflusst, sondern auch der Knochenstoffwechsel. So steigert die Erhöhung von Glukokortikoiden das Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose.

In einer Studie von Dennison *et al.* konnte gezeigt werden, dass endogenes Cortisol einen negativen Einfluss auf die spinale Knochendichte hat [43]. Hierzu wurden von gesunden Männern im Alter von 61 – 72 Jahren Cortisolprofile erstellt. Dabei wurden über 24 Stunden alle 20 Minuten venöse Blutproben entnommen und auf Cortisol hin untersucht. Das Ergebnis der Studie zeigt signifikant, dass das Sekretionsprofil von Cortisol einen Einfluss auf die Knochendichte hat und zu einem Trabekelverlust im späteren Leben führen kann. Dabei spielen Cortisolpeaks in der Sekretion eine geringere Rolle als die basale Cortisolsekretion. Aber auch das kardiovaskuläre Risiko ist erhöht.

Therapeutisch sollte bei einem eindeutigen Cushing eine operative Entfernung des Adenoms angestrebt werden, da dies einem kurativen Vorgehen entspricht. Bei den subklinischen Cushing-Syndromen kann ein konservatives Vorgehen in Betracht gezogen werden. Dennoch bringt auch hier ein operatives Vorgehen Vorteile mit sich. Sind zum Beispiel Hypertonus, Diabetes mellitus, Obesitas oder Hyperlipidämie durch die unphysiologische Sekretion von Cortisol verursacht, so kann nach Entfernen des Adenoms eine Besserung der Symptome bis hin zur Heilung erzielt werden [44].



## Einleitung

### 1.2.3. Das adrenokortikale Karzinom

Das adrenokortikale Karzinom [ACC] ist eine maligne Erkrankung der Nebennieren. Mit einer Inzidenz von 1 bis 2 Fällen auf 1 Million Menschen gehört es zu den seltenen Erkrankungen [10, 45, 46]. Dabei gibt es zwei altersbetrachtete Erkrankungsgipfel: der erste Häufigkeitsgipfel liegt im Kindesalter, der zweite im Bereich der vierten bis fünften Lebensdekade [47].

Frauen sind dabei 1,5-fach häufiger betroffen als Männer. Diese Daten gehen aus dem Deutschen Nebennieren-Karzinom-Register hervor [47].

Außerdem wurde eine örtliche Häufung in Südbrasilien berichtet. Hier ist vor allem die Inzidenz bei Kindern mit 3,2 bis 4,2 Erkrankungen auf 1 Million Kindern unter 15 Jahren erhöht. Ursache dafür ist die Häufung einer Keimbahn Tumorsuppressorgen-Mutation des Proteins p53 [48-50].

Einen eindeutigen molekularbiologischen Mechanismus für die Entstehung eines Nebennierenrinden-Karzinoms gibt es nicht. Vielmehr gehen eine Vielzahl von genetischen Erkrankungen mit einer erhöhten Inzidenz einher. Auch einige familiäre Tumorsyndrome zeigen eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit. So finden sich gehäuft bei Li-Fraumeni-Syndrom [LFS] und Beckwith-Wiedeman Syndrom [BWS] ACC Manifestationen im Kindesalter. Wohingegen Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 [MEN1], familiäre adenomatöse Polyposis Coli [FAP], Neurofibromatose Typ 1 oder DNA-Mismatch-Reparatur Proteinmutationen im Erwachsenenalter mit einem ACC einhergehen [51, 52].

Es bleibt dennoch festzuhalten, dass trotz erhöhtem Risiko im Rahmen erblicher Tumorsyndrome an einem ACC zu erkranken der Phänotyp der ACC Entwicklung generell von geringer Penetranz ist. So zeigen Patienten mit einem LFS eine Inzidenz von 6,5 % bis 9,9 % für die Erkrankung an einem ACC, häufiger noch erkranken Patienten mit einem LFS an Brustkrebs, Weichteilsarkome, Osteosarkome und Kolorektalkarzinome [52, 53]. Es wird geschätzt, dass ca. 7 % bis 20 % der TP53-Mutationen de novo entstehen. Die Mehrheit der im Erwachsenenalter entstandene ACC entsteht durch sporadische somatische

## Einleitung

Mutationen des TP 53 Gens oder IGF 2, aber auch der Tumor Suppressor Genen [54].

Die klinische Manifestation eines ACC ist häufig abhängig von der hormonellen Produktion [55]. Es werden hormonaktive Tumore in der Regel früher erkannt als hormonell inaktive Tumore. Hierbei führt eine exzessive Produktion an Glukokortikoiden zu einem Cushing-Syndrom mit den typischen Cushing Stigmata (Tabelle 4) [33]. Außerdem kommt es zu einer katabolen Stoffwechsellage. Die gesteigerte Proteolyse führt zu Muskelatrophie und fördert das Auftreten der Striae rubrae distensae. Die diabetogene Stoffwechsellage begünstigt die Entstehung eines steroidbedingten Diabetes.

Ein Exzess an Mineralkortikoiden führt zu einem therapierefraktären Hypertonus und selten zu einer Hypokaliämie [56].

*Tabelle 4 Klinik des Hypercortisolismus*

Metabolisch	Diabetogene Stoffwechsellage
	Stammfettsucht
	Stiernacken
	Verringerung Muskelmasse
	Mondgesicht
	Hypokaliämie
Knochen	Osteoporose
Kardiovaskulär	Arterieller Hypertonus
Endokrinologisch	Impotenz
	Akne
	Amenorrhoe
	Hirsutismus
Haut	Atrophie
	Hämatome
	Striae rubrae distensae

## Einleitung

	Wundheilungsstörung
Psyche	Depression bis Paranoia
	Ängstlichkeit

Zudem kann auch die Synthese von Sexualhormonen betroffen sein. Nicht selten sind ein Überschuss an Androgenen bei männlichen Patienten, ein Östrogenexzess bei Frauen oder generell ein Überschuss an Steroidvorstufen klinisch inapparent. Wohingegen ein Östrogenexzess bei Männern zu verminderter Libido, Gynäkomastie und Hodenatrophie führt. Ein Androgenexzess bei Frauen induziert ein Hirsutismus, Brustatrophie, Zyklusstörungen und ein tiefer werden der Stimme. Häufig liegt ein gemischter Hormonexzess mit dem Phänotyp bzw. mit Symptomen eines Cushings und Virilisierung oder seltener Conn Syndrom und Feminisierung vor [55].

Hormoninaktive ACCs werden meist erst spät auffällig, häufig sind erste Symptome Bauchschmerzen, Völlegefühl und Übelkeit. Diese Beschwerden werden durch Verdrängungseffekte oder Infiltrationen ausgelöst [45]. Die Prognose eines ACC ist sehr schlecht [57]. Ein kurativer Ansatz besteht nur in frühen Stadien, in denen eine R0-Resektion (vollständige Tumorentfernung) erzielt werden kann. Dabei spielen im Hinblick auf die Prognose der Erkrankung zahlreiche Faktoren eine relevante Rolle. So haben Alter, Tumorgröße, venöser Tumorthrombus und Ki67 einen prognostischen Einfluss. Je größer ein Tumor bei der Erstdiagnose ist, desto schlechter die Prognose. Zum einen haben größere Tumore meist ein schnelleres Wachstum, zum anderen ist die Wahrscheinlichkeit einer Infiltration von Blut-, Lymphgefäßen und Nachbarorgane sowie die Folge einer Metastasierung höher [58].

Der Ki67 ist ein Marker für die Proliferation. Es ist ein Protein, welches sich in der Interphase der Zellteilung im Zellkern befindet und sich während der Mitose an die Chromosomen lagert. In ruhenden Zellen fehlt hingegen das Protein

## Einleitung

Ki67. Deshalb eignet es sich als Marker, um den Anteil der wachstumsaktiven Zellen einer Zellpopulation zu bestimmen. So konnte in einer Arbeit von Beuschlein *et. al* gezeigt werden, dass der Ki67-Anteil einen prognostischen Einfluss hat, sogar bei R0 resezierten Tumoren [59]. Es konnten drei Grenzwerte für Ki67 ermittelt werden  $< 10 \%$ ,  $10 \% - 19 \%$  und  $> 20 \%$ . Je höher der gemessene Ki67-Anteil liegt, desto kürzer zeigte sich das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben. Somit kann bei Tumoren mit einem höheren Ki67 von einer schlechteren Prognose ausgegangen werden.

### 1.3. Diagnostik des ACC

Zur Diagnostik und Kategorisierung des ACC haben sich in der klinischen Praxis Algorithmen, um das ACC gut zu kategorisieren etabliert. Wichtig sind hierbei vor allem bildgebende Verfahren, aber auch die Hormondiagnostik stellt einen relevanten Baustein dar. Zudem ist eine histologische Untersuchung nötig, um weitere prognostische Faktoren, Infiltration und Gewebsursprung eindeutig zu bestimmen.

#### 1.3.1. Bildgebende Verfahren

Mittels bildgebender Verfahren lassen sich schnell erste Hinweise auf eine mögliche Malignität gewinnen. So deutet eine Raumforderung mit einer Größe von  $> 6 \text{ cm}$  und schlechte Abgrenzbarkeit von Nachbargewebe eher auf einen malignen Prozess hin [28, 29]. Heutzutage ist eine Ultraschalluntersuchung einfach umzusetzen, erfordert jedoch entsprechende Erfahrung, um untersucherabhängige Ergebnisse zu erhalten. Eindeutigere Erkenntnisse lassen sich mittels Schnittbildgebung wie CT oder MRT erheben. Bei CT-Aufnahmen zei-

## Einleitung

gen sich ACCs meist als vergrößerte Raumforderungen von inhomogener Struktur mit Nekrosen, Einblutungen und Kalzifizierungen. Kleine ACCs können in Nativ-CTs jedoch homogen erscheinen [60, 61]. ACC verdächtige Nebennieren haben in der Regel Raumforderungen mit einer Dichte von  $> 10$  HU im Nativ-CT. Im MRT lassen sich die Nebennieren besser von umgebenden Strukturen und Nachbarorganen, insbesondere von Leber, Magen, Milz und Niere, abgrenzen. Im Vergleich zum Leberparenchym sind ACCs meist in T1 gewichteten Bildern hypointens und in T2 gewichteten Aufnahmen hyperintens. Ein inhomogenes Bild kann auch in MR-Bildern durch das Vorhandensein von Einblutungen, Nekrosen und Kalzifizierungen verursacht werden.

Eine funktionelle Bildgebung wäre die  $^{18}$ Fluorodeoxyglucose [FDG]-PET Bildgebung.  $^{18}$ Fluorodeoxyglucose-Tracer ist ein Glukose-Analoga, welcher ähnlich wie Glukose in die Zellen aufgenommen wird [62]. Dabei kann der Glukosebedarf einer Zelle und damit die metabolische Aktivität dargestellt werden. Hierbei lassen sich Erkenntnisse über eine abnorme Steigerung des Zellstoffwechsels (charakteristisch für die meisten Tumorgewebe) im Vergleich zur gesunden Nebenniere gewinnen. Jedoch hat FDG als Tracer nur eine geringe Spezifität und wird auch in entzündeten Geweben, dem Gehirn und in generell stoffwechselaktivem Gewebe angereichert [63].

FDG-PET-Aufnahmen werden vor allem zur Staging-Untersuchung bei der Suche nach Fernmetastasen und Lymphknotendiagnostik eingesetzt.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, mit spezifischen Radiotracern zu arbeiten. Ein Beispiel ist [  $^{123}$ I ]IMTO ] [  $^{123}$ Iod]-Iodometomidate, ein Radiotracer zur Darstellung von adrenalem Gewebe mittels Szintigraphie. So konnte Hahner *et al.* [64] zeigen, dass man mit Hilfe von IMTO die Cyp 11 B1 (11 Beta-Hydroxylase) und B2 (Aldosteronsynthase) spezifisch blockieren kann. Beides sind Mitglieder der Cytochrom P450 Familie und spielen durch die Steroidhormonproduktion eine relevante Rolle im Gewebe. Durch die rasche Anreicherung an Cyp11B1 und B2 im Gewebe lässt sich Gewebe adrenalen Ursprungs sehr spezifisch darstellen. Hahner *et al.* konnte auch schon in vivo IMTO Bildgebungen durch-

## Einleitung

führen, um ACC-Gewebe in Patienten darzustellen. Zusätzlich bieten ACCs mit einer ausreichend hohen und langen Speicherung von IMTO die Möglichkeit einer Radiojodtherapie, wenn das Radioiodisotop  $^{123}\text{I}$  durch  $^{131}\text{I}$  ersetzt wird.

### 1.3.2. Hormonelle Diagnostik

Die Bestimmung des Hormonstatus ist ein elementarer Bestandteil in der Diagnostik und Abklärung eines ACC, da hormonproduzierende ACCs zahlreiche Folgen bedingen wie Bluthochdruck, diabetogene Stoffwechsellage und Immunsuppression durch Cortisolexzess [19]. Wichtig sind hierbei die Bestimmung von Cortisol, Aldosteron, Sexualhormonen, DHEA und DHEA-S. Zur Abgrenzung eines Phäochromozytoms sollten zudem differentialdiagnostisch Metanephrine und Normetanephrine bestimmt werden. Das Phäochromozytom geht zu 90 % aus dem Gewebe des Nebennierenmarkes hervor, kann allerdings auch in den sympathischen Paraganglien entstehen. Ca. 10 % aller Phäochromozytome sind maligne [65, 66]. Der Großteil sind gutartige Adenome mit hormoneller Aktivität. Meist erfolgt dabei eine Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin (seltener Dopamin). Klinisch äußert sich die Katecholaminwirkung vor allem durch Hypertonie, Tachykardie, Palpitationen und Hyperglykämie. Hormonell inaktive benigne Raumforderungen des Nebennierenmarkes sind das Ganglioneurom und Myelolipom.

Wichtig beim Verdacht auf ACC ist vor allem die Cortisolbestimmung [57]. Aufgrund einer möglichen autonomen Produktion wird die gesunde Nebenniere vollständig supprimiert und es besteht demnach ein erhöhtes Risiko, dass bei vollständiger Entfernung des cortisolproduzierenden ACCs eine Addison-Krise ausgelöst wird, mitunter auch mit lebensbedrohlichem Verlauf. Eine postoperativ erforderliche Substitution von Hydrocortison kann folglich erforderlich sein [19]. Bei der Nachsorge dient ein Hormonexzesses auch als potenzieller Tu-

## Einleitung

mormarker, um ein Rezidiv des hormonproduzierenden ACCs frühzeitig zu detektieren, aber auch weitere Kontrollen und Untersuchungen sind sinnvoll und werden in Internationalen Registern erfasst [47].

### 1.3.3. Histopathologie und Tumorklassifikation

Wichtig für die genaue Differenzierung ist die histopathologische Untersuchung. Hierbei wird von einer Biopsie eher Abstand genommen, da die Gefahr von Impfmetastasen nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Zudem ist nicht gewährleistet, dass aussagekräftige Areale in den Biopsien enthalten sind. Die pathologische Aufarbeitung erfolgt deshalb anhand des operativ entfernten Tumors oder Probematerialies [57]. Bei einem angestrebten kurativen Ansatz ist dabei die vollständige Entfernung (R0) des ACCs ausschlaggebend. Dabei werden die Resektionsränder des Präparates hinsichtlich eines ausreichenden Sicherheitsabstandes (> 10 mm) zum gesunden Gewebe hin und auch die Infiltration von Nachbarstrukturen sowie Lymphknoten untersucht. Nur bei vollständiger Tumorentfernung kann eine R0-Resektion erzielt werden [67].

Die histologische Untersuchung erfolgt primär mittels Lichtmikroskopie. Dabei wird das Präparat gezielt nach neun morphologischen Charakteristika hin untersucht (Weiss Score System): Eosinophilie des Zytoplasmas in mehr als 75 % der Tumorzellen, diffuse Zellarchitektur, Nekrosen, Atypien von Zellkern und atypische Mitosen, Mitoseindex über 5 Mitosen auf 50 Hauptgesichtsfelder, venöse Infiltration, sinusoidaler Einbruch oder Kapselinfiltration [68]. Für jedes der zutreffenden Charakteristika wird ein Punkt vergeben: 1-3 Punkte sprechen für ein eher benigne und  $\geq 4$  Punkte für einen malignen Tumor.

Zusätzlich werden noch weitere Untersuchungen empfohlen, die Hinweise auf die Prognose bzw. Entstehung geben können, wie z. B. die Bestimmung des

## Einleitung

Ki67-Index. Eine Untersuchung des Steroidogenic Factor-1 [SF-1] erlaubt zudem den Rückschluss auf eine Abstammung aus steroidbildendem Gewebe, wie z. B. ein adrenaler Ursprung. Eine starke SF-1 Expression ist auch assoziiert mit einem signifikant schlechteren Outcome [69].

Die Einteilung des Tumors erfolgt nach der ENSAT-Klassifikation in vier Stadien. Dies erlaubt eine erste Abschätzung des weiteren Verlaufs, des Voranschreitens der Erkrankung sowie einer Prognose. Wichtige Parameter der ENSAT-Klassifikation sind Größe des Tumors, Infiltration von Nachbargewebe, befallene Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen (Tabelle 5). So konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieser Klassifikation die 5-Jahres-Überlebensrate besser eingeschätzt werden konnte als es bis dato unter geläufigen Klassifikationen möglich war [70]. Die Klassifikation bestimmt das Therapieregime und auf das weitere Vorgehen zur Behandlung des ACCs.

*Tabelle 5 ENSAT Klassifikation*

Stadium	
I	T <sub>1</sub> : Tumorgröße < 5 cm
II	T <sub>2</sub> : Tumorgröße > 5 cm
III	T <sub>3</sub> : Infiltration ins Nachbargewebe
	T <sub>4</sub> : Infiltration in Nachbarorgane oder Tumorthrombus in V. renalis oder V. cava
	N <sub>1</sub> : positive Lymphknoten
IV	M <sub>1</sub> : Fernmetastasen



## Einleitung

### 1.4. Therapie des ACCs

#### 1.4.1. Operative Therapie

Empfehlungen zum operativen Vorgehen und Verfahren werden in der S2k Leitlinie (= konsensbasierte Leitlinie) festgehalten, welche aktuell aktualisiert werden [71].

Die operative Therapie wird vor allem in den ENSAT-Stadien I bis III angestrebt. Hierbei ist eine R0-Resektion bzw. die vollständige Tumorentfernung das operative Ziel und der einzige kurative Therapieansatz. Zudem hat eine R0-Resektion einen großen Einfluss auf ein mögliches Rezidiv. Unvollständig entfernte Tumore führen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu einem früheren Rezidiv und haben nachteilige Auswirkungen auf das Gesamtüberleben [72].

Generell kann beim operativen Vorgehen zwischen einer minimal-invasiven Methode mittels Laparoskopie und einer offenen Methode unterschieden werden. Die operative Entfernung möglicher Fernmetastasen muss individuell anhand der Gesamtsituation evaluiert werden.

Ein Vorteil eines minimal-invasiven Eingriffes ist die kleinere Wundfläche und damit verbunden eine schnellere Wundheilung sowie ein kürzerer Krankenhausaufenthalt im Vergleich zu einer offenen OP. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass eine großflächige Exploration des Situs erschwert ist. In verschiedenen Studien wurden beide Methoden miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind jedoch teilweise widersprüchlich. In der Arbeit von Brix *et al.* wurde die Entfernung lokal begrenzter ACCs mit einer Größe unter 10 cm mit beiden Methoden verglichen [73]. Hierbei gab es keinen relevanten Unterschied im Ergebnis der Patienten bezüglich des rezidivfreien Überlebens und perioperativen Komplikationen wie Tumorkapselbruch und peritonealer Aussaat. Beide Methoden sind demnach als gleichwertig zu betrachten und bedürfen einer entsprechenden Erfahrung von Seiten des Operateurs in spezialisierten Zentren.

## Einleitung

Die offene Adrenalektomie bei ACC gilt jedoch dennoch als Goldstandard, zumal eine radikale Tumorentfernung angestrebt wird. Eine umfangreiche Mitentfernung möglicher befallener Lymphknoten bzw. Lymphknotenstationen zur Komplettierung des Tumorstaging wird dadurch ermöglicht. Dies verbessert darüber hinaus auch die onkologische Prognose [74]. Die beste Prognose haben dabei lokal begrenzte Tumore, die mittels einer En-bloc-Resektion (R0) unter ggf. Mitnahme von Niere und Milz entfernt wurden (kurativer Therapieansatz) [72].

### 1.4.2. Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie des ACCs gestaltet sich insgesamt als kompliziert. Eine alleinige medikamentöse Heilung kann nicht erzielt werden. Primäres Ziel ist vielmehr, ein Voranschreiten des Tumors zu unterbinden bzw. zu verhindern. Unterteilt wird die medikamentöse Therapie in drei Kategorien bzw. Prinzipien: eine adrenostatische /-lytische, eine zytostatische und eine symptomatische Therapie. Es gibt eine europäische Leitlinie zum Nebennierenkarzinom in der die jeweiligen Therapieempfehlungen und Diagnostik aufgeführt sind: „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“ von M. Fassnacht *et al.* [57]. Ebenfalls vom gleichen Autor existiert auf internationaler Ebene die ESMO-Guideline „Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up“ [75].

Bei einem Rezidiv oder bei unvollständig entfernten Tumoren, welche im Verlauf regelmäßig kontrolliert werden müssen, stellen vor allem die adrenolytische/-statische und zytostatische Therapie eine Behandlungsoption dar. Der

## Einleitung

Krankheitsverlauf wird mittels bildgebender Diagnostik verfolgt und anhand den RECIST 1.1 [Response Evaluation Criteria in Solid Tumors] Kriterien definiert und bewertet [76]. Anhand vorgegebener Parameter werden entsprechende Läsionen erfasst. Wichtig ist dabei, dass der Status vor Beginn einer Therapie erhoben wird, um im Verlauf der Behandlung ein Ansprechen (Response) der Therapie von einem Fortschreiten der Erkrankung unterscheiden zu können. Zudem müssen die Methoden und Techniken gleich sein, um sicher Rückschlüsse ziehen zu können. Das Ansprechen dient dabei auch zur Messung des individuellen Therapieerfolges und kann in eine CR [Complete Response], PR [Partial Response], PD [Progressive Disease] und SD [Stable Disease] unterteilt werden.

### 1.4.2.1. Adrenostatische /-lytische Therapie

Mitotan, auch bekannt unter o,p'-Dichlordiphenyldichlorethan [DDD], ist eine Substanz, welche 1949 als Isomer des Insektizids Dichlordiphenyltrichlorethan [DDT] entdeckt wurde. Initial konnte durch die orale Aufnahme von DDD bei Hunden eine Schädigung der Leber und Nebennieren festgestellt werden [77]. In weiteren Forschungen wurde Mitotan daraufhin als aktiver Metabolit identifiziert [78]. In histologischen Untersuchungen konnte ca. 12 Stunden nach der ersten Mitotan-Gabe die erste Veränderung in den Mitochondrien der Zona glomerulosa und fasciculata festgestellt werden, wohingegen das Mark der Nebenniere unverändert blieb [79]. Es kam zur signifikanten Abnahme der Zona glomerulosa. Die Zona fasciculata war hingegen schwächer betroffen. Sie zeigte abnormal angeschwollene Mitochondrien und unphysiologische Fetttröpfchen. Unter der Therapie mit Mitotan kann das Serumcortisol und damit die Glukokortikoidausscheidung reduziert werden [80]. Im Maximalfall ist eine exogenen Nebennierenrindeninsuffizienz die Folge. Zusätzlich zeigte sich nach Beendigung der Mitotan-Therapie, dass sich eine Erholung der Nebenniere

## Einleitung

wiedereinstellen kann. Dabei ist unklar, ob hierfür eine adrenolytische oder adrenostatische Wirkung ursächlich ist [81].

Vor diesem Hintergrund wurde Mitotan zur symptomatischen Therapie des Cushing-Syndroms in der Veterinärmedizin eingesetzt. Aber auch beim Menschen erzielte diese Therapie eine Veränderung der Zona glomerulosa und fasciculata. In der Arbeit von Touitou *et al.* konnte bei am Cushing-Syndrom erkrankten Patienten ebenfalls eine adrenolytische Wirkung nachgewiesen werden [82]. Eine signifikante Reduktion von Cortisol und Cortison konnte ebenfalls festgestellt werden. Zusätzlich war auch die Konzentration von Aldosteron und 18-Hydroxycorticosteron reduziert, sodass Mitotan einen inhibitorischen Effekt auf die 11-Beta-Hydroxylase und 17-Beta-Hydroxylase aufwies. Dies wurde durch Hart *et al.* ebenfalls bestätigt [83]. Ein genauer Wirkmechanismus konnte jedoch bis dato noch nicht sicher identifiziert werden. Mitotan hat zudem noch einen Einfluss auf den Fettmetabolismus der Zellen und induziert unter anderem Cytochrom P450 Proteine [81, 84].

Zur optimalen Wirksamkeit der Mitotan-Therapie muss ein Wirkspiegel zwischen 14mg/l bis 20 mg/l im Serum aufgebaut und erhalten werden. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen wie Schwäche, Schwindel, Ataxie, Lethargie, Hypercholesterinämie und Leberwertveränderungen muss aufgrund der engen therapeutischen Breite eine regelmäßige Serumspiegelkontrolle erfolgen [85].

Mitotan wird vor allem zur Behandlung des ACCs angewandt, sowohl mit einer adjuvanter als auch in manchen Fällen mit einer neoadjuvanter Intention mit dem Ziel der Reduktion der Tumormasse, um eine (bessere) Operabilität zu erreichen [86].

## Einleitung

### 1.4.2.2. Zytostatische Therapie

In der zytostatischen Therapie des ACCs gibt es zwei Therapieoptionen der Wahl: die Kombinationschemotherapie mit Cisplatin, Etoposid mit Doxorubicin (EDP) sowie die Monotherapie mit Streptozotocin (STZ) [87]. Etoposid ist ein Hemmer der Topoisomerase II und unterbindet somit die Zellteilung. Zusätzlich führt es zur Entstehung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen [88]. Doxorubicin interkaliert mit der DNA, verhindert damit die Transkription und hemmt ebenfalls die Topoisomerase II [89]. Platinhaltige Chemotherapien (Cisplatin, Oxaliplatin) führen durch Platin-Komplex-Bildung zur Querverknüpfung der DNA, sodass die DNA-Replikation gestört wird [90]. Streptozotocin gehört zu der Gruppe der Glucosamine bzw. Nitrosoharnstoffe sowie zu den alkylierenden Zytostatika (siehe 1.6.).

Beide Regime waren Bestandteil der randomisierten kontrollierten Studie FIRM-ACT [First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment] [87]. In dieser Studie wurden 304 Patienten mit einem fortgeschrittenen ACC randomisiert und in zwei Behandlungsarme verteilt. Die Patienten erhielten dabei Mitotan plus entweder EDP oder Streptozotocin. Patienten mit Fortschreiten der Erkrankung bekamen das alternative Schema als Zweitlinientherapie (Crossover). Während ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben in der Therapie mit EDP im Vergleich zu Streptozotocin festgestellt wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Therapien im Gesamtüberleben (Primärer Endpunkt). (siehe 1.5.)

Weitere Substanzen, die auch in Studien untersucht werden, sind z. B. 5-Fluoruracil, Gemcitabin und Tyrosinkinaseinhibitoren [91].

## Einleitung

### 1.4.2.3. Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie orientiert sich an der Hemmung der Cortisolproduktion und damit auch an der Senkung der damit verbundenen Risiken und Nebenwirkungen. Es werden vor allem Arzneimittel eingesetzt, welche die Synthese von Cortisol blockieren. Hierbei ist es wichtig, die Cortisol-Produktion nicht vollständig zu supprimieren, sondern in einen Normbereich zu senken, um das Risiko einer Nebennierenrindeninsuffizienz und dadurch lebensbedrohliche Situationen zu minimieren. Die hier aufgeführten Medikamente haben insgesamt keinen adrenolytischen oder -statischen Effekt.

Ketoconazol, ein Medikament zur Behandlung von Pilzinfektionen, führt zur Hemmung von Enzymen, welche relevant für die Synthese von Cortisol sind, wie z. B. die 11 Beta-Hydroxylase und Cholesterindesmolase. Außerdem werden weitere Enzyme geblockt, sodass auch die Produktion von Androgenen beeinflusst wird [92]. Während einer Therapie mit Ketoconazol sollten regelmäßig die Leberwerte und die QTc-Zeit kontrolliert werden. Zusätzlich kommt es zu Interaktionen mit CYP3A4, sodass Akkumulationen oder Wirkverlust von anderen Arzneimitteln möglich sind.

Eine andere Möglichkeit zur medikamentösen Behandlung des Hypercortisolismus stellt Metyrapon dar. Es hemmt selektiv die 11 Beta-Hydroxylase, 18-Hydroxylase und die Aldosteronsynthese. Metyrapon verfügt über eine gute Bioverfügbarkeit nach oraler Zufuhr [93]. Aufgrund der Hemmung der relevanten Enzyme lässt sich eine Reduktion der Cortisolsynthese erzielen. Metyrapon ist ein Induktor von CYP3A4, sodass Akkumulationen oder Wirkverlust von anderen Arzneimitteln, die von CYP3A4 metabolisiert werden, möglich sind. Zu den Nebenwirkungen gehören neben gastrointestinalen Nebenwirkungen auch Kopfschmerzen, Hautausschlag, Hypotonie und eine mögliche Nebenniereninsuffizienz [94, 95].

## Einleitung

Ein weiteres Medikament, das die Cortisolsynthese supprimieren kann, ist Etomidat. Es kann zur Hypnoseinduktion während einer Narkoseeinleitung parenteral verabreicht werden und wirkt hierbei über GABA-Rezeptoren in der Formatio reticularis. Außerdem hemmt es die 11 Beta-Hydroxylase, wodurch die Cortisolsynthese gestört wird [94]. Eine effektive Therapie zur längerfristigen Kontrolle eines Hypercortisolismus ist jedoch aufgrund der hypnotischen Wirkung nicht möglich.

### 1.5. FIRM-ACT Studie

Die FIRM-ACT Studie, initiiert im Jahr 2004, hatte das Ziel, ein Therapieregime in der Behandlung des Nebennierenkarzinoms zu etablieren [87, 96]. Insgesamt nahmen 40 spezialisierte Zentren zur ACC-Behandlung aus 12 verschiedenen Ländern und drei verschiedenen Kontinenten teil. Hierzu wurden Patienten mit einem histologisch gesicherten und inoperablen ACC ohne zytotoxische Vorbehandlung (außer Mitotan) in die Studie eingeschlossen. Die Randomisierung erfolgte auf zwei annähernd identische Behandlungsarme, um die beiden zytotoxischen Behandlungen Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin mit Mitotan (EDP + M, EDP-Arm) und Streptozotocin mit Mitotan (STZ + M, STZ-Arm) zu vergleichen. Aufgrund der limitierten Therapiemöglichkeiten konnten Patienten mit Progression des Tumorleidens oder ausgeprägten Nebenwirkungen unter der Erstlinientherapie in den jeweilig anderen Behandlungsarm der Studie wechseln (Crossover). Mitotane wurde entsprechend eines angestrebten Serumspiegels dosiert (Ziel-Spiegel 14 bis 20 mg/L) [75, 97, 98].

Das EDP-Protokoll enthielt folgende Dosierungen intravenös: Etoposid mit 100 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche am zweiten, dritten und vierten Tag eines Zyklus, Doxorubicin mit 40 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche am ersten Tag und Cisplatin mit 40

## Einleitung

mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche am dritten und vierten Tag. Ein Zyklus EDP wurde alle 4 Wochen wiederholt.

Das STZ-Regime beinhaltete eine Initialdosis von 1 g STZ für fünf Tage im ersten Zyklus, gefolgt von 2 g am ersten Tag im Intervall von drei Wochen ab dem zweiten Zyklus. Der primäre Endpunkt der Studie war das Gesamtüberleben (OS, Overall Survival). Sekundäre Endpunkte waren progressionsfreies Überleben (PFS, Progression-free Survival), Tumoransprechen und Lebensqualität. Da ein Crossover erlaubt war, erfolgten auch Subgruppenanalysen zum Ansprechen der Zweitlinientherapie.

Es konnten insgesamt 304 Patienten im Zeitraum von 2004 bis 2009 eingeschlossen werden. Aufgrund der multizentrischen Rekrutierung, einer ausreichend großen Kohorte sowie den entsprechenden Einschlusskriterien kann von einer repräsentativen Kohorte ausgegangen werden. Von den 304 Patienten wurden 151 in den EDP- und 153 in den STZ-Arm randomisiert. Das mediane Alter betrug 51,9 Jahre (19 bis 76,2) in der EDP-M und 50 Jahre (18,8 bis 72,8) in der Sz-M Gruppe. Die beiden Gruppen wurden außerdem homogen nach Geschlecht, Tumorstatus (III und IV) sowie endokrinen Symptomen, Ausmaß der Metastasierung und dem ECOG Status aufgeteilt.

Aus den erhobenen Daten konnte ein höheres objektive Tumoransprechen im Behandlungsarm EDP (35 von 151 Patienten, 23,2 %) vs. STZ (14 von 153 Patienten, 9,2%) (p-Wert < 0,001) ermittelt werden. Unter objektivem Tumoransprechen wurden Patienten mit einem kompletten oder partiellen Tumoransprechen zusammengefasst. So gab es in der EDP-M Gruppe 2 CR (1,3 %), Tumorfrei seit OP 4 (2,6 %), PR 29 (19,2 %) und in der STZ-M Gruppe CR 1 (0,7 %), Tumorfrei seit OP 2 (1,3 %) und PR 11 (7,2 %).

Auch das mediane PFS lag signifikant höher unter der Therapie mit EDP (5 Monate (95 % Konfidenzintervall [CI] 3,5 bis 6,9)) vs. STZ (2,1 Monate (95 % CI 2,04 bis 2,33)) (Hazard Ratio = 0,55; 95 % CI 0,43 bis 0,69; p-Wert < 0,001). Jedoch unterschied sich das mediane OS mit einer Dauer von 14,8 Monaten



## Einleitung

(95% CI 11,3 bis 17,1) im EDP-Arm und 12 Monaten (95 % CI 10,3 bis 13,6) im STZ-Arm nicht signifikant (Hazard Ratio = 0,79; 95 % CI 0,61 bis 1,02; p-Wert = 0,07). Im STZ-Arm hatten weniger Patienten gravierende Nebenwirkungen wie Nebenniereninsuffizienz, Knochenmarkstoxizität, kardiovaskuläre oder thrombembolische Ereignisse, Neurotoxizität, Einschränkung der Leber oder Nierenfunktion als im EDP-Arm (STZ 37 Patienten mit 62 Nebenwirkungen im Vergleich zu EDP 47 Patienten mit 86 Nebenwirkungen) (p-Wert = 0,16). Die Nebenwirkungen und auch der Endpunkt Lebensqualität zeigten insgesamt allerdings keine signifikanten Ergebnisse. In einer Subgruppenanalyse zeigte sich, dass ein effektiver Mitotanserumspiegel mit einem tendenziell erhöhten OS einhergeht. In der FIRM-ACT Studie konnte ein Serumspiegel im Zielbereich nur bei 54 % der Patienten erzielt werden [87].

Im klinischen Alltag wird aufgrund des besseren Ansprechens sowie des erhöhten PFS die Therapie mit EDP + M als Erstlinientherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzinoms empfohlen [87]. Dies geht auch aus der europäischen Leitlinie von M. Fassnacht und M. Terzolo (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) [57] hervor.

## Einleitung

### 1.6. Streptozotocin [STZ]

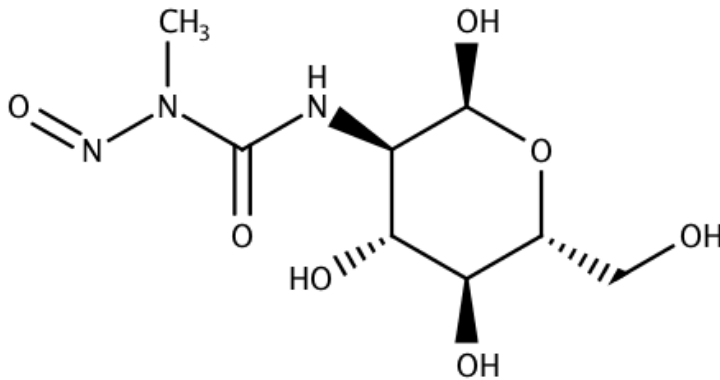


Abbildung 4 Streptozotocin Strukturformel erstellt mit Marvin Sketch ChemAxon

STZ mit seiner antibiotischen Wirkung wurde 1956 von Wissenschaftlern der Firma Upjohn entdeckt [99]. Als eine natürlich vorkommende Substanz wird sie von *Streptomyces achromogenes* gebildet [100]. *Streptomyces achromogenes* ist ein aerobes, fadenförmige und grampositive Bakterium.

Es wirkt durch Methylierung der DNA zytotoxisch. Dabei wird eine Methylgruppe auf Guanin übertragen, sodass O<sup>6</sup>-Methylguanin entsteht. Dieses paart sich bevorzugt mit Thymin anstelle von Cytosin. Folglich entsteht eine Punktmutation von Guanin in Adenin, was an potenziell jeder Guaninbase der DNA geschehen kann. Mismatch Repair Enzyme kontrollieren vor allem den neu synthetisierten Strang, sodass O<sup>6</sup>-Methylguanin im initialen Strang mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bestehen bleibt [101]. Es finden somit vermehrt abnormale DNA-Reparaturen statt, die wiederum die Apoptose induzieren. STZ gehört zu der Substanzklasse der Nitrosoharnstoffe und Glucosamine, worauf auch die strukturelle Ähnlichkeit mit Glucose basiert [102].

Die intrazelluläre Aufnahme erfolgt mit Hilfe von Transportproteinen in der Zellmembran. Hierbei spielt vor allem GLUT-2 eine relevante Rolle. In In-vitro-Versuchen mit Beta-Zellen aus dem Pankreas konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Gehalt von STZ von der Expression von GLUT-2 abhängt [102]. Hierzu wurde unter anderem eine Insulinproduzierende-Adenom-Zelllinie (RIN)

## Einleitung

von Ratten mit einer Überexpression von GLUT-2 transfiziert. Der zytotoxische Effekt trat dabei in der Zellreihe der GLUT-2 Überexpression ein, wohingegen die untransfizierten Zellen überlebten. Eine Expression von GLUT-2 ist somit eine Voraussetzung, dass STZ in die Zelle aufgenommen werden kann und somit seine Wirkung entfaltet. Außerdem lassen sich hierdurch die Nebenwirkungen von STZ erklären, denn sämtliche Gewebe, die GLUT-2 exprimieren, sind während einer Therapie mit STZ betroffen. So kann es neben gastrointestinalen Beschwerden zu einer Schädigung der Nieren, der Leber und zu Blutbildveränderungen kommen. Eine Anwendung im klinischen Alltag findet STZ vor allem in der chemotherapeutischen Behandlung fortgeschrittener neuroendokriner Tumore des Pankreas [103, 104], aber auch zur Behandlung von Nebennierenrindenzinomen.

### 1.7. Glucose Transporter-2 [GLUT-2]

GLUT-2 ist ein transmembranöses Protein, welches Glucose entlang des Konzentrationsgradienten über die Zellmembran transportiert. Es besteht aus 524 Aminosäuren und wird im SLC2A2 Gen auf Chromosom 3 kodiert. GLUT-2 wird vor allem in den Zellen der Leber, der Niere, des Darms und in den Beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Neben Glucose kann GLUT-2 auch Fructose und Glucosamine transportieren [105]. GLUT-2 hat eine hohe Affinität für Glucosamine und eine niedrige für Glucose. Damit ist es in der Lage Glucose über Membranen schnell zu befördern [106]. In den Beta-Zellen der Langerhan'schen Zellen des Pankreas spielt GLUT-2 eine wichtige Rolle in der Regulierung des Blutzuckerhaushalts. So erfolgt die Glucoseaufnahme in die Beta-Zellen über GLUT-2. Durch den gesteigerten Glucosemetabolismus der Zelle kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran und über einen vermehrten  $\text{Ca}^{+2}$  Einstrom zur Sekretion von Insulin [107].

## Einleitung

In Nagetieren wird hauptsächlich GLUT-2, im Menschen zusätzlich GLUT-1 (SLC2A1 Gen) und GLUT-3 (SLC2A3 Gen) exprimiert. Mutationen, welche GLUT-2 betreffen, führen meist zu einer hepato-renalen Glykogen-Akkumulation, zu Glukose- und Galactoseintoleranz, Hypoglykämie, tubulären Nephropathie sowie zu Wachstumsstörungen. Beim Menschen kommt es jedoch zu keiner Störung der Insulinsekretion, da die GLUT-Isoformen weiterhin Glucose in die Beta-Zellen aufnehmen und damit die Insulinsekretion mitsteuern.

Das Fanconi-Bickel-Syndrom wird durch Mutationen im SLC2A2 Gen verursacht und führt durch Mutation zu einem gestörten Glukosetransport. Dadurch akkumuliert Glykogen in Leber und Niere und verursachen die obengenannten Auswirkungen. Zusätzlich kommt es zu einer Vergrößerung von Leber und Nieren mit einer Hypophosphatämie. Es gibt jedoch auch Mutationen von GLUT-2, welche zu einem mildereren Phänotyp bis hin zur isolierten Glukosurie ohne Organmanifestation führen [108].

GLUT-2 wird auch in weiteren Zellen exprimiert. Die Glukoseabgabe der Enterozyten erfolgt über GLUT-2 in die Blutbahn, aber auch im zentralen Nervensystem spielt die Expression von GLUT-2 beispielsweise eine relevante Rolle in der Glukosehomöostase. Eine Expression konnte in Neuronen, Endothelzellen, Astrozyten und Tanyzyten nachgewiesen werden [109, 110].

### 1.8. O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT]

Die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT/ AGT] gehört zu den DNA-Reparaturmolekülen. Es ist ein Protein bestehend aus 207 Aminosäuren [111]. MGMT übernimmt Methylierungen von O6-Methylguanin zu Guanin, so dass die Base Guanin wiederhergestellt wird. Die Methylierung wird häufig

## Einleitung

durch alkylierende Substanzen verursacht und kann endogen oder exogen herbeigeführt werden. Sie kommt natürlicherweise in sämtlichen Zellen vor. Durch die Methylierung von Guanin zu O6-Methylguanin erfolgt eine Fehlpaarung der DNA während der Replikation. Anstelle von Cytosin wird Thymin in den neu replizierten Strang eingebaut [112]. Im nächsten Replikationszyklus werden an der Thymin-Stelle entsprechend der Basenpaarung Adenosin-Basen gepaart, sodass an der ursprünglichen Position eine A-T-Mutation entstanden ist. Diese Mutationen können neben veränderter Proteinexpression auch das Entstehen maligner Entartungen begünstigen. Letztendlich führen eine hohe Anzahl an Mutationen zur Einleitung der Apoptose, sodass dieser therapeutische Effekt in der systemischen Anti-Tumortherapie bestimmter Tumorentitäten zum Einsatz kommt, da Tumorzellen meist eine höhere Replikationsrate haben und vermehrt Mutationen entstehen [113]. Der genaue Mechanismus zur Apoptose-Induktion ist weiterhin jedoch nicht vollständig geklärt, da die Veränderung von O6-Methylguanin weder die Replikation noch die Transkription wesentlich beeinflussen [114]. Die Einleitung der Apoptose wird sowohl über den mitochondrialen Weg als auch über die Aktivierung des Death-Rezeptors angestoßen.

O6-Methylguanin kann mit Hilfe von MGMT zu Guanin repariert werden. Hierzu wird die kovalente Bindung zwischen dem Methylrest und der DNA gespalten und die Alkylgruppe an das interne Cystein der MGMT übertragen. Dies führt zu einer irreversiblen Inaktivierung von MGMT (Suizid-Substrat). Es besteht also ein 1:1 Verhältnis zwischen Alkylierungsschaden und MGMT. Anders als bei anderen DNA-Reparaturmechanismen benötigt MGMT keine weiteren Enzyme, um den Schaden zu beseitigen, sodass hierfür eine einzigartige Kinetik besteht. Die Expression und der Gehalt von MGMT ist von Gewebe zu Gewebe, aber auch von Individuum zu Individuum unterschiedlich und damit auch die Fähigkeit, O6-Methylguanin zu reparieren [115]. Wir entschieden uns daher für unsere Untersuchungen nicht den Gehalt an MGMT in den Tumorzellen zu bestimmen, da dies lediglich der Momentaufnahme zum Zeitpunkt der OP entspricht. Stattdessen untersuchten wir den Methylierungsstatus und damit ein indirektes Maß für das Expressionspotenzial.

## Einleitung

Tumorzellen haben häufig eine Überexpression von MGMT, was zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika führen kann. In Glioblastomen konnte durch Untersuchung des Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion ein signifikant längeres Überleben bei Patienten mit einer MGMT-Promotorhypermethylierung und Behandlung mit einer alkylierenden Chemotherapie nachgewiesen werden [116, 117]. Dies ermöglicht eine Einschätzung des Ansprechens bei Behandlung mit Temozolomid bei Glioblastomen. Eine Hypermethylierung der Promotorregion geht mit einem Gen-Silencing einher, wodurch die Expression des MGMT-Gens reduziert wird [118].

Die Wirkung von MGMT kann mit Hilfe von O6-Benzylguanin [BG] aufgehoben werden [119]. Es selbst dient als Substrat für MGMT, sodass nach Übernahme der Alkylgruppe von BG MGMT abgebaut wird und für die DNA-Reparatur folglich nicht mehr zur Verfügung steht. Theoretisch könnte eine Chemotherapie mit alkylierenden Chemotherapeutika durch Gabe von BG verstärkt oder Resistenzen reduziert werden. Systemisch angewandt wird BG allerdings auch in gesunden Zellen aufgenommen, sodass eine zielgerichtete Anwendung nicht möglich ist. Neben einer Verstärkung der zytotoxischen Wirkung werden somit ebenfalls Nebenwirkungen verstärkt, da auch gesunde Zellen vermehrt DNA-Schäden sowie Mutationen erleiden. Ein weiterer Einfluss auf die Expression des MGMT-Gens besteht in der Induzierbarkeit. So führt die Exposition mit alkylierenden Noxen, Bestrahlung, vermehrten DNA-Strangbrüchen und Glukokortikoide zu einer vermehrten Expression von MGMT und kann eine Hypomethylierung der Promotorregion bewirken [120].

### 1.9. Fragestellung der Arbeit

Die bisherige Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenrindenzarzinoms umfasst zwei Chemotherapieregime: EDP und STZ jeweils in Kombination mit Mitotan. In der FIRM-ACT Studie konnte eine Überlegenheit von EDP gegenüber STZ gezeigt werden, wobei das Gesamtüberleben keinen signifikanten Unterschied zeigte. Aus den Daten der FIRM-ACT Studie und des Würzburger Nebennierenrindenzarzinom-Registers geht ebenfalls hervor, dass einige Patienten von einer STZ-Therapie profitieren und das Eintreten einer stabilen Erkrankung oder den teilweisen Rückgang der Tumormasse erreichen. Dabei ist unklar, warum einige Patienten von einer STZ Therapie profitieren und andere nicht.

Eine Behandlung mit Chemotherapien bringt in der Regel starke Nebenwirkungen mit sich, wovon einige vorübergehend und andere permanent bestehen können. Ein Teil davon kann sogar gravierende Auswirkungen wie eine bleibende Nierenschädigung oder Lebertoxizität haben.

Es bleibt daher zu klären, ob es Marker gibt, welche das Ansprechen einer Therapie mit STZ abschätzen lassen bzw. Hinweise auf einen positiven Einfluss unter der Therapie geben. Durch eine individualisierte Chemotherapie mit STZ beim Nebennierenrindenzarzinom wird versucht, diejenigen Patienten zu identifizieren, welche von einer Chemotherapie mit STZ potenziell profitieren könnten. Hierdurch könnten Nebenwirkungen einer nicht wirksamen Chemotherapie reduziert bzw. von vornherein vermieden werden.

## Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Ziel Patienten mit einem fortgeschrittenem Nebennierenrindenzinom zu identifizieren, welche von einer Therapie mit STZ+M profitieren könnten. Hierzu wurden folgende Punkte genauer untersucht und in unserer Kohorte analysiert.

1. Prognostische Marker für eine Therapie mit Streptozotocin beim NNR-Karzinom
  - a. Auswirkung von GLUT-2-Expression auf das Ansprechen mit STZ
  - b. MGMT-Methylierung als prognostischer Marker
2. Der Methylierungsstatus von bestimmten Mismatch Repair Mechanismen und deren Einfluss auf die Therapie und Verteilungsmuster bei ACC Patienten.



### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Patientendaten

Es wurden lediglich Daten und Tumormaterial von Patienten erfasst und verwendet, die ihr schriftliches Einverständnis erteilten und das 18. Lebensjahr vollendet hatten. Dies geschah in Zustimmung des Ethikkomitees der Universität Würzburg (Nr. 88/11 und Nr. 93/02) in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

Die Daten wie Alter, Geschlecht, Weiss-Score, Ki67 und ENSAT-Tumorstadium wurden dem Würzburger Nebennierenkarzinom Register und dem ENS@T-Register ([www.ensat.org](http://www.ensat.org)) entnommen.

In die Analyse konnten insgesamt 79 Patienten eingeschlossen werden. Das mediane Alter betrug 49 Jahre bei einer Spanne von 21 bis maximal 71 Jahren. Die Geschlechterverteilung beinhaltete 49 Frauen und 30 Männer. Die durchschnittliche TumorgroÙe betrug 12,4 cm (2,5 bis maximal 24 cm) und bei 43 % der Patienten konnte eine R0-Resektion erzielt werden. In der histologischen Aufarbeitung war ein durchschnittlicher Proliferationsindex von 20 (ermittelt wird der Proliferationsindex als Anteil der Ki67-positiven Zellen an der Gesamtzahl der Kerne) und ein Weiss-Score von 6 feststellbar. Vor dem Therapiebeginn mit Streptozotocin erhielten 38 Patienten keine Therapie, 27 erhielten EDP, 10 Gemcitabin mit Capecitabin und 4 Patienten eine Bestrahlung. Zum Zeitpunkt der Operation waren bei 31,6 % der Patienten keine Fernmetastasen, bei 27,8 % in einem, bei 22,8 % in zwei und bei 17,7 % in mehr als drei Organen Fernmetastasen diagnostiziert worden. Hierbei waren vor allem Lunge und Leber betroffen. Bei 60,8 % der Patienten fand zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Abklärung eines möglichen Hypercortisolismus statt. Hiervon konnte bei 34 der Untersuchten eine pathologische Sekretion festgestellt werden. Während

## Material und Methoden

der Behandlung mit STZ erfolgte bei 94 % der Patienten eine zusätzliche ad-  
renolytische/adrenostatische Therapie mit Mitotan.

In der Kohorte konnten 29 Responder und 50 Non-Responder identifiziert wer-  
den. Unter den Responder hatten 22 Patienten eine stabile Erkrankung und 7  
ein Teilansprechen unter der Therapie mit STZ.

*Tabelle 6 Datentabelle der eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose*

Alter in Jahren (median (range))	49 (21-71)	
Geschlecht (Frau:Mann)	49:30	
<b>Initial ENSAT Tumorstadium, n (%)</b>		
I-II	27	34,2 %
III	22	27,8 %
IV	27	34,2 %
Unbekannt	3	3,8 %
<b>Resektionsstatus, n%</b>		
R0	34	43 %
RX	4	5,1 %
R1 / R2	30	38 %
Unbekannt	11	13,9 %
Tumorgröße (Ø in cm) (Min/Max)	12,4 (2,5/24)	
<b>Fernmetastasen (Anzahl Organbefall), n (%)</b>		
0	25	31,6 %
1	22	27,8 %
2	18	22,8
3 und mehr	14	17,7 %
<b>Organe mit Fernmetastasen, n</b>		
Lunge	33	
Leber	32	
Lymphknoten	19	
Lokal (Peritonealkarzinose)	11	
<b>Cortisol-produzierend, n</b>		

## Material und Methoden

pathologisch	48	60,8 %
<b>Histologie, (median (range))</b>		
Proliferationsindex (Ki 67)	20 (1-50)	
Weiss Score	6 (2-9)	
<b>Vor STZ Gabe</b>		
<b>Vorausgehende Chemotherapie, n (%)</b>		
Keine	38	48,1 %
EDP	27	34,2 %
Gemcitabin + Capetctabin (nach EDP)	10	12,7 %
Anderes	4	5,1 %
<b>Vorausgehende lokale Therapie, n (%)</b>		
Tumorbettbestrahlung	13	16,5 %
<b>Co Therapie mit Mitotan, n (%)</b>	74	94%

### 2.2. Material

Neben den herkömmlichen Labormaterialien wurden die weiteren Chemikalien, Antikörper und Kits wie in Tabelle 7 gelistet eingesetzt. Standardchemikalien wie Xylol, Ethanol oder destilliertes Wasser sind dabei nicht aufgeführt. Diese wurden über die Firmen AppliChem, Bio-Rad, Merk, SIGMA-ALDRICH und Roth bezogen.

*Tabelle 7 Material und Geräte*

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
QIAamp DNA FFPE Tissue	QIAGEN, Hilden, DE
HhAI Enzym R6441	Promega, Madison, USA
Cy5 dye	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dako Liquid DAB + Substrat	Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornien

## Material und Methoden

Chromogen System	nien, USA
Dako ADVANCED HRP Link und ADVANCED HRP Enzyme	Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA
FLEX Universal Negative Control Mouse	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Humanes Ab Serum H4522	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE
Entellan	Merck, Darmstadt, DE
Hämaulaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe, DE
Eosin G-Lösung 1% wässrig	Roth, Karlsruhe, DE
Mouse anti-Human GLUT 2 G3900-15N	US Biological Biomol, Massachusetts, USA
DNA Size Standard-600	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Mineral Oil	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
<b>Geräte:</b>	
GenomeLab GeXP	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Bio-Rad MyCycler	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Mikrotom SLEE CUT 4062	SLEE medical GmbH, Mainz, DE
NanoDrop 2000	Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop	Zeiss, Jena, DE
L46 Vortex	Labinco, Breda, NL
MIKRO 200R Zentrifuge	Hettich Lab, Tuttlingen, DE
Thermo Shaker TS-100 LSF	Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, DE
Schnellkochtopf Sicomatic T	Silit, Riedlingen an der Donau, DE

## Material und Methoden

Einzelkochtafel	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, DE
Wasserkocher	Unold Electro, Hockenheim, DE
Pipette Research 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Research plus 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Reference 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE

### 2.3. Herstellung der Schnittpräparate

Zur Herstellung der Schnitte für die histologische Färbung und Isolierung von Tumor-DNA wurde das Tumorgewebe in den Pathologien entsprechend vorbereitet. Die Herstellung der Schnittpräparate erfolgte aus dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms. So konnte sichergestellt werden, dass exakte Schnitte mit einer entsprechenden Dicke erhalten werden konnten ohne das präparierte Gewebe unnötig zu verletzen.

Im Detail erfolgte die Herstellung der Schnittpräparate wie folgt: Zur Vorbereitung wurden die Gewebeblöcke für mindestens 2 Stunden gekühlt, was insgesamt das Resultat der angefertigten Schnitte verbesserte. Der gekühlte Block wurde in das Mikrotom eingespannt und das Messer entsprechend eingestellt. Für die Immunhistochemie und Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 2 µm und für die DNA-Isolierung Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt, sodass sie dort aufschwimmen und ihre originale Größe wieder annehmen konnten. Außerdem wurden hierdurch entstandene Falten geglättet. Anschließend konnten die Schnitte auf Objektträger übertragen werden. Hierzu wurde der Objektträger im Wasserbad unter den Schnitt gebracht und dieser vorsichtig spannungsfrei aufgetragen. Das überschüssige Wasser wurde abgeklopft und der Objektträger für 24 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet.

### 2.4. Hämatoxylin-Eosin [HE] Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gehört zu den Routinefärbungen in der Histologie. Durch das Hämalaun werden basophile Strukturen blau gefärbt, wie zum Beispiel die im Zellkern enthaltene DNA und das raue endoplasmatische Retikulum. Durch das Eosin erfolgt eine Rotfärbung der azidophilen Strukturen. Dies sind vor allem Proteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum und Kollagene.

Als Vorarbeit zur Isolierung von Tumor-DNA wurden von den Gewebeproben HE-Färbungen angefertigt, um den Tumor von gesunden Umgebungsgewebe zu unterscheiden und dadurch gezielt Tumor-DNA zu gewinnen. Für die HE-Färbung wurden Schnitte mit einer Dicke von 2  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Entparaffinierung erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Xylolbädern für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanol-Reihe, beginnend von 100 % bis 70 % für jeweils 3 Minuten rehydriert und überschüssige Xylolreste entfernt. Um das restliche Ethanol zu entfernen, wurden die Schnitte 5-malig in destilliertem Wasser gewaschen. Das eingesetzte Hämalaun wurde für 3 Minuten auf die Schnitte gegeben und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gebläut. Die Gegenfärbung erfolgte mit Eosin, welches für eine Minute inkubiert wurde. Das überschüssige Eosin wurde mit Hilfe von destilliertem Wasser abgewaschen, mit Ethanol erneut dehydriert und für 20 Minuten bei 56 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

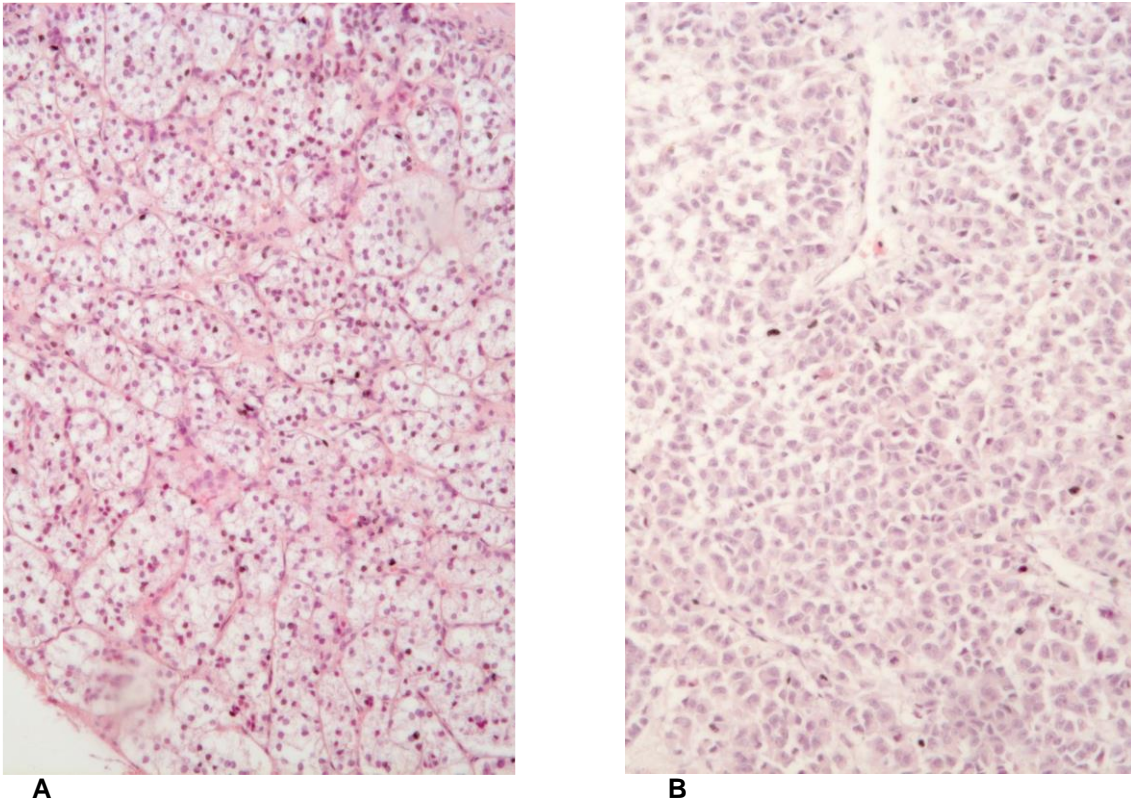


Abbildung 5 Beispiel der HE Färbung, A: normale Nebenniere 20-fache Vergrößerung, angeordnete Zellgruppierungen sichtbar B: ACC 20-fache Vergrößerung, aufgehobene Zellarchitektur und pleomorphe Zellkerne

### 2.5. DNA-Isolierung aus FFPE Gewebe

Die angefertigten HE-Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops untersucht, um das Tumorgewebe vom umliegenden gesunden Gewebe zu unterscheiden. Hierbei wurde vor allem auf maligne Charakteristika geachtet, wie z. B. infiltratives Wachstum, Aufhebung des histologischen Gewebeaufbaus, Kernatypien, vermehrte Mitosefiguren, Nekroseareale und pleomorphe Tumorzellen. Durch die Identifizierung des Tumors sollte sichergestellt werden, dass zur DNA-Isolierung nur Tumormaterial genutzt wird.

## Material und Methoden

Die identifizierten Areale wurden markiert, sodass von Schnitten der Dicke 4  $\mu\text{m}$  das Tumormaterial mit Hilfe eines Skalpells extrahiert werden konnte. Insgesamt wurden zwei Schnitte, mit dem Ziel mindestens 1  $\text{cm}^2$  Tumormaterial für die DNA-Isolierung zu gewinnen und eine ausreichende Menge Tumor-DNA zu gewährleisten, genutzt. Das Material wurde in Reaktionsgefäße überführt. Die DNA-Isolierung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit von QIAGEN, DNA FFPE Tissue Kit. Säulen und Puffer wurden laut Herstellerangaben vorbereitet und gelagert. Auch für die Isolierung wurde sich streng an die Herstellerangaben hinsichtlich eingesetzter Mengen, Ablauf und Konzentrationen gehalten. Um das Paraffin zu entfernen, wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 ml Xylol hinzugefügt und gevortext. Mit Hilfe der Zentrifugation bildete sich am Boden ein Pellet. Das Xylol wurde vorsichtig entfernt. Um auch zu gewährleisten, dass die Reste des Xylols entfernt werden, wurde Ethanol hinzugefügt und die Schritte wurden wiederholt.

Das überschüssige Ethanol verdampfte bei Zimmertemperatur aus den offenen Gefäßen. Entsprechend der Herstelleranleitung wurde Buffer ATL 180  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben bei 56  $^{\circ}\text{C}$  für mindestens eine Stunde bis das gesamte Gewebe lysierte inkubiert. Um die Proteinase zu inaktivieren und die Formaldehydmodifizierung der DNA rückgängig zu machen, wurden die Proben für eine Stunde auf 90  $^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Buffer AL wurde hinzugefügt, vorsichtig zu einer gleichmäßigen Lösung gemischt und daraufhin entsprechend den Angaben in die Säulen übertragen und angewandt. Um die DNA zu lösen, wurden nach den entsprechenden Schritten die Säulen mit 20  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser benetzt, für 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit (20 000 g) für eine Minute zentrifugiert.



## 2.6. Spektroskopische Kontrolle DNA

Damit die gewonnene DNA zur weiteren Analyse verwendet werden kann, musste neben der Konzentrationsbestimmung auch die Qualität der DNA geeignet sein. Dies wurde mit Hilfe einer spektroskopischen Untersuchung im NanoDrop 2000 überprüft. Zur Untersuchung wurde 1 µl des Eluates untersucht. Die photometrische Untersuchung der Konzentration beruhte dabei auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Um die Konzentration einer nukleinsäurehaltigen Lösung zu bestimmen wurde die Absorption bei 260 nm bestimmt. Sie wurde dabei wie folgt berechnet:

$$E = \text{Absorptionskoeffizient} \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion, c = Stoffkonzentration, d = Schichtdicke)

Um Aussagen über die Qualität der Proben treffen zu können, wurden die Verhältnisse zu den Absorptionen bei 230 nm (organische Substanzen) und 280 nm (Proteine und Phenole) bestimmt. Für reine DNA-Proben galten folgende, in Tabelle 8 angegebene Werte:

*Tabelle 8; Reine DNA- Proben Spektroskopie*

Verhältnis	Soll Quotient
Abs 260/280	1,8 – 2,0
Abs 260/230	≥ 2,0

### 2.7. Citratpuffer

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein Citratpuffer mit einem pH von 6 benötigt. Hierzu wurde 1,05 g Citronensäure in destilliertem Wasser gelöst und 4 NaOH-Plättchen hinzugefügt. Es wurde ein Gesamtvolumen von 500 ml benötigt. Mit Hilfe von HCl und NaOH wurde der pH-Wert auf 6 titriert.

### 2.8. Immunhistochemische Färbung GLUT 2

Die Immunhistochemie beruhte auf Anfärbung mit Hilfe einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Hierzu wurden Strukturen oder Proteine durch einen als Marker genutzten gekoppelten Antikörper dargestellt. Die Antikörper-Antigen-Reaktion beruhte auf einer Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Außerdem wurde zwischen zwei Färbemethoden unterschieden: einer direkten und einer indirekten Färbung. Bei der direkten Färbung ist der Antikörper direkt mit einem Marker gekoppelt. Bei der indirekten Methode wird ein sekundärer Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist, eingesetzt.

Zur Entparaffinierung wurden 2 µm dicke Schnitte in zwei aufeinanderfolgenden Xylobäder entparaffiniert. Anschließend wurde das überschüssige Xylol abgeschüttelt und die Schnitte in einem 100%igen Ethanolbad vom restlichen Xylol befreit. Die Rehydrierung des Gewebes erfolgte in Bädern mit absteigender Ethanolkonzentration, begonnen bei 90 % bis hin zu einer 70%igen Lösung, und destilliertem Wasser. Da Proteine bzw. Antigene während des Fixierungsprozesses verändert werden, mussten die Schnitte vorbehandelt werden. Dadurch wurde eine mögliche Maskierung der Antigene beseitigt und die Antikörper konnten besser an die Antigene binden. Es erfolgte daher eine thermische Antigen-Retrieval, indem die Schnitte im vorbereiteten Citratpuffer mit pH 6 in einem Druckkochtopf für 13 Minuten erhitzt wurden. Nach dem Erhitzen

## **Material und Methoden**

kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten ab. Anschließend wurden sie in drei PBS [phosphate buffered saline] Waschschritten für 5 Minuten vom Citratpuffer befreit. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte mit jeweils 200 µl aus einem 10%igem Gemisch von Wasserstoffperoxid und Methanol benetzt und für 10 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte eine Proteinblockierung mit 200 µl von 20%igen Humanserum mit PBS für eine Stunde. Zuvor wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet.

Der GLUT-2-Antikörper wurde auf eine Konzentration von 1:75 mit einem Gemisch aus 40%igen Humanserum und PBS verdünnt. Der Antikörper wurde ebenfalls für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert.

Die Negativkontrolle wurde mit einem Anti-Maus-Immunglobulin behandelt. Zur Visualisierung der markierten Proteine wurde ein Peroxidase-basiertes Verfahren genutzt. Hierzu wurde DAB [3,3'-Diaminobezidin] Chromogen und DAB-Substrat verwendet, welche entsprechend den Herstellerangaben für 7 Minuten inkubiert. Für die Gegenfärbung erfolgte ein Tauchbad in Hämalun nach Meyer. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Vor dem Trocknen bei 65 °C dehydrierten die Schnitte in 100%igem Ethanol. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

### **2.9. Auswertung Immunhistochemische GLUT 2 Färbung**

Die Auswertung der Schnitte erfolgte durch Analyse der Färbung unter einem Lichtmikroskop und Bestimmung eines semiquantitativen H-Scores. Die Schnitte wurden dabei von zwei Untersuchern unabhängig voneinander beurteilt. Ausgewertet wurde nur das Tumormaterial und hierbei vor allem die membranäre und cytoplasmatische Färbung von GLUT-2.

## Material und Methoden

Die stärkste GLUT-2-Expression zeigt vor allem Lebergewebe, welches auch als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Ausprägung der Expression erfolgte anhand einer Punkteskala: bei einer maximalen Färbung gab es 3 Punkte bzw. bei fehlender Expression 0 Punkte. Aus diesen Werten wurde ein H-Score gebildet. Dieser setzte sich aus der Multiplikation der maximalen Färbungsintensität mit einem festgelegten Faktor zusammen. Der Faktor wurde dabei wie folgt definiert: 0,1, wenn 1% – 9 %, 0,5, wenn 10 % – 49 % und 1, wenn mehr als 50 % der Zellen des Gewebes positiv gefärbt waren. Kam es bei der Auswertung zu einer zu großen Differenz des Erst- und Zweituntersuchers, erfolgte eine erneute Evaluation. Der so bestimmte H-Score diente als Grundlage für die weiteren Auswertungen.

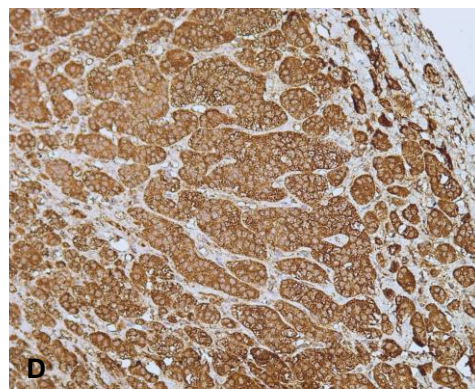
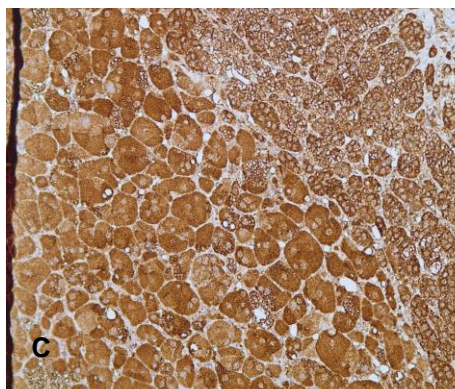
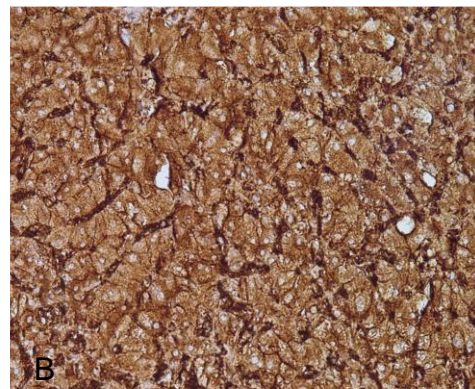
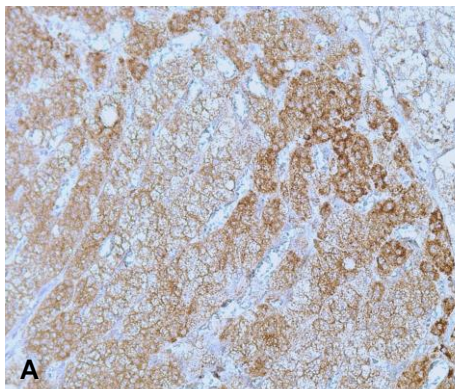


Abbildung 6 Beispiele der GLUT-2 Immunohistochemie, A: normale Nebenniere, B: Lebergewebe, C: ACC mit ausgeprägt zytoplasmatischer Expression, D: ACC mit ausgeprägter membranärer Expression. 10-fache Vergrößerung.

### 2.10. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification [MLPA] entspricht vereinfacht geschichteten Polymerase-Kettenreaktionen [PCR]. Die Produkte (Amplicons) unterscheiden sich in ihrer Größe, sodass diese nach Auftrennung der Fragmente mittels Kapillargelelektrophorese anhand ihrer Größe analysiert werden konnten [121]. Jede zu amplifizierende Zielstruktur beinhaltet, neben einem fluoreszenzmarkierten Primer, einen reversen Primer, gekoppelt an Oligonukleotide der Zielstruktur, und eine Stuffer Sequenz (variabel in der Größe zur Unterscheidung). Durch die Stuffer Sequenz konnten die einzelnen Produkte in ihrer Größe entsprechend festgelegt werden und erlaubten damit Rückschlüsse auf das Zielgen. Bei einer methylierungsspezifischen MLPA erfolgte die Hinzugabe einer bestimmten Endonuklease, welche methylierungsspezifisch innerhalb einer bestimmten Basenabfolge spaltet. Die Spaltung erfolgte nur, wenn keine Methylierung an der Sequenz vorlag. Dadurch wurden nur methylierte Zielstrukturen amplifiziert und erlaubten einen Rückschluss auf den Methylierungsstatus eines Genes [122].

Zur Analyse des Methylierungsstatus des MGMT-Gens wurde ein kommerzielles Kit von MRCP Holland (ME011-B2) und die Endonuklease HhaI Enzym (Promega R6441) verwendet. Für die Durchführung hielt man sich an die Herstellervorgaben. In dem vorbereiteten Kit wurden neben dem MGMT-Gen auch weitere Gen-Abschnitte von weiteren DNA-Reparaturmechanismen untersucht. Für jede Durchführung wurden 150 ng DNA eingesetzt und auf 5 µl mit TE-Puffer 0.1 verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 98 °C im Thermocycler denaturiert. Entsprechend den Herstellervorgaben wurde ein Hybridisierungs-Master Mix aus MLPA-Buffer und Probemix erstellt. In jede Probe wurden 3 µl des Hybridisierungsmixes hinzugefügt und die Hybridisierung im Thermocycler fortgesetzt: eine Minute bei 95 °C und 16 bis 20 Stunden bei 60 °C. Für den Ligaseschritt wurde als Vorbereitung ein Mix aus Ligase Puffer B, Ligase 65 und destilliertes Wasser für die normalen MLPA-Reaktion hergestellt. Für die methylierungsspezifische Untersuchung wurde ebenfalls das

## **Material und Methoden**

Enzym HhaI hinzugefügt. Für jeden Untersuchungsdurchlauf wurden eine normale und eine methylierungsspezifische Reaktion benötigt. Anschließend wurde die Ligation und Digestion im Thermocycler fortgesetzt. Zur endgültigen Amplifizierung erfolgte eine PCR über 35 Zyklen.

### **2.11. Kapillargelelektrophorese**

Das MLPA-Produkt wurde für die Analyse mittels Kapillargelelektrophorese mit Hilfe der Sample Loading Solution [SLS] auf 1:10 verdünnt. Der Größenstandard 600 bp wurde vorab mit destilliertem Wasser auf 1:50 verdünnt. Zu 30 µl des verdünnten Größenstandards wurden 10 µl des verdünnten PCR-Produktes hinzugefügt und gut gemischt. Somit betrug die Auftrennungssprobe insgesamt 40 µl. Um eine zu starke Verdunstung zu vermeiden, wurde auf jede Probe ein Tropfen Mineralöl gegeben. Anschließend wurde die Analyse im Sequenzierer gestartet. Die Kapillargelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzten Ladung wandern. Durch die Gelmatrix gelangen kleinere Teilchen schneller durch die Poren als größere, sodass sich die kleineren Teilchen in dem Medium schneller fortbewegen. So wurden die Amplifizierungsprodukte entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Fluoreszenzmarkierung (Cy5) konnten diese photometrisch gemessen werden. Aus den Messungen wurde ein Elektropherogramm erstellt, wobei die einzelnen Signal-Peaks einem Amplifizierungsprodukt einer bestimmten Größe entsprechen.

### 2.12. Elektropherogramm / MLPA-Auswertung

Für die Auswertung der Proben wurde der Peak-Wert aus dem Elektropherogramm verwendet. Zur exakten Auswertung wurde eine Normalisierungskonstante berechnet. Dabei wurde jeder Probenwert durch den Wert der Referenzproben dividiert. Für jede Probe konnten somit so viele Quotienten wie Referenzproben vorhanden sind erhalten werden. Aus den bestimmten Quotienten wurde der Median ermittelt und damit die Normalisierungskonstante bestimmt.

Für die methylierungsspezifische MLPA und die Ermittlung des Methylierungsgrades wurde die Normalisierungskonstante der fragmentierte durch die der unfragmentierten Probe dividiert.

Um die Kopienzahlvarianten zu ermitteln, wurde die Normalisierungskonstante der unverdauten Proben durch die durchschnittliche Normalisierungskonstante der unverdauten Referenzproben dividiert. Der so bestimmte Dosage Quotient erlaubte Rückschlüsse auf die Kopienzahlvarianten. Dies entsprach auch der Herstellerempfehlung zur Auswertung der erhobenen Daten.

#### 2.12.1. Untersuchte Reparaturmechanismen

MSH2, auch bekannt unter MutS-Protein-Homolog 2, bildet zusammen mit MSH6 ein Heterodimer und bildet damit das DNA-Reparaturprotein MutS $\alpha$  Komplex und Homomultimere, um DNA-Schäden zu beseitigen [123]. Mutationen führen in der Regel zu einer Mikrosatelliteninstabilität, welche vor allem beim hereditären non-polypösen kolorektalem Karzinom eine Rolle spielt [124]. MutS-Protein-Homolog 6 entwickelt seine Funktion erst durch Bindung mit MSH2 zu MutS $\alpha$ . Hierzu bildet es Heterodimere, um falsche Basenpaarungen an der DNA zu reparieren.

## Material und Methoden

Eine Sonderstellung nimmt MutL-Protein-Homolog 1 ein. Es vermittelt Protein-Protein-Interaktionen während der Mismatch-Erkennung und in der meiotischen Rekombination [125].

MutL-Protein-Homolog 3 bildet zusammen mit MLH1 ein Heterodimer, welches eine Endonukleaseaktivität aufweist und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Meiose. MutS-Protein-Homolog 3 bildet zusammen mit MSH2 Heterodimere (MutS $\beta$  Komplex), welche ebenfalls eine relevante Rolle in der DNA-Reparatur, vor allem bei der Loop-Reparatur, spielen. Somit führt ein Mangel an MSH3 zu einer Reduktion der Kapazität, DNA-Schäden zu reparieren, wohingegen eine Überexpression ebenfalls zu einer Abnahme der Kapazität führt [126]. Dies beruht auf der Gegebenheit, dass eine Überexpression eine vermehrte Bildung von MutS $\beta$  Komplexen zur Folge hat. Durch den Verbrauch von MSH2 kommt es zu einem relativen Überfluss an MSH6, welches hierdurch degradiert und abgebaut wird. Es entsteht ein Mangel an MutS $\alpha$ , wodurch die Menge an DNA-Veränderungen wieder ansteigt [126].

PMS2 interagiert mit MLH1 und bildet das heterodimer MutL $\alpha$ . Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von Mismatch-Paarung der DNA. Der Verlust von PMS2 führt nicht zwangsläufig zu einer Mikrosatelliteninstabilität [127]. Sämtlich untersuchten Amplicons sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

*Tabelle 9 Übersicht SALSA MLPA ME011-B2 modifiziert aus Produktbeschreibung MS-MLPA ME011-B2 Mismatch Repair genes probemix von MRC Holland*

Länge (nt)	SLSA MLPA Sonde	MV Location (HG18)	Chromosomale Position
142	PMS2 Sonde 07935-L16571	07-006.015204	7p22.1
148	MLH1 Sonde 01685-L01265	03-037.009502	3p22.1
154	PMS2 Sonde 11966-L13112	07-006.015098	7p22.1
160	MSH6 Sonde 06228-L05731	02-047.863786	2p16.3
166	MLH1 Sonde 01686-L15580	03-037.009769	3p22.2
172	MGMT Sonde 14133-L15736	10-131.155674	10q26.3
184	MSH2 Sonde 06227-L07711	02-047.483525	2p21
196	MLH1 Sonde 06222-L07712	03-037-009769	3p22.2



## Material und Methoden

202	MGMT Sonde 05670-L14276	10-131.155095	10q26.3
208	MSH6 Sonde 06230-L05733	02-047.863727	2p16.3
214	MGMT Sonde 12250-L14205	10-131.155600	10q26.3
220	MSH3 Sonde 07940-L14208	05-079.985777	5q14.1
238	MLH1 Sonde 07187-L07710	03-037.009361	3p22.2
247	MSH2 Sonde 11634-L12398	02-047.510479	2p21
265	MLH1 Sonde 06221-L01747	03-037.009621	3p22.2
274	MSH2 Sonde 06142-L00599	02-047.483938	2p21
283	MSH3 Sonde 11947-L00795	05-079.986354	5q14.1
292	MLH1 Sonde 02258-L01745	03-037.010225	3p22.2
301	MSH6 Sonde 06229-L05732	02-047.863538	2p16.3
339	PMS2 Sonde 07934-L16147	07-006.015443	7p22.1
346	MGMT Sonde 13716-L15582	10-131.155600	10q26.3
355	MLH3 Sonde 07941-L07722	14-074.587871	14q24.3
391	MGMT Sonde 14136-L12791	10-131.154982	10q26.3
400	MSH2 Sonde 06141-L13115	02-047.483612	2p21
409	MGMT Sonde 14135-L16573	10-131.155901	10q26.3

Wie bereits erwähnt, MGMT beseitigt die Methylierung von Guanin, sodass alkylierende Schäden repariert werden [114]. Dadurch, dass MGMT ein Selbstmordsubstrat ist, spiegelt der Gehalt an MGMT nicht das Expressionspotential wider bzw. ist die Menge an MGMT nur eine Momentaufnahme. Diese wird zum Beispiel im Rahmen einer immunhistochemischer Färbung erfasst. Durch eine Untersuchung der Methylierung des Gens, lassen sich Abschätzungen über das Expressionspotenzial erfassen. Die untersuchten Stellen des MGMT Gens auf Methylierung sind in der Abbildung 7 dargestellt.

## Material und Methoden

MGMT 391	CGTGCAAGCGACCTGCCACGGCCCGAGTGG TCCTGAAA <b>GCGCG</b> CGGGGGTCGTAGGACGG <b>GCGCG</b> CTTAGTGAGA
MGMT 202	CGGGCCATTTGGCAAACCTAAGGCACAGAGC CTCAGGCGGAAGCTGGGAAG <b>GCGCG</b> CGCC GGCTTGAC
MGMT 346	GCGGAGCCGAGGACCTGAGAAAAGCAGAGA <b>GCGCG</b> CGGGGGCGGGGCGGG
MGMT 172	GAAAGGCTGGGCAACACCTGGGAGGCACTT GGG <b>GCGC</b> ACCTGGAGCTCGCCCGGATGG GT
MGMT 409	GGA

Abbildung 7 MGMT Amplicons des MLPA Kit ME011-B2 modifizierte Darstellung mit den Schnittstellenbereichen der HhaI Endonuklease

### 2.13. Datenerhebung und statistische Berechnung

Die Daten der vorliegenden Studie wurden aus dem bestehenden Deutschen Nebennieren-Karzinom-Register als auch aus der Datenbank der FIRM-ACT Studie entnommen und bei Bedarf ergänzt. Waren Daten unvollständig oder nicht eindeutig, so wurden weitere Daten anhand von Arztbriefen, Laborwerten und OP-Berichten eingeholt und die entsprechenden Informationen durch die an dieser Studie teilnehmenden Zentren anonymisiert vervollständigt. Das Tumormaterial wurde, sofern nicht vorhanden, bei den jeweiligen Pathologien an-

## **Material** und Methoden

gefordert. Sämtliche Daten wurden in einer eigenen Datenbank erfasst und um die eigenen Messungen ergänzt. Die Daten wurden mit standardisierten statistischen Berechnungen analysiert. Unter anderem wurde bei komplexeren Fragestellungen auch die Unterstützung von Bioinformatikern eingeholt. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven erstellt und multivariable Überlebensanalysen mit Hilfe der Cox-Regression. Die Analyse der MLPA-Resultate erfolgte bei ordinalskalierten Variablen mit Hilfe des nicht parametrischen Mann Whitney U Tests. Die Berechnung der Daten erfolgte mit Hilfe computergestützter Software: EXCEL (Microsoft, Redmond, USA), SPSS (IBM Chicago, IL, USA) und Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Kohorten Daten

Als Responder wurden die Patienten, welche unter STZ-Gabe eine stabile Erkrankung oder sogar eine Reduktion der Tumormasse hatten, definiert. Dabei wurden vier Kategorien festgelegt, anhand derer die Patienten nach dem ersten Follow-up bewertet wurden. Eine „complete response“ (CR) zeigte einen vollständigen Rückgang der Tumormasse, wohingegen eine „partial response“ (PR) eine Reduktion der Tumormasse um mehr als 30 % definierte. Als „stable disease“ (SD) wurde eine Änderung der Tumormasse von maximal 30 % (Zu- oder Abnahme) bezeichnet. Eine „progressive disease“ (PD) ging mit einer Zunahme der Tumormasse um mehr als 30 % einher.

In der Überlebenszeitanalyse mithilfe der Kaplan-Meier-Kurven konnte in unserer Kohorte kein signifikanter Unterschied im OS festgestellt werden.

Das Gesamtüberleben (OS) erstreckte sich zeitlich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod oder bis zum letzten dokumentierten Follow-up, falls keine weiteren Angaben vorhanden waren.

Außerdem erhoben wir das OS unter der Chemotherapie, dieser umfasst den Zeitraum von Gabe STZ bis zum Tod oder letztem follow-up des Patienten. Hier konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,002$ ).

## Ergebnisse

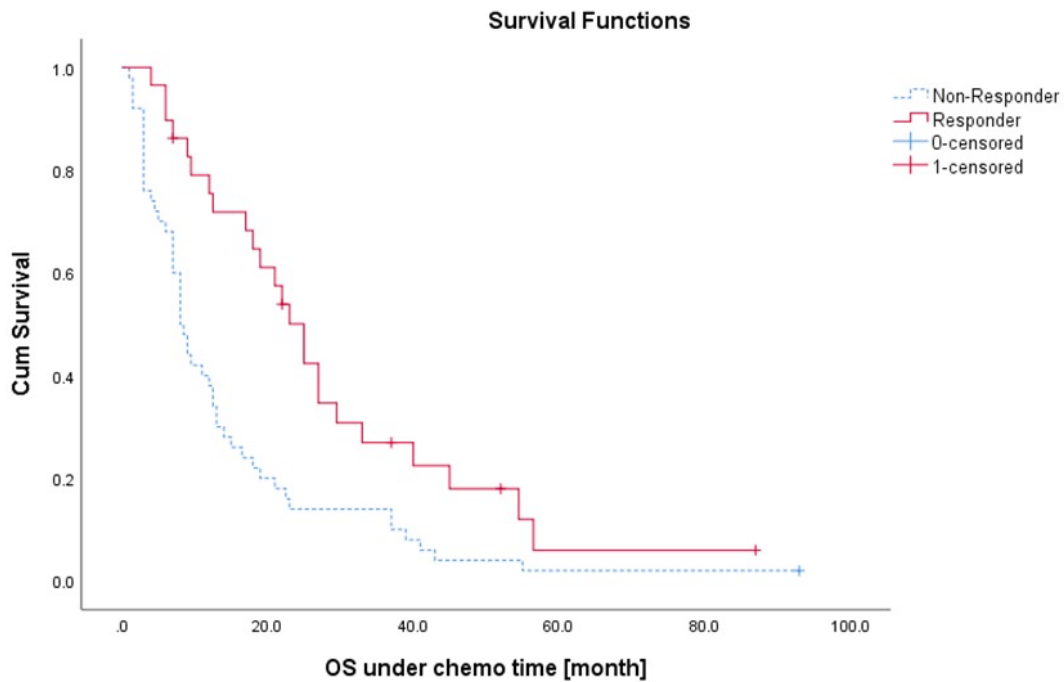


Abbildung 8 Gesamtüberleben unter der Chemotherapie STZ,  $p = 0,002$

Ähnlich konnte ein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben (PFS) zwischen Responder und Non-Responder bei Behandlung mit STZ ermittelt werden ( $p=0,0001$ ), was auch zu erwarten war. So trat ein Progress in der Gruppe der Responder später ein als bei den Non-Responder.

Das PFS erstreckte sich zeitlich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Fortschreiten der Tumorerkrankung, welches sich im Rahmen von Follow-ups und (Re-)Staging zeigte. In unserer Kohorte befanden sich 29 Responder (36,7%) und 50 Non-Responder (63,3%).

## Ergebnisse

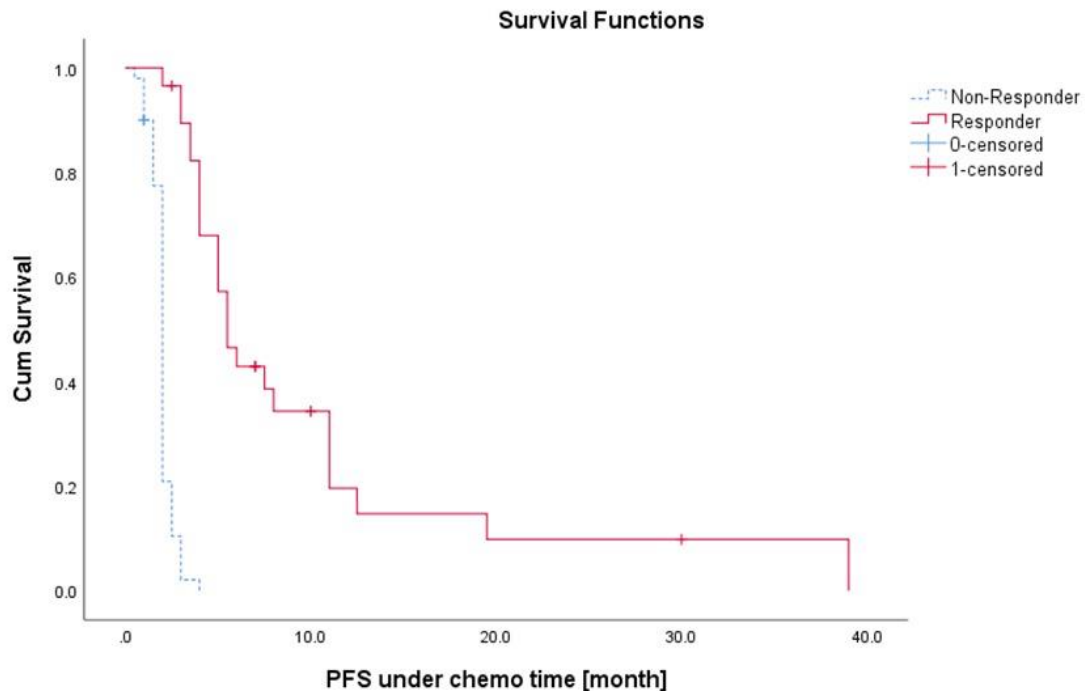
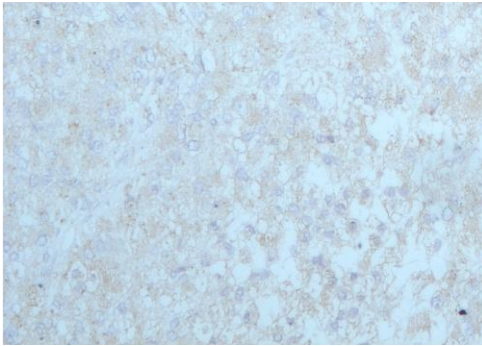


Abbildung 9 Progressionsfreie Überleben unter der Chemotherapie STZ,  $p = 0,0001$

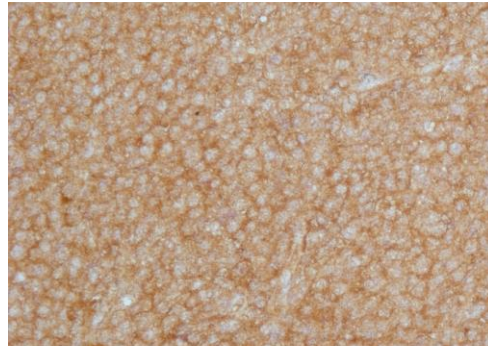
### 3.2. GLUT-2 Expression

In der Expressionsanalyse mittels immunhistochemischer Färbung von GLUT-2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Responder und Non-Responder. Das Muster der Färbung gestaltete sich variabel, so zeigten ein Teil der Proben eine stärkere Färbung der Membran ( $n=39$ ; (49,4 %)), eine homogene Färbung zwischen Membran und Zytoplasma ( $n=34$ ; (43 %)), eine membranär schwächere Färbung ( $n=2$ ; (2,5 %)) und keine Färbung ( $n=4$ ; (5,1 %)) unter allen untersuchten ACCs (s. Abbildung 9). Der Median der Expression war identisch. Der H-Score lag bei 2 für die Membran und bei 1 für das Zytoplasma.

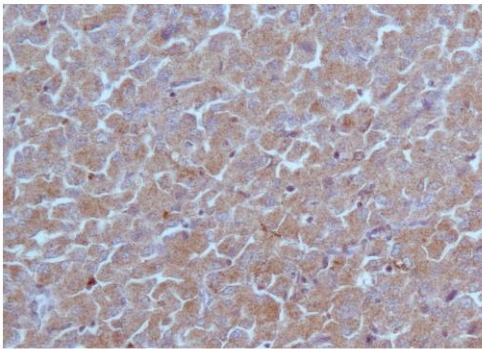
## Ergebnisse



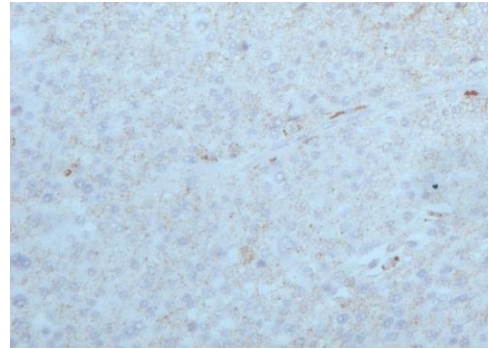
**A**



**B**



**C**



**D**

*Abbildung 10 Beispielbilder der GLUT-2 Expression von ACC in 10-facher Vergrößerung: A: schwach membranär ohne zytoplasmatisch, B: stärker membranär als zytoplasmatisch, C: stärker zytoplasmatisch als membranär, D: keine membranäre Expression*

## Ergebnisse

*Tabelle 10 Übersicht GLUT-2 Expression Non- Responder*

Non-Responder (n=50) membranäre GLUT-2 Expression		
H Score	(n)	
0	4	8 %
1	10	20 %
2	23	46 %
3	13	26 %
Zytoplasmatische GLUT-2 Expression		
H Score	(n)	
0	6	12 %
1	20	40 %
2	24	48 %
3	0	0 %

*Tabelle 11 Übersicht GLUT-2 Expression Responder*

Responder (n=29) membranäre GLUT-2 Expression		
H Score	(n)	
0	0	0 %
1	12	41,3 %
2	11	38 %
3	6	20,7 %
Zytoplasmatische GLUT-2 Expression		
H Score	(n)	
0	1	3,5 %
1	17	58,6 %
2	9	31 %
3	2	6,9 %



## Ergebnisse

Es gab vier Proben von Non-Responder, welche keine Expression von GLUT-2 zytoplasmatisch und membranär aufwiesen (s. Abbildung 11).

Die Expression der GLUT-2-Proteine erfolgt im raschen Einbau in die Membranen, sodass die Membranen in der Immunhistochemie mehrheitlich eine stärkere Anfärbung aufwiesen.

Im direkten Vergleich zum gesunden Nebennierengewebe konnte eine tendenziell stärkere Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dies zeigte sich vor allem in einer Mehrexpression im Zytoplasma. Jedoch konnten auch hier keine statistisch signifikanten Ergebnisse ermittelt werden.

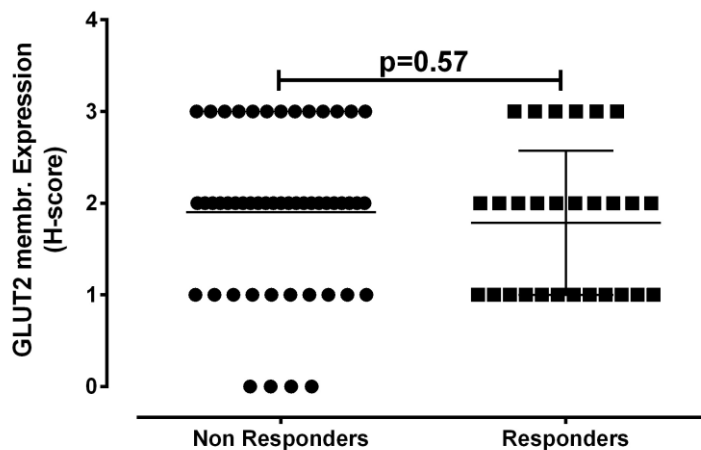


Abbildung 11 GLUT2 Expression membranär

## Ergebnisse

### 3.3. Methylierungsstatus

Im verwendeten Kit wurden neben dem MGMT-Gen auch weitere Gene von DNA-Reparaturmechanismen auf Hypermethylierung analysiert. Darunter fielen unter anderem Analysen zu MSH2, MSH6, MLH1, MSH3, MLH3 und PMS2.

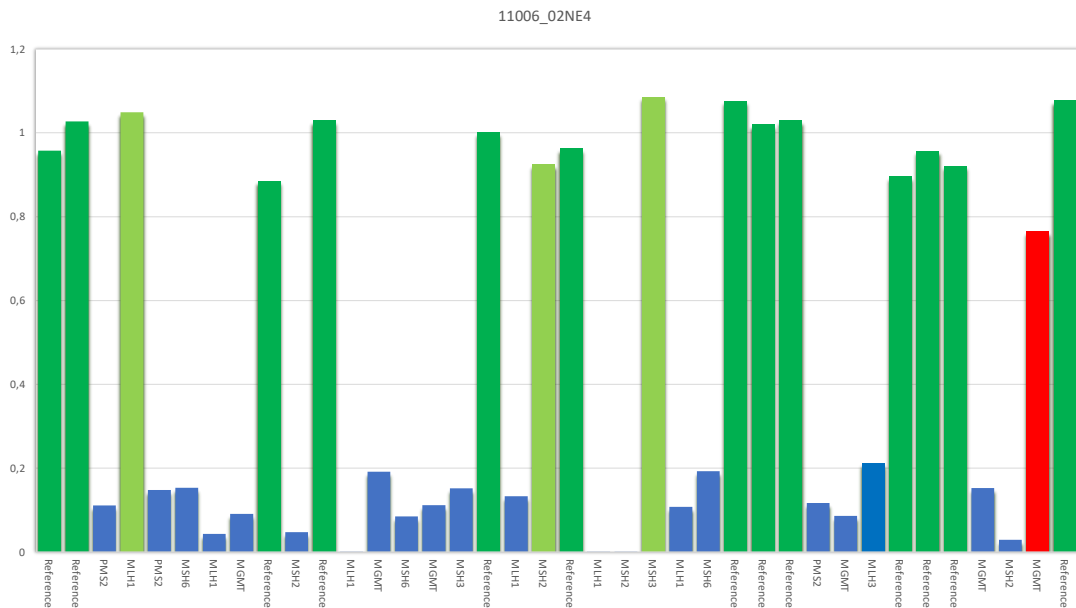


Abbildung 12 Beispiel einer MLPA Probe, Messwerte in Excel übertragen und mit Hilfe eines Balkendiagramms veranschaulicht, Fragmente bzw. Amplicons nach Größe sortiert, von links nach rechts aufsteigender Größe.

In der vorliegenden Analyse konnte nur bei MGMT ein signifikanter Unterschied zwischen Responder und Non-Responder festgestellt werden. Die anderen untersuchten Genbereich der ausgewählten DNA-Reparaturmechanismen zeigten keinen Einfluss auf das Therapieansprechen zu haben (s. Tabelle 12).

## Ergebnisse

*Tabelle 12 MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, MSH3, PMS2 und MGMT Methylierung Responder vs. Non-Responder mittels Mann-Whitney-U-Test*

<b>Amplicon</b>	<b>Responder vs. Non-Responder p-Wert</b>
MSH2 184	0,3389
MSH2 274	0,4932
MSH2 400	0,3411
MSH6 160	0,3775
MSH6 206	0,4444
MSH6 301	0,2194
MLH1 166	0,3207
MLH1 196	0,3008
MLH1 238	0,2524
MLH1 265	0,3590
MLH1 292	0,3633
MLH3 355	0,0760
MSH3 220	0,2558
PMS2 142	0,4196
PMS2 154	0,2696
PMS2 339	0,2538
MGMT 172	0,1302
MGMT 202	0,0844
MGMT 214	0,3435
MGMT 346	0,0170
MGMT 391	0,1908
MGMT 409	0,0496

So zeigt die Methylierung von MSH2 keinen Unterschied zwischen den Responder und Non-Responder. In einer Subgruppenuntersuchung der Non-Responder zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied bzgl. der Methylierung des Amplicon 184 mit einem signifikanten Unterschied im Mann-

## Ergebnisse

Whitney-U-Test ( $p= 0,03235$ ). Hier zeigten mehr männliche Patienten eine Methylierung als weibliche (s. Abbildung 12).

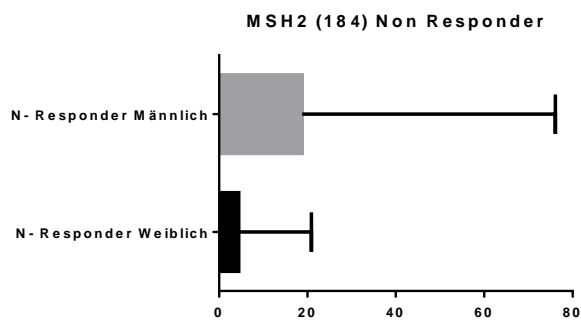


Abbildung 13 MSH2 (184) Non Responder Männlich versus Weiblich,  $p=0,03235$

Auch die Methylierung von MSH6, MLH1 und PMS2 zeigte keinen relevanten Einfluss auf die Therapie zu haben.

Wohingegen MLH 3 eine tendenziell stärkere Methylierung bei den Responder aufwies ( $p= 0,0760$ ), aber eine statistische Signifikanz konnte nicht festgestellt werden.

## Ergebnisse

Mit Hilfe des verwendeten Kits konnten insgesamt sechs verschiedene Stellen im Promotor-Bereich des MGMT-Genabschnitts untersucht werden. Innerhalb der Subgruppenanalyse der Frauen bestanden signifikante Unterschiede zwischen den weiblichen Responder und Non-Responder in der Mann-Whitney-U Analyse bei den Amplicon 346 ( $p=0,0114$ ) und Amplicon 202 ( $p=0,0326$ ).

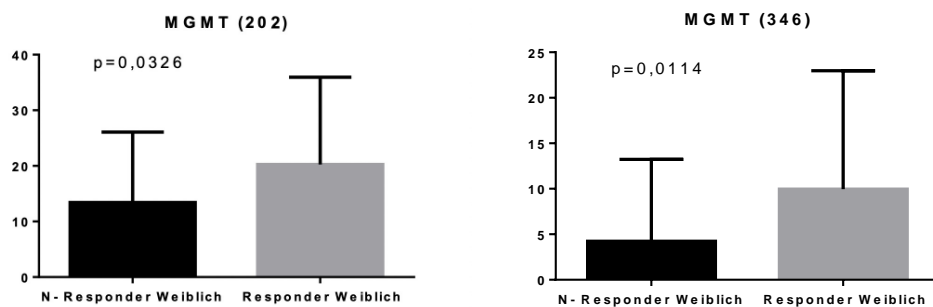


Abbildung 14 MGMT (202) und (346) Non-Responder weiblich versus Responder weiblich

Bei der MGMT-Stelle des Amplicons 409 (im Bereich des Intron 1, 463 Nukleotide nach ATG) waren lediglich zwei der berechneten Schwellenwerte kennzeichnend, sodass hier nicht von einem konstanten Schwellenwert ausgegangen werden kann. Auffällig am Amplicon 409 war auch eine erhöhte Rate an Hypermethylierung in der Gruppe der Responder. Mittels Mann Whitney U Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Responder und Non-Responder ermittelt werden ( $p=0,0496$ ). Ein eindeutiger Grenzwert konnte dabei jedoch nicht bestimmt werden.

## Ergebnisse

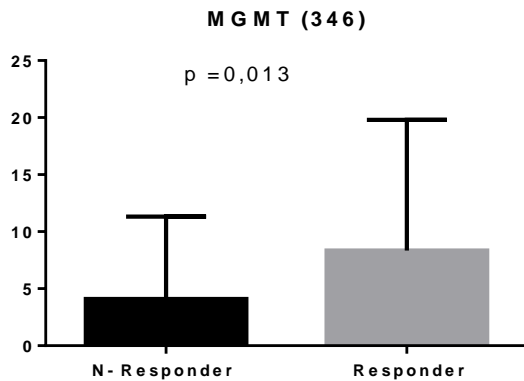


Abbildung 15 MGMT (346) Non Responder versus Responder

In den untersuchten Stellen zeigte die MGMT-Stelle des Amplicons 346 (93 Nukleotide nach ATG) einen signifikanten Unterschied zum Vorteil der Gruppe der Responder.

Die Bestimmung eines Schwellenwertes der Methylierung von Amplicon 346 erfolgte mit Hilfe bioinformatischer Analysen. Hierzu wurden das Minimum und Maximum bestimmt sowie der Median berechnet. Anschließend wurde der Schwellenwert, beginnend mit dem Minimum bis zum Maximum, dahingegen überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Non-Responder und Responder über oder unter dem Schwellenwert besteht. Werte, die dem Schwellenwert entsprachen, wurden der Untergruppe zugeordnet. Anschließend erfolgte der nächste Durchlauf. In diesem wurde der Schwellenwert um 10 % des Medians erhöht und erneut überprüft. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Schwellenwert das Maximum überschritt. Hierbei waren bis zu einem oberen Grenzwert konstant signifikante Werte ermittelbar.

Für das Amplicon 346 konnte der Grenzwert 7,98 ermittelt werden. In unserer Kohorte lagen 65 Patienten unter (oder gleich) und 14 Patienten über diesem Schwellenwert. Es zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ( $p=0,013$ ) im OS bei Patienten unter der STZ-Therapie (Zeitraum ab der ersten STZ Gabe bis Ereignis-

## Ergebnisse

eintritt), die oberhalb des Grenzwertes lagen. Diese Patienten hatten folglich ein längeres Überleben als die Patienten, deren Wert unterhalb des Grenzwertes lag.

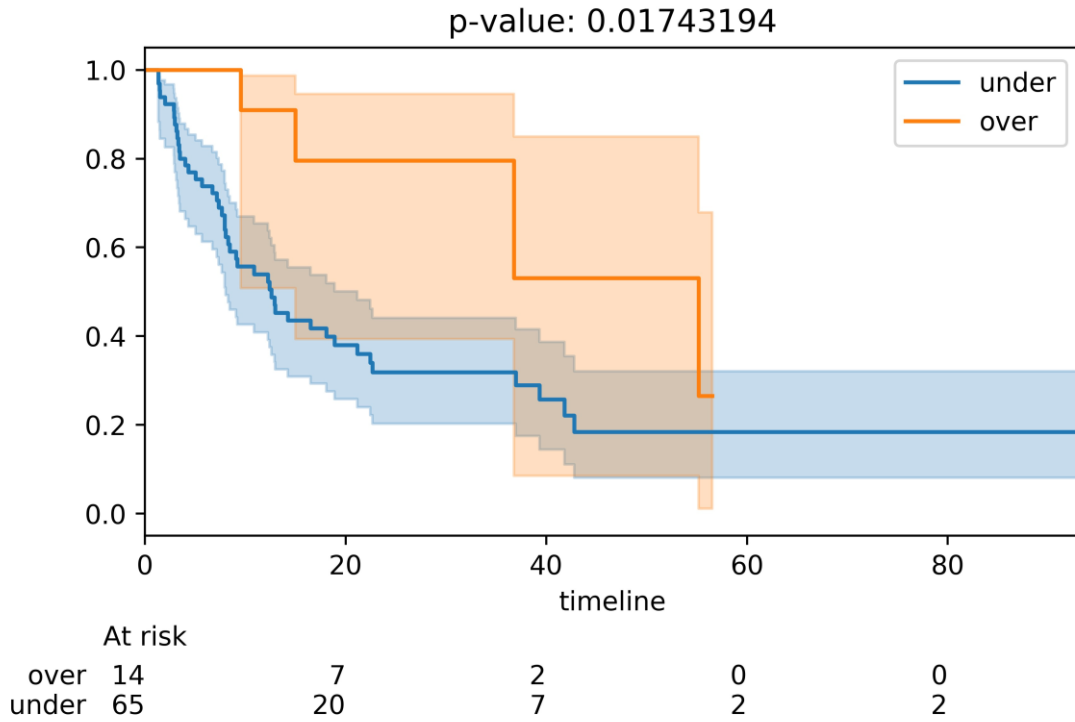


Abbildung 16 Überlebenskurve in Bezug auf MGMT 346 Methylierung

### 4. Diskussion

#### 4.1. Daten und Versuchsaufbau:

Die vorliegende Arbeit handelt von Versuchen an Tumormaterial von Patienten mit Nebennierenrindenzinomen und Analysen der entsprechenden Patientendaten, welche anhand dokumentierter Untersuchungen und Nachsorgeprotokollen erfasst wurden, und Daten der FIRM-ACT Studie, der ersten klinischen Phase III Studie, die von den teilnehmenden Zentren sowie des Würzburger Nebennierenregisters erhoben wurden. Trotz der niedrigen Inzidenz des Nebennierenkarzinoms konnte somit auf eine große Anzahl von Patienten zurückgegriffen werden. In der analysierten Kohorte konnten 79 Patienten eingeschlossen werden, wovon 29 (36,7%) Responder auf STZ + M waren. Hier lag die Ansprechrate deutlich höher als zum Beispiel in der FIRM-ACT Studie, bei der die objektive Ansprechrate bei 9,2% auf STZ + M lag [87]. Dies beruht unter anderem auf der Tatsache, dass für die vorliegenden Analysen nur Patienten eingeschlossen wurden, die mindestens einen Zyklus STZ erhalten hatten. Außerdem wurde das objektive Ansprechen anders als in der FIRM-Act Studie definiert. Auch Patienten mit einer stabilen Erkrankung wurden eingeschlossen.

Unvollständige Datensätze von Patienten wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Außerdem musste ausreichend Tumormaterial für die Untersuchungen vorliegen. Ein geringer Teil der notwendigen Daten musste durch OP-Berichte, Befunde, Laborwerte und anhand von Arztbriefen ergänzt werden. Die Verlaufsdaten wurden analog der Follow-up Untersuchungen erhoben und in das entsprechende Register und die entsprechende Datenbank eingepflegt. Das Tumormaterial stammte mehrheitlich von operativen Präparaten ohne zytotoxische Vorbehandlung. Diese wurden für die histologischen Untersuchungen standardisiert in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Auswirkungen der Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung auf die DNA sind möglich.



## Diskussion

Das untersuchte Gewebe stellt im Gesamten eine Momentaufnahme der Erst-diagnose bzw. des Zeitpunkts der Operation dar. Hierdurch konnten Veränderungen durch eine zytotoxische, adrenostatische oder adrenolytische Therapie sowie zelluläre Veränderungen im Rahmen eines progredienten Tumorgeschehens ausgeschlossen werden. Veränderungen, die erst im Verlauf der Erkrankung (z. B. Metastasen) oder im Rahmen der Therapie auftreten konnten, sind in der Arbeit somit nicht berücksichtigt.

Die histologische und immunhistochemische Färbung sowie die MLPA entsprechen standardisierten zu diagnostischen Zwecken durchgeführten Verfahren. Die verwendeten Methoden können folglich wiederholt und möglicherweise in der Routinediagnostik etabliert werden.

### 4.2. GLUT-2 Expression als Voraussetzung

Die Aufnahme von Glukose in die Zelle hängt von Transportproteinen und deren Expression ab. Eines dieser Transportproteine ist GLUT-2, welcher sich in den Membranen von Zellen befindet. Dieser transportiert Glukose entlang eines Konzentrationsgradienten. Das Ausmaß der Expression wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, so zeigen tendenziell stoffwechselintensive Zellen eine höhere Expression. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von GLUT-2 eine Voraussetzung für die Aufnahme von STZ in die Zellen ist und somit für die Entfaltung der zytotoxischen Wirkung [102]. Der Transport von STZ mit Hilfe von GLUT-2 ist durch eine strukturelle Ähnlichkeit mit Glucose bedingt, da STZ an der C2 Position Glukose enthält. Erst dadurch wird der Transport des Glucosamin über den Glucose Transporter GLUT-2 ermöglicht. Wir untersuchten die Expression in den Proben mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung und konnten hierdurch sowohl die Expression im Zytoplasma als auch den membranären Einbau bestimmen.

## Diskussion

Verwendet wurde dazu ein spezifischer monoklonaler Antikörper (G3900-15 N, Biomol), der den menschlichen GLUT-2 bindet und für immunhistochemische Färbungen geeignet ist. Zur Kontrolle erfolgten Färbungen an verschiedenen GLUT-2 hoch exprimierenden Geweben wie Leber und Niere. Bevor die Schnitte der ACC gefärbt wurden, ermittelten wir die korrekte Konzentration zum Erzielen einer optimalen Färbung. Theoretisch wären Kreuzreaktionen mit anderen strukturell verwandten Proteinen der GLUT Transporter möglich. Laut Herstellerangaben wurden jedoch Kreuzreaktionen auf GLUT-1 und GLUT-3 ausgeschlossen [128]. Zur Bemessung der Expression bildeten wir einen semi-quantitativen H-Score, der durch zwei Untersucher unabhängig voneinander ermittelt wurde. Bei zu großer Abweichung erfolgten eine erneute Evaluation und Ermittlung eines neuen H-Score. Durch die wiederholte Analyse unabhängig von beiden Auswertern konnte ein potentiell Bias (gegenseitige Beeinflussung) reduziert werden. Der Nachteil dieser Methode besteht nämlich darin, dass immer die Gefahr besteht, dass die Proben bzw. die Ergebnisse untersucherabhängig ermittelt werden und eine Objektivität dadurch nicht gewährleistet werden kann.

In der analysierten Kohorte war kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Responder und Non-Responder erkennbar. Aber der zytotoxische Effekt von STZ basierte nicht allein auf der Expression von GLUT-2 und dem Ausmaß der Expression. So zeigten in der Kohorte auch Non-Responder eine Expression von GLUT-2.

Zu beachten ist hier jedoch, dass vier der Proben eine fehlende membranäre und zytoplasmatische GLUT-2 Expression aufwiesen, sodass eine Aufnahme von STZ in die Tumorzellen nicht möglich war. Diese Proben stammten alle von Non-Responder. Dies bestätigt, dass die membranäre Expression von GLUT-2 in den Tumorzellen eine erste Voraussetzung ist, dass STZ seine zytotoxische Wirkung entfalten kann. Bei fehlender Expression hingegen kann dieser Effekt nicht eintreten. Dies wurde schon von Schnedl et. al in vitro anhand von GLUT-2 exprimierenden Insulinoma versus nicht GLUT-2 exprimierenden Zellen von

## Diskussion

Ratten gezeigt [102]. So kann zur Prognoseabschätzung auf ein potenzielles Ansprechen einer Therapie mit STZ die Expression von GLUT-2 nicht isoliert betrachtet werden. Vielmehr ist in der Prognoseabschätzung eine Stufendiagnostik erforderlich. Dabei gilt die membranäre Expression als hartes Kriterium. Es ist daher von entscheidender Relevanz, vor einer Therapie mit STZ die membranäre Expression von GLUT-2 zu kennen. Diese Untersuchung könnte beispielsweise mittels immunhistochemischer Färbung erfolgen. Außerdem muss bedacht werden, dass GLUT-2 entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert. Hierdurch wäre theoretisch ein Transport von intra- nach extrazellulär möglich, welches auf die STZ-Therapie einen negativen Einfluss haben könnte. Diese und auch weitere in vivo Mechanismen bedürfen weiterer Untersuchungen, um deren Effekte genauer zu untersuchen. Zudem wäre es wichtig zu wissen, ob es weitere Mechanismen gibt, die eine Rolle im Transport von STZ über die Zellmembran spielen, zumal menschliche Zellen weitere GLUT Subtypen exprimieren und nicht klar ist, ob diese auch in der Lage sind, STZ zu transportieren.

### 4.3. Ergebnisse der MLPA

Die Ergebnisse der MLPA gaben keine Hinweise darauf, dass Methylierungen der DNA-Reparaturmechanismen (MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, MSH3 und PMS2) Einfluss auf das Therapieansprechen hatten. Bis auf MGMT konnte keine eindeutige Tendenz oder ein statistischer Unterschied ermittelt werden. Dies legt nahe, dass die untersuchten Reparatur-Gene keine Rolle in der Therapie mit STZ spielen. Wohingegen der Methylierungsstatus des MGMT Gens eine therapierelevante Entscheidung bei der Therapie von Glioblastom oder anaplastischem Astrozytom mit Temozolomid hat [115, 129]. Hier konnte bei MGMT Hypermethylierung und Temozolomid Therapie ein längeres Gesamtüberleben festgestellt werden.

## Diskussion

In verschiedenen Tumorentitäten scheint MGMT eine häufigere Promotor Methylierung aufzuweisen. Hierdurch erfolgt eine geringe Expressierung des MGMT Gen und Methylguanin kann weniger repariert werden, da ein MGMT eine Alkylierung vom Methylguanin entfernen kann und so die Methylierung behebt, was wiederum zum Zelltod führen kann [130].

Vor allem in neuroendokrinen Tumoren (NET) konnte festgestellt werden, dass Methylierung des MGMT Gen gehäuft vorkommen [131, 132]. Insgesamt gibt es bei NET eine hohe Anzahl an weiteren methylierten Genen (>3 von den Untersuchten Genen: hMLH1, p16, APC, MEN1, APC, RARbeta, MGMT, COX2, p14, THBS1, TIMP3, E-cadherin, HIC1, RASSF1). Walter et al. konnten feststellen, dass eine hohe Anzahl an methylierten Genen suggestiv für einen „Hypermethylierungs Phänotyp“ bei NET ist und eine MGMT Methylierung mit vorteilhaftem progressionsfreiem Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) ab dem Zeitpunkt der Erstgabe einer alkylierenden Chemotherapie einhergehen [133].

Liegt MGMT hypermethyliert bei einem „Hypermethylierungs-Phänotyp“ vor, so verhält sich die Prognose positiv unter der Therapie mit einer alkylierenden Chemotherapie. Welche Gene jedoch für diesen Phänotyp relevant sind, ist nicht genau definiert. In den NET Studien wurden vor allem hMLH1, p16, APC, MEN1, APC, RARbeta, MGMT, COX2, p14, THBS1, TIMP3, E-cadherin, HIC1, RASSF1, THBS1 untersucht. In der vorliegenden Studie wurde lediglich MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, MSH3 und PMS2 auf eine Hypermethylierung untersucht. Hier zeigte sich kein Hypermethylierungs Phänotyp. Es wäre daher wichtig, MGMT in der Zusammenschau weiterer Gen Methylierungen zu betrachten und herauszufinden, ob sich ein Hypermethylierungsphänotyp bestätigen lässt und inwiefern dieser sich bei ACCs auswirkt und möglicherweise auch Rolle bei der Tumorgenese spielt.

Bei andere Tumorentitäten spielt der Methylierungsstatus von MGMT für die Therapieentscheidung mit methylierenden Chemotherapeutika schon jetzt eine entscheidende Rolle. Ein Beispiel ist hier die Therapie beim Glioblastom [116].

## Diskussion

Hier konnte Hegi et al. zeigen, dass der Methylierungsstatus von MGMT bei der Therapie mit Temozolomid ein prädiktiver Faktor ist und Patienten mit einer MGMT Hypermethylierung ein signifikant längeres OS (median 21,7 Monate vs. 15,3 Monate ( $p=0,007$ )) aufwiesen. Ähnliches konnte bereits von Walter et al. [133] auch für NET zeigen bei Einsatz von Temozolomid, Dacarbazin und STZ. Hier wurde bei NET der Methylierungsstatus mittels Pyrosequenzierung untersucht und retrospektiv analysiert. Dabei zeigte sich ein signifikant längeres PFS und OS ab dem Zeitpunkt der Alkylanz-Gabe bei MGMT Promotor Methylierung (26,4 Monate vs. 10,8 Monate ( $p = 0,002$ ) und 77 vs. 43 Monate ( $p = 0,026$ )). Jedoch zeigten die Ergebnisse insgesamt eine große Heterogenität, sodass weitere prospektive Untersuchungen bei NET und MGMT Methylierung als prognostischer Faktor bei der Therapie mit Temozolomid (alkylierende Chemotherapie) erforderlich sind [134].

Eine Vielzahl weiterer Faktoren können insgesamt die Resultate beeinflussen. Vor allem die Qualität und Integrität der DNA spielen hierbei eine relevante Rolle. Einflussfaktoren wie Alter, Lagerung und Verarbeitung von Gewebeproben und somit der DNA haben ebenfalls Auswirkungen. So wurde schon vom Kit-Hersteller angegeben, dass Lagerung und Alter der DNA Auswirkungen auf die Gen-Kopienzahlvariation haben kann. Hier zeigt sich ein ACC spezifisches Problem, da es sich beim ACC um eine seltene Erkrankung handelt, ist die Möglichkeit an native DNA von Tumoren zu gelangen sehr schwer.

Durch die Fixierung und Konservierung des Gewebes in Paraffin kann es zudem zu unspezifischen Veränderungen in der DNA kommen und auch unspezifische Alkylierungen sind unter anderem möglich. Diese Veränderungen geschehen während der Verarbeitung des Gewebes und haben in der Analyse insgesamt nur einen geringen Einfluss. So werden diese Effekte auch durch interne Standardproben und Kontrollen der MLPA in den Berechnungen der Quotienten in ihren Auswirkungen korrigiert. Paraffin-fixiertes Gewebe unterliegt standardisierten und international etablierten Verfahren, sodass Gewebeproben effektiv konserviert werden können. Zahlreiche Studien greifen auf paraffin-

## Diskussion

fixiertes Gewebe zurück und zeigen keinen nachteiligen Effekt auf DNA-Analysen und Immunhistochemische Färbungen [135-137].

Insgesamt konnte mit den erhobenen Daten ein prädiktiver Marker (Amplicon 346; MV Location (HG18) 10-131.155600) für eine Therapie mit STZ identifiziert werden. Dies wäre ein erster Schritt hin zu einer individualisierten Chemotherapie mit STZ bei der Behandlung von ACCs.

Hierdurch könnten Patienten identifiziert werden, welche von einer Therapie mit STZ profitieren und bei denen das Voranschreiten der Erkrankung eingedämmt werden kann. Ebenso könnten Patienten, die von STZ nicht vorrangig profitieren, erkannt und primär einer anderen Therapie zugeführt werden.

So weist die Methylierung im Bereich des MGMT 346 Amplicons einen signifikanten ( $p = 0,0174$ ) Einfluss auf die Response auf. Auch das Amplicon 409 war in der Gruppe der Responder stärker methyliert als in der Gruppe der Non-Responder. Laut Hersteller liegt der Bereich des Amplicons 346 im Gebiet von zwei Methylierungs-Hotspots. Die anderen untersuchten MGMT-Stellen zeigten keine relevanten Auffälligkeiten. Für die Untersuchungen wurde das Kit von MRC Holland (ME011-B2) genutzt, welches allerdings aktuell nicht mehr erhältlich ist.

Daneben gibt es zahlreiche weitere tumoreigene Einflussfaktoren, die eine Response auf STZ beeinflussen können. Ein möglicher Einflussfaktor könnte die Wirkung von Cortisol sein und die Tatsache, dass im Rahmen einer STZ Monotherapie eine rasche Resistenz gegen STZ entwickelt werden kann. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Expression von MGMT steigern. Dies geschieht durch glukokortikoidsensitive Elemente im Promotorbereich des MGMT Gens [120, 138].

Des Weiteren gibt es auch andere DNA-Modifizierungen wie z. B. Hydroxymethylierung bei 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC). Eine Hydroxymethylierung eines Gens fördert die Expression und könnte daher bei einer Hydroxymethylierung des MGMT-Gens ebenfalls die Expression von MGMT fördern. Dies hat

## Diskussion

einen komplett anderen Effekt auf die MGMT-Expression und könnte das Ansprechen auf STZ nachteilig beeinflussen sowie Resistenzen fördern [139]. Aktuell ist nur wenig zur 5hm-C des MGMT-Gens bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Untersuchungen des MGMT-Promotors beim Glioblastom mit Hilfe von Bisulfitbehandlung und durch PCR keine Unterscheidung zwischen 5m-C und 5hm-C erfolgt [140, 141]. Daher kann das Ausmaß von 5-hmC und 5m-C mit den herkömmlichen Methoden nicht eindeutig bestimmt werden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass 5-hmC auch die methylierungsspezifische Restriktionsendonuklease HhaI hemmt. Es müssen demnach weitere Analysen erfolgen. So könnten Methyl-DNA Immunpräzipitation oder Methylated-CpG Island Recovery Assay die Sensitivität und Spezifität erhöhen, mit denen Patienten für den personalisierten Einsatz von STZ beim ACC identifiziert werden können [142].

Um die vorliegenden Ergebnisse zu stärken, wäre es sinnvoll, die Untersuchungen an einer unabhängigen Kohorte zu wiederholen und abzugleichen. Zusätzlich wäre es sinnvoll, die potenziellen Einflussfaktoren genauer zu erfassen und entsprechend zu berücksichtigen. Hierzu könnte in den Follow-up-Untersuchungen neben der bildgebenden Diagnostik auch der Hormonstatus durch Bestimmung von Cortisol oder Gesamtcortisol ermittelt werden. Außerdem wäre es interessant, den Methylierungsstatus im Verlauf zu untersuchen. Sollte es zu einer weiteren OP kommen, könnte das Tumormaterial auf den MGMT-Methylierungsstatus und GLUT-2 hin untersucht werden, um mögliche Veränderungen im Verlauf der Therapie zu detektieren.

## Diskussion

### 4.4. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Kombination des Methylierungsstatus des MGMT-Gens und die membranäre GLUT-2 Expression als prognostischer Faktor bei der Therapie mit STZ betrachtet werden kann.

So ist die membranäre Expression von GLUT-2 ein erstes Kriterium, dass STZ in die Tumorzellen aufgenommen und hier die zytotoxische Wirkung entfalten kann.

Vor allem das Amplicon 346 des MGMT-Gens zeigte sich als positiver prädiktiver Wert und bestätigte damit, ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten, dass der Methylierungsstatus des MGMT-Gens eine Prognoseabschätzung beim Einsatz alkylierende Chemotherapie ermöglicht. So ist die Bestimmung des Methylierungsstatus in der Diagnostik und Therapieentscheidung des Glioblastoms bereits etabliert. Da Patienten mit Glioblastom und kombinierter Radio-Chemotherapie beim Vorliegen eines methylierten MGMT-Promotors ein signifikant längeres OS aufwiesen als nicht methylierte [116]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei neuroendokrinen Tumoren während einer Therapie mit alkylierender Chemotherapie gezeigt werden [134].

Insgesamt ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Ergebnisse auch auf ACCs übertragen lassen. Dies konnte ebenfalls durch die vorliegenden Untersuchungen aufgezeigt werden. Damit in Zukunft die Therapie mit STZ gezielter verabreicht werden kann, müssen jedoch die Ergebnisse verstärkt betrachtet und durch erneute Untersuchungen anhand einer unabhängigen Kohorte bestätigt werden. Hierzu sollte im Rahmen einer Stufendiagnostik zuerst die membranäre Expression von GLUT-2 mittels immunhistochemischer Färbung untersucht werden. Nur durch eine ausreichende Expression kann sichergestellt werden, dass STZ in die Tumorzellen aufgenommen werden kann [102]. Dies stellt einen ersten wichtigen Schritt hin zu einer individualisierten Therapie beim ACC



## Diskussion

dar. Bei einer fehlenden membranären GLUT-2 Expression sollte eher nicht der Einsatz von STZ erfolgen.

Der nächste Schritt wäre die Untersuchung des Methylierungsstatus des MGMT-Promotors. Hier wäre es sinnvoll, die von uns genutzte MLPA zu verwenden, aber auch der Vergleich mit anderen Methoden sollte berücksichtigt werden. Vor allem die Stelle des Promotor-Abschnitts mit dem Amplicon 346 und 409 sollte vermehrt beachtet werden. Es wäre jedoch auch sinnvoll, weitere Stellen zu untersuchen, um deren Einfluss auf die Expression des MGMT-Gens zu evaluieren.

Eine der häufig angewendeten Methoden zur Analyse von MGMT-Promotor-Methylierung ist die Bisulfit Konversion und Pyrosequenzierung, welche den Vorteil bietet, mehrere CpG Inseln parallel untersuchen zu können [143]. Hierdurch könnten weitere Bereiche der Promotorregion des MGMT untersucht und der prädiktive Nutzen zur Therapieevaluierung weiter analysiert werden. Jedoch bedarf es hierbei eines Pyrosequenzierers. Eine reine methylierungsspezifische PCR ist leichter umsetzbar und lässt sich einfacher in der Laborroutine etablieren und geht daher auch mit geringeren Kosten einher.

Zusätzlich muss der Einfluss von Glukokortikoide genauer untersucht werden. Da die Expression von MGMT über Glukokortikoide induziert werden kann [120, 138]. Um diese Wirkung genauer zu untersuchen, könnte z. B. die Expression von MGMT bei Cortisol produzierenden ACC Zelllinien analysiert werden. In einem nächsten Schritt könnte man die Cortisolsynthese medikamentös hemmen und die Auswirkung auf die Expression sowie die Auswirkungen von STZ in verschiedenen Konzentrationen erfassen. Außerdem wäre es wichtig zu wissen, wie lange dieser Effekt andauert, ob eine Wirkabschwächung bei einer andauernden Glukokortikoidexposition im Verlauf eintritt und ob die Mehrexpression von MGMT im Verlauf abnimmt.

## Diskussion

In vitro konnte an verschiedenen Zelllinien, vor allem bei Glioblastomzellen, nachgewiesen werden, dass Glukokortikoide einen nachteiligen Effekt auf eine alkylierende Chemotherapie haben können. Hier wird neben der Chemotherapie häufig Dexamethason verabreicht, um eine mögliche Schwellung sowie weitere Nebenwirkungen zu unterdrücken [144-146]. Dies kann zu einer Mehrexpression von MGMT führen und damit zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Methylierungen. Eine Glukokortikoidtherapie kann folglich nachteilige Auswirkungen bei einer alkylierenden Chemotherapie haben bzw. eine Wirkabschwächung hervorrufen. Da 60 % aller ACC Glukokortikoide übersezernieren, besteht ein großes Risiko, dass es durch Hypercortisolismus zu einer Überexpression von MGMT und damit zu einer durch den Tumor selbst induzierten Resistenz kommen kann. Diese Effekte müssen genauer untersucht werden und auch Aspekte, ob ein subklinischer Hypercortisolismus oder eine Veränderung der physiologischen Cortisolfreisetzung z. B. bei einer oralen Substitution ebenfalls zu einer verminderten Ansprechrate auf STZ führen kann, müssen beachtet werden.

Zusätzlich wäre es interessant zu untersuchen, ob Derivate der Glukokortikoide, vor allem Vorstufen der Glukokortikoide, einen Effekt auf die MGMT-Expression haben, da durch ihre strukturelle Ähnlichkeit möglicherweise diese an Glukokortikoidrezeptoren binden und evtl. eine Aktivierung bewirken könnten. Dies würde wiederum zu einer vermehrten MGMT-Expression führen [120]. Zumal eine symptomatische medikamentöse Therapie bei Hypercortisolismus, z. B. mit Metyrapon oder Ketoconazol, meist mit einer erhöhten Konzentration an anderen Metaboliten von Glukokortikoiden einhergehen.

Letztendlich muss von der Hypothese ausgegangen werden, dass ein ACC mit einem (subklinischen) Hypercortisolismus unter Therapie mit STZ eine schlechtere Prognose haben kann. Eine Kombinationstherapie mit einem Adrenolytikum und/oder die Vermeidung einer Hypercortisolämie könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Jedoch muss beachtet werden, dass auch die Möglichkeit einer Down-Regulation durch die unphysiologischen Glukokortikoidspiegel

## Diskussion

bestehen kann, sodass die zuvor beschriebenen Effekte nicht unbedingt langfristig bestehen oder eintreten werden. Es wäre daher sinnvoll, in der Patientenkohorte den Hormonstatus kontinuierlich zu erheben.

Ein weiterer großer Einflussfaktor, der untersucht werden muss, sind weitere DNA-Modifizierungen die zu einer vermehrten Expression führen können, wie z.B. die Hydroxymethylierung. Die Hydroxymethylierung wird allerdings durch die MLPA und auch Bisulfit Konversion nicht berücksichtigt. Einflüsse der Hydroxymethylierung sind bisher wenig erforscht und es lässt sich mit bislang etablierten Methoden eine Hydroxymethylierung nicht von einer Methylierung unterscheiden. Neuere Methoden sind jedoch in der Lage, reine Methylierungen zu differenzieren. Hierzu könnten schon von vornherein Auswirkungen der 5-hmC gezielter berücksichtigt werden, da diese zu einer gesteigerten Expression führen. Dies würde wiederum eine gesteigerte Expression von MGMT und ein höheres Reparaturpotenzial gegenüber STZ bedeuten. Daher hätte eine ausgeprägte Hydroxymethylierung nachteilige Auswirkungen auf das Tumorsprechen mit STZ. Sollten sich die vorliegenden Ergebnisse reproduzieren lassen und sich der Methylierungsstatus von MGMT als prognostischer Faktor in der Therapie mit STZ beim ACC erweisen, so müssten auch die weiteren Einflussfaktoren genauer untersucht werden.

Insgesamt nehmen DNA-Modifikationen eine zunehmend wichtigere Rolle ein und zeigen einen relevanten Einfluss auf die Tumorthherapie und müssen somit bereits bei der Therapieentscheidung berücksichtigt werden.

Ebenfalls interessant wäre es, die GLUT-2 Expression und den MGMT-Gen-Status im Verlauf zu untersuchen. Oft kommt es während einer Chemotherapie zu einem Tumorprogress oder zum Wachstum von Metastasen. Durch eine erneute Untersuchung des MGMT-Gens und der Expression von GLUT-2 könnten zwei mögliche Resistenzmechanismen analysiert werden. Eine verminderte GLUT-2 Expression würde eine niedrigere intrazelluläre Aufnahme von STZ bedeuten. Eine Hypomethylierung oder Hydroxymethylierung des MGMT-Gens

## Diskussion

würde zu einer vermehrten Expression mit erhöhtem Reparaturpotenzial führen. Dies würde aber auch auf ein Therapieversagen von STZ hindeuten.

Die Methylierung des MGMT-Gens ist auch oft bei Tumoren mit einem Hypermethylierungs-Phänotyp vorhanden [147]. Dieser Phänotyp zeigt sich mit einer genomweiten Hypermethylierung unter anderem auch bei verschiedenen Tumorsuppressorgenen mit günstigerer Prognose unter einer Antitumorthherapie. Ob es einen Hypermethylierungs-Phänotyp auch bei ACC gibt und dieser ebenfalls mit einer günstigeren Prognose unter einer Antitumorthherapie einhergeht, muss weiter untersucht werden. Hierzu würde es sich anbieten, weitere Gene hinsichtlich Methylierungsstatus zu untersuchen.

### 4.5. Stärken und Schwächen

Die erhobenen Daten deuten auf mögliche prognostische Marker in der Chemotherapie des Nebennierenrindenzinoms mit STZ hin. Ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten und einer alkylierenden Chemotherapie, scheint der Methylierungsstatus von MGMT zusammen mit der GLUT-2 Expression einen prognostischen Einfluss zu haben. Zur Abschätzung der Aussagekraft der in dieser Studie erhobenen Daten, werden im Folgenden die Schwächen und Stärken gegenübergestellt.

Einer der möglichen Schwächen der Studie mag die retrospektive Datenerhebung und niedrige Patientenzahl sein. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass das Nebennierenrindenzinom mit einer Inzidenz von 1 bis 2 Fällen auf 1 Million Menschen zu den seltenen Erkrankungen gehört und damit die Fallzahlen generell niedrig sind [10, 45, 46]. Hierdurch relativiert sich die niedrige Anzahl an Patienten, sodass die untersuchten 79 Patienten als große Kohorte betrachtet werden sollte. Ein positiver Aspekt ist, dass nur Patienten eingeschlossen wurden, von denen vollständige Daten sowie ausreichend Tumormaterial für die

## Diskussion

erforderlichen Untersuchungen vorlagen. Alle Patienten hatten ein histologisch gesichertes ACC. Außerdem konnte auf Patienten der FIRM-ACT Studie, welche multizentrisch durchgeführt wurde, zurückgegriffen werden. Es ergibt sich hierdurch ein homogenes Spektrum an Patienten, sodass sich trotz der geringen Inzidenz für ACC eine gleichmäßige Kohorte ergab und ein mögliches Bias reduziert werden konnte. Daher spielten lokale Häufungen, wie sie bei manchen Tumorsyndromen oder genetischen Erkrankungen auftreten, in unserer Kohorte keine tragende Rolle.

Eine weitere Stärke sind die ausführlich erhobenen Daten, die vom Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie von regelmäßigen Follow-up-Untersuchungen vorlagen. Diese Daten stammen von Schwerpunktzentren, die zum Großteil auch an der FIRM-ACT Studie beteiligt waren.

Ebenfalls als Stärke unserer Studie zu werten ist die einfache Umsetzung. Viele Untersuchungen konnten mit der Standardlaborausrüstung durchgeführt werden und eignen sich, bis auf die Kapillargelelektrophorese, zur Etablierung in der Routinediagnostik. Es müssten lediglich eine immunhistochemische Färbung für GLUT-2, die Extraktion der Tumor DNA und die methylierungsspezifische MLPA durchgeführt werden.

Es gibt wenige Vergleichsstudien zum Methylierungsmuster bei FFPE und gefrorenem Tumormaterial. Jedoch waren hier keine Unterschiede feststellbar [148], sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Formalinfixierung keine größeren Auswirkungen auf die Untersuchungen hatte. Zudem ist FFPE einfacher zu lagern und zugänglich als natives gefrorenes Gewebe.

Ein weiterer Vorteil, der in der vorliegenden Arbeit genutzten Methode ist der Fakt, dass nur wenige Zwischenschritte bei den Untersuchungen erforderlich sind, sodass die Anzahl potenzieller Fehlerquellen überschaubar bleibt. Ein Nachteil der gewählten MLPA ist, dass nur wenige Stellen des MGMT-Promotors untersucht werden können, an denen entsprechend die Endonukle-

## Diskussion

ase Hhal binden kann mit den Stellen der Sequenzfolge 5´GCGC 3´. Im Vergleich zur methylierungsspezifischen PCR können jedoch mittels MLPA mehrere Bereiche parallel untersucht werden. Inwiefern diese untersuchten Bereiche repräsentativ für die Promotor-Methylierung des MGMT-Gens bei ACCs sind, ist allerdings nicht geklärt. Es gibt jedoch Untersuchungen, die einen signifikanten Einfluss der untersuchten Stellen beschreiben [118, 149].

Durch die gewählte Methode kann außerdem, ähnlich wie bei anderen Verfahren, die auf eine Bisulfitkonversion aufbauen, keine Unterscheidung zwischen Hydroxymethylierung und Methylierung geliefert werden.

In unseren Untersuchungen konnten einige mögliche Einflussfaktoren nicht ausreichend berücksichtigt werden, da u. a. Daten zum Cortisol-Spiegel oder zu Auswirkungen des Kombinationspartners nicht durchgehend erhoben wurden. Dies wären Punkte, die in weiteren Untersuchungen genauer erfasst und analysiert werden müssten.

Der Hinweis eines prognostischen Effekts bei der STZ Therapie ist der große Vorteil der vorliegenden Untersuchung. Ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten ging eine MGMT-Promotor-Hypermethylierung mit einer günstigeren Ansprechrate auf eine alkylierende Chemotherapie einher. Da STZ auch bei neuroendokrinen Tumoren wie z. B. bei Insulinomen eingesetzt wird, könnten hier ebenfalls die membranäre GLUT-2 Expression und die MGMT-Methylierung auf ein günstigeres Therapieansprechen hindeuten und die Daten sich ggf. auf weitere Tumorentitäten übertragen.

### 5. Zusammenfassung

Die Chemotherapie eines Nebennierenrindenzinoms gestaltet sich als insgesamt schwierig, da nur wenige prognostische Faktoren existieren. Ein mögliches Chemotherapie-Regime beinhaltet Streptozotocin, ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches Guanin in Methylguanin alkyliert. Das andere verwendete Therapieregime umfasst EDP. Die FIRM-ACT Studie war die erste randomisierte Studie, welche die beiden Chemotherapie Regime EDP und STZ in Kombination mit Mitotan in der Behandlung des fortgeschrittenen ACC analysierte. Hier konnte ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben bei der Behandlung mit EDP + M (5 Monate) vs. STZ + M (2,1 Monate) festgestellt werden. Ein objektives Ansprechen des Tumors zeigte sich bei EDP + M bei (35 von 151 Patienten) und bei STZ + M bei (14 von 153) Patienten. Es folgte daher die Empfehlung im Versorgungsalltag EDP + M als Erstlinientherapie einzusetzen. Zur Evaluierung eines möglichen Ansprechens von STZ wurde der Methylierungsstatus von MGMT analysiert. MGMT ist ein Protein, welches Alkylierungen durch Bindung entfernt und repariert Methylguanin in Guanin. Eine Hypermethylierung führt zu einer reduzierten Expression von MGMT und folglich zu einer verminderten Reparaturkapazität. Dies führt insgesamt zu einem besseren Ansprechen der alkylierenden Chemotherapie mit längerem progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben. In der Kohorte konnten dabei zwei Amplicons des MGMT-Gens mit einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen Responder und Non-Responder festgestellt werden. Zudem untersuchten wir die Expression von GLUT-2, welcher STZ über die Zellmembran transportiert. Vier der untersuchten Proben zeigten jedoch keine membranäre Expression, diese waren Non-Responder, sodass die membranäre Expression von GLUT-2 eine erste Voraussetzung für die Aufnahme von STZ in Tumorzellen zu sein scheint. Entsprechend der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der Methylierungsstatus der Promotorregion des MGMT-Gens als prognostischer Faktor zur Therapieentscheidung mit STZ hinzugezogen werden sollte, wenn die Tumorzellen GLUT-2 membranär exprimieren. Insgesamt könnte dies der erste Schritt einer individualisierten/stratifizierten Chemotherapie beim fortgeschrittenen ACC mit STZ sein.

### 6. Literaturverzeichnis

1. Waschke, F.P.u.J., *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen Innere Organe*. Elsevier. Vol. 23. Auflage. 2010.
2. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus Lernatlas der Anatomie*. 2015, Thieme: Stuttgart. p. 444.
3. Simpson, S.L., *Physiology of the Adrenal Gland*. Br Med J, 1937. **1**(3969): p. 229-32.
4. Randall, D.C., *Discovering the role of the adrenal gland in the control of body function*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(5): p. R1007-8.
5. Kempainen, R.J. and E.N. Behrend, *Adrenal physiology*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1997. **27**(2): p. 173-86.
6. Willenberg, H.S. and S.R. Bornstein, *Adrenal Cortex; Development, Anatomy, Physiology*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
7. Lüllmann-Rauch, R., in *Taschenlehrbuch Histologie*. 2009, Thieme: Stuttgart. p. 427-432.
8. H., C.D., *Ham's Histology*. 1987. **9. Aufl.**
9. Kuruba, R. and S.F. Gallagher, *Current management of adrenal tumors*. Current Opinion in Oncology, 2008. **20**(1): p. 34-46.
10. *NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. NIH Consens State Sci Statements, 2002. **19**(2): p. 1-25.
11. Kloos, R.T., et al., *Incidentally Discovered Adrenal Masses\**. Endocrine Reviews, 1995. **16**(4): p. 460-484.
12. Aron, D.C. and N.S. Ross, *[Incidentally discovered adrenal gland tumors]*. Presse Med, 1992. **21**(27): p. 1295.
13. Glazer, H.S., et al., *Nonfunctioning adrenal masses: incidental discovery on computed tomography*. AJR Am J Roentgenol, 1982. **139**(1): p. 81-5.
14. Herrera, M.F., et al., *Incidentally discovered adrenal tumors: an institutional perspective*. Surgery, 1991. **110**(6): p. 1014-21.
15. Abrams, H.L., R. Spiro, and N. Goldstein, *Metastases in carcinoma; analysis of 1000 autopsied cases*. Cancer, 1950. **3**(1): p. 74-85.
16. Bullock, W.K. and A.E. Hirst, Jr., *Metastatic carcinoma of the adrenal*. Am J Med Sci, 1953. **226**(5): p. 521-4.
17. Lam, K.Y. and C.Y. Lo, *Metastatic tumours of the adrenal glands: a 30-year experience in a teaching hospital*. Clin Endocrinol (Oxf), 2002. **56**(1): p. 95-101.
18. 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.
19. Remde, H., O. Kimpel, and M. Fassnacht, *[Adrenal incidentaloma - differential diagnosis and management]*. Dtsch Med Wochenschr, 2022. **147**(3): p. 85-91.



## Literaturverzeichnis

20. Fassnacht, M., *Nebennieren-Inzidentalom/Subklinisches Cushing-Syndrom: Wann besteht eine OP-Indikation?*. Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel - Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2010.
21. Hussain, S., et al., *CT diagnosis of adrenal abnormalities in patients with primary non-adrenal malignancies*. Eur J Radiol, 1986. **6**(2): p. 127-31.
22. Mitnick, J.S., et al., *Non-functioning adrenal adenomas discovered incidentally on computed tomography*. Radiology, 1983. **148**(2): p. 495-9.
23. Barzon, L., et al., *Risk factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 520-6.
24. Burgener, F.A., et al., *Differenzialdiagnosen in der Computertomografie*. 2012: Thieme.
25. Caoili, E.M., et al., *Delayed enhanced CT of lipid-poor adrenal adenomas*. AJR Am J Roentgenol, 2000. **175**(5): p. 1411-5.
26. Pena, C.S., et al., *Characterization of indeterminate (lipid-poor) adrenal masses: use of washout characteristics at contrast-enhanced CT*. Radiology, 2000. **217**(3): p. 798-802.
27. Singer, A.A., et al., *Metastasis or adenoma? Computed tomographic evaluation of the adrenal mass*. Cleve Clin J Med, 1994. **61**(3): p. 200-5.
28. Siegelman, E.S., *Adrenal MRI: techniques and clinical applications*. J Magn Reson Imaging, 2012. **36**(2): p. 272-85.
29. Degenhart, C., *Tumoren der Nebennieren : Prinzipien der Bildgebung und Differenzialdiagnosen*. Radiologe, 2014. **54**(10): p. 998-1006.
30. Korobkin, M., et al., *CT time-attenuation washout curves of adrenal adenomas and nonadenomas*. AJR Am J Roentgenol, 1998. **170**(3): p. 747-52.
31. Kjellman, M., C. Larsson, and M. Backdahl, *Genetic background of adrenocortical tumor development*. World J Surg, 2001. **25**(7): p. 948-56.
32. *Conn Register*. Available from: <http://www.conn-register.de/conn2.html>.
33. Boscaro, M., et al., *Cushing's syndrome*. Lancet, 2001. **357**(9258): p. 783-91.
34. Conn, J.W., *Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome*. J Lab Clin Med, 1955. **45**(1): p. 3-17.
35. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
36. Milliez, P., et al., *Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(8): p. 1243-8.
37. Herold, G. and u. Mitarbeiter, *Innere Medizin*. 2014, Dr. med. Gerd Herold: Köln. p. 781-788.
38. Rossi, G.P., *Diagnosis and treatment of primary aldosteronism*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011. **40**(2): p. 313-32, vii-viii.

## Literaturverzeichnis

39. Rossi, G.P., et al., *The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(5): p. 1606-14.
40. Ross, E.J. and D.C. Linch, *Cushing's syndrome--killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis*. Lancet, 1982. **2**(8299): p. 646-9.
41. Ross, N.S., *Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1994. **23**(3): p. 539-46.
42. Reincke, M., *Subclinical Cushing's syndrome*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2000. **29**(1): p. 43-56.
43. Dennison, E., et al., *Profiles of endogenous circulating cortisol and bone mineral density in healthy elderly men*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(9): p. 3058-63.
44. Toniato, A., et al., *Surgical versus conservative management for subclinical Cushing syndrome in adrenal incidentalomas: a prospective randomized study*. Ann Surg, 2009. **249**(3): p. 388-91.
45. Wajchenberg, B.L., et al., *Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 711-36.
46. Dackiw, A.P., et al., *Adrenal cortical carcinoma*. World J Surg, 2001. **25**(7): p. 914-26.
47. Koschker, A.C., et al., *Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006. **114**(2): p. 45-51.
48. Michalkiewicz, E., et al., *Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 838-45.
49. Pianovski, M.A., et al., *Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil*. Pediatr Blood Cancer, 2006. **47**(1): p. 56-60.
50. Ribeiro, R.C., et al., *An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9330-5.
51. Else, T., *Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **351**(1): p. 66-70.
52. Gonzalez, K.D., et al., *Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1250-6.
53. Olivier, M., et al., *Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6643-50.
54. Akerstrom, T., et al., *Genetics of adrenocortical tumours*. Journal of Internal Medicine, 2016. **280**(6): p. 540-550.
55. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
56. Conn, J.W., *Aldosteronism and hypertension. Primary aldosteronism versus hypertensive disease with secondary aldosteronism*. Arch Intern Med, 1961. **107**: p. 813-28.

## Literaturverzeichnis

57. 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.
58. Jain, M., et al., *Weiss criteria in large adrenocortical tumors: a validation study*. Indian J Pathol Microbiol, 2010. **53**(2): p. 222-6.
59. 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.
60. Thompson, G.B. and W.F. Young, Jr., *Adrenal incidentaloma*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(1): p. 84-90.
61. Lockhart, M.E., J.K. Smith, and P.J. Kenney, *Imaging of adrenal masses*. Eur J Radiol, 2002. **41**(2): p. 95-112.
62. Boland, G.W., et al., *Indeterminate adrenal mass in patients with cancer: evaluation at PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose*. Radiology, 1995. **194**(1): p. 131-4.
63. Jungehulsing, M., et al., *Detection of unknown primary cancer with fluor-deoxy-glucose positron emission tomography*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1999. **108**(6): p. 623-6.
64. Hahner, S., et al., *[123 I]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2358-65.
65. Bouloux, P.G. and M. Fakeeh, *Investigation of pheochromocytoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 1995. **43**(6): p. 657-64.
66. Scholz, T., et al., *Clinical review: Current treatment of malignant pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(4): p. 1217-25.
67. Germain, A., M. Klein, and L. Brunaud, *Surgical management of adrenal tumors*. Journal of visceral surgery, 2011. **148**(4): p. e250-61.
68. Papotti, M., et al., *The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma*. Horm Cancer, 2011. **2**(6): p. 333-40.
69. Sbiera, S., et al., *High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010. **95**(10): p. E161-71.
70. 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.
71. (DGAV), E.v.d.C.A.E.C.f.h.d.D.G.f.r.A.-u.V., *S2k-Leitlinie Operative Therapie von Nebennierentumoren*.  
. Version vom 17. Dezember 2017.
72. Lee, J.E., et al., *Surgical management, DNA content, and patient survival in adrenal cortical carcinoma*. Surgery, 1995. **118**(6): p. 1090-8.
73. Brix, D., et al., *Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients*. Eur Urol, 2010. **58**(4): p. 609-15.
74. Reibetanz, J., et al., *Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma*. Ann Surg, 2012. **255**(2): p. 363-9.

## Literaturverzeichnis

75. 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.
76. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. Eur J Cancer, 2009. **45**(2): p. 228-47.
77. Nelson, A.A. and G. Woodard, *Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE)*. Arch Pathol (Chic), 1949. **48**(5): p. 387-94.
78. Cueto, C., J.H. Brown, and A.P. Richardson, Jr., *Biological studies on an adrenocorticolytic agent and the isolation of the active components*. Endocrinology, 1958. **62**(3): p. 334-9.
79. Kaminsky, N., S. Luse, and P. Hartroft, *Ultrastructure of adrenal cortex of the dog during treatment with DDD*. J Natl Cancer Inst, 1962. **29**: p. 127-59.
80. Corso, C.R., et al., *Pharmacological profile and effects of mitotane in adrenocortical carcinoma*. Br J Clin Pharmacol, 2021. **87**(7): p. 2698-2710.
81. Sbiera, S., et al., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3895-908.
82. Touitou, Y., A. Bogdan, and J.P. Luton, *Changes in corticosteroid synthesis of the human adrenal cortex in vitro, induced by treatment with o,p'-DDD for Cushing's syndrome: evidence for the sites of action of the drug*. J Steroid Biochem, 1978. **9**(12): p. 1217-24.
83. Hart, M.M., E.S. Swackhamer, and J.A. Straw, *Studies on the site of action of o,p'-DDD in the dog adrenal cortex. II. TPNH- and corticosteroid precursor-stimulation of o,p'-DDD inhibited steroidogenesis*. Steroids, 1971. **17**(5): p. 575-86.
84. Scheidt, H.A., et al., *The adrenal specific toxicant mitotane directly interacts with lipid membranes and alters membrane properties depending on lipid composition*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **428**: p. 68-81.
85. Haider, M.S., et al., *The Challenging Pharmacokinetics of Mitotane: An Old Drug in Need of New Packaging*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2021. **46**(5): p. 575-593.
86. Bednarski, B.K., et al., *Borderline resectable adrenal cortical carcinoma: a potential role for preoperative chemotherapy*. World J Surg, 2014. **38**(6): p. 1318-27.
87. Fassnacht, M., et al., *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2189-97.
88. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor*. Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-21.

## Literaturverzeichnis

89. Speth, P.A., Q.G. van Hoesel, and C. Haanen, *Clinical pharmacokinetics of doxorubicin*. Clin Pharmacokinet, 1988. **15**(1): p. 15-31.
90. Ali, I., et al., *Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2013. **13**(2): p. 296-306.
91. Megerle, F., et al., *Advanced Adrenocortical Carcinoma - What to do when First-Line Therapy Fails?* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. **127**(2-03): p. 109-116.
92. Cerdas, S., et al., *[Short term effects of ketoconazole in Cushing's syndrome]*. Ann Endocrinol (Paris), 1989. **50**(6): p. 489-96.
93. Daniel, E. and J.D. Newell-Price, *Therapy of endocrine disease: steroidogenesis enzyme inhibitors in Cushing's syndrome*. Eur J Endocrinol, 2015. **172**(6): p. R263-80.
94. Tritos, N.A., *Adrenally Directed Medical Therapies for Cushing Syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2021. **106**(1): p. 16-25.
95. Jeffcoate, W.J., et al., *Metyrapone in long-term management of Cushing's disease*. Br Med J, 1977. **2**(6081): p. 215-7.
96. Schteingart, D.E., et al., *Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(3): p. 667-80.
97. Baudin, E., et al., *Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1385-92.
98. Haak, H.R., et al., *Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients*. Br J Cancer, 1994. **69**(5): p. 947-51.
99. Vavra, J.J., et al., *Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic*. Antibiot Annu, 1959. **7**: p. 230-5.
100. Weiss, R.B., *Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity*. Cancer Treat Rep, 1982. **66**(3): p. 427-38.
101. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
102. Schnedl, W.J., et al., *STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells*. Diabetes, 1994. **43**(11): p. 1326-33.
103. Moertel, C.G., J.A. Hanley, and L.A. Johnson, *Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma*. N Engl J Med, 1980. **303**(21): p. 1189-94.
104. Schrader, J., et al., *Extended cycle streptozotocin/5-FU chemotherapy for maintenance therapy in pancreatic neuroendocrine tumors*. Endocrine, 2019. **65**(2): p. 460-467.
105. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(2): p. E141-5.
106. Thorens, B., et al., *Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells*. Cell, 1988. **55**(2): p. 281-90.

## Literaturverzeichnis

107. Dean, P.M. and E.K. Matthews, *Electrical activity in pancreatic islet cells*. Nature, 1968. **219**(5152): p. 389-90.
108. Grunert, S.C., et al., *Fanconi-Bickel syndrome: GLUT2 mutations associated with a mild phenotype*. Mol Genet Metab, 2012. **105**(3): p. 433-7.
109. Arluison, M., et al., *Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(3): p. 137-46.
110. Garcia, M., et al., *Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing*. J Neurochem, 2003. **86**(3): p. 709-24.
111. Gerson, S.L., et al., *Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues*. Carcinogenesis, 1986. **7**(5): p. 745-9.
112. Verbeek, B., et al., *O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy*. Br Med Bull, 2008. **85**: p. 17-33.
113. Liu, L. and S.L. Gerson, *Targeted modulation of MGMT: clinical implications*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 328-31.
114. Kaina, B., et al., *MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(8): p. 1079-99.
115. Gerson, S.L., *Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2388-99.
116. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
117. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
118. Danam, R.P., et al., *Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing*. Mol Carcinog, 1999. **24**(2): p. 85-9.
119. Yan, L., J.R. Donze, and L. Liu, *Inactivated MGMT by O6-benzylguanine is associated with prolonged G2/M arrest in cancer cells treated with BCNU*. Oncogene, 2005. **24**(13): p. 2175-83.
120. Grombacher, T., S. Mitra, and B. Kaina, *Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes*. Carcinogenesis, 1996. **17**(11): p. 2329-36.
121. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
122. Scott, R.H., et al., *Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation*. J Med Genet, 2008. **45**(2): p. 106-13.
123. Jiricny, J., *The multifaceted mismatch-repair system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 335-46.

## Literaturverzeichnis

124. Battaglin, F., et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives*. Clin Adv Hematol Oncol, 2018. **16**(11): p. 735-745.
125. Edelmann, W., et al., *Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1125-34.
126. Marra, G., et al., *Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8568-73.
127. Nicolaides, N.C., et al., *Genomic organization of the human PMS2 gene family*. Genomics, 1995. **30**(2): p. 195-206.
128. Biological, b.U.S., *GLUT 2 (Glucose Transporter, Insulin Regulatable) G3900-15N*.
129. Mur, P., et al., *Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients*. J Neurooncol, 2015. **122**(3): p. 441-50.
130. Sharma, S., et al., *Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis*. Anticancer Res, 2009. **29**(10): p. 3759-68.
131. Arnold, C.N., et al., *Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system*. Int J Cancer, 2007. **120**(10): p. 2157-64.
132. Chan, A.O., et al., *CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors*. Oncogene, 2003. **22**(6): p. 924-34.
133. Walter, T., et al., *O6-Methylguanine-DNA methyltransferase status in neuroendocrine tumours: prognostic relevance and association with response to alkylating agents*. Br J Cancer, 2015. **112**(3): p. 523-31.
134. Trillo Aliaga, P., et al., *Should temozolomide be used on the basis of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase status in patients with advanced neuroendocrine tumors? A systematic review and meta-analysis*. Cancer Treat Rev, 2021. **99**: p. 102261.
135. Homig-Holzel, C. and S. Savola, *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics*. Diagn Mol Pathol, 2012. **21**(4): p. 189-206.
136. Aziz, S.J. and C.E. Zeman-Pocrnich, *Tissue Processing*. Methods Mol Biol, 2022. **2422**: p. 47-63.
137. Bronsert, P., et al., *Impact of routinely employed procedures for tissue processing on the proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. Proteomics Clin Appl, 2014. **8**(9-10): p. 796-804.
138. Biswas, T., et al., *Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone*. Oncogene, 1999. **18**(2): p. 525-32.
139. Moen, E.L., et al., *The role of gene body cytosine modifications in MGMT expression and sensitivity to temozolomide*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1334-44.
140. Huang, Y., et al., *The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8888.

## Literaturverzeichnis

141. Jin, S.G., S. Kadam, and G.P. Pfeifer, *Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(11): p. e125.
142. Rauch, T. and G.P. Pfeifer, *Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer*. Lab Invest, 2005. **85**(9): p. 1172-80.
143. Mikeska, T., et al., *Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis*. J Mol Diagn, 2007. **9**(3): p. 368-81.
144. Kostopoulou, O.N., et al., *Glucocorticoids promote a glioma stem cell-like phenotype and resistance to chemotherapy in human glioblastoma primary cells: Biological and prognostic significance*. Int J Cancer, 2018. **142**(6): p. 1266-1276.
145. Ueda, S., et al., *Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas*. J Neurosurg, 2004. **101**(4): p. 659-63.
146. Aasland, D., et al., *Repair gene O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase is controlled by SP1 and up-regulated by glucocorticoids, but not by temozolomide and radiation*. J Neurochem, 2018. **144**(2): p. 139-151.
147. van den Bent, M.J., et al., *A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 7148-55.
148. Moran, B., et al., *Assessment of concordance between fresh-frozen and formalin-fixed paraffin embedded tumor DNA methylation using a targeted sequencing approach*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 48126-48137.
149. Jeuken, J.W., et al., *MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas*. Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 1055-65.



Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ACC	Adrenokortikales Karzinom
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BG	O(6)-Benzylguanin
BWS	Beckwith-Wiedeman-Syndrom
bzw.	Beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall
CR	Complete Response
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobezidin
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DDT	Dichlordiphenyltrichloethan
d. F.	Der Fälle
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDP	Etoposid Doxorubicin Platin
ENSAT	European Network for the study of adrenal tumors
entzdl.	Entzündlich
et al.	Et alii
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis Coli
FIRM ACT	First international Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma

## Appendix

	Treatment
FDG	<sup>18</sup> Fluorodeoxyglucose
FS-1	Steroidogenic Factor-1
g	Gramm
GLUT-2	Glucose Transporter-2
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HU	Hounsfield Units
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
MACS	mild autonomous cortisol secretion
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie
Mind.	Mindestens
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NET	Neuroendokrine Tumore
ng	Nanogramm
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
RECIST	Response Evaluation Criteria in solid Tumors
RIN	Rat Insulinoma
P	P-Wert
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissionen-Tomographie
PD	Progressive Disease
PFS	Progression-free Survival, Progressionsfreies Überleben
PR	Partial Response
QTc	frequenzkontrollierte QT Zeit im Elektrokardiogramm

## Appendix

s.	Siehe
SD	Stable Disease
SLS	Sample Loading Solution
Stz.	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
TE	TE Puffer (TRIS-EDTA Puffer)
u. a.	Unter anderem
v. a.	Vor allem
vs	versus
z. B.	Zum Beispiel

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Selbsterstellte Zeichnung der Nebennierenanatomie modifiziert nach F. Paulsen u. J. Waschke [1].....	1
Abbildung 2 Selbsterstellte Zeichnung der Histologie der Nebenniere, A: Kapsel, B: Zona glomerulosa, C: Zona fasciculata, D: Zona reticularis und E: Nebennierenmark. Modifiziert nach [8] .....	3
Abbildung 3 Vorgehen Nebenniereninzidentalom modifiziert nach Fassnacht et al. [18, 20], RF [Raumforderung, OP [Operation]. .....	6
Abbildung 4 Streptozotocin Strukturformel erstellt mit Marvin Sketch ChemAxon .....	28
Abbildung 5 Beispiel der HE Färbung, A: normale Nebenniere 20-fache Vergrößerung, angeordnete Zellgruppierungen sichtbar B: ACC 20-fache Vergrößerung, aufgehobene Zellarchitektur und pleomorphe Zellkerne ...	41
Abbildung 6 Beispiele der GLUT-2 Immunhistochemie, A: normale Nebenniere, B: Lebergewebe, C: ACC mit ausgeprägt zytoplasmatischer Expression, D: ACC mit ausgeprägter membranärer Expression. 10-fache Vergrößerung. ....	46
Abbildung 7 MGMT Amplicons des MLPA Kit ME011-B2 modifizierte Darstellung mit den Schnittstellenbereichen der HhaI Endonuklease .....	52
Abbildung 8 Gesamtüberleben unter der Chemotherapie STZ, $p = 0,002$ .....	55
Abbildung 9 Progressionsfreie Überleben unter der Chemotherapie STZ, $p = 0,0001$ .....	56
Abbildung 10 Beispielbilder der GLUT-2 Expression von ACC in 10-facher Vergrößerung: A: schwach membranär ohne zytoplasmatisch, B: stärker membranär als zytoplasmatisch, C: stärker zytoplasmatisch als membranär, D: keine membranäre Expression.....	57
Abbildung 11 GLUT2 Expression membranär .....	59
Abbildung 12 Beispiel einer MLPA Probe, Messwerte in Excel übertragen und mit Hilfe eines Balkendiagramms veranschaulicht, Fragmente bzw. Amplicons nach Größe sortiert, von links nach rechts aufsteigender Größe. ....	60
Abbildung 13 MSH2 (184) Non Responder Männlich versus Weiblich, $p=0,03235$ .....	62
Abbildung 14 MGMT (202) und (346) Non-Responder weiblich versus Responder weiblich .....	63
Abbildung 15 MGMT (346) Non Responder versus Responder .....	64
Abbildung 16 Überlebenskurve in Bezug auf MGMT 346 Methylierung .....	65

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Raumforderungen der NNR.....	4
Tabelle 2 Raumforderungen des NNM.....	4
Tabelle 3 Sonstige Raumforderungen der Nebenniere .....	5
Tabelle 4 Klinik des Hypercortisolismus .....	12
Tabelle 5 ENSAT Klassifikation.....	18
Tabelle 6 Datentabelle der eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose .....	36
Tabelle 7 Material und Geräte .....	37
Tabelle 8; Reine DNA- Proben Spektroskopie .....	43
Tabelle 9 Übersicht SALSA MLPA ME011-B2 modifiziert aus Produktbeschreibung MS-MLPA ME011-B2 Mismatch Repair genes probemix von MRC Holland .....	50
Tabelle 10 Übersicht GLUT-2 Expression Non- Responder.....	58
Tabelle 11 Übersicht GLUT-2 Expression Responder.....	58
Tabelle 12 MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, MSH3, PMS2 und MGMT Methylierung Responder vs. Non-Responder mittels Mann-Whitney-U-Test.....	61

## Appendix

### IV. MGMT Datentabelle:

Probe	MGMT [171,42]	MGMT [201,61]	MGMT [214,64]	MGMT [346,25]	MGMT [392,72]	MGMT [408,61]
1	7,6	13,4	10,5	4,2	20,9	13,5
2	10,5	12,7	13,9	0	0	79,9
3	12,8	7	30,6	0	8,76	59,2
4	8,9	10,4	7,3	3,2	3,1	76
5	21,3	13,2	18,6	0	58,1	84,4
6	0	0	0	0	0	39,2
7	0	0	0	0	0	39,2
8	62,8	17,7	11,9	6,7	11,7	75,5
9	0	9,8	13,8	0	0	87,6
10	4,8	9,7	6,6	3,4	3,7	86,2
11	7,2	16,2	11,9	7,3	11,4	55,8
12	7,8	0	7,8	0	0	78,7
13	19,2	16	90,9	0	0	69,3
14	8,4	6,7	4,7	0	8,5	16,7
15	11,6	6,5	52,9	2,3	4,4	40,6
16	0	0	0	0	0	70,7
17	0	0	0	0	0	31,9
18	0	10,8	9,4	0	16,2	54,5
19	76,6	26,6	0	0	0	73,8
20	13,9	21,4	17,5	8,9	47,5	62,7
21	6,7	11,7	11,1	0	15,8	59,4
22	71,3	15,8	15,6	5,2	71,7	102,9
23	8,9	18,1	13	6,9	39,2	55,8
24	13,7	0	11,9	0	0	46,7
25	6	15,6	12,1	5,7	8	57
26	0	22,8	0	0	0	0
27	73,2	13,9	88,8	6,5	7,9	93,8
28	15,2	44,3	5,2	4,4	17,2	68,2
29	5,6	11,6	9,3	0	6,6	62
30	12	60,4	61,9	48	50,8	61,3
31	0	0	0	0	0	67,3
32	10,6	24,4	18,4	7,1	34,4	79,5
33	33,7	65	35,2	16	16,4	0
34	8,8	12,4	11,8	0	7,2	81,2
35	7,6	17,8	29,8	7,9	13,1	62
36	13,7	32,1	53,2	11,3	23,3	88,7
37	6,3	13,3	9,2	4,3	7,1	85,3
38	10,2	16,8	13,7	4,4	9	56,8
39	30,7	3	19,5	0	20,1	77,6
40	32,3	9,2	35	4,1	10,1	82,4
41	17,6	9	14,3	3	6,3	65,4
42	7,7	12,2	10,4	5,3	6,7	58,5
43	9,8	22,1	20,2	7,8	20	24,1
44	29,8	31,5	23,8	7,9	40	66,9
45	28	11,2	10	4,4	5,8	46,5
46	20	38,1	19,1	7,6	10,2	46,1

## Appendix

47	25,9	31	8,77	3,2	12,9	21,2
48	9,4	14,1	13,7	4,6	10,2	19,9
49	24,8	15,8	0	0	22	21,1
50	9,5	18,9	14,3	5,3	34,3	54,5
51	0	0	0	0	0	42,8
52	45,9	22,8	55,8	13,2	10,8	67,7
53	9,1	17,8	15,2	0	23	60,5
54	37,8	54,8	33	45,7	63,7	81,1
55	8,1	11,1	10,5	7,8	13,6	83,7
56	26,2	0	0	0	0	79
57	9,9	12,5	16,4	4,1	26,8	61,8
58	6,2	11,8	9,1	3,1	5,4	72,6
59	19,5	10,6	9,4	2,5	7,7	23,9
60	0	0	0	0	0	47
61	9,8	11	0	0	0	26,8
62	34,8	33,5	7,9	25,2	38,5	78,7
63	21,9	34,7	16,8	12,4	82,9	69,2
64	54,8	51,4	83,6	14,4	10,8	75,6
65	7,9	17,8	7,7	0	0	67,5
66	10,9	38,7	17,6	7,2	25,8	89,8
67	57	15,8	65,9	4,2	50,4	74,9
68	0	23,4	16,9	7,2	22,6	61,1
69	49,2	22,3	14,9	8	10,5	87,3
70	11,6	15,7	12,1	4,4	6,1	82,8
71	10,7	16,3	11,1	5,4	9,2	72,5
72	4,4	0	0	0	9,1	87,7
73	8,1	17,1	9,9	7,77	13,6	68,3
74	12,7	19,9	21,1	9,3	18,5	70,6
75	13,5	15,6	27,9	5,2	7,3	52,5
76	17,2	32,3	19,3	9,9	13,2	62
77	13,1	24,5	17,3	8	10,7	68,4
78	13,4	28,8	14,1	0	0	31,2
79	31,7	0	16,6	44,7	23,8	93,3

## Appendix

### V. MLPA Datentabelle:

Probe	MLH1 [164,89]	MLH1 [196,03]	MLH1 [238,98]	MLH1 [264,21]	MLH1 [292,26]	MLH3 [353,87]	MSH2 [183,62]	MSH2 [272,97]	MSH2 [400,29]	MSH3 [220,94]	MSH6 [158,86]	MSH6 [208,65]	MSH6 [300,88]	PMS2 [141,57]	PMS2 [153,38]	PMS2 [339,32]
1	3,2	0	13	0	8,1	64,3	0	0	6,3	11,3	10,9	1,8	14,2	0	8,6	14,6
2	0	0	12,7	0	7,3	0	0	0	0	13,9	0	0	0	0	8,6	12,9
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,3	6,4	0	7,4	0	4	8,1
4	6,7	0	11	0	7	0	0	0	7,1	13,6	11,7	3,1	11,9	5,6	7,9	12,9
5	0	0	0	0	0	78	0	0	0	10,4	10,4	0	0	0	0	11
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,7	0	0	0	0	0	12,2
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	5,7	0	18,9	0	7,8	0	0	0	0	12	14,4	5,8	24,8	13,9	11,3	15,5
9	51,4	0	8,1	0	4,6	0	0	0	0	9,2	7,7	0	11,3	0	5,5	10
10	3,1	0	8,5	0	6,3	2,6	0	0	7	9,2	9,5	0	8,8	3,3	4,2	9,8
11	5,5	0	13,4	0	9,1	0	0	0	4,6	21,8	15,5	3,7	20	5,4	11,5	22
12	6,1	0	0	0	0	0	0	0	0	4,3	4,2	0	6	0	3,4	6,2
13	0	0	11,7	0	6	0	0	0	0	9,4	10,6	0	6,8	5,7	7,9	16,3
14	2	0	6,8	0	2,7	55,7	0	0	0	6,9	5,9	0	8,6	8,3	5,1	10,6
15	2,6	0	7,8	0	4,9	2	71,9	0	3,1	8,8	6,9	0	8,5	4,2	5,6	7,6
16	0	0	0	0	0	46,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,4	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	25	0	14,4	21,6
20	7,2	0	24,6	3	10,1	8,9	0	2,3	7,5	20,4	20,2	5,5	26,1	13,7	14,9	16,8
21	0	0	12,6	0	0	0	0	0	0	14,1	12,1	0	12,3	0	9,1	10,5



## Appendix

22	0	0	10,6	0	7,4	0	0	0	0	11,6	12,3	0	16,9	9,3	9,8	12,5
23	6,4	0	20,6	0	13,4	7,2	0	4,1	6,1	18,1	19,3	7,5	22,7	13,1	14,9	29,1
24	0	0	0	0	0	63,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	6	0	15,2	0	8,3	82,9	0	0	6,6	14,1	14,5	4,8	15,3	8,5	10,3	12,5
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,7	15,3
27	4,8	0	15,4	0	7,77	6,5	0	0	5,4	14,7	13,6	5,8	18,5	10,8	0	15,6
28	0	0	8,3	0	14,1	9	8,6	0	10,1	7,3	26,3	18,4	60,3	35,7	22,5	20,5
29	4	0	10	0	5	21,8	0	0	3,4	6,5	9,11	0	13,2	0	7,4	8
30	5,7	0	14	0	5,7	0	0	0	5,9	11,9	14,7	0	17,1	11,5	10,4	79,3
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	5,5	0	14,2	0	10,2	6,8	0	0	8,3	14,3	16,8	7,3	20,9	14,4	13,3	13,9
33	25,5	25	36,3	18,1	34,4	20	25,4	16,3	17,2	28,2	55,2	36,3	24,6	64,8	29,7	25,2
34	0	0	11,8	0	5,8	0	0	0	0	12,7	11,5	0	16,2	7,4	10,6	11,1
35	8,8	0	16,9	0	14,2	7,9	0	0	11,8	17,1	21,2	6,6	19,77	12,2	14	18,9
36	0	0	23,7	0	16,4	10,6	247,2	0	7,7	21	30	15,9	33	21,5	22,8	29,1
37	4	0	10,9	0	7,3	0	122,9	0	31	11,8	11,8	0	14,1	8,2	8,7	8,4
38	5,8	0	17	0	7,5	81,3	0	0	5,4	13,1	15,3	4,8	15	10,6	9,8	12,7
39	0	0	31,6	0	11,5	62	53,2	0	0	20	16	0	25,6	7,4	13,1	17,1
40	0	0	0	0	5,4	2,8	0	0	3,5	9,4	0	0	10,6	0	7	8,5
41	3,8	0	0	0	4,5	0,2	0	0	4,6	11,3	10,3	2,5	12,2	5,1	7,2	11,8
42	5,9	0	13,9	0	9,5	5	0	0	5,9	13,8	14,5	3,3	13,9	7,4	9,7	13,5
43	9,1	0	22,6	3,3	13,2	65,1	4,4	4,3	9,2	20,3	19,8	10,2	24,1	19,9	14,5	17,6
44	10,4	0	22	0	13,7	6,7	0	0	8,8	17,8	24,6	11,4	17,2	29,3	18,4	17,6
45	6	0	14,4	0	8,2	3,9	0	0	5,7	13,3	12,2	5,1	11,6	8,4	9,9	13,7
46	9,3	8,2	22,2	3,5	20,7	10,6	8	5,1	9,1	17,9	32,4	12,9	26	33,1	22,2	18,7
47	9	0	13,6	0	17,1	114,6	0	0	3,7	8,4	19,8	15,2	19,7	12	15,1	14,1

## Appendix

48	4,8	0	12,3	0	8,5	73,2	0	1,8	6,3	12,5	13,9	6,4	18,5	124	10,2	12,3
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	6,6	0	14,7	0	9,5	88,6	0	1,8	5,4	15,1	15,8	2,5	20,1	6,6	11,4	15,8
51	0	0	0	0	0	33,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,8
52	11,1	0	17,1	0	0	8,2	0	0	9,9	18	25,6	0	0	30,5	16,5	15,3
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	22,5	0	0	0
54	0	0	11,4	0	8,8	5,6	0	0	7,9	11,7	11,8	0	13,6	0	0	12,7
55	3,7	0	9,3	0	4,3	27,8	0	0	5	9	7	0	10,5	4,3	4,5	7,6
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	4	0	9,3	0	4,9	47,1	0	0	4,4	11,3	9,8	0	11,3	4,9	6,7	10,1
58	4,6	0	7,7	0	4,7	64,6	0	0	3,6	6	8,3	0	0	0	4,1	8,6
59	2,8	0	7,5	0	4,5	2,6	1,7	0	2,5	8,1	7,9	3,5	11,1	7,5	7	9,2
60	154	0	0	66	0	102,1	59,7	0	0	23,4	0	0	0	27,7	0	48,8
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	4,2	0	10,7	0	6,3	38,5	0	0	5,3	11,7	10,6	2,9	14,4	6,6	7,4	10
63	7,2	0	26,2	0	18	8,5	0	5,6	10,2	21,5	22,7	13,6	38,2	12,5	17,8	22
64	0	0	11,6	0	7,1	94,1	0	0	5,1	8,6	11,9	0	16,1	7,6	8,1	11,7
65	3,7	0	8,8	0	6,2	0	0	0	0	6,5	9,8	0	0	4,4	5,2	9,8
66	0	0	0	0	27	10,8	0	0	6,6	19,5	40,3	0	9,5	0	11,6	26,5
67	3,5	0	0	0	6	73,3	0	0	4,4	11,8	9,4	0	7,4	2,9	7	10,2
68	20,2	0	23,7	0	12,4	7,3	0	0	6,9	17,8	20,3	9,6	22,1	16,9	16,7	19,8
69	5,9	0	19,5	0	11,2	8,2	0	0	5,4	20,4	17,4	10,6	23	16,9	17,1	18,4
70	7,1	0	18	0	6,4	7,4	0	0	6	12,1	17,5	5,1	17,4	7,1	8,8	15,2
71	5,9	0	13	0	9,7	5,6	0	2,1	6,8	14,3	16,1	7,5	17	12,7	11,8	14,5
72	2	13,6	0	0	4,7	2,4	0	0	0	9	10,4	0	13,8	4	7,3	11,3
73	3,8	0	11,9	0	9,6	18,9	4,2	0	2,6	13,5	13,6	7,6	17,2	9,9	13,2	10,4

## Appendix

74	5,7	0	28,1	2,1	11,2	78,7	0	2,9	6,6	22,8	21,2	11,4	29,2	11	17,8	19,8
75	2,9	0	10,5	0	6,9	3,8	0	0	4,5	11,1	11,7	5,1	13,1	9,2	10,1	10,9
76	9,5	5	18	4,6	13,1	8,7	7,4	5,5	7,5	17,7	30	12,8	20,6	31,3	21	17,8
77	8	0	16,8	0	11,5	6,6	0	0	9,1	17,1	21,5	7,3	19,3	20,9	15,7	18
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,4	0	0	0	0	0	0

## IV. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungslabor der Endokrinologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik I am Lehrstuhl für Endokrinologie und Diabetologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Martin Fassnacht durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Silviu Sbiera und Prof. Dr. med. Martin Fassnacht danken, die mir die Möglichkeit gab, meine forschenden Interessen und Erfahrungen mit dieser Doktorarbeit zu verwirklichen. Außerdem für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die umfangreiche Laborausstattung und den wissenschaftlichen Austausch in den Doktorandenseminaren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Silviu Sbiera für die Überlassung des Forschungsthemas, seine tatkräftige Unterstützung sowie Vermittlung der wissenschaftlichen Grundlagen und seiner Geduld.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sabine Herterich für die Übernahme des Korreferates und den neuen Input, um in verzwickten Momenten der Situation eine komplette Wendung zu geben. Herrn Marquardt danke ich für die Unterstützung der Statistik.

Zusätzlich möchte ich mich noch beim Team des endokrinologischen Forschungslabors, insbesondere bei Frau Sonja Steinhauer und Katja Marienfeld für die Vermittlung der erforderlichen Fähigkeiten und die positive Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank, vor allem René für die Unterstützung und Motivation. Durch den kontinuierlichen Rückhalt, die Entlastung und Unterstützung konnte ich mich erfolgreich meinem Studium widmen und auch die Doktorarbeit voranbringen. In Momenten des Zweifels konnte ich hierdurch neue Motivation schöpfen. Aber auch Bianca und Nina vielen Dank für eure Korrekturen und die Unterstützung, sowie unsere langjährige Freundschaft.

Vielen Dank.

