

Aus dem Pathologischen Institut  
der Universität Würzburg

Vorstand:

Professor Dr. med. Dr. med. h.c. Hans Konrad Müller-Hermelink

**Immunhistologische Expressionsanalyse potentiell therapeutisch relevanter  
Proteine im Nebennierenrindencarcinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Martina Groh  
aus Gerbrunn  
Würzburg, Februar 2009

Referent: Prof. Dr. Ott

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Müller-Hermelink

Dekan: Prof. Dr. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2010

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Nebennierenrinde.....	1
1.2 Karzinom der Nebennierenrinde.....	1
1.2.1 Beschreibung.....	1
1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild des NNR-Ca.....	5
1.2.3 Staging des NNR-Ca.....	6
1.2.4 Prognose des NNR-Ca.....	6
1.2.5 Makroanatomie.....	7
1.2.6 Mikroskopische Anatomie.....	8
1.2.7 Immunhistochemische Analysen beim NNR-Ca.....	9
2 Materialien und Methoden.....	11
2.1 Immunhistologie.....	11
2.1.1 Grundlagen.....	11
2.1.2 Nachweismethoden.....	11
2.1.2.1 Streptavidin-Biotin-Komplex.....	12
2.1.2.2 ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex).....	12
2.1.2.3 Chromogen.....	13
2.1.3 Reaktionsmuster der immunhistochemischen Färbungen.....	13
2.1.4 Protokoll für die Immunhistochemie am Tissue-Mikroarray.....	13
2.2 Beschreibung der verwendeten Antikörper/ Färbungen.....	17
2.2.1 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	17
2.2.2 Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität.....	17
2.2.2.1 CD117.....	17
2.2.2.2 EGFR .....	18
2.2.2.3 Her-2/neu.....	20
2.2.3 Hormonrezeptoren.....	21
2.2.3.1 Östrogen.....	21
2.2.3.2 Progesteron.....	22
2.2.4 Proliferationsmarker.....	23

2.2.4.1 Ki67.....	23
2.2.4.2 p53.....	24
2.2.5 Sonstige.....	25
2.2.5.1 AMACR.....	25
2.2.5.2 VEGF.....	26
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität.....	28
3.1.1 CD117.....	28
3.1.2 EGFR .....	29
3.1.3 Her-2/neu.....	29
3.2 Hormonrezeptoren.....	30
3.2.1 Östrogen.....	30
3.2.2 Progesteron.....	31
3.3 Proliferationsmarker.....	32
3.3.1 Ki67.....	32
3.3.2 p53.....	32
3.4 Sonstige.....	33
3.4.1 AMACR.....	33
3.4.2 VEGF.....	33
4 Diskussion.....	34
5 Zusammenfassung.....	42
6 Anhang.....	44
6.1 Abkürzungen .....	44
6.2 Einheiten.....	46
6.3 Literaturverzeichnis.....	47
6.4 Bildnachweis.....	58
7 Danksagung	
8 Lebenslauf	

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 – Direkte Nachweismethode.....	11
Abbildung 2 – Indirekte Nachweismethode.....	11
Abbildung 3 – Doppelt-indirekte Nachweismethode.....	12
Abbildung 4 – Streptavidin-Biotin-Komplex.....	12
Abbildung 5 – ABC-Methode.....	13
Abbildung 6 – Prinzip des Microtissue-Arrays.....	14
Abbildung 7 – CD117 (-).....	17
Abbildung 8 – CD117 (2+).....	18
Abbildung 9 – EGFR (-).....	18
Abbildung 10 – EGFR (1+).....	19
Abbildung 11 – EGFR (2+).....	19
Abbildung 12 – EGFR (3+).....	20
Abbildung 13 – Her-2/neu (-).....	20
Abbildung 14 – Her-2/neu (Zytoplasmafärbung).....	21
Abbildung 15 – Östrogen (Zytoplasmafärbung).....	21
Abbildung 16 – Progesteron (2+).....	22
Abbildung 17 – Progesteron (3+).....	22
Abbildung 18 – Ki67 (10%).....	23
Abbildung 19 – Ki67 (30%).....	23
Abbildung 20 – p53 (1+).....	24
Abbildung 21 – p53 (2+).....	24
Abbildung 22 – AMACR (1+).....	25
Abbildung 23 – AMACR (2+).....	25
Abbildung 24 – VEGF (1+).....	26
Abbildung 25 – VEGF (2+).....	26
Abbildung 26 – VEGF (3+).....	27
Abbildung 27 – CD117 NNR-Ca-Auswertung.....	28
Abbildung 28 – EGFR NNR-Ca-Auswertung.....	29
Abbildung 29 – Her-2/neu NNR-Ca-Auswertung.....	29
Abbildung 30 – Östrogen (Kern) NNR-Ca-Auswertung.....	30
Abbildung 31 – Östrogen (Zyto) NNR-Ca-Auswertung.....	30

## Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

---

Abbildung 32 – Progesteron (Kern) NNR-Ca-Auswertung.....	31
Abbildung 33 – Progesteron (Zyto) NNR-Ca-Auswertung.....	31
Abbildung 34 – Ki67 NNR-Ca-Auswertung.....	32
Abbildung 35 – p53 NNR-Ca-Auswertung.....	32
Abbildung 36 – AMACR NNR-Ca-Auswertung.....	33
Abbildung 37 – VEGF NNR-Ca-Auswertung.....	33

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 – Fernmetastasen beim Nebennierenrindenzarzinom.....	2
Tabelle 2 – Histopathologische Kriterien von Nebennierenkarzinomen.....	9

## 1 Einleitung und Fragestellung

### 1.1 Nebennierenrinde

Die Nebennierenrinde (NNR) ist Bestandteil beider Nebennieren (Glandulae suprarenales), die sich an dem kranialen Pol der Nieren befinden und je etwa 4-5 g wiegen. Die Nebennierenrinde, auch Kortex genannt, entsteht aus dem embryonalen Peritonealepithel (Zölomepithel) zwischen dem Ansatz des Mesenteriums und der Urogenitalfalte und sezerniert Steroidhormone (Klöppel et al., 2004).

Histologisch lassen sich drei Schichten unterteilen, die von einer bindegewebigen Kapsel umgeben sind. Die periphere Schicht ist die **Zona glomerulosa**, die vorwiegend für die *Mineralkortikoidsynthese* (v.a. Aldosteron) zuständig ist. Die Zellen sind in Ballen und Strängen angeordnet und relativ klein.

Die Zellen der anschließenden **Zona fasciculata** sind radiär ausgerichtet und strangförmig angeordnet. Zwischen den einzelnen Zellen sind Sinus zu sehen, in die die hier produzierten *Glukokortikoide* (v.a. Kortisol) abgegeben werden. Im Vergleich zu den beiden anderen Zonen ist der Zelldurchmesser deutlich größer. Diese Zone macht beim Erwachsenen den Hauptteil der NNR aus (Welsch, 2006; Krieglstein, 2004).

Am weitesten innen liegend befindet sich die **Zona reticularis**, die neben der überwiegenden *Androgenproduktion* (Dehydroepiandrosteron/ DHEA) auch *Glukokortikoide* produziert. Strukturell zeigt sich ein netzartig verzweigter Aufbau der Zone. Nach innen schließt sich dann das Nebennierenmark an (Krieglstein, 2004).

### 1.2 Karzinom der Nebennierenrinde

#### 1.2.1 Beschreibung

Das Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Ca) ist ein sehr seltener maligner, epithelialer Tumor, der von den adrenokortikalen Zellen ausgeht (Dohna, 2001). Es sind dabei hormonell aktive und hormonell inaktive Fälle beschrieben. Die hormonell aktiven Tumoren können einen Steroid- (Androgen- oder Östrogen-), einen Glukokortikoid- oder Mineralkortikoidexzess aufweisen. Mischformen können ebenfalls auftreten. Die jährliche Inzidenz des NNR-Ca liegt in Deutschland bei 2:1.000.000 (Klöppel et al., 2004). Es ist für etwa 0,2% aller Krebstodesfälle verantwortlich (Allolio et al., 2002).

Karzinome der NNR weisen eine bimodale Altersverteilung auf, mit einer Häufigkeitsspitze im Kindesalter bei etwa 10 Lebensjahren. Hier kommen Karzinome sogar dreimal häufiger vor als Adenome (Klöppel et al., 2004). NNR-Karzinome haben bei Kindern eine günstigere Prognose (Allolio et al., 2002). Ein zweiter Häufigkeitsspitze findet sich in der fünften bis sechsten Lebensdekade (Roman, 2006). Das mittlere Alter bei Diagnose betrug, in einer Metaanalyse mit 920 Patienten, 45 Jahre (Allolio et al., 2002). Das Verhältnis Frauen zu Männern geben Schulick et al. mit etwa 3:2 an.

In Südbrasilien ist eine deutlich erhöhte jährliche Inzidenz von NNR-Ca bei Kindern beobachtet worden, die mit einer Mutation [R337H] des Tumorsuppressorgens TP53 in Verbindung gebracht wird (Allolio und Fassnacht, 2006; Figueiredo et al., 2006).

Die Metastasierung des NNR-Karzinoms erfolgt vor allem in die Leber (44-93%) und die Lunge (46-79%), außerdem lymphogen (18-73%), ins Peritoneum (18-70%), die Knochen (7-24%) und die Nieren (weniger als 10%) (Schlamp et al., 2006).

**Tabelle 1**

Fernmetastasen beim Nebennierenrindenzinom (von Allolio et al., 2002 und Schlamp et al., 2006)			
Lokalisation der Metastase (Angaben in Prozent)	Untersucher, (n=Patientenzahl)		
	Hutter u. Kayhol, (n= 127)	King u. Lack, (n= 29)	Luton et al, (n= 88)
Leber	44	93	46
Lunge	53	79	46
Lymphknoten	18	73	40
Peritoneum	16	79	40
Pleura	5	-	3
Skelett	7	24	17
Gehirn	4	10	6
Kontralaterale NNR	-	7	3
Niere	2	10	-

Die Kanzerogenese/ Pathogenese des NNR-Ca ist in weiten Teilen noch nicht geklärt, es werden derzeit zwei Modelle diskutiert (Ortmann et al., 2004). Die erste Theorie geht davon aus, dass zuerst aus gesundem Nebennierenparenchym ein Adenom entsteht, welches durch eine weitere Noxe zum Karzinom entdifferenziert. Als wahrscheinlicher wird aber als zweites Modell diskutiert, dass durch eine inaktivierende Mutation in TP53 in der Bande 17p13 und/oder eine Mutation in 11p15, die eine IGF-II-Überexpression zur Folge hat, eine *de novo* Tumorgenese initiiert wird (Allolio und Fassnacht, 2006).

Ein weiterer Faktor, der möglicherweise eine Rolle in der Kanzerogenese spielt, ist ein Allelverlust des ACTH-Rezeptor-Gens. ACTH ist wesentlich an der NNR-Differenzierung beteiligt (Beuschlein et al., 2001). Ein Defekt des ACTH-Rezeptor-Gens könnte daher einen wesentlichen Schritt in der Karzinogenese des NNR-Ca darstellen (Allolio et al., 2002).

Obwohl sporadische Tumoren einen Großteil der NNR-Karzinome ausmachen, sind benigne und maligne NNR-Tumore auch im Rahmen verschiedener erblicher Tumorsyndrome beschrieben (van Ditzhuijsen et al., 2007):

### (1) Li-Fraumeni-Syndrom (LFS, OMIM 151623)

Das Li-Fraumeni-Syndrom wurde 1969 erstmalig beschrieben. Es wird in etwa 70% der Fälle durch eine Keimzellmutation des Tumorsuppressorgens TP53 (in 17p13.1) verursacht (Libé et Bertherat, 2005) (**LFS-1**). Seltener finden sich im CHEK2-Gen in 22q12.1 (**LFS-2**) oder in 1q23 (**LFS-3**) Mutationen (Bell et al., 1999; Bachinski et al., 2005). Die Häufigkeit wird mit 1:10.000 angegeben. Es werden bei diesem seltenen Tumorsyndrom vermehrt NNR-Karzinome, Mammakarzinome, Osteosarkome, Gliome und andere ZNS-Tumore, Weichteilsarkome und Leukämien gefunden (Bachinski et al., 2005; Dohna, 2001). Daneben können auch Melanome, Karzinome der Lunge, Prostata und des Pankreas vorkommen (Sidhu et al., 2003).

### (2) Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS, OMIM 130650)

[Synonym: Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom = EMG-Syndrom] (Pschyrembel, 2001)

Bei diesem ebenfalls seltenen Syndrom findet man neben NNR-Karzinomen, eine Viszeromegalie, Hepatoblastome, charakteristische Ohrmuscheldysplasien, embryonale Tumore, beim Neugeborenen eine Hypoglykämie, Anomalien der Niere, Makroglossie, Hypersomie und Bauchwanddefekte in Kombination mit Malignomen wie dem Wilms-Tumor der Niere (Marx, 2004; Baujat et al., 2004; Sidhu et al., 2003). Die Häufigkeit wird mit 1:15.000 angegeben. Ursache ist ein genetischer Defekt in 11p15.5, der in etwa 15% der Fälle autosomal dominant vererbt wird (Gomes et Ramos, 2003). Durch Anomalien in diesem Bereich ist auch die Transkription des IGF-II-Gens, das in diesem Abschnitt kodiert wird, gestört, was zu erhöhten IGF-II-Pegeln führt.

Diese IGF-II-Überexpressionen und p53-Mutationen treten auch bei sporadischen Formen des NNR-Ca gehäuft auf (Allolio et al., 2002; Slater et al., 2006).

Ein anderes Syndrom, bei dem NNR-Karzinome vorkommen können, ist die MEN1.

### *(3) Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1, OMIM 13100)*

[Synonym: MEA1 = Multiple Endokrine Adenomatose 1, Wermer-Syndrom, familiäres Zollinger-Ellison Syndrom] (Heitz et al., 2004; Klöppel et al., 2004; Calender et al., 2004)

Dieser Symptomkomplex besteht aus einem primären Hyperparathyreoidismus (80-98% aller MEN1-Fälle) und Hypophysen- und Pankreastumoren (Dohna, 2001). Auch im Duodenum und in anderen Organen sind multiple endokrine Tumore zu finden (Heitz et al., 2004). In 25-40% der Fälle treten NNR-Läsionen auf, wobei Karzinome sehr viel seltener sind als Adenome (Libé et Bertherat, 2005). Ursache eines MEN1 ist eine hereditäre, inaktivierende Mutation des MEN1-Tumorsuppressorgens. Das MEN1-Gen (Chromosomenregion 11q13) kodiert das MENIN-Protein. Tritt ein Verlust des noch funktionierenden Allels auf, wird die Kanzerogenese initiiert (Heitz et al., 2004).

In verschiedenen Studien [Kjellman et al., 1999/ Heppner et al., 1999/ Schulte et al., 2000] wurde bei bis zu 90% der MEN1-bedingten NNR-Karzinome ein Allelverlust (LOH) in eben dieser Region (11q13) gefunden. Da bei diesem LOH offenbar fast die gesamte 11q-Domäne betroffen ist, könnte sich dort ein bisher unentdecktes Tumorsuppressorgen befinden (Libé et Bertherat, 2005). Das MEN1-Syndrom wird

autosomal dominant vererbt, es kommen aber auch spontane Formen vor (Sidhu et al, 2003).

### 1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild des NNR-Ca

Die meisten der NNR-Karzinome sind endokrin aktiv. Bei mehr als der Hälfte aller NNR-Karzinome verursachen die veränderten Hormonspiegel eine klinische Symptomatik (Ortmann et al., 2004; Schulick et al., 1999). Wahrscheinlich bedingt durch die höhere Sensitivität aktueller Untersuchungen, geben neuere Studien sogar einen Anteil von 60 bzw. 79% an (Allolio und Fassnacht, 2006; Ramon, 2006). Da die Hormonproduktion in den Tumorzellen aber vergleichsweise ineffektiv ist, sind die Tumoren, wenn sie klinische Symptome in Form einer hormonellen Störung verursachen, i.d.R. schon recht groß (Allolio et al., 2002).

Je nach Art des produzierten Hormons resultieren unterschiedliche spezifische Krankheitsbilder:

(1) Kortisolexzess: Erhöhte Kortisolspiegel führen je nach Ausprägung zu dem Vollbild oder einer milden Form des **Cushing-Syndroms**. Es bezeichnet eine schwere Stoffwechselstörung, die eine Stammfettsucht, Osteoporose und Magengeschwüre verursacht (Lüllmann-Rauch, 2003). Charakteristisch sind auch: Ekchymosen (fleckförmige Blutungen der Haut), Hautveränderungen (Striae rubrae distensae, Atrophie), Muskelschwäche und ein volles Gesicht („Mondgesicht“) durch den gestörten Fettmetabolismus (Vierhapper, 2002).

(2) Östrogenexzess: Durch die vermehrten Östrogene kommt es beim Mann zu einer Hodenatrophie und Gynäkomastie. Man spricht von einer **Feminisierung** des Mannes, die sich bei etwa 10% der endokrin aktiven NNR-Karzinome klinisch manifestiert (Schlamp et al., 2006).

(3) Androgenexzess: Klinisch äußert sich dies bei Frauen u.a. in einer Akne, einer Hypertrophie der Klitoris, Glatzenbildung, einer veränderten Stimmlage und Hirsutismus. In der Regel sind Zyklusstörungen zu finden (Allolio und Fassnacht, 2006; Vierhapper, 2002). Führt die Gesamtheit der Veränderungen zu einem männlichen Erscheinungsbild, wird dies als **Virilisierung** bezeichnet. Etwa 20-35% der endokrin aktiven NNR-Karzinome führen zu einer klinischen Virilisierung (Schlamp et al., 2006).

> (4) Aldosteronexzess: Ein Hyperaldosteronismus verursacht ein **Conn-Syndrom**, ist aber beim NNR-Ca relativ ungewöhnlich (Dohna, 2001). Klinisch treten Hypertonie und eine deutliche Hypokaliämie auf. Die häufigere Ursache für eine gravierende Hypokaliämie ( $\emptyset$  Serum-Kalium 2,3 +/- 0,08mmol/l) ist jedoch eine erhöhte Kortisolausschüttung. Durch die intrarenale Erhöhung wird das Kortisol von der 11- $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase nicht mehr zu Kortison inaktiviert, wodurch der Mineralkortikoidrezeptor verstärkt aktiviert wird (Allolio und Fassnacht, 2006).

Nicht-funktionelle Karzinome fallen meist durch Schmerzen – oft auch Rückenschmerzen – Lethargie, ein abdominelles Druckgefühl oder Erbrechen auf. Seltener treten Fieber, Gewichtsverlust, eine tastbare Raumforderung oder allgemeines Unwohlsein auf, so dass selbst großvolumige Tumoren das Allgemeinbefinden wenig einschränken (Allolio und Fassnacht, 2006; Sidhu et al., 2003). Ausnahmsweise wurde von einer Hämaturie oder dem Auftreten einer Dyspnoe berichtet. Zum Teil hatten die Patienten mehrere Symptome und in wenigen Fällen zeigten sie keine Symptomatik (Schulick et al., 1999).

### 1.2.3 Staging des NNR-Ca (Schulick et al., 1999; WHO classification of endocrine Tumours, 2004)

T1 – Tumorgröße = 5 cm, keine Infiltration der Umgebung (lokalisiert)

T2 – Tumorgröße > 5 cm, keine Infiltration der Umgebung (lokalisiert)

T3 – Tumor wächst lokal infiltrierend in das umgebende Fettgewebe

T4 – Tumor wächst lokal infiltrierend in angrenzende Organe

N0 – Keine regionalen Lymphknoten befallen

N1 – Regionaler Lymphknotenbefall

M0 – Keine Metastasen nachweisbar

M1 – Metastasen nachweisbar

### 1.2.4 Prognose des NNR-Ca

Schulick und Brennan haben fünf verschiedene Studien verglichen (Soreide et al., 1970-84; Icard et al., 1992; Zografos et al., 1994; Haak et al., 1994; Crucitti et al., 1996) und fanden Gesamt-5-Jahres-Überlebensraten von 16-35%. Kann eine komplette

chirurgische Resektion erreicht werden, erhöhen sich diese Werte auf 38-62%. Bei inkompletter Resektion verschlechtert sich die Rate auf 0-9%.

Die 5-Jahres-Überlebensrate im klinischen Stadium I geben Sidhu et al. mit 66%, im Stadium II mit 58%, im Stadium III mit 24% und im Stadium VI mit 0% an.

Mehr als 50% der Fälle mit Fernmetastasen versterben innerhalb eines Jahres (Gicquel et al., 1997).

Die Prognose von Patienten mit Rezidiv ist besser wenn die Primäroperation und das Auftreten des Rezidivs weit auseinander liegen (Allolio et al., 2002).

### **1.2.5 Makroanatomie**

NNR-Karzinome können sehr groß werden und bis zu 5 kg wiegen (Klöppel et al., 2004). Kleinere Tumore sind noch von einer Kapselstruktur umgeben. Größere Neoplasien infiltrieren in der Regel Nachbarstrukturen wie das Nebennierenmark, die Nieren, die Leber, das Zwerchfell und das Venensystem (Neville et al., 1982). Einblutungen und Nekrosen kommen häufig vor.

In der Abgrenzung von Adenomen und Karzinomen gilt, dass Tumoren der NNR mit einem Gewicht über 100 g karzinomverdächtig sind (Heitz et al., 2004). Schulick et al. fanden in einer Studie mit 113 Patienten einen durchschnittlichen Tumordurchmesser von 14 cm (Werte von 4-25 cm) und ein durchschnittliches Gewicht von 750 g (Werte von 4-2600 g). Das deutsche NNR-Ca-Register gibt eine durchschnittliche Größe bei Diagnose von 11,5 +/- 4,7 cm an (Patientenzahl = 215; Allolio und Fassnacht, 2006). In einer Empfehlung der National Institutes of Health von 2002 werden NNR-Tumore, die größer als 6 cm sind, als malignomverdächtig angesehen und die Entfernung empfohlen (NIH State-of-the-Science Statement, 2002).

Wenn die Neoplasien keine Störungen des endokrinen Systems verursachen, können sie sehr lange unbemerkt bleiben. NNR-Karzinome sind daher oft nur Zufallsbefunde und befinden sich bei Diagnose bereits in fortgeschrittenen klinischen Stadien, die z.T. nur palliativ angegangen werden können (Dohna, 2001).

### 1.2.6 Mikroskopische Anatomie

Histologisch zeigen die NNR-Ca eine solide Architektur, es kann aber auch ein pseudoalveoläres oder trabekuläres Wachstumsmuster beobachtet werden. Die enthaltenen meist sehr weiten sinusoidalen Gefäße weisen oft Endotheldefekte auf, so dass die Tumorzellen unmittelbar an den Blutstrom heranreichen und nicht selten zapfenartige Gefäßeinbrüche zu beobachten sind. Größere Tumore können zystische Veränderungen und Herde dystropher Kalzifizierungen aufweisen (Neville et al., 1982). Die Tumorzellen sind meist morphologisch nicht mehr eindeutig einer korrespondierenden Zelle im normalen NNR-Parenchym zuzuordnen (Klöppel et al., 2004). Sie zeigen oft ein lipidarmes Zytoplasma, ohne den typischen kompakten Zellen der normalen Nebennierenrinde zu entsprechen. Der Zytoplasmasaum ist oft schollig und schwach eosinophil. Viele Karzinome weisen keine wesentliche Pleomorphie von Zellen und Zellkernen (Neville et al., 1982) auf und unterscheiden sich daher zytologisch nicht signifikant von den gutartigen Tumoren. In einigen Fällen kann aber auch ein ausgeprägter Zell-Pleomorphismus mit einem oder mehreren prominenten Nukleoli vorliegen. Auch mehrkernige Zellformen und Kernteilungsfiguren können dann beobachtet werden (Neville et al., 1982).

Verschiedene Scoringsysteme werden zur Dignitätsbewertung insbesondere mittelgroßer Tumore eingesetzt, bei denen die rein morphologische Abgrenzung eines Adenoms von einem Karzinom nicht gelingt. Im am weitesten verbreiteten System nach Weiss et al. (1989) werden 9 histopathologische Merkmale erfaßt. Das Vorliegen von drei oder mehr dieser Merkmale korreliert stark mit einem malignen Verlauf der Erkrankung. Das wichtigste Einzelkriterium der Überlebens-Prognose ist bislang die Mitoseaktivität eines Tumors (Stojadinovic et al., 2002).

Ein ausgedehntes desmoplastisches Stroma mit breiten fibrösen Bändern ist charakteristisch für das NNR-Ca. Eine Polymorphie der Zellen, ein diffuses Wachstumsmuster, Gefäßinvasionen und hämorrhagische Nekrosen der Zellverbände sprechen ebenfalls für ein Karzinom (Allolio und Fassnacht, 2006; Soon et al., 2008). Beweisend ist ein invasives und organüberschreitendes Wachstum.

**Tabelle 2** (nach Allolio et al., 2002)

Histopathologische Kriterien von Nebennierenkarzinomen: <i>Das Vorhandensein von &gt;3 Kriterien spricht für eine Malignität des Tumors.</i>	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Breite fibröse Bänder</li><li>- Gefäßinvasion</li><li>- Kapselinvasion</li><li>- Diffuses Wachstumsverhalten</li><li>- &gt;1 Mitose auf 10 hochauflösende Gesichtsfelder</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Pleomorphie</li><li>- Nukleäre Hyperchromasie</li><li>- Nukleäre Atypien</li><li>- Nekrosen</li><li>- Abnorme Nukleoli</li><li>- Eosinophile Zellen (&gt;75% aller Tumorzellen)</li></ul>

Die genannten Scoringsysteme können wesentlich bei der aus therapeutischer und prognostischer Sicht sehr wichtigen Beurteilung helfen, ob es sich um ein Nebennierenrindencarzinom oder ein -adenom handelt. Ergänzend werden immunhistochemische Analysen eingesetzt, um zum einen den adrenokortikalen Ursprung eines Tumors zu klären und zum anderen einen weiteren Beitrag in der Dignitätsbewertung zu leisten.

### 1.2.7 Immunhistochemische Analysen beim NNR-Ca

Der monoklonale Antikörper D11, Inhibin-a, Melan A (Klon A103), steroidogenic factor 1 (Ad4BP), Synaptophysin (Komminoth et al., 1995) und Chromogranin A sind geeignet um den adrenokortikalen Ursprung des Tumors zu belegen oder auszuschließen (Allolio und Fassnacht, 2006; DeLellis et Shin, 2002). Etwa 80% der NNR-Karzinome zeigen eine positive Färbereaktion für D11 und Melan A. Ad4BP soll in fast allen Fällen positiv sein (DeLellis et Shin, 2002). Chromogranin A wird in der Regel nicht exprimiert (Komminoth et al., 1995). Nach einer Metaanalyse der WHO "Classification of Tumours of Endocrine organs" werden in NNR-Karzinomen Zytokeratine nur selten und dann schwach exprimiert, das epitheliale membranständige Antigen (EMA) bleibt negativ, ebenso Chromogranin A, was der verlässlichste Marker zur Abgrenzung von Nebennierenmarktumoren ist.

Der Nachweis von mutiertem p53 und eine hohe Proliferationsfraktion, bestimmt als Ki67-Index, sind häufig beim NNR-Ca zu finden. Laut unveröffentlichten Ergebnissen des deutschen NNR-Ca-Registers ist eine hohe Expression von Ki67 (> 10%) mit schlechtem Überleben assoziiert (Allolio und Fassnacht, 2006). Stojadinovic et al. (2002) fanden in 36% der NNR-Karzinome einen erhöhten Ki67-Index, aber in keiner der gesunden Nebennierenproben.

Eine IGF-II-Überexpression und die Expression von Cyclin E sind möglicherweise geeignet, um benigne von malignen NNR-Läsionen zu differenzieren (Logie' et al., 2000; Allolio und Fassnacht, 2006).

Neben der differentialdiagnostischen Abgrenzung und der Dignitätsbewertung kommt der immunhistochemischen Analyse auch eine wichtige Bedeutung bei der Bestimmung der Expression von Zielproteinen für eine spezifische Tumorthherapie zu. Bislang liegen diesbezügliche Daten aber nur für wenige Proteine und meist nur an kleinen Fallzahlen vor. So konnten Saeger et al. (2002) an 17 NNR-Ca eine Überexpression von Her-2/neu nicht belegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener möglicherweise therapeutisch relevanter Proteine mittels immunhistochemischer Analyse unter Zuhilfenahme der Tissue Microarray-(TMA)-Technik an einer großen Serie von 104 NNR-Ca untersucht und mit der von Nebennierenadenomen und normalem Nebennierengewebe verglichen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Immunhistologie

#### 2.1.1 Grundlagen

Mit der Immunhistologie (IH) ist es möglich, in Geweben gezielt spezifische Strukturen färberisch zu markieren. Für die IH werden enzybeladene Antikörper (Ak) benutzt, die an eine spezifische Struktur – ihr passendes Epitop (spezifische Bindungsstelle/antigene Determinante) – direkt oder indirekt binden (Dalquen et al., 2000). Nach Zugabe eines Substrats setzt das Enzym das Substrat um und erzeugt einen Farbniederschlag, wodurch die entsprechende Struktur markiert wird (Welsch, 2006).

Antikörper sind Glykoproteine, die als Abwehrreaktion eines Organismus gegen einen eingedrungenen Fremdstoff von den Plasmazellen produziert werden. Man unterscheidet Immunglobuline (Ig) A, D, E, G und M, die im Immunsystem verschiedene Aufgabengebiete haben. In der IH werden hauptsächlich **IgG** verwendet. Die Immunglobuline bestehen aus zwei schweren H-Ketten (heavy) und zwei leichten L-Ketten (light). Der Ak kann auch funktionell in ein Fc- (u.a. Bindung an Zelloberflächen) und zwei Fab-Fragmente (Epitopbindung) geteilt werden (Noll et al., 2000).

#### 2.1.2 Nachweismethoden

Man unterscheidet die **direkte**, die **indirekte** und die **doppelt-indirekte** Nachweismethode. Bei der direkten Methode bindet ein konjugierter Ak direkt an das angebotene Epitop (Welsch, 2006; Noll et al., 2000). Schema:

**Abbildung 1 – Direkte Nachweismethode**

<i>Antigen+</i>	<i>konjugierter Ak+</i>	<i>Substrat=</i>	<i>Farbentwicklung</i>
-----------------	-------------------------	------------------	------------------------

Bei der indirekten Methode ist der Farbkomplex auf einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, zu finden (Dalquen et al., 2000). Schema:

**Abbildung 2 – Indirekte Nachweismethode**

<i>Antigen+</i>	<i>Primär-Ak+</i>	<i>Sekundär-Ak+</i>	<i>Substrat=</i>	<i>Farbentwicklung</i>
-----------------	-------------------	---------------------	------------------	------------------------

Die doppelt indirekte Methode nutzt drei verschiedene Ak, den Primär-Ak, den Sekundär-Ak und den Tertiär-Ak an den dann das Enzym gekoppelt ist. Schema:

**Abbildung 3 – Doppelt-indirekte Nachweismethode**

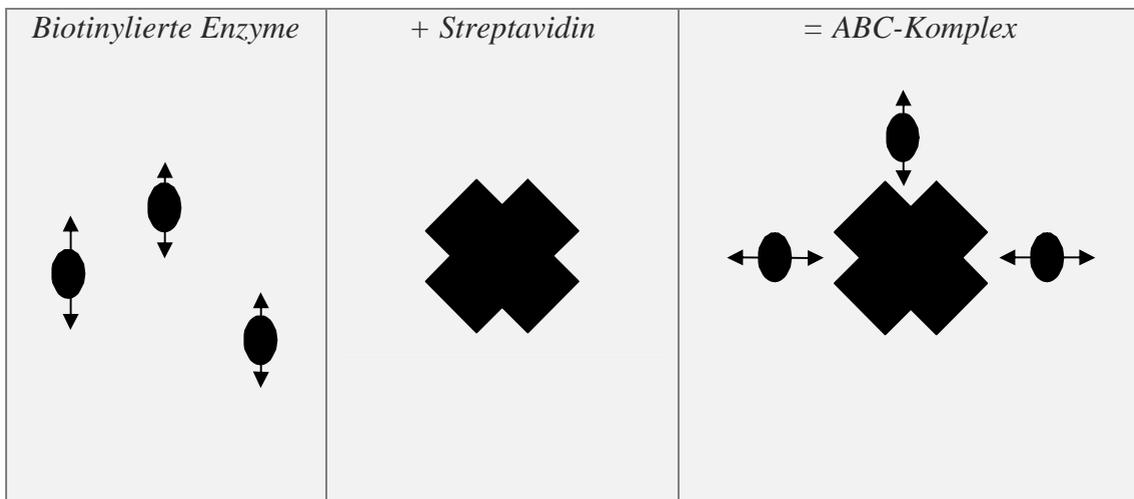
Antigen+	Primär-Ak+	Sekundär-Ak+	Tertiär-Ak+	Substrat=	Farbentwicklung
----------	------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

Die doppelt-indirekte Methode ist indiziert, wenn eine **Signalamplifizierung** erwünscht ist.

### 2.1.2.1 Streptavidin-Biotin-Komplex

Streptavidin ist ein Glykoprotein, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen wird. Es hat vier Bindungsstellen für das wasserlösliche Vitamin Biotin. Für die ABC-Nachweisreaktion werden drei der vier Bindungsstellen mit Biotin (das wiederum mit einem Enzym verbunden ist) abgesättigt. Das Biotin lässt sich gut an den Brückenantikörper koppeln - man spricht dann von einem biotinylierten Ak. An den biotinylierten Ak bindet sich dann der (Strept)avidin-Biotin-Enzym-Complex (=ABC) (Noll et al., 2000). Häufig ist das verwendete Enzym (Meerrettich-)peroxidase.

**Abbildung 4 – Streptavidin-Biotin-Komplex**



### 2.1.2.2 ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex)

Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode – sie wird auch als Enzym-Anti-Enzym-Komplex-Technik bezeichnet (Dalquen et al., 2000). Der unkonjugierte Primär-Ak wird auf das vorbereitete Präparat gegeben und bindet dort das Antigen.

Überschüsse werden mit einer Spüllösung (z.B. PBS/ 0,9% NaCl) entfernt. Dann wird der konjugierte (=biotinylierte) Brücken-Ak dazugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. An das Biotin des Brückenantikörpers bindet die **freie Bindungsstelle** des Streptavidin-Biotin-Enzym-Konjugats (=ABC-Komplex). Nach Substratzugabe erfolgt ein Farbumschlag (Noll et al., 2000).

Schema:

**Abbildung 5 – ABC-Methode**

<i>Antigen+</i>	<i>Primär- antikörper+</i>	<i>Biotinylierter Brücken- antikörper+</i>	<i>Streptavidin -Biotin -Enzym- Komplex+</i>	<i>Chromogen=</i>	<i>Farb- umschlag</i>
-----------------	--------------------------------	--	--	-------------------	---------------------------

### 2.1.2.3 Chromogen

In der vorliegenden Studie wurde 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) genutzt. DAB wird von der Peroxidase zu einem braunen Farbprodukt umgesetzt, es ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich, kann die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol durchlaufen und dann eingedeckt werden (Dalquen et al., 2000).

### 2.1.3 Reaktionsmuster der immunhistochemischen Färbung

Man unterscheidet eine zytoplasmatische, eine nukleäre oder eine membrangebundene Färbung, je nachdem wo die gesuchten antigenen Strukturen zu finden sind. Zum Teil findet man auch Kombinationen der Reaktionsmuster (Noll et al., 2000).

### 2.1.4 Protokoll für die Immunhistochemie am Tissue-Mikroarray

#### 1. Gewebeentnahme

#### 2. Fixierung mittels phosphatgepufferter Formalinfixierung.

Gebrauchsanweisung für die phosphatgepufferte Formalinfixierung pH 7,4:

- 100 ml 40%iges Formalin
- 6,5 g Natriumphosphat
- 4,0 g Natriumdihydrogenphosphat (monohydrat)

Dies wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert. Ein Nachteil der Formalinfixierung ist die Quervernetzung von Proteinen, wodurch die

Antigenität der Proteine beeinträchtigt und die Bindung des Erstantikörpers erschwert oder ganz verhindert wird. Aus diesem Grund muss das Epitop vor der immunhistochemischen Färbung des Präparates wieder zugänglich gemacht werden („Demaskierung“). Dies kann durch ein enzymatisches Verfahren (Trypsin, Protease, Pepsin, Neuraminidase etc.) und/ oder über Hitzedemaskierung (Mikrowelle, Drucktopf etc.) geschehen (Scott et Nagle, 1998; Sprich, 2006).

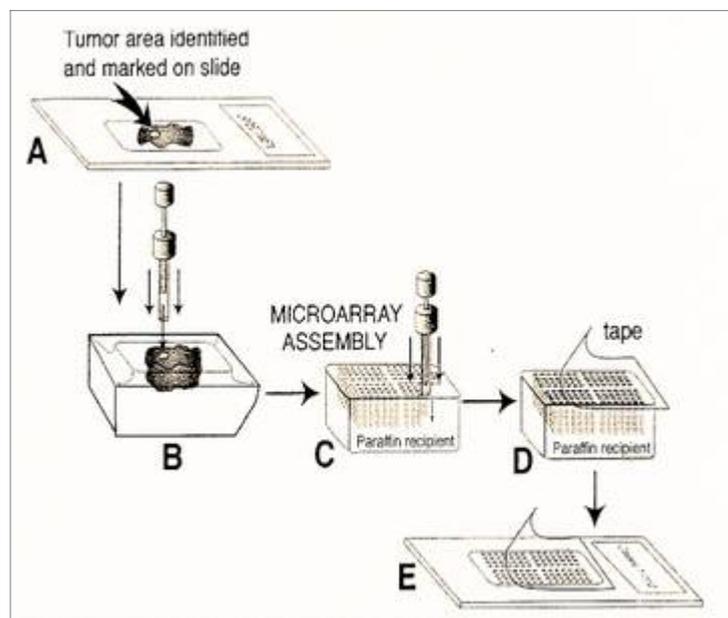
### 3. Herstellen von Paraffinblöcken

Nach der Fixierung werden die Proben zum Entwässern in die aufsteigende Ethanolreihe überführt. Nacheinander werden sie in 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol eingebracht. Damit das Paraffin in das Parenchym diffundieren kann, erfolgt eine Xylol-Behandlung. Die Temperatur des Paraffins sollte 60°C nicht überschreiten. Nachdem die Paraffinblöcke erhärtet sind, kann der Tissue-Mikroarray (TMA) hergestellt werden.

### 4. Herstellung der Tissue-Micro-Arrays (TMA)

Das Prinzip des Gewebe-Mikroarrays besteht darin, sehr viele Gewebeproben auf einen Objektträger zu bringen. Dadurch können verschiedene Patientenfälle mit gleicher

Erkrankung in einem Färbeschritt gefärbt und miteinander verglichen werden. Die ausgewählten Fälle werden in Paraffin eingebettet und daraus Stenzen angefertigt. Entscheidend ist die genaue Dokumentation der Anordnung, damit die Proben später auch sicher den richtigen Fällen zugeordnet werden können.



**Abbildung 6 – Prinzip des Microtissue-Arrays (Mucci et al., 2000)**

Um eine gewisse Mittelung der Ergebnisse zu gewährleisten, werden von jedem Fall mehrere Stenzen aufgebracht. In dieser Studie wurden je fünf Stenzen pro Fall angefertigt. Um histologisch repräsentative Ausschnitte des Tumors zu erfassen, muss die Position der Stenzen anhand eines HE-Schnittes sorgfältig gewählt werden

(möglichst wenig Bindegewebe und Nekrosen und viele Tumorzellen). Der ausgewählte Bereich wird im Schnitt und dann am Block markiert und aus diesem werden dann die Stenzen mit Hilfe eines Tissue Punchers (Beecher Instruments) [Prinzip siehe Abb.6], entnommen und in ein gleich großes Loch im Empfängerblock eingebracht (Mucci et al., 2000). Abschließend wird der Array 5 min bei 60°C erwärmt um die Oberfläche zu glätten und die eingebrachten Proben im Empfängerblock zu verankern.

Die beiden NNR-Tissue Microarrays beinhalten Gewebeproben (5 Stenzen pro Fall) von 104 NNR-Karzinomen, jeweils 5 NNR-Adenomen mit Conn-Syndrom, bzw. mit Cushing-Syndrom, 5 inaktiven NNR-Adenomen und 5 gesunden Nebennieren.

5. Schneiden der Präparate mit einem Mikrotom (ca. 3-5 µm dünn), übertragen auf einen silanisierten Objektträger und über Nacht trocknen lassen um einen guten Halt auf dem Objektträger – v.a. für die spätere Hitzedemaskierung und Färbung – sicher zu stellen.

6. Präparate entparaffinieren und rehydrieren über Xylol (20 min) und die absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol). Mit Aqua dest. und mehrmals mit Puffer (PBS) spülen.

7. Demaskierung der Objekte

a) Citronensäure (CS): 42 g Citronensäure; 20,9 g NaOH-Plätzchen; 10 l Aqua dest.; der pH-Wert wird mit NaOH eingestellt. Die Präparate werden in heißer CS in den Dampfdrucktopf eingesetzt und für etwa 20 min gekocht.

b) Proteinase K: EGFR wird mittels enzymatischer Andauung demaskiert.

8. Färben

Alle Färbungen außer EGFR, das per Hand geblockt und gefärbt wird, werden im Automaten bei Raumtemperatur gefärbt.

a) EGFR-Färbung [EGFR pharmDx<sup>TM</sup> Kit für den manuellen Gebrauch, Code K1492] (Dako, Package Insert)

Schritt 1: Proteinase K (mit Tris-HCl-Puffer und Natriumazid verdünnt)

Das Restwasser wird möglichst vollständig entfernt. Das Präparat wird für 5 min mit mind. 3 Tropfen (~100 µl) Proteinase-K-Lösung eingedeckt. Mit Aqua dest. spülen, 5 min in ein Bad mit destilliertem Wasser einlegen.

Schritt 2: Peroxidase-Block. Feuchtigkeit weitgehend vom Objekt entfernen und mind. 3 Tropfen (~100 µl) Peroxidase-Block (= 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 5 min auf das Objekt geben. Mit Puffer spülen und 5 min ins Puffer-Bad stellen.

Schritt 3: Primär-Ak (= Maus-anti-Human-IgG/ Klon 2-18C9)

Puffer abschütteln und abwischen. Den Objektträger mit dem Primär-Ak eindecken (mind. 100 µl/ 3 Tropfen) und 30 min abgedeckt inkubieren. Mit Puffer spülen.

Schritt 4: Markiertes Polymer (Dextranpolymer mit dem Sekundär-Ak und Meerrettichperoxidase zur Farbverstärkung). Puffer abschütteln und abwischen. Der Objektträger wird mit der Polymer-Lösung (mind. 100 µl/ 3 Tropfen) beschichtet und für 30 min abgedeckt inkubiert. Mit Puffer spülen.

Schritt 5: DAB+Substrat-Chromogenlösung

Puffer abschütteln und abwischen. Das Präparat wird mit der Lösung bedeckt (mind. 100 µl/ 3 Tropfen) und 10 min inkubiert. Mit Aqua dest. spülen, 2-5 min in Aqua dest. Bad einlegen.

Schritt 6: Gegengefärben mit Hämalaun

b) Färbeverfahren der restlichen Antikörper

Die Präparate wurden mit dem Histostain<sup>TM</sup>-Plus<sup>®</sup> Kit von Zymed<sup>®</sup> im Autostainer gefärbt.

Schritt 1: Blocking Reagenz (-> stoppt die endogene Peroxidase)

Das Blocking Reagenz besteht aus Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und wird für 15 min appliziert. Mehrmals mit PBS pH 7,4 spülen.

Schritt 2: Auftragen des Primär-Antikörpers

Der Ak wird für eine Stunde auf dem Präparat belassen, dann wird er mit PBS pH 7,4 sorgfältig abgespült.

Schritt 3: Applizieren des Sekundär-Antikörpers

Der biotinylierte Ak wird nach 20 min Einwirkzeit mit ausreichend PBS pH 7,4 abgewaschen.

Schritt 4: Auftragen von Streptavidin POX

Die gebrauchsfertige Lösung mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat verbleibt für 20 min auf dem Objektträger und wird dann mit genügend PBS pH 7,4 abgespült.

Schritt 5: Chromogen

Die eigentliche Färbung erfolgt nach Zugabe des DAB, welches 10 min einwirkt und danach mit Puffer (PBS pH 7,4) abgespült wird.

Schritt 6: Gegenfärbung mit Hämalaun

### 9. Eindecken der Objektträger

Nach dem Färben werden die Präparate gewässert und in die aufsteigende Alkoholreihe überführt, damit sie anschließend mit Folie eingedeckt werden können.

## **2.2 Beschreibung der verwendeten Antikörper**

### **2.2.1 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Reaktionsmuster: HE färbt Zytoplasma und Zellkerne.

Hämalaun-Eosin (HE) ist eine Standardfärbung der Pathologie und wird meist genutzt um sich einen ersten Überblick über das Gewebe und dessen Zustand zu verschaffen. Die HE-gefärbten Schnitte sind für die Herstellung der Tissue-Mikroarrays essentiell. Hämalaun [ein Farblack aus Hämatoxylin u. Alaun] ist ein saurer, blauer Farbstoff und bindet aufgrund ionischer Wechselwirkungen an basische Zellstrukturen (raues endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen, basische Gruppen der DNA und RNA) (Pschyrembel, 2001). Eosin ist ein basischer, roter Farbstoff und wechselwirkt mit sauren Gruppen, die vor allem bei extrazellulären und auch bei einigen zytoplasmatischen Proteinen zu finden sind. Somit erscheinen bei der HE-Färbung der Zellkern blau und das Zytoplasma blassrot (Müller-Hermelink, 2004).

Alle verwendeten Präparate wurden nach der jeweiligen Färbung mit Hämalaun gegengefärbt.

### **2.2.2 Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität**

#### **2.2.2.1 CD117 (OMIM: \*164920)**

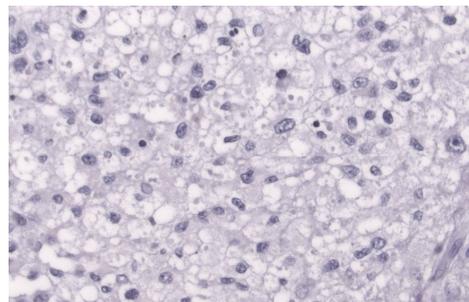
[Synonym: C-kit, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, mast/stem cell growth factor receptor precursor, proto-oncogene tyrosine-protein kinase kit, SCFR]

Firma: Dako / Verdünnung des Axs: 1:400 /

Demaskierung: Target (mod. Zitratpuffer)

Reaktionsmuster: CD117 zeigt eine zytoplasmatische Anfärbung.

**Abbildung 7 - CD117 (-)**



Beurteilung: Die Zytoplasmafärbung wird nach folgender Einteilung beurteilt:

Zytoplasmafärbung (= Wert):

**0** – Keine Färbung; **1** – Schwach positiv; **2** – Stark positiv

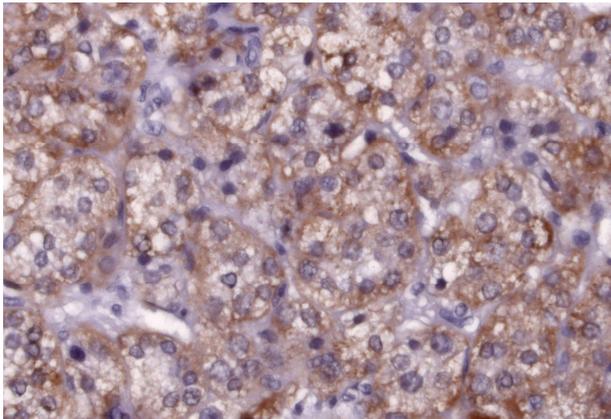
C-kit ist ein Protoonkogen und zeigt Tyrosinkinase-Aktivität. Es ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums

(Funasaka et al., 1992; Petri, 2006).

Seine dauerhafte Aktivierung in Folge von genetischen Mutationen ist u.a. die Ursache für die Entstehung von bestimmten Weichgewebstumoren. Der

Nachweis von CD117 in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) wird seit einiger Zeit in der Diagnostik genutzt und das

**Abbildung 8 - CD117 (2+)**



Medikament Imatinib (Gleevec / STI571) (Shchemelinin et al., 2006), das ein potenter Antagonist des CD117-Rezeptors ist, wird in großangelegten Studien erprobt (Gumurdulu et al., 2007; Hohenberger et al., 2003; Gross et al., 2006). Bei verschiedenen anderen Krankheitsbildern wird der Einfluss von C-Kit erforscht (Matsuda et al., 1993). Für das NNR-Ca liegen bislang keine entsprechenden Studien vor.

### 2.2.2.2 EGFR (OMIM: \*131550)

[Synonym: epidermal growth factor receptor, receptor tyrosine-protein kinase ErbB-1; HER-1; V-ERB-B]

Genlokus: 7p12.3-p12.1

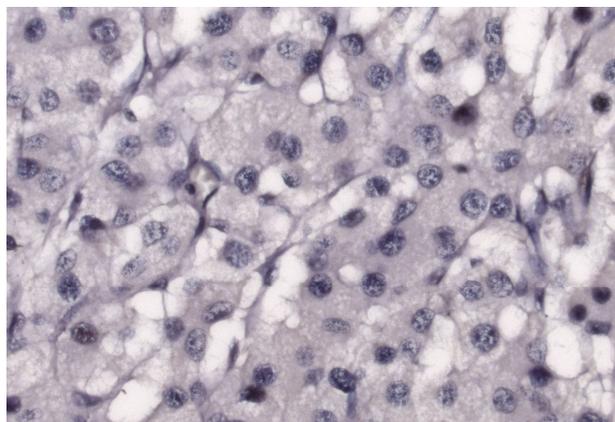
Firma: Dako (K1492) /

Demaskierung: Proteinase K

Reaktionsmuster: EGFR zeigt eine membranständige Anfärbung.

Beurteilung: In die Beurteilung

**Abbildung 9 - EGFR (-)**



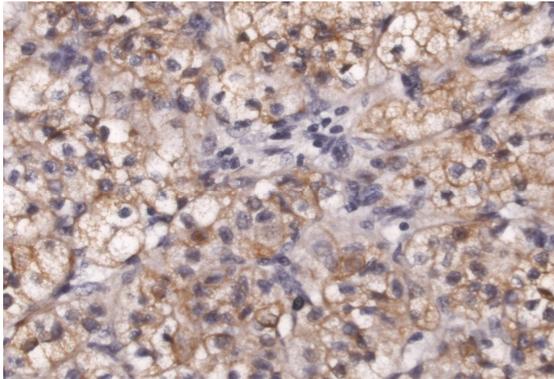
fließen die Stärke der Anfärbung und das Ausmaß der Membrananfärbung mit ein.  
Membrananfärbung (= **Wert**):

**0** – Keine Anfärbung, bzw. weniger als 10% der Zellen

**1** – Inkomplette Membrananfärbung (unvollständig), mehr als 10% der Zellen

**2** – Durchgehende Membrananfärbung, mäßig angefärbt, mehr als 10% der Zellen

**3** – Durchgehende Membrananfärbung, stark angefärbt, mehr als 10% der Zellen

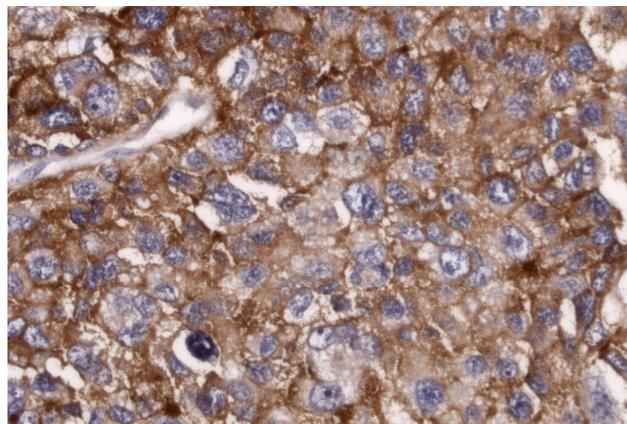


**Abbildung 10 - EGFR (1+)**

Der Epidermal Growth Factor Rezeptor ist ein Mitglied einer Familie von vier strukturell ähnlichen Glykoproteinen, die als „Typ-I Rezeptoren“ bezeichnet werden (Agrawal et al., 2005). Zu diesen auch erbB-Familie genannten Rezeptoren gehören noch

HER2/erbB2 oder neu, HER3/erbB3 und HER4/erbB4. HER1 zeigt Tyrosinkinase-Aktivität und wird auf dem Chromosom 7p12.3-p12.1 codiert, dessen Produkt ist ein 170-kDa Protein. Der Ligand des HER1, der Epidermal Growth Factor, ist ein pluripotenter Wachstumsfaktor (Shchemelinin et al. (II), 2006), der das Wachstum und die Steroidproduktion von NNR-Zellen stimuliert (Doi et al., 2001; Zhou et al., 2006), zudem beeinflusst er auch die Angiogenese in Tumoren (Emmett und Foster, 1998). EGFR findet sich in einer Vielzahl gesunder Zellen, u.a. in Muskelzellen, Fibroblasten, Nervenzellen und verschiedenen Epithelzellen. In verschiedenen Tumoren ist er

**Abbildung 11 - EGFR (2+)**



überexprimiert, wie beispielsweise in malignen Tumoren des Kopf-/Halsbereiches, von

Lunge, Pankreas, Blase und Mamma. (Viloria-Petit und Rengfio-Calzado, 2005) Für EGFR existiert ein selektiver Tyrosinkinase Inhibitor mit dem Namen Tyrphostin (AG1478) und ein chimärer Antikörper gegen EGFR mit dem Namen Cetuximab (Zhou et al., 2006; Sharkey und Goldenberg, 2006), der zu den ersten dieser neuen Präparategeneration zählt (Shchemelinin et al., 2006).

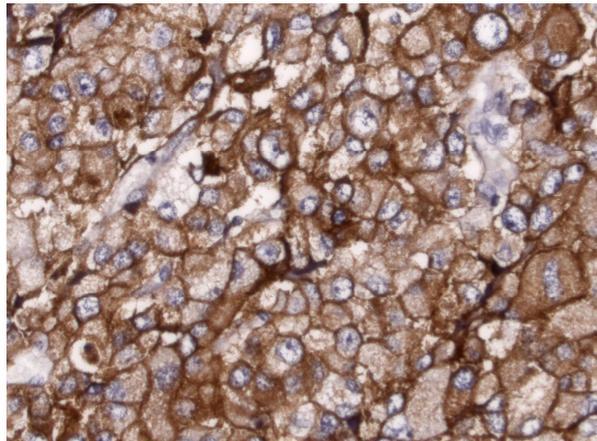


Abbildung 12 - EGFR (3+)

### 2.2.2.3 Her-2/neu (OMIM: \*164870)

[Synonym: ErbB-2; tyrosine kinase-type cell surface receptor HER2, v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, TKR1, c-erb B2, HER2]

Firma: Dako / Verdünnung des Aks:

**1:400** / Demaskierung: CS

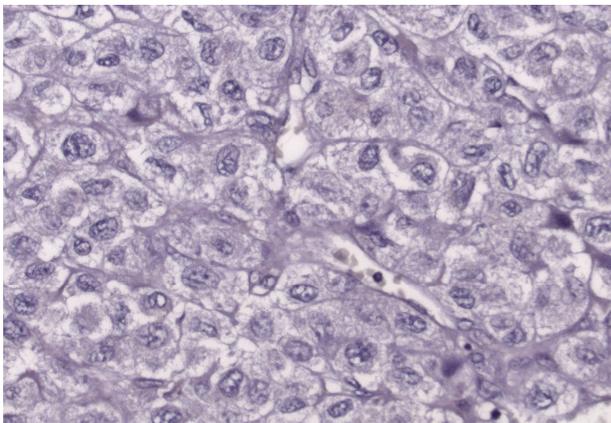
Reaktionsmuster: Her-2/neu zeigt eine membranständige Anfärbung.

Beurteilung: In die Beurteilung gehen das Ausmaß der Membrananfärbung und die Stärke der Anfärbung mit ein.

Membranfärbung (= **Wert**):

**0** – Keine Anfärbung, bzw. weniger als 10% der Zellen

Abbildung 13 - Her-2/neu (-)



**1** – Inkomplette Membranfärbung (unvollständig), mehr als 10% der Zellen

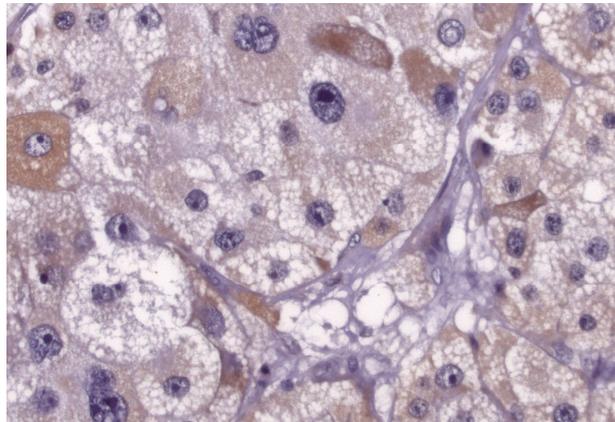
**2** – Durchgehende Membranfärbung, mäßig angefärbt, mehr als 10% der Zellen

**3** – Durchgehende Membranfärbung, stark angefärbt, mehr als 10% der Zellen

Das Her-2/neu Molekül ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor. Es ist ein weiteres Mitglied der „Typ-I-Rezeptor“-Familie und weist ebenfalls Tyrosinkinase-Aktivität auf (Agrawal et al., 2005). Wie EGFR findet sich Her-2/neu in einer Vielzahl gesunder Zellen, u.a. in

Muskelzellen, Fibroblasten, Nervenzellen und verschiedenen Epithelzellen. Maligne Tumore des Colons, der Ovarien, der Mamma und der Blase, die eine Her-2/neu Überexpression aufweisen, weisen eine schlechte Prognose auf. Tyrostophin (AG879) ist ein selektiver Tyrosinkinase Inhibitor des Her-2/neu (Zhou et al., 2006).

**Abbildung 14 - HER-2/neu (Zytoplasmafärbung)**



### 2.2.3 Hormonrezeptoren

#### 2.2.3.1 Östrogenrezeptor (OMIM: +133430)

[Synonym: Estrogen receptor 1; ESR1]

Genort: 6q25.1

Firma: Dako / Verdünnung des Aks: **1:40** / Demaskierung: CS

Reaktionsmuster: Zytoplasmatische und Kernfärbung

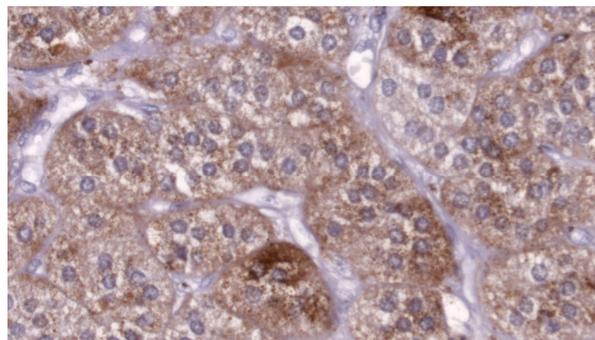
Beurteilung: Es werden die Kernanfärbung (= Kernwert) und die Zytoplasmafärbung (= Zellwert) getrennt nach folgender Einteilung beurteilt:

**0** – Keine Färbung; **1** – Wenig angefärbt; **2** – Mäßig angefärbt; **3** – Stark angefärbt

Der Östrogenrezeptor (ER) ist ein zytosolischer ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor. Man unterscheidet einen ERA und einen ER $\beta$ , die beide eine zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine Liganden-Bindungsdomäne (LBD)

aufweisen. Bindet das Östrogen, kann der Ligand-Rezeptor-Komplex im Zellkern die Transkription verschiedener Proteine induzieren (Löffler, 2003). ERA vermittelt eine Östrogen-induzierte Wachstumsstimulation. In bestimmten Tumoren, wie z.B. dem

**Abbildung 15 - Östrogen (Zytoplasmafärbung 2+)**



Mammakarzinom, wird eine Überexpression des ESR1 als immunhistochemischer Marker und seine Expression als therapeutischer Ansatzpunkt bestimmt. So ist in den meisten Mammakarzinomen das MUC1-Protein überexprimiert, was zu einer verstärkten Expression des ESR1 führt (Wei et al., 2006). In den letzten Jahren werden auch selektive Modulatoren des ESR1 erforscht wie beispielsweise das Bazedoxifenazetat (Komm et al., 2005).

### 2.2.3.2 Progesteron-Rezeptor (OMIM: \*607311)

[Synonym: PR, PGR]

Genort: 11q22

Firma: Dako / Verdünnung des Ak:

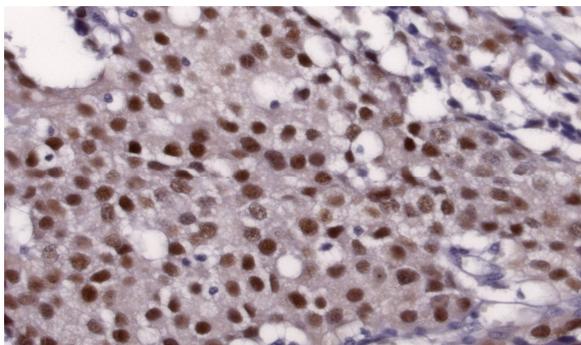
**1:40** / Demaskierung: CS

Reaktionsmuster: Zytoplasmatische und Kernfärbung

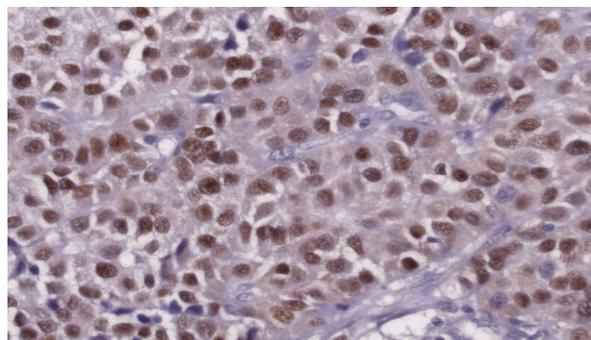
Beurteilung: Es werden die Kernfärbung (= **Kernwert**) und die Zytoplasmafärbung (= **Zellwert**) getrennt bewertet und nach folgender Einteilung beurteilt:

**0** – Keine Färbung; **1** – Wenig angefärbt; **2** – Mäßig angefärbt; **3** – Stark angefärbt

**Abbildung 17 - Progesteron (Kernfärbung 3+)**



**Abbildung 16 - Progesteron (Kernfärbung 2+)**



Wie auch das Östrogen gehört das Progesteron zur Gruppe der Steroidhormone und bindet wie dieses an seinen zytosolischen Rezeptor. Der Komplex fungiert dann als Transkriptionsfaktor und reguliert so die Translation bestimmter Proteine (Löffler, 2003). Auch die Expression des Progesteron-Rezeptors wird zur

Einschätzung von Prognose und therapeutischen Optionen von Tumoren (z.B. Mammakarzinom) verwendet (Wu, 2001). Circa 85% der Patientinnen mit primären

Mammatumoren, die ER und/ oder PR überexprimieren, sprechen auf eine Antihormontherapie an (Wu, 2001).

## 2.2.4 Proliferationsmarker

### 2.2.4.1 Ki67

[Synonym: MIB-1]

Firma: Dako / Verdünnung des Aks:

**1:800** / Demaskierung: CS

Reaktionsmuster: Ki67 zeigt eine nukleäre Anfärbung. Erfasst wird der prozentuale Anteil der positiven Kerne. Die Einteilung erfolgt in 10%-Schritten. Hohe Prozentwerte deuten auf hohe Wachstumsraten des Gewebes hin.

Kernfärbung (= Wert):

Abbildung 18 - Ki67 (10%)

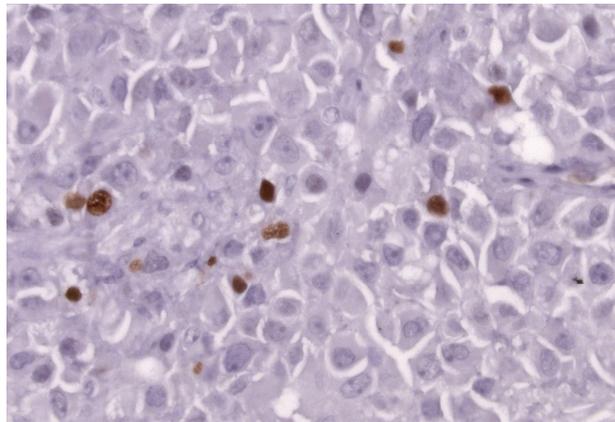
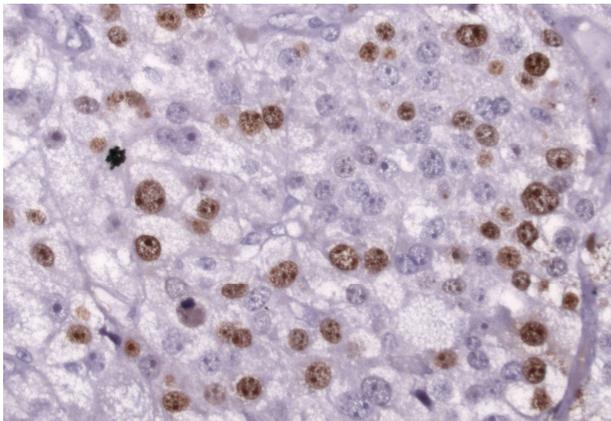


Abbildung 19 - Ki67 (30%)



**0** - Keine Zellkerne angefärbt;

**10** - Es sind 10% der Nuklei angefärbt;

**20** - Es sind 20% der Nuklei angefärbt;

**100** - Es sind 100% der Zellkerne gefärbt

Ki67 ist ein großes nukleäres Phosphoprotein und dient als Proliferationsmarker. Seine Expression ist stark vom Zellzyklus

abhängig, während der G<sub>0</sub>-Phase (in ruhenden Zellen) wird dieses Molekül nicht exprimiert, dagegen wird es in vielen Krebsentitäten als Zeichen der verstärkten Proliferation vermehrt exprimiert (Gumurdulu et al., 2007).

#### 2.2.4.2 p53 (OMIM: +191170)

[Synonym: Tumor protein p53; TP53]

Genort: 17p13.1

Firma: Dako / Verdünnung des Aks:

**1:150** / Demaskierung: CS

Reaktionsmuster: p53 zeigt eine nukleäre Anfärbung.

Beurteilung: Hier wird die Kernfärbung (= **Wert**) betrachtet:

**0** – Keine Anfärbung; **1** – Wenig angefärbt; **2** – Stark angefärbt

Das p53 ist ein

Tumorsuppressorprotein und gehört zur p53-Familie. Die Bezeichnung gibt gleichzeitig das Molekulargewicht des Proteins an. Es wird vom p53-Suppressorgen (= TP53) codiert, das auf der Bande 17p13.1 zu finden ist (Riede et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen hat das p53 zwei Aufgaben:

Liegt eine Schädigung der zellulären DNA vor, hemmt das p53 die Zelle am Übergang in die S-Phase des Zellzyklus (Löffler, 2003). Auf dem anderen Weg führt p53 über eine Signalkette zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Zelle.

p53 ist in jeder Körperzelle zu finden. Bei Tumorzellen kommen häufig Mutationen im

p53-Gen vor, wodurch das entstehende Protein fehlerhaft ist, seine Überwachungsfunktion verliert und somit ein bedeutender Faktor in der Pathogenese von Tumoren ist (Riede et al., 2004). Die immunhistochemische Überexpression von p53 korreliert gut mit dem Mutationsstatus von p53 (Davidoff et al, 1991; Reincke et al., 1994).

Abbildung 20 - p53 (1+)

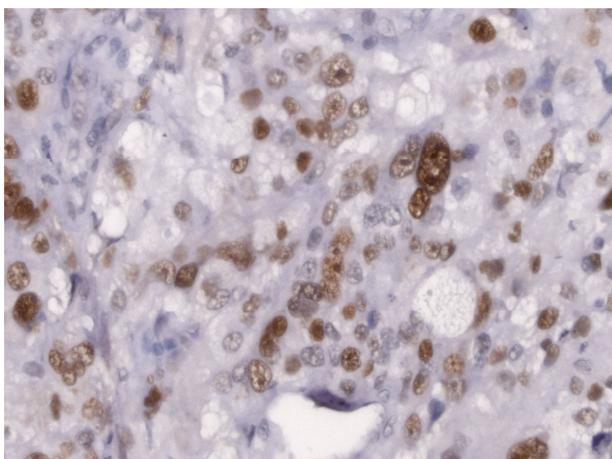
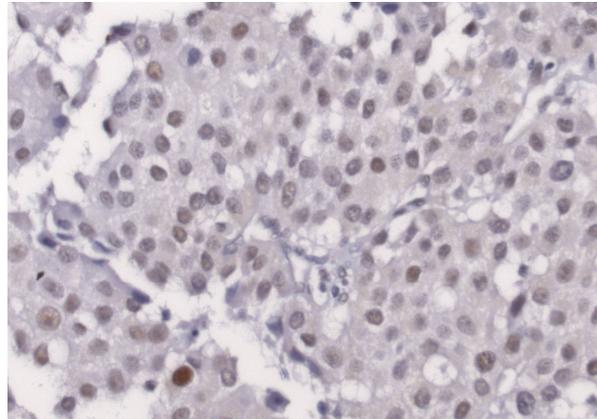


Abbildung 21- p53 (2+)

## 2.2.5 Sonstige

### 2.2.5.1 AMACR (OMIM: +604489)

[Synonym: Alpha-methylacyl-CoA racemase]

Genlokus: 5p13.2-q11.1

Firma: Biologo / Verdünnung des

Aks: **1:40** / Demaskierung: Target

Reaktionsmuster: AMACR zeigt eine zytoplasmatische Anfärbung.

Beurteilung: Die

Zytoplasmaanfärbung wird nach folgender Einteilung beurteilt:

Zytoplasmafärbung (= **Wert**):

**0** – Keine Färbung; **1** – Schwach angefärbt; **2** – Stark angefärbt

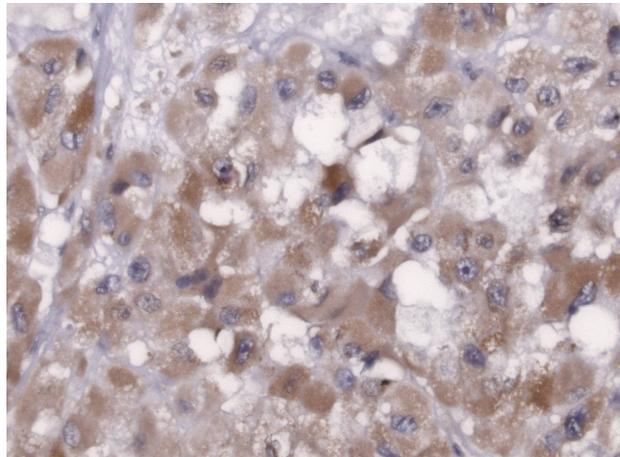


Abbildung 22 - AMACR (1+)

AMACR ist in Peroxisomen und Mitochondrien zu finden und katalysiert einen Schritt

in der Biosynthese von Gallensäuren und wird für den Abbau verzweigtkettiger Fettsäuren benötigt. Es setzt (25R)-3a,7a,12a-trihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoyl-CoA (THCA-CoA) zu seinem Diastereomer (25S)-THCA-CoA um (Cuebas et al., 2002).

In einer 2004 veröffentlichten Studie von Kumar-Sinha et al. zeigte sich bei Patienten mit Prostatakrebs beständig eine

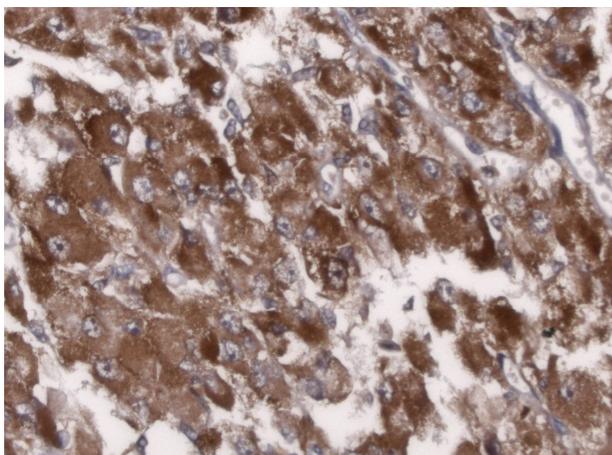


Abbildung 23 - AMACR (2+)

Erhöhung des Enzyms. Auch in anderen Studien waren Variationen der Proteinstruktur und der genetischen Sequenz von AMACR mit einem erhöhten Risiko für Prostatakarzinome assoziiert (Kumar-Sinha et al., 2004).

Bislang liegen Untersuchungen über die Expression von AMACR in NNR-Ca nicht vor.

### 2.2.5.2 VEGF (OMIM: +192240)

[Synonym: Vascular endothelial growth factor, VEGF-A]

Genort: 6p12

Firma: Santa Cruz / Verdünnung des Axs: **1:100** / Demaskierung: CS  
Reaktionsmuster: Membranständige Färbung.

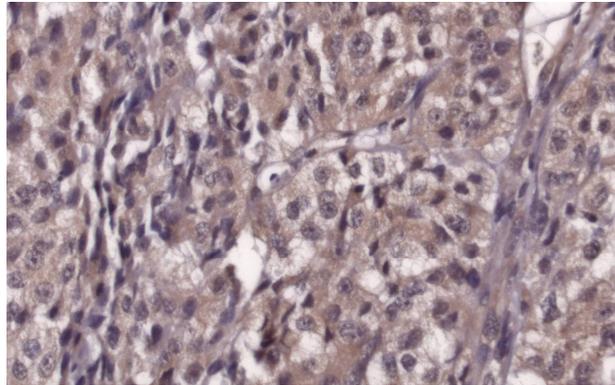
Beurteilung:

**0** – Keine Färbung; **1** – Schwach positiv; **2** – Stark positiv

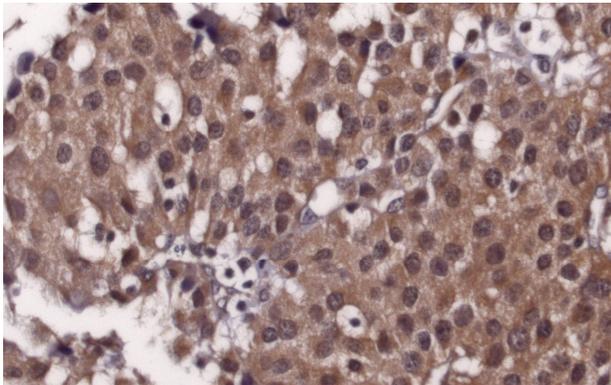
VEGF ist ein potenter Regulator der

Angiogenese und beeinflusst die vaskuläre Permeabilität für Wasser und Proteine. Shibuya gibt an, dass die Membrandurchlässigkeit durch VEGF um das 50.000-fache erhöht wird im Vergleich zu einer Histamin-bedingten Permeabilitätserhöhung. In den

**Abbildung 24 – VEGF (1+)**



**Abbildung 25 – VEGF (2+)**



vergangenen Jahren wurden verschiedene Mitglieder der VEGF Gen-Familie entdeckt. Dies sind VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der PLGF (placental growth factor). Die biologische Wirkung von VEGF ist abhängig von drei verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren – VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). Sie

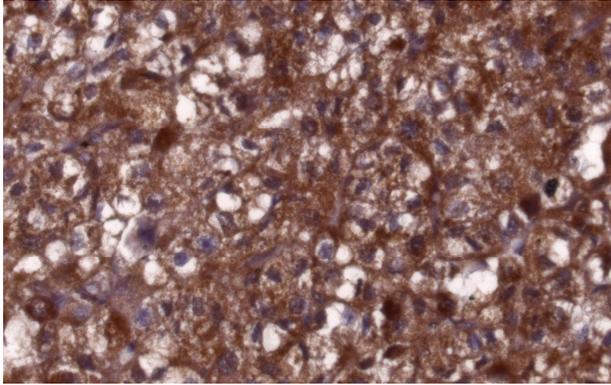
werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert (Papaioannou et al., 2006). VEGF(-A) bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2.

VEGFR-3 findet man hauptsächlich in Lymphgefäßen.

VEGF (besonders VEGF-A) spielt eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese in gesundem Parenchym wie auch in Tumorgewebe (Zacharieva et al., 2004). Es sind

verschiedene maligne Tumore bekannt, die VEGF freisetzen um die Neubildung von Blutgefäßen anzuregen um so ein weiteres Tumorwachstum zu ermöglichen.

**Abbildung 26 – VEGF (3+)**



Bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genentech), ein therapeutischer Ak, bindet an VEGF, verhindert die Interaktion mit endothelialen Zellen und kann so die Neubildung von Blutgefäßen in wachsenden Tumoren hemmen. Dieses Präparat wird zur Erstbehandlung von Patienten mit metastasierendem Dickdarmkrebs (Kolon- oder Rektumkarzinom) in Kombination

mit einer Chemotherapie angewendet. In weiteren Studien wird die Anwendung von Avastin beim Nierenzellkarzinom, beim Mammakarzinom und bei einigen anderen Neoplasien eruiert (Sharkey und Goldenberg, 2006).

Zacharieva et al. untersuchten Patienten mit adrenalen Tumoren und fanden bei diesen einen deutlich erhöhten Serumspiegel von VEGF im Vergleich zu gesunden Probanden.

Die von uns verwendeten Marker zeigen im Gewebe in der Regel eine homogene Anfärbung, daher wurde der Prozentsatz gefärbter bzw. nicht gefärbter Zellen in unseren Ergebnisse nicht gesondert berücksichtigt. Allerdings wurde ein Fall nur dann als positiv gewertet, wenn die jeweils genannten Kriterien (siehe 2.2) für mindestens 5% der Zellen zutrafen. Eine Ausnahme von dieser Einteilung sind EGFR, HER-2/neu und Ki67. Hier mussten mehr als 10% der Zellen angefärbt sein.

### 3 Ergebnisse

Die beiden NNR-Tissue-Microarrays beinhalten Gewebeproben (je Fall wurden 5 Stenzen angefertigt) von 104 NNR-Karzinomen, jeweils 5 NNR-Adenomen mit Conn-Syndrom, bzw. mit Cushing-Syndrom, 5 inaktiven NNR-Adenomen und 5 gesunden Nebennieren. Alle NNR-Ca entstammen dem deutschen Nebennierenrindenzarzinom-Register im Rahmen der FIRM-ACT Studie. Die Diagnosen wurden von verschiedenen Pathologen gestellt, die Referenzpathologie aller Fälle wurde im Referenzzentrum für Endokrine Pathologie in Hamburg von Prof. Dr. Saeger erstellt. Damit ein Fall als auswertbar angesehen werden konnte, mussten mindestens zwei Stenzen auswertbar sein. Es wurde der höchste Wert, der mindestens zweimal vorhanden war, gewertet.

#### 3.1 Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität

##### 3.1.1 CD117

In der Färbung für CD117 waren 117 von 124 Proben auswertbar. Sieben NNR-Ca waren nicht auswertbar. Die Werte reichen von 0-2.

Von den 97 auswertbaren NNR-Ca haben 25 Proben den Wert 0 (=26%), 69 Präparate (=71%) den Wert 1 und 3 Fälle (=3%) weisen den Wert 2 auf.

Bei den Conn-Adenomen und den Cushing-Adenomen zeigen je drei Fälle keine Reaktivität und zwei Fälle eine

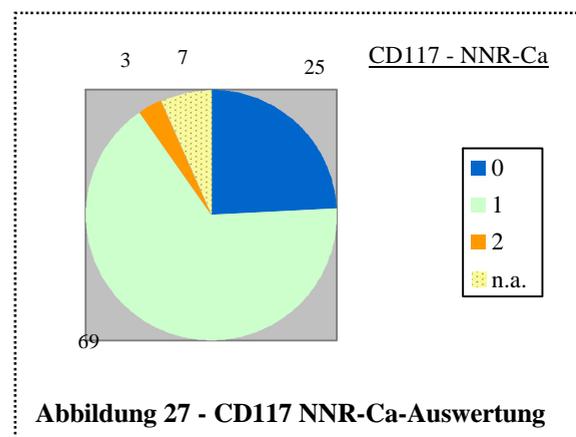


Abbildung 27 - CD117 NNR-Ca-Auswertung

Expression von 1. Von den fünf inaktiven Adenomen zeigen vier Fälle keine Expression und ein Fall einen Wert von 1. Im normalen NNR-Gewebe wurde nur in einem Fall eine Färbung im Bereich der Rinde beobachtet, die übrigen Vergleichsgewebe waren negativ.

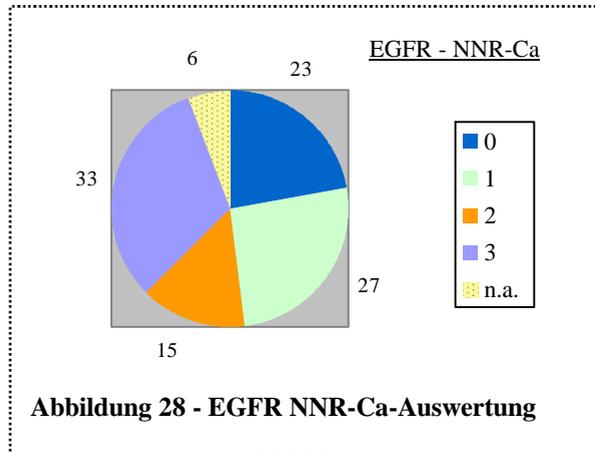
### 3.1.2 EGFR

Von den 124 Proben waren in dieser Färbung 118 evaluierbar. Sechs der NNR-Ca konnten nicht ausgewertet werden. Es wurden Werte von 0-3 ermittelt.

Von den 98 auswertbaren NNR-Ca waren 23 negativ (=23%), 27 (=28%) zeigten eine Expression von 1, 15 (=15%) eine Expression von 2 und 33 Fällen (=34%) eine Expression von 3.

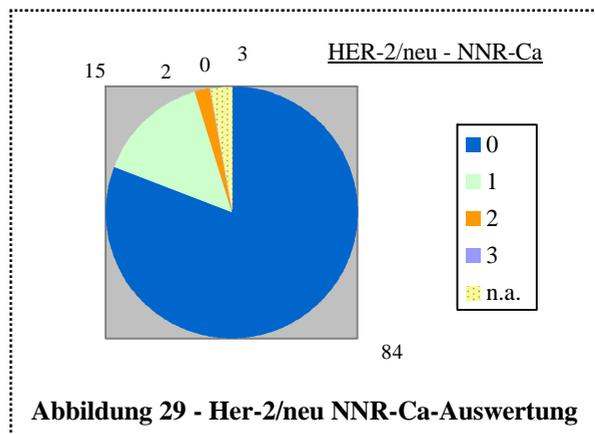
Alle Conn-Adenome waren beurteilbar. Drei zeigten eine Expression von 1 und zwei eine Expression von 2. Die Cushing-Adenome umfassten drei Fälle

ohne Expression und einen Fall mit einer Expression von 1. Zwei der fünf Fälle von inaktiven Adenomen zeigten eine Expression von 1, zwei weitere eine Expression von 2 und nur in einem Fall lag eine starke Expression von 3 vor. Beim normalen NNR-Gewebe waren vier Fälle negativ und ein Präparat zeigte eine Expression von 1.



### 3.1.3 Her-2/neu

In den Her-2/neu-gefärbten Arrays waren 121 von 124 Fällen auswertbar, drei NNR-Ca waren nicht auswertbar. 84 (=83%) der 101 NNR-Karzinome zeigten keine Expression von Her-2/neu, 15 (=15%) eine Expression von 1 und zwei (=2%) eine Expression von 2. Alle Conn-Adenome, Cushing-Adenome, inaktive NNR-Adenome und normale NNR zeigten keine Expression von Her-2/neu.



### 3.2 Hormonrezeptoren

#### 3.2.1 Östrogen

Von den 124 Fällen waren 120 evaluierbar. Vier NNR-Ca konnten nicht ausgewertet werden.

**Kern:** Es wurden Werte von 0-3 ermittelt.

Von den 100 beurteilbaren NNR-Ca waren 76 (=76%) nukleär negativ für den Östrogenrezeptor. 18 (=18%) zeigten eine nukleäre Expression von 1 und in je drei Fällen (=je 3%) wurde eine

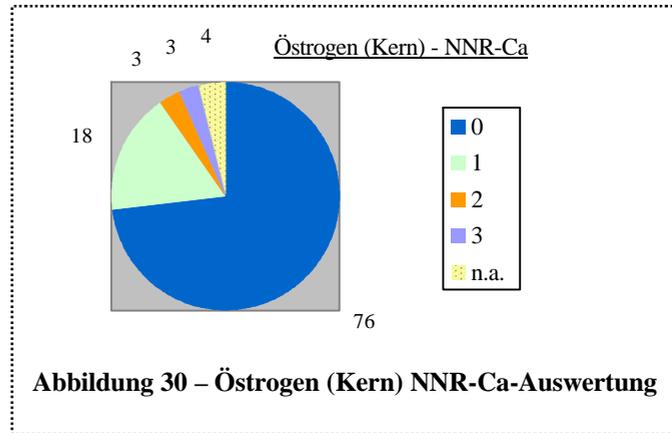


Abbildung 30 – Östrogen (Kern) NNR-Ca-Auswertung

Expression von 2 bzw. 3 beobachtet. Drei der fünf Conn-Adenome zeigten keine Expression des Östrogenrezeptors und je ein Fall eine Expression von 1 bzw. 3. Alle Fälle von Cushing-Adenomen waren negativ. Bei den inaktiven Adenomen blieb ein Fall negativ und jeweils zwei Fälle zeigten eine Expression von 1 bzw. 2. An den normalen NNR-Gewebe fand sich in vier Fällen keine Expression und in einem Fall eine Expression von 2.

**Zytoplasma:** Es wurden Werte von 0-3 gefunden.

Von den 100 beurteilbaren NNR-Ca waren drei Fälle (=3%) negativ. In 32 Fällen (=32%) fand sich eine zytoplasmatische Expression von 1, in 23 Fällen (=23%) eine Expression von 2 und in 42 Fällen (=42%) eine Expression von 3.

Vier der fünf Conn-Adenome zeigten einen Färbegrad von 2, eines zeigte den Färbegrad 1. Die Cushing-Adenome, wie auch die inaktiven Adenome und die normale NNR, zeigten sämtlich eine Expression von 2.

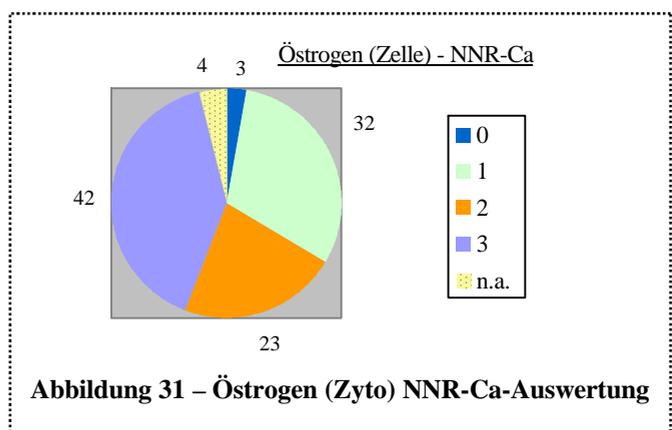


Abbildung 31 – Östrogen (Zyto) NNR-Ca-Auswertung

### 3.2.2 Progesteron

121 von 124 Fällen konnten ausgewertet werden, drei NNR-Ca waren nicht auswertbar.

**Kern:** Es wurden Expressionen von 0-3 gefunden.

62 der 101 NNR-Ca (=61%) waren nukleär negativ für den Progesteronrezeptor. In 27 (=27%) Fällen zeigte sich eine Expression von 1 und in 10 Fällen (=10%) eine Expression von 2. Eine kräftige nukleäre

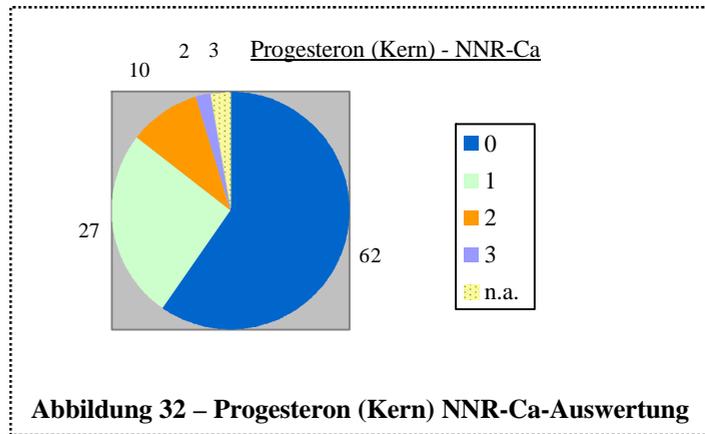


Abbildung 32 – Progesteron (Kern) NNR-Ca-Auswertung

Expression von 3 konnte in zwei Fällen (=2%) beobachtet werden. Die fünf Conn-Adenome blieben negativ. Drei der fünf Cushing-Adenome waren ebenfalls negativ, zwei Fälle zeigten eine Färbeintensität von 1. Von den fünf inaktiven Adenomen sind vier negativ und eines zeigt eine Expression von 2. Beim normalen NNR-Gewebe blieben drei Fälle negativ und zwei Fälle zeigten eine Expression von 1.

**Zytoplasma:** Die Werte liegen zwischen 0 und 3.

Unter den 101 auswertbaren NNR-Ca waren 27 Fälle (=27%) zytoplasmatisch negativ. 44 Fälle (ca. 43%) zeigten eine Expression von 1, 24 (=24%) von 2 und 6 Fälle (=6%) eine Expression von 3. Vier der fünf Conn-Adenome zeigten eine Expression von 1

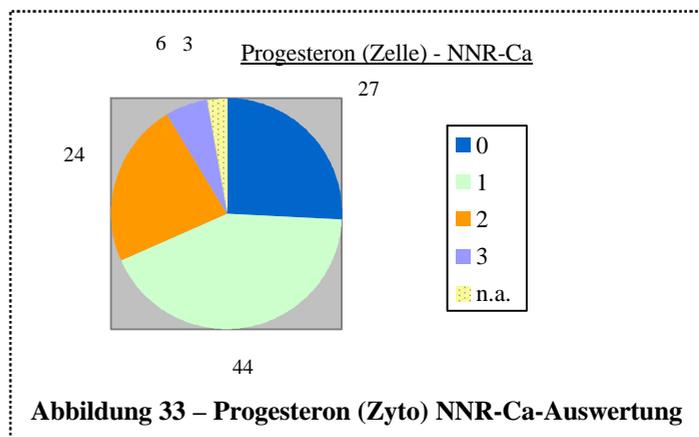


Abbildung 33 – Progesteron (Zyto) NNR-Ca-Auswertung

und ein Fall eine Expression von 2. Bei den Cushing-Adenomen zeigten vier Fälle eine Expression von 2 und ein Fall eine Expression von 3. Von den fünf inaktiven Adenomen waren zwei negativ und je ein Fall zeigte eine Expression von 1, 2 bzw. 3. Von den fünf gesunden NNR ließen zwei eine Expression von 1 erkennen und drei eine Expression von 3.

### 3.3 Proliferationsmarker

#### 3.3.1 Ki67

In der Ki67-Darstellung waren 116 von 124 Proben auswertbar. Acht NNR-Karzinome waren nicht auswertbar. Die Werte reichen von 0 bis 40%.

Von den 96 auswertbaren NNR-Ca hatten 21 Fälle (=22%) den Wert 0, 37 Fälle (ca. 38%) den Wert 10, 18 (=19%) den Wert 20, 15 (=16%) den Wert 30,

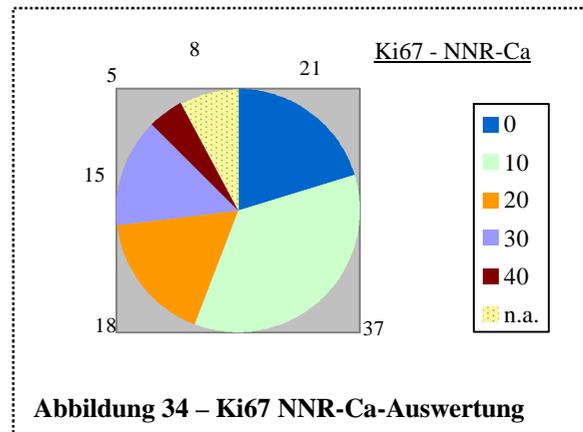


Abbildung 34 – Ki67 NNR-Ca-Auswertung

fünf Fälle (=5%) zeigten eine Proliferationsfraktion von 40. Drei der fünf Conn-Adenome zeigten keine Markierung in der Proliferationsdarstellung, zwei Fälle eine Proliferation von 10%. Die Cushing-Adenome zeigten das gleiche Ergebnis. Bei den inaktiven Adenomen fanden sich zwei Fällen mit dem Wert 0 und drei mit dem Wert 10%. Das normale NNR-Gewebe zeigte keine proliferative Aktivität.

#### 3.3.2 p53

Von den 124 Proben waren in der p53-Färbung 120 evaluierbar. Vier NNR-Ca konnten nicht ausgewertet werden. Die Werte für p53 liegen im Bereich von 0 bis 2.

Von den 100 beurteilbaren NNR-Ca waren 15 negativ (=15%) in der p53-Darstellung, 40 Fälle (=40%) zeigten eine Färbeintensität von 1 und 45 (=45%) eine

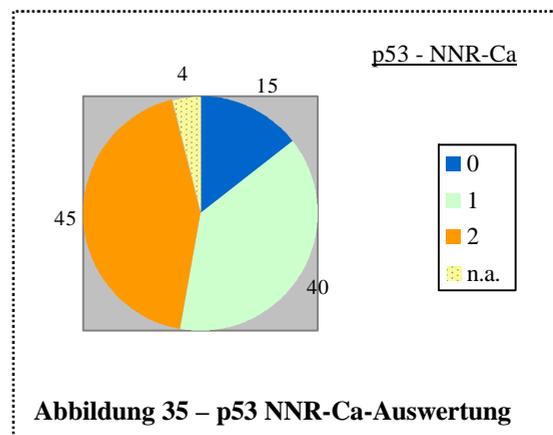


Abbildung 35 – p53 NNR-Ca-Auswertung

kräftige Expression von 2. Alle Conn-Adenome zeigten eine Expression von 1, ebenso wie vier der fünf Cushing-Adenome. Ein weiteres Cushing-Adenom zeigte eine Expression von 2. Die normale NNR war negativ für p53.

### 3.4 Sonstige

#### 3.4.1 AMACR

Von 124 Fällen konnten 115 evaluiert werden. Acht NNR-Ca und ein Vergleichsgewebe mit normaler NNR waren nicht auswertbar.

Nur 11 (=11%) der 96 auswertbaren NNR-Ca waren negativ für AMACR. In 48 Fällen (=50%) fand sich eine Expression von 1, in 37 (39%) eine Expression von 2. Drei der fünf Conn-Adenome zeigten eine Expression von 1 und zwei Fälle von 2. Ein Fall der

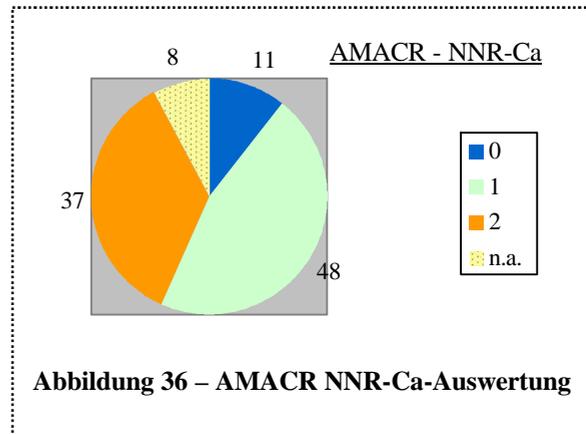


Abbildung 36 – AMACR NNR-Ca-Auswertung

Cushing-Adenome blieb negativ, vier Fälle zeigen eine Farbeintensität von 1. Von den fünf inaktiven Adenomen blieben zwei negativ und drei zeigten eine Expression von 1. Die vier auswertbaren Fälle des normalen NNR-Gewebes waren negativ.

#### 3.4.2 VEGF

Von den 124 Proben waren in diesem Präparat 113 evaluierbar. Elf der NNR-Ca konnten nicht ausgewertet werden. Es wurden Werte von 0-3 ermittelt.

Unter den 93 auswertbaren NNR-Ca waren 49 Fälle (=53%) negativ, 26 (=28%) zeigten eine Expression von 1, 17 (=18%) eine Expression von 2 und ein Fall (=1%) eine kräftige Expression von 3.

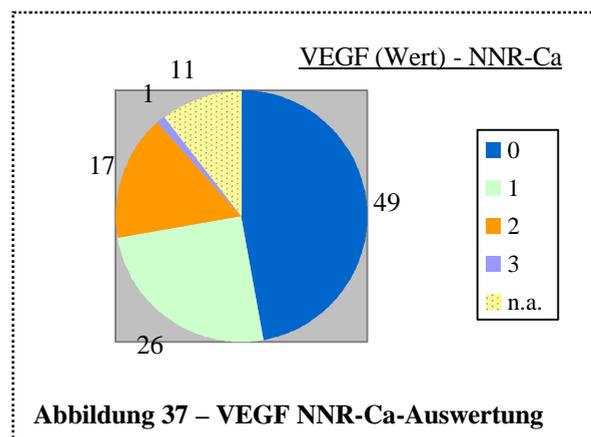


Abbildung 37 – VEGF NNR-Ca-Auswertung

Drei der fünf Conn-Adenome waren negativ und zwei wiesen eine Farbeintensität von 1 auf. Von den fünf

Cushing-Adenomen waren zwei negativ und zwei wiesen eine Expression von 1 auf. Bei den inaktiven Adenomen waren zwei negativ, zwei zeigten eine Farbeintensität von 1 und eines von 2. Beim normalen NNR-Gewebe waren drei Gewebe negativ und zwei Fälle wiesen eine Expression von 1 auf.

## 4 Diskussion

Das Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Ca) ist ein seltener maligner, epithelialer Tumor mit einer jährlichen Inzidenz in Deutschland von etwa 2:1.000.000 Einwohner. Es ist für etwa 0,2% aller Krebstodesfälle verantwortlich. In verschiedenen Studien (Soreide et al., 1970-84; Icard et al., 1992; Zografos et al., 1994; Haak et al., 1994; Crucitti et al., 1996) lag die Gesamt-5-Jahre-Überlebensrate bei 16-35%. Die Seltenheit der Erkrankung erschwert die Entwicklung wirksamer Therapieansätze erheblich. Erst in letzter Zeit gelang es, größere Patientenkohorten in kontrollierten Studien zu behandeln (Allolio et al., 2006) und größere Fallzahlen an Tumorgewebe wissenschaftlichen Untersuchungen zuzuführen. Erstmals besteht damit auch die Möglichkeit die Expression, möglicherweise relevanter Proteine, für moderne Therapiekonzepte an großen Fallzahlen zu untersuchen. Bislang liegen nur sehr lückenhafte diesbezügliche Studien vor. So konnten Saeger et al. (2002) an 17 NNR-Ca zeigen, dass eine Überexpression von Her-2/neu, die in bis zu 10-20% der Mammakarzinome zu finden ist und eine Behandlung mit dem spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ermöglicht (Piccart-Gebhart, M. J. 2001), in NNR-Ca nicht zu finden ist.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression verschiedener, in der modernen Tumorthherapie relevanter Proteine mittels immunhistochemischer Analyse an 104 NNR-Ca untersucht und mit der entsprechenden Expression bei jeweils fünf Cushing-, Conn- und inaktiven Nebennierenadenomen, sowie in fünf tumorfreien Nebennieren, verglichen. Um einen hohen technischen Durchsatz bei den Färbungen zu ermöglichen und eine Standardisierung innerhalb der einzelnen Färbungen zu ermöglichen (Sprich, 2006), wurde die Tissue Microarray-(TMA)-Technik angewandt.

Als bemerkenswertestes Ergebnis ist die Expression der Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) in 85 von 96 in dieser Färbung auswertbaren Fällen (89%) zu verzeichnen. 37 dieser Fälle (39%) zeigten dabei eine kräftige Expression. AMACR wird zytoplasmatisch exprimiert und ist in Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert. Sowohl in Adenokarzinomen der Prostata, wie auch in in deren Vorläuferläsionen (prostatistische intraepitheliale Neoplasie: PIN) ist eine Expression von AMACR

beschrieben und kann bei der Differentialdiagnose sehr hilfreich sein (Hameed et al. 2005; Nassar et al., 2005). Interessanterweise ist auch in einem Teil der Fälle mit gutartiger Prostatavergrößerung (adenomyomatöse Prostathyperplasie) eine AMACR-Expression zu beobachten (Murphy et al., 2007).

Vor diesem Hintergrund erscheint bemerkenswert, dass auch in der Mehrzahl der untersuchten Nebennierenadenome (12 von 15 = 80%) zumindest eine schwache AMACR-Reaktivität zu beobachten war, während die mituntersuchten normalen Nebennieren negativ blieben. Die Bestimmung der AMACR-Expression ist demnach offenbar nicht hilfreich in der Abgrenzung Adenom/ Karzinom, zeigt aber eine Parallelität in der Tumorgenese des NNR-Ca mit anderen Tumorentitäten auf.

CD117 (C-kit) ist ein Protoonkogen und zeigt Tyrosinkinase-Aktivität. Es ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums (Funasaka et al., 1992; Petri, 2006). Seine dauerhafte Aktivierung in Folge von genetischen Mutationen ist u.a. Ursache für die Entstehung von bestimmten Weichgewebstumoren. In der vorliegenden Studie exprimierten 72 der 97 auswertbaren NNR-Ca CD117 (=74%) zumindest schwach. Eine starke Expression ließ sich nur in drei Fällen belegen (=3%). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer Studie von Zhang et al., die an einer Serie von 9 Nebennierenkarzinomen in nur 11% eine spezifische Expression von CD117 fanden (Zhang et al., 2003).

Diese Ergebnisse lassen C-kit nicht als geeignete Zielstruktur für eine spezifische Tumorthherapie erscheinen. Unterstützt wird diese Einschätzung auch von klinischen Daten: In einer kleinen Serie metastasierter endokriner Tumoren, die auch vier NNR-Ca beinhaltete (Gross et al., 2006), kam es unter der Behandlung mit Imatinib Mesylat (Glivec), einem C-kit-Inhibitor, zu einer Krankheitsprogression in drei von vier untersuchten Fällen mit NNR-Ca, in einem Fall mußte die Behandlung wegen schwerwiegender psychischer Nebenwirkungen abgebrochen werden.

Eine Studie von Khan (2004) beschäftigt sich u.a. mit der Mutationsanalyse von C-kit an 15 NNR-Ca. Sie untersuchten die in GIST am häufigsten gefundene Mutation in Exon 11 und fanden in keinem NNR-Ca diese Mutation. Weitere Untersuchungen zu möglicherweise vorhandenen Mutationen in CD117 stehen noch aus, aber der Einsatz des C-kit-Inhibitors Imatinib scheint keine vielversprechende Therapieoption zu sein.

Der epidermal growth factor receptor (EGFR) wird in verschiedenen malignen Tumoren, z.B. der Lunge, des Colons, des Kopf-/Halsbereiches, von Pankreas, Blase und Mamma überexprimiert. Therapeutisch wird ein chimärer Antikörper gegen EGFR mit dem Namen Cetuximab (Erbix®) eingesetzt (Zhou et al., 2006; Sharkey und Goldenberg, 2006).

In einer großen Studie mit 64 NNR-Ca (Kamio et al., 1990) wurde die zytoplasmatische und membrangebundene immunhistochemische Anfärbung von EGFR untersucht. Insgesamt 63 Fälle (98,4%) waren positiv und somit signifikant mehr als bei den Adenomen, bei denen nur 10 von 23 (43,5%) immunreaktiv waren. Einschränkend ist hier zu bemerken, dass nach aktuellen Kriterien nur eine membranständige Reaktivität als positiv gewertet würde. In einer anderen Studie (Sasano et al., 1994) fand sich in 4 von 5 Fällen von NNR-Ca (80%) eine moderate bis starke Expression von EGFR. Unter den mituntersuchten Adenomen waren es lediglich 19% (5/26). Die restlichen Fälle zeigten keine oder nur eine schwache Anfärbung. In der vorliegenden Studie wurde nur eine membranständige Expression von EGFR als spezifisch gewertet. 48 der auswertbaren 98 NNR-Ca (=49%) zeigten eine mäßige bis starke membranständige EGFR-Reaktivität, während in 28% der Fälle (27 von 98) nur eine schwache, bzw. in 23% der Fälle keine Reaktivität zu verzeichnen war. Einschränkend sollte bedacht werden, dass EGFR zumindest bei anderen Tumoren (z.B. Colonkarzinom) eine sehr heterogene Expressionsverteilung innerhalb des Tumorparenchyms aufweisen kann und nicht ausgeschlossen ist, dass Tumore, die im TMA negativ blieben, an anderer – im Array nicht erfasster Stelle des Tumors (z.B. in der Invasionsfront) – eine Expression aufgewiesen haben könnten. Umgekehrt sind die im TMA positiven Fälle sicher als positiv zu werten. Daher erscheint eine auf den EGFR zielende Therapie durchaus theoretisch vielversprechend zu sein, auch wenn neueste Ergebnisse klinischer Studien (Quinkler et al., 2008) mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib zumindest bei weit fortgeschrittener Tumorerkrankung und nach Versagen zumindest zweier anderer Therapieprotokolle keinen Nutzen einer Anti-EGFR-basierten Therapie in diesen Fällen von NNR-Ca belegen konnten.

Um die Entwicklung bzw. den Einsatz neuer Wirkstoffe voran zu bringen ist die genetische Analyse der potentiellen Zielproteine sehr wichtig. Mutationen in den Genen

der Zielproteine können dabei der Ansatzpunkt für Wirkstoffe sein. Für EGFR gibt es bislang, soweit dem Autor bekannt, keine Mutationsanalysen.

Über die Expression von Her-2/neu, die in bis zu 10-20% der Mammakarzinome zu finden ist und eine Behandlung mit dem spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ermöglicht (Piccart-Gebhart, M. J. 2001), liegen bislang nur sehr beschränkte Studien vor. So konnten Saeger et al. (2002) an 17 NNR-Ca zeigen, dass eine Überexpression von Her-2/neu in NNR-Ca nicht zu finden ist. Gupta et al. (2001) fanden in keiner der 15 untersuchten NNR-Ca eine Her-2/neu Überexpression.

In guter Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten 99 der 101 auswertbaren NNR-Ca (=98%) keine oder nur eine schwache, inkomplette Membranfärbung in der Her-2/neu-Darstellung. Lediglich in zwei Fällen (=2%) war eine mäßige komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen nachweisbar. In Einklang mit den Daten aus der Literatur belegt die vorliegende Studie daher, dass eine gegen Her-2/neu gerichtete Therapieoption beim NNR-Ca offenbar nicht besteht.

Das Gen für das Tumorsuppressorprotein p53 ist in Tumorzellen oft mutiert, wodurch das entstehende Protein fehlerhaft ist, seine Zellzyklus-Überwachungsfunktion verliert und damit ein bedeutender Faktor in der Pathogenese von Tumoren ist (Riede et al., 2004). Die immunhistochemisch nachweisbare Überexpression von p53 korreliert gut mit dem Mutationsstatus von p53 (Davidoff et al., 1991; Reincke et al., 1994).

In Brasilien wurde eine Untersuchung an Kindern mit NNR-Ca durchgeführt. Sie fand in keiner der 33 analysierten Fälle eine p53-Positivität (Sbragia et al., 2005). Eine deutsche Studie an erwachsenen Patienten ergab ein konträres Ergebnis: Hier wiesen 30% der Fälle (3/10) eine immunhistochemische Positivität auf (Wachenfeld et al., 2001). In einer späteren Studie mit 16 NNR-Ca zeigten 15 Fälle (=94%) eine positive Reaktion [d.h. mind. 1% der Zellen waren gefärbt] für p53 (Bernini et al., 2002). Von den 16 Fällen waren in 10 Fällen 10-50% der malignen Zellen angefärbt. Um mögliche falsch positive Fälle zu minimieren werteten die Autoren die Präparate auch noch mit einem erhöhtem Ausschlusslevel [d.h. mind. 5% der Zellen mussten positiv sein] aus. Hierbei kamen sie ebenfalls auf ein deutliches Ergebnis von 68,7% positiver Fälle (11 von 16).

In der vorliegenden Studie waren von den 100 beurteilbaren NNR-Ca nur 15 (=15%) negativ (<5% angefärbt) in der p53-Darstellung, 40 Fälle (=40%) zeigten eine schwache bis mäßige und 45 (=45%) eine kräftige Expression von p53. Insgesamt wurde p53 also in 85% aller untersuchten Fälle von NNR-Ca exprimiert. Alle Conn-Adenome zeigten eine schwache Expression, ebenso wie vier der fünf Cushing-Adenome. Nur ein Adenom (ein weiteres Cushing-Adenom) zeigte eine kräftige p53-Expression. Die normale NNR war negativ für p53. Die erhaltenen Daten belegen die Bedeutung von p53 in der Tumorgenese des NNR-Ca. Die niedrigen Detektionsraten von p53 in den früheren Studien könnten dabei mit der höheren Sensitivität der aktuell verwendeten Antikörper im Vergleich mit den früheren begründet sein.

Gicquel et al. (2001) untersuchten 13 Patienten mit NNR-Ca und fanden bei 11 von ihnen (=85%) einen 17p13 LOH. Aufgrund dieses hohen Prozentsatzes ist wahrscheinlich, dass ein Teil der für die Pathogenese von NNR-Ca verantwortlichen Gene dort zu finden ist. Da jedoch nur etwa bei 25% der NNR-Ca eine p53-Mutation zu finden ist, liegt die Vermutung nahe, dass außer dem p53 in dieser Region ein weiteres Tumorsuppressorgen zu finden ist das an der NNR-Ca Tumorentstehung beteiligt ist.

Eine weitere Studie zur Mutationsanalyse von p53 hatte ähnliche Ergebnisse: Reincke et al. (1994) fanden in 3 von 11 (27%) untersuchten NNR-Ca Punktmutationen in Exon 6 bis 8. Barzon et al. (2001 [I]) fanden in 6 von 7 Fällen (=86%) eine Mutation in TP53.

Soon et al. (2008) haben aktuelle Quellen zu Mutationen in p53 und 17p13 LOH zusammengefasst. Sie geben den Prozentsatz von p53 Mutationen in NNR-Ca mit 20-27% an und den 17p13 LOH fanden sie in bis zu 87,5% der NNR-Ca.

VEGF (besonders VEGF-A) spielt eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese in gesundem Parenchym wie auch in Tumorgewebe (Zacharieva et al., 2004). Es sind verschiedene maligne Tumore bekannt, die VEGF freisetzen um die Neubildung von Blutgefäßen anzuregen um so ein weiteres Tumorwachstum zu ermöglichen.

Bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genentech), ein therapeutischer Ak, bindet an VEGF, verhindert die Interaktion mit endothelialen Zellen und kann so die Neubildung von Blutgefäßen in wachsenden Tumoren hemmen. Dieses Präparat wird zur Erstbehandlung von Patienten mit metastasierendem Dickdarmkrebs (Kolon- oder Rektumkarzinom) in Kombination mit einer Chemotherapie angewendet. In weiteren

Studien wird die Anwendung von Avastin beim Nierenzellkarzinom, beim Mammakarzinom und bei einigen anderen Malignitäten eruiert (Sharkey und Goldenberg, 2006).

Zacharieva et al. untersuchten Patienten mit adrenalen Tumoren und fanden bei diesen einen deutlich erhöhten Serumspiegel von VEGF im Vergleich zu gesunden Probanden.

In einer Studie mit einer Fallzahl von 13 Nebennierenrindenzellkarzinomen war die Anfärberate von VEGF im Vergleich zu gesunden NNR-Proben und Adenomen signifikant erhöht, was ein erhöhtes Potential zur Blutgefäßneubildung in Karzinomen vermuten lässt (Bernini et al. II, 2002). Sie bewerteten das Expressionslevel anhand der Prozentzahl der angefärbten Zellen. Die Karzinome hatten einen Wert von  $85,3 \pm 2,1\%$ , die Fälle der gesunden NNR-Kontrollgruppe dagegen nur einen Wert von  $33,1 \pm 6,1\%$ .

Eine andere Untersuchung mit 20 Fällen konnte dagegen keine Unterschiede in der Expression feststellen. Adenome und Karzinome zeigten eine ähnliche VEGF-Expression (Volante et al., 2006).

In dieser Studie zeigten 17 der auswertbaren 93 NNR-Ca (=18%) eine mäßige und ein Fall (=1%) eine kräftige Expression von VEGF. 26 Fälle (=28%) zeigten eine nur schwache Expression und 49 Fälle (=53%) waren negativ.

Obwohl eine VEGF-Expression offenbar nicht zu den häufigsten in NNR-Ca nachweisbaren das Tumorwachstum unterstützenden Mechanismen zu gehören scheint (nur knapp ein Fünftel der untersuchten Fälle zeigte eine mäßige bis starke Expression), könnte eine VEGF-inhibierende Therapie in ausgewählten Fällen (u.U. nach Bestimmung der VEGF-Expression im Tumorgewebe), z.B. auch als supportive Maßnahme, sinnvoll sein. Weitere Studien sind aber sicher nötig, um die Bedeutung der VEGF-Expression im NNR-Ca und die Chancen einer entsprechenden Inhibierung zu evaluieren.

Die Zelllinie H295R, die zur Erforschung der zellulären Eigenschaften von Nebennierenrindenzellkarzinomzellen benutzt wird, besitzt alle wichtigen adrenalen Enzymsysteme. Anhand dieser Zelllinie untersuchen Forscher die Induktion und Inhibition von adrenokortikalen Enzymen durch verschiedene Verbindungen (Somjen et al., 2003). Montanaro et al. fanden in der Zelllinie H295R eine deutliche Überexpression des Östrogenrezeptor- $\beta$ -Moleküls im Vergleich zur Östrogenrezeptor- $\alpha$ -

Isoform, was vermuten lässt, dass beim NNR-Ca der Östrogenrezeptor- $\beta$  entscheidend an proliferativen Vorgängen beteiligt ist.

Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Analyse von 16 Nebennierenrindenzinomen (Barzon et al. II, 2008). Hierbei waren 12 von 16 Fällen positiv für Östrogenrezeptor- $\beta$ , sechs waren stark gefärbt und sechs waren schwach gefärbt. Dagegen war kein Fall positiv für Östrogenrezeptor- $\alpha$ .

In der vorliegenden Studie wurde daher auch das  $\beta$ -Molekül des Östrogenrezeptors immunhistochemisch dargestellt. Von den 100 beurteilbaren NNR-Ca waren 76 nukleär negativ (=76%) für die  $\beta$ -Untereinheit des Östrogenrezeptors. 18 (=18%) zeigten eine schwache nukleäre Expression und je drei Fälle (=je 3%) eine mäßige, bzw. starke Expression.

Interessanterweise zeigte die Mehrzahl der Fälle auch eine zytoplasmatische Reaktivität in der Färbung für die  $\beta$ -Untereinheit des Östrogenrezeptors: Von den 100 beurteilbaren NNR-Ca waren nur drei Fälle (=3%) zytoplasmatisch negativ. In 32 Fällen (=32%) fand sich eine schwache zytoplasmatische Färbereaktion, in 23 Fällen (=23%) eine mäßige und in 42 Fällen (=42%) sogar eine starke zytoplasmatische Expression.

Ganz vergleichbare Ergebnisse wurden in der immunhistochemischen Darstellung des Progesteronrezeptors erzielt: 62 der 101 in dieser Färbung auswertbaren NNR-Ca waren nukleär negativ (=61%) für den Progesteronrezeptor. In 27 (=27%) Fällen zeigte sich eine schwache Expression und nur in 10 Fällen (=10%) konnte eine mäßige und in zwei Fällen (=2%) eine kräftige nukleäre Expression beobachtet werden.

Diese Daten legen nahe, dass eine wesentliche Abhängigkeit des Tumors von den Hormonen, deren Rezeptoren hier untersucht wurden, nicht zu bestehen scheint. Die Signifikanz und Bedeutung der zytoplasmatischen Reaktivität in einer großen Zahl der untersuchten Fälle ist nicht klar. Es könnte sich grundsätzlich um eine unspezifische Reaktivität des teils lipidreichen Gewebes mit dem Antikörper handeln, aber dann wäre eher eine gleichmäßige Hintergrundreaktivität zu erwarten. Die doch recht heterogene Anfärbbarkeit der verschiedenen Tumoren legt eine gewisse Spezifität doch nahe. Ob einem zytosolischen Kompartiment der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, die ihren bekannten Wirkort ja im Kern haben, eine funktionelle Bedeutung zukommt, wäre in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

Das nukleäre Phosphoprotein Ki67 wird in vielen Krebsentitäten als Zeichen der verstärkten Proliferation vermehrt exprimiert (Gumurdulu et al., 2007).

Stojadinovic et al. haben 2002 eine große Studie (insgesamt 124 Patienten) zum Vergleich von gesundem NNR-Gewebe und Nebennierenrindenzinomen durchgeführt. In keiner der 38 gesunden Vergleichsproben war ein erhöhter (mehr als 5% der Zellkerne angefärbt) Ki67-Index nachweisbar. In der Gruppe mit primärem NNR-Karzinom (38) hatten 35,5% der Fälle eine erhöhte Ki67-Expression.

Eine andere Studie fand in NNR-Ca einen mittleren Ki67-Index von  $11,94 \pm 7,58\%$ . Im Vergleich dazu lag dieser in normalem, gesundem NNR-Gewebe bei  $1,9 \pm 1,3\%$  (Wachenfeld et al., 2001). Die Autoren stellten fest, dass ein Ki67-Index über 5% ein spezifisches und sensitives Merkmal für ein NNR-Ca sei.

Ein ähnliches Ergebnis fanden Bernini et al. (2002): Sie fanden sowohl in allen Nebennierenadenomen als auch in gesundem NNR-Parenchym eine sehr niedrige (<1%) MIB-1-(Ki67)-Expression. In Nebennierenkarzinomen war dagegen eine stark erhöhte MIB-1-(Ki67)-Expression (3-40%) und signifikant höhere Mittelwerte von  $13,7 \pm 3,0\%$  im Vergleich zu gesunden Proben nachweisbar. Morimoto et al. (2008) haben in einer Studie festgestellt, dass bei erhöhten Ki67-Indizes im Primärtumor die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv eines NNR-Ca nach vorausgegangener Resektion gesteigert und der Krankheitsverlauf aggressiver ist.

Von den 96 auswertbaren NNR-Ca der hier vorliegenden Studie hatten 21 Fälle (=22%) den Wert 0, 37 Fälle (ca.38%) den Wert 10, 18 (=19%) den Wert 20, 15 (=16%) den Wert 30, fünf Fälle (=5%) zeigten eine Proliferationsfraktion von 40. Drei der fünf Conn-Adenome zeigten keine Markierung in der Proliferationsdarstellung, zwei Fälle eine Proliferation von 10%. Die Cushing-Adenome zeigten das gleiche Ergebnis. Bei den inaktiven Adenomen fanden sich zwei Fällen mit dem Wert 0 und drei mit dem Wert 10%. Das normale NNR-Gewebe zeigte keine proliferative Aktivität. Insgesamt fand sich damit eine deutlich erhöhte Proliferationsaktivität, bestimmt als Ki67-Index in den NNR-Ca, verglichen mit den Adenomen und dem mituntersuchten Normalgewebe. Diese erhöhte Proliferation spiegelt sich auch im aggressiven Verlauf der meisten NNR-Ca wieder.

## 5 Zusammenfassung

Das Nebennierenrindenzarzinom ist ein seltener maligner, epithelialer Tumor mit einer jährlichen Inzidenz in Deutschland von 2 pro 1 Million Einwohnern. Es ist für etwa 0,2% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die Seltenheit der Erkrankung erschwert die Entwicklung wirksamer Therapieansätze erheblich. Erst in letzter Zeit gelang es, größere Patientenkohorten in kontrollierten Studien zu behandeln (Allolio et al. 2006) und größere Fallzahlen an Tumorgewebe wissenschaftlichen Untersuchungen zuzuführen. Erstmalig besteht damit auch die Möglichkeit, die Expression eventuell relevanter Proteine für moderne Therapieansätze auch an großen Fallzahlen zu untersuchen. Bislang liegen nur sehr lückenhafte diesbezügliche Studien vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression einiger möglicherweise therapeutisch relevanter Proteine mittels immunhistochemischer Analyse unter Zuhilfenahme der Tissue Microarray-(TMA)-Technik in einer großen Serie von 104 NNR-Ca untersucht und mit der von Nebennierenadenomen und normalem Nebennierengewebe verglichen. Insgesamt 9 verschiedene Proteine wurden immunhistochemisch dargestellt: Als wichtigster Befund wurde eine Überexpression der Alpha-methylacyl-CoA Racemase (**AMACR**) in 89% der untersuchten NNR-Ca festgestellt. Interessanterweise zeigte auch die Mehrzahl der untersuchten Nebennierenadenome (80%) zumindest eine schwache AMACR-Reaktivität, während die mituntersuchten normalen Nebennieren negativ blieben. Diese bislang nicht beschriebene Beobachtung gleicht den bekannten Befunden z.B. in der Prostata, in der sowohl die dort entstehenden Adenokarzinome, als auch deren Vorläuferläsionen (PIN) eine AMACR-Expression zeigen.

**EGFR**, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, auf den der bereits etablierte therapeutische Antikörper Cetuximab (Erbix®) zielt, wurde in 49% der untersuchten NNR-Ca verstärkt exprimiert, so dass eine gegen den EGFR gerichtete Therapie in ausgewählten Fällen eine Behandlungsoption zu eröffnen scheint.

Die Suche nach Mutationen in diesem potentiellen Zielprotein könnte weitere Ansatzpunkte für Wirkstoffe aufzeigen, Studien gibt es dazu bislang keine.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich in dieser Studie für **VEGF**, das von 19% der untersuchten NNR-Ca mäßig oder stark exprimiert wurde. Auch hier könnte eine entsprechende Therapie mit einem bereits kommerziell erhältlichen spezifischen

Antikörper (Bevacizumab/Avastin®) in einem Teil der Fälle eine Behandlungsoption, ggf. auch als supportive Maßnahme, eröffnen. Angesichts der Expression von VEGF in nur rund einem Drittel der Fälle, wäre hier aber eine vorangehende Bestimmung des Expressionsstatus am Tumorgewebe unerlässlich. Weitere Untersuchungen sollten auch den VEGF-Rezeptor als möglichen Ansatzpunkt neuer Wirkstoffe, wie z.B. der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib [SU11248; SUTENT™] (Le Tourneau et al., 2007), erforschen.

Im Gegensatz dazu wurde eine wesentliche Expression weiterer untersuchter Proteine (CD117/C-kit, Her-2/neu, Östrogen- und Progesteronrezeptor) in NNR-Ca in dieser Studie nicht in einem Maße gefunden, welches in einer signifikanten Zahl von Fällen eine Therapieoption eröffnen würde.

Eine immunhistochemisch bestimmbare Expression von p53, als Surrogatmarker für ein mutiertes p53-Gen wurde in 85% der untersuchten NNR-Ca nachgewiesen. Dies weist auf eine zentrale Bedeutung von p53-Mutationen in der Genese von NNR-Ca hin.

(Reincke et al., 1994; Gicquel et al., 2001; Barzon et al., 2001; Soon et al., 2008)

Auch die Proliferationsfraktion, bestimmt als Ki67-Index, war in den untersuchten Karzinomen gegenüber den Adenomen und den mitgeführten normalen Nebennieren deutlich erhöht, was das aggressive Wachstumspotential der Mehrzahl der NNR-Ca widerspiegelt.

Weitere klinische Studien sind nötig, um die Bedeutung der gefundenen Proteinexpressionen für eine gezielte Therapie zu evaluieren.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

(25R)-THCA-CoA – (25R)-3a,7a,12a-trihydroxy-5β-cholestanoyl-CoA

ABC – (Strept)avidin-Biotin-Enzym-Complex

ACTH – adrenokortikotropes Hormon

Ak – Antikörper

AMACR – Alpha-methylacyl coenzyme A racemase

Aqua dest. = destilliertes Wasser

BWS – Beckwith-Wiedemann-Syndrom

Ca – Karzinom

Ca. – circa

CD – cluster of differentiation

CDK – cyclin dependent kinase

CS – Citronensäure

DAB – 3,3 Diaminobenzidin

DHEA – Dehydroepiandrosteron

DNA – desoxyribonucleic acid

EGF – epidermal growth factor

EGFR – epidermal growth factor receptor

EMA – epitheliales membranständiges Antigen

EMG-Syndrom – Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom

ESR1/ ER – Östrogenrezeptor

Et al. – und andere

GIST – gastrointestinaler Stromatumor

HE – Hämalaun-Eosin

Her2/neu – human epidermal growth receptor 2

Ig – Immunglobulin

IGF-II – Insulin like growth factor II

IH – Immunhistologie

LFS – Li-Fraumeni-Syndrom

LOH – loss of heterozygosity = Allelverlust

MEA1 – multiple endokrine Adenomatose 1

MEN1 – multiple endokrine Neoplasie Typ 1

Mind. – mindestens

Mod. – modifiziert

MUC1 – Bezeichnung eines Proteins

NaCl - Kochsalzlösung

NaOH – Natriumhydroxid/ Natronlauge

NNR – Nebennierenrinde

NNR-Ca – Nebennierenrindenkarzinom

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man = *Online-Datenbank menschlicher Gene und genetischer Störungen für Forscher. Sie wurde von Dr. Victor A. McKusick und seinen Kollegen an der Johns Hopkins Universität ins Leben gerufen. (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)*

PBS – phosphate buffered saline

PIN – prostatische intraepitheliale Neoplasie

PLGF – placental growth factor

RNA – ribonucleic acid

TMA – Tissue-Microarray

U.a. – und andere

URL – uniform resource locator

VEGF – Vascular endothelial growth factor

WHO – World Health Organisation

Zyto – Zytoplasma

## 6.2 Einheiten

°C – Grad Celsius

μ – Mikro (=  $10^{-3}$ )

cm – Zentimeter

g – Gramm

kDa – kiloDalton

kg – Kilogramm

min – Minuten

ml – Milliliter

mmol – Millimol

### 6.3 Literaturverzeichnis

**Agrawal, A./ Gutteridge, E./ Gee, J.M./ Nicholson, R.I./ Robertson, J.F.:** Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer, *Endocrine-Related Cancer* 12, 2005; pp.135–144.

**Ahlman, H./ Khorram-Manesh, A./ Jansson, S./ Wängberg, B./ Nilsson, O./ Jacobsson, C.-E./ Lindstedt, S.:** Cytotoxic Treatment of Adrenocortical Carcinoma, *World Journal of Surgery* 25, 2001; pp. 927-933.

**Allolio, B./ Fassnacht, M.:** CLINICAL REVIEW: Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(6), 2006; pp. 2027-2037.

**Allolio, B./ Fassnacht, M./ Arlt, W.:** Maligne Tumoren der Nebennierenrinde, *Der Internist* 43(2), 2002; S.186-195.

**Arora, A./ Scholar, E.M.:** Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy, *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics Fast Forward* 315(3), 2005; pp. 971-979, DOI: 10.1124/jpet.105.084145

**Bachinski, L.L./ Olufemi, S.E./ Zhou, X./ Wu, C.C./ Yip, L./ Shete, S./ Lozano, G./ Amos, C.I./ Strong, L.C./ Krahe, R.:** Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23, *Cancer Research* 65, 2005; pp. 427-431.

**Barzon, L./ Chilosi, M./ Fallo, F./ Martignoni, G./ Montagna, L./ Palù, G./ Boscaro, M. (Barzon et al. I):** Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors, *European Journal of Endocrinology* 145, 2001; pp. 207-212.

**Barzon, L./ Masi, G./ Pacenti, M./ Trevisan, M./ Fallo, F./ Remo, A./ Martignoni, G./ Montanaro, D./ Pezzi, V./ Palù, G. (Barzon et al. II):** Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors, *Virchows Arch* 452, 2008; pp. 181–191, DOI 10.1007/s00428-007-0542-0

**Barzon, L./ Zucchetta, P./ Boscaro, M./ Marzola, M.C./ Bui, F./ Fallo, F. (Barzon et al. III):** Scintigraphic patterns of adrenocortical carcinoma: morpho-functional correlates, *European Journal of Endocrinology* 145, 2001; pp. 743-748.

**Baujat, G./ Rio, M./ Rossignol, S./ Sanlaville, D./ Lyonnet, S./ Le Merrer, M./ Munnich, A./ Gicquel, C./ Cormier-Daire, V./ Colleaux, L.:** Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome, *American journal of Human Genetics* 74(4), 2004; pp. 715-720.

**Bell, D.W./ Varley, J.M./ Szydlo, T.E./ Kang, D.H./ Wahrer, D.C./ Shannon, K.E./ Lubratovich, M./ Verselis, S.J./ Isselbacher, K.J./ Fraumeni, J.F./ Birch, J.M./ Li, F.P./ Garber, J.E./ Haber, D.A.:** Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome, *Science/AAAS* 286(5449), 1999; pp. 2528-2531.

**Bergenstal, D.M./ Hertz, R./ Lipsett, M.B./ Moy, R.H.:** Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-DDD. *Ann. Intern. Med.* (53), 1960; p. 672.

**Bernini, G.P./ Moretti, A./ Bonadio, A.G./ Menicagli, M./ Viacava, P./ Naccarato, A.G./ Iacconi, P./ Miccoli, P./ Salvetti, A. (= Bernini et al. II, 2002):** Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex, *J Clin Endocrinol Metab.* 87(11), 2002; pp. 4961-4965.

**Bernini, G.P./ Moretti, A./ Viacava, P./ Bonadio, A.G./ Iacconi, P./ Miccoli, P./ Salvetti, A.:** Apoptosis control and proliferation marker in human normal and neoplastic adrenocortical tissues, *British journal of cancer* 86, 2002; pp. 1561-1565.

**Berruti, A./ Terzolo, M./ Sperone, P./ Pia, A./ Casa, S.D./ Gross, D.J./ Carnaghi, C./ Casali, P./ Porpiglia, F./ Mantero, F./ Reimondo, G./ Angeli, A./ Dogliotti, L.:** Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial, *Endocrine-related cancer* 12(3), 2005; 657-666.

**Beuschlein, F./ Fassnacht, M./ Klink, A./ Allolio, B./ Reincke, M.:** ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation, *Eur J Endocrinol.* 144(3), 2001; pp. 199-206.

**Böcker, W./ Kleihues, P./ Höfler, H.K./ Lax, S./ Porembra, C./ Moll, R.:** Allgemeine Tumorpathologie, in: *Pathologie*, hg. von Böcker, 3. Auflage, München: Elsevier GmbH, 2004; S. 169-174, 212-214.

**Buhmeida, A./ Pyrhönen, S./ Laato, M/ Collan, Y.:** Prognostic factors in prostate cancer, *Diagnostic Pathology* 1(4), 2006; URL: <http://www.diagnosticpathology.org/content/1/1/4>; Download: 12.03.2007.

**Calender, A./ Morrison, C.D./ Komminoth, P./ Scoazec, J.Y./ Sweet, K.M./ Teh, B.T.:** Multiple endocrine neoplasia type 1, in: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*, edited by DeLellis et al., Lyon - France (IARC Press), 2004; p. 218.

**Ciftci, A.O./ Senocak, M.E./ Tanyel, F.C./ Büyükpamukçu, N.:** Adrenocortical Tumors in Children, *Journal of Paediatric Surgery* 36, 2001; pp. 549-554.

**Cuebas, D.A./ Phillips, C./ Schmitz, W./ Conzelmann, E./ Novikov, D.K.:** The role of a-methylacyl-CoA racemase in bile acid synthesis, *Biochemical Journal* 363, 2002; pp. 801-807.

**Dako:** Package Insert – EGFR pharmDx™ Kit for Manual Use (Code K1492), URL: [http://www.dako.co.uk/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=108136004](http://www.dako.co.uk/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=108136004); Download: 24.03.2007.

**Dako (II):** Package Insert – DakoCytomation Target Retrieval Solution Ready-to-Use (> Code S1700): [http://www.dakogmbh.de/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=105418002](http://www.dakogmbh.de/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=105418002); Download: 22.1.2008.

**Dalquen, P./ Baschiera, B./ Delfs-Jegge, S./ Grilli, B./ Kleiber, B./ Vogel, S.:** Zytologische Methoden, in: Zytopathologie (=Band 8 der „Pathologie“), hg. von Feichter und Dalquen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000; S. 425-431, 440-444.

**Davidoff, A.M./ Humphrey, P.A./ Iglehart, J.D./ Marks, J.R.:** Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(11), 1991; pp. 5006-5010.

**DeLellis, R.A./ Shin, S.J.:** Diagnostic of Immunohistochemistry of Endocrine Tumors (chapter 9), in: Diagnostic Immunohistochemistry, 2002; pp. 209, 223-225.

**Dohna, M.A.:** Charakterisierung von Nebennierenrindentumoren mittels der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (Dissertation), Dekanat der Medizinischen Fakultät Heidelberg, 2001; S. 1-21.

**Doi, J./ Takemori, J.D./ Ohta, M./ Nonaka, Y./ Okamoto, M.:** Differential regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II and 17 $\alpha$ -hydroxylase/lyase P450 in human adrenocortical carcinoma cells by epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor, Journal of Endocrinology 168, 2001; pp. 87-94.

**Emmett, C./ Foster, K.:** Cytokines, Growth Factors, and Adhesion Molecules (Cap.14), in: Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization, edited by Nakamura and Folds, Blackwell Science, 1998; pp. 110-112.

**European Medicines Agency:** Initial marketing authorisation applications (Press Release), edited by: Committee for Medicinal Products for Human Use, Doc. Ref. EMEA/152608/2006, 2006; Download 9.9.2006.

**Figueiredo, B.C./ Sandrini, R./ Zambetti, G.P./ Pereira, R.M./ Cheng, C./ Liu, W./ Lacerda, L./ Pianovski, M.A./ Michalkiewicz, E./ Jenkins, J./ Rodriguez-Galindo, C./ Mastellaro, M.J./ Vianna, S./ Watanabe, F./ Sandrini, F./ Arram, S.B.I./ Boffetta, P./ Ribeiro, R.C.:** Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation, Journal of medical genetics 43, 2006; pp. 91-96. DOI: 10.1136/jmg.2004.030551

**FIRM-ACT:** (First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment) CLINICAL STUDY PROTOCOL, URL: [http://www.firm-act.org/documents/FIRM\\_ACT\\_protocol\\_final.pdf](http://www.firm-act.org/documents/FIRM_ACT_protocol_final.pdf), FIRM-ACT protocol version April 24th 2004; Download 04.03.2007.

**Funasaka, Y./ Boulton, T./ Cobb, M./ Yarden, Y./ Fan, B./ Lyman, S.D./ Williams, D.E./ Anderson, D.M./ Zakut, R./ Mishima, Y./ Halaban, R.:** c-Kit-Kinase Induces a Cascade of Protein Tyrosine Phosphorylation in Normal Human Melanocytes in Response to Mast Cell Growth Factor and Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase But is Down-Regulated in Melanomas, Molecular Biology of the Cell (3), 1992; pp. 197-209.

**Giachelli, C.M./ Speer, M.Y./ Li, X./ Rajachar, R.M./ Yang, H.:** Regulation of Vascular Calcification: Role of Phosphate and Osteopontin, *Circulation Research – Journal of the American Heart Association* 96, ISSN: 0009-7330, 2005; pp. 717-722.

**Gicquel, C./ Baudin, E./ Lebouc, Y./ Schlumberger, M.:** Adrenocortical carcinoma, *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 8(5), 1997; pp. 423-427.

**Gomes, M.V./ Ramos, E.S.:** Beckwith-Wiedemann syndrome and isolated hemihyperplasia, *São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 121(3), 2003; pp. 133-138.

**Gross, D.J./ Munter, G./ Bitan, M./ Siegal, T./ Gabizon, A./ Weitzen, R./ Merimsky, O./ Ackerstein, A./ Salmon, A./ Sella, A./ Slavin, S.:** The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R, *Endocrine-Related Cancer* 13, 2006; pp.535-540; DOI: 10.1677/erc.1.01124

**Gumurdulu, D./ Erdogan, S./ Kayaselcuk, F./ Seydaoglu, G./ Parsak, C.K./ Demircan, O./ Tuncer, I.:** Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters, *World Journal of Gastroenterology* 13(3), 2007; pp. 426-431.

**Gupta, D./ Shidham, V./ Holden J./ Layfield, L.:** Value of topoisomerase II alpha, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9, 2001; pp. 215-221.

**Hahner, S./ Fassnacht, M.:** Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment, *Current Opinion in Investigational Drugs* 6(4), 2005; pp. 386-394.

**Hameed, O./ Humphrey, P.A.:** Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate, *Seminars in Diagnostic Pathology*, 22, 2005; pp. 88-104; DOI: 10.1053/j.semmp.2005.11.001

**Hamrahian, A.H./ Ioachimescu, A.G./ Remer, E.M./ Motta-Ramirez, G./ Bogabathina, H./ Levin, H.S./ Reddy, S./ Gill, I.S./ Siperstein, A./ Bravo, E.L.:** Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas, Cleveland Clinic experience, *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2005; pp. 871-877.

**Heitz, Ph.U./ Komminoth, P./ Klöppel, G.:** Nebennieren, in: *Pathologie*, hg. von Böcker, 3. Auflage, München: Elsevier GmbH, 2004; S. 411-420.

**Heitz, Ph.U./ Komminoth, P./ Klöppel, G.:** Polyglanduläre Störungen, in: *Pathologie*, hg. von Böcker, 3. Auflage, München: Elsevier GmbH, 2004; S. 433-437.

**Hohenberger, P./ Reichardt, P./ Stroszczynski, C./ Schneider, U./ Hossfeld, D.K.:** Gastrointestinale Stromatumoren — Tumorentität und Therapie mit Imatinib, Deutsches Ärzteblatt 100, Ausgabe 23, 2003; Seite A-1612 / B-1334 / C-1250.

**Horstmann, M./ Merseburger, A.S./ Stenz, A./ Kuczyk, M.:** Systematische Therapie maligner Nebennierentumoren, der Urologe 45(5), 2006; S.605-608.

**Kamio, T./ Shigematsu, K./ Sou, H./ Kawai, K./ Tsuchiyama, H.:** Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma, Human Pathology 21(3), 1990; pp. 277-282.

**Khan, T.S.:** New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Adrenocortical Cancer, [Ny Diagnostik och Behandling av Patienter med Binjurebarkscancer], Uppsala universitet (Medicinska fakulteten), 2004; pp. 1, 9-12, 20-25, 27-28, 38-40, 49-52, 58-60, 65-75.

**Khan, T.S./ Imam, H./ Juhlin, C./ Skogseid, B./ Gröndal, S./ Tibblin, S./ Wilander, E./ Öberg, K./ Eriksson, B.:** Streptozocin and o,p`-DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: Long-term survival in its adjuvant use, Annals of Oncology 11, 2000; pp. 1281-1287.

**Klöppel, G./ Saeger, W./ Böhm, N./ Oberholzer, M.J./ Riede, U.N.:** Endokrines System, in: Allgemeine und spezielle Pathologie, hg. von Riede u.a., 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2004; S. 994-1005, 1032.

**Komm, B.S./ Kharode, Y.P./ Bodine, P.V./ Harris, H.A./ Miller, C.P./ Lyttle, C.R.:** Bazedoxifene acetate: a selective estrogen receptor modulator with improved selectivity, Endocrinology 146 (9), 2005; pp. 3999-4008.

**Komminoth, P./ Roth, J./ Schröder, S./ Saremaslani, P./ Heitz, P.U.:** Overlapping Expression of Immunohistochemical Markers and Synaptophysin mRNA in Pheochromocytomas and Adrenocortical Carcinomas Implications for the Differential Diagnosis of Adrenal Gland Tumors, Laboratory Investigation 72 (4), 1995; pp. 424-430.

**Kriegelstein, K.:** Nebennieren, in: Anatomie, Band 2, hg. von Drenckhahn, 16. Auflage, München: Elsevier, 2004; S. 206-211.

**Küsters, S.:** Nachweis von EGFR und ErbB2 Genamplifikationen in humanen Tumormodellen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Gewebe- und Zelllinien-Mikroarrays, 2006; S. 18-21.

**Kumar-Sinha, C./ Shah, R.B./ Laxman, B./ Tomlins, S.A./ Harwood, J./ Schmitz, W./ Conzelmann, E./ Sanda, M.G./ Wei, J.T./ Rubin, M.A. / Chinnaiyan, A.M.:** Elevated  $\alpha$ -Methylacyl-CoA Racemase Enzymatic Activity in Prostate Cancer, American Journal of Pathology 164, 2004; pp. 787-793.

**Le Tourneau, C./ Raymond, E./ Faivre, S.:** Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal

stromal tumors (GIST), Therapeutics and clinical risk management 3(2), 2007; pp. 341-348.

**Libé, R./ Bertherat, J.:** Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases, European Journal of Endocrinology 153, 2005; pp. 477-487.

**Llyod, R.V./ Tischler, A.S./ Kimura, N./ McNicol, A.M./ Young Jr., W.F.:** Adrenal tumours: Introduction, in: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs, edited by DeLellis et al., Lyon - France (IARC Press), 2004; pp. 136-138.

**Löffler, G.:** Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 5. Auflage, 2003; S. 482-484, 505-507.

**Logie´, A./ Boudou, P./ Boccon-Gibod, L./ Baudin, E./ Vassal, G./ Schlumberger, M./ Le Bouc, Y./ Gicquel, C.:** Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Xenograft Model, Endocrinology 141(9), (download from: [endo.endojournals.org](http://endo.endojournals.org) on November 5, 2006), 2006; pp. 3165-3171.

**Lüllmann-Rauch, R.:** Nebennierenrinde, in: Histologie, Georg Thieme Verlag, 2003; S. 362-365.

**Marx, A.:** Thymus, in: Pathologie, hg. von Böcker, 3. Auflage, München: Elsevier GmbH, 2004; S. 570.

**Matsuda, R./ Takahashi, T./ Nakamura, S./ Sekido, Y./ Nishida, K./ Seto, M./ Seito, T./ Sugiura, T./ Ariyoshi, Y./ Takahashi, T./ Ueda, R.:** Expression of the *c-kit* Protein in Human Solid Tumors and in Corresponding Fetal and Adult Normal Tissues, American Journal of Pathology 142 (1), 1993; pp. 339-346.

**Miller, J.W./ Crapo, L.:** The Medical Treatment of Cushing`s Syndrom, Endocrine Reviews 14(4), by The Endocrine Society, 1993; pp. 443-458.

**Montanaro, D./ Maggiolini, M./ Recchia, A.G./ Sirianni, R./ Aquila, S./ Barzon, L./ Fallo, F./ Andò, S./ Pezzi, V.:** Antiestrogens upregulate estrogen receptor beta expression and inhibit adrenocortical H295R cell proliferation, J Mol Endocrinol. 35(2), 2005; pp. 245-256.

**Morimoto, R./ Satoh, F./ Murakami, O./ Suzuki, T./ Abe, T./ Tanemoto, M./ Abe, M./ Uruno, A./ Ishidoya, S./ Arai, Y./ Takahashi, K./ Sasano, H./ Ito, S.:**

Immunohistochemistry of a proliferation Marker Ki67/MIB1 in Adrenocortical Carcinomas: Ki67/MIB1 Labeling Index is a Predictor for Recurrence of Adrenocortical Carcinomas, Endocrine journal, 2008; download: 5.2.2008, URL: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/advpub/0/advpub\\_0801090039/\\_article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/advpub/0/advpub_0801090039/_article), DOI:10.1507/endocrj.K07-079

**Müller-Hermelink, H.K./ Pfeiffer, U./ Roessner, A.:** Allgemeines, in: Pathologie für Zahnmediziner, hg. von Hermelink-Müller u.a., 1. Auflage, München: Elsevier GmbH, 2004; S.

6-9.

**Mucci, N.R./ Akdas, G./ Manely, S./ Rubin, M.A.:** Neuroendocrine Expression in Metastatic Prostate Cancer: Evaluation of High Throughput Tissue Microarrays to Detect Heterogeneous Protein Expression, *Human Pathology* 31 (4), 2000; pp. 406-411, DOI: 10.1053/hp.2000.7295

**Murphy, A.J./ Hughes, C.A./ Lannigan, G./ Sheils, O./ O'Leary, J./ Loftus, B.:** Heterogeneous expression of the  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase in prostatic cancer correlates with Gleason score, *Histopathology* 50, 2007; pp. 243-251; DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02572.x

**Nassar, A./ Amin, M.B./ Sexton, D.G./ Cohen, C.:** Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13(3), 2005; pp. 252-255.

**Neville, M.A./ O'Hare, M.J.:** The Human Adrenal Cortex, *Pathology and Biology – An Integrated Approach*, first edition, 1982; pp. 144, 149, 152.

**NIH State-of-the-Science Statement on management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”):** NIH Consens State Sci Statements 19(2), 2002 Feb 4-6; pp. 1-23.

**Noll, S./ Schaub-Kuhnen, S.:** Praxis der Immunhistochemie, hg. von Höfler u.a., 1. Auflage, 2000; S. 1, 9-71.

**Ohwada, S./ Izumi, M./ Kawate, S./ Hamada, K./ Toya, H./ Togo N, Horiguchi J, Koibuchi Y, Takahashi T, Yamada M:** Surgical outcome of stage III and IV adrenocortical carcinoma, *Jpn J Clin Oncol.* 37(2), 2007; pp. 108-113.

**OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man:** Online-Datenbank erstellt von Dr. Victor A. McKusick und Kollegen, ständig von Forschern aktualisiert, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>.

**Ortmann, D./ Hausmann, J./ Beuschlein, F./ Schmenger, K./ Stahl, M./ Geissler, M./ Reincke, M.:** Steroidogenic Acute Regulatory (StAR)-Directed Immunotherapy Protects against Tumor Growth of StAR-Expressing Sp2-0 Cells in a Rodent Adrenocortical Carcinoma Model, *Endocrinology* 145(4), 2004; pp. 1760-1766.

**Papaoiannou, A.I./ Kostikas, K./ Kollia, P./ Gourgoulialis, K.I.:** Clinical implications for Vascular Endothelial Growth Factor in the lung: friend or foe?, *Respiratory Research* 7(128), 2006; DOI:10.1186/1465-9921-7-128 – Download: 27.03.2007.

**Petri, M.:** Immunhistochemisches Profil gastrointestinaler Stromatumore (GIST) in Korrelation mit klinischen Daten (Inaugural-Dissertation), Medizinische Fakultät Universität Freiburg, 2006; S. 1-4.

**Piccart-Gebhart, M. J.:** Herceptin®: the future in adjuvant breast cancer therapy, *Anti-Cancer Drugs* 12(4), 2001; pp. 27-33.

**Pschyrembel, klinisches Wörterbuch:** hg von Willibald Pschyrembel, 259. Auflage, Walter de

Gruyter GmbH & Co. KG, 2001.

**Quinkler, M./ Hahner, S./ Wortmann, S./ Johanssen, S./ Adam, P./ Ritte, C./ Strasburger, C./ Allolio, B./ Fassnacht, M.:** Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine, *J Clin Endocrinol Metab*, 93(6), 2008; pp. 2057-2062.

**Reincke, M./ Karl, M./ Travis, W.H./ Mastorakos, G./ Allolio, B./ Linehan, H.M./ Chrousos, G.P.:** p53 Mutations in Human Adrenocortical Neoplasms: Immunohistochemical and Molecular Studies, *Journal of Endocrinology and Metabolism* 78 (3), 1994; pp. 790-794.

**Reincke, M./ Wachenfeld, C./ Mora, P./ Thumser, A./ Jausch-Hancke, C./ Abdelhamid, S./ Chrousos, G.P./ Allolio, B.:** p53 Mutations in Adrenal Tumors: Caucasian Patients Do Not Show the Exon 4 „Hot Spot“ Found in Taiwan, *Journal of Endocrinology and Metabolism* 81 (10), 1996; pp. 3636-3638.

**Riede, U.-N./ Walch, A./ Wiestler, O.D.:** Störungen des Zellwachstums, in: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, hg. von Ursus-Nikolaus Riede u.a., 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2004; S. 338-384.

**Roman, S.:** Adrenocortical carcinoma, *Current Opinion in Oncology* 18(1), 2006; p. 36-42.

**Rüdiger, T./ Müller-Hermelink, H.K.:** Quality Assurance in Immunohistochemistry, in: *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*, Volume 3, 2005; p. 13.

**Sachdev, D./ Yee, D.:** Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy, *Mol Cancer Ther* 6(1), 2007; pp. 1-12.

**Saeger, W./ Fassnacht, M./ Reincke, M./ Allolio, B.:** Expression of HER-2/neu Receptor Protein in Adrenal Tumors, *Pathology Research and Practice* 198, 2002; pp. 445-448.

**Sanfilippo, J.S./ Wittliff, J.L.:** Steroid hormone receptors in adrenal cortical carcinoma, *Am J Obstet Gynecol*. 150(3), 1984; pp. 326-327.

**Sartor, O./ Cutler Jr., G.B.:** Mifepristone: treatment of Cushing's syndrome, *Clinical obstetrics and gynecology* 39(2), 1996; p. 506-510.

**Sasano, H./ Suzuki, T./ Shizawa S./ Kato, K./ Nagura, H.:** Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization, *Modern Pathology* 7(7), 1994; pp. 741-746.

**Sbragia, L./ Oliveira-Filho, A.G./ Vassallo, J./ Pinto, G.A./ Guerra-Junior, G./ Bustorff-Silva, J.:** Adrenocortical tumors in Brazilian children: immunohistochemical markers and prognostic factors, *Archives of pathology & laboratory medicine* 129(9), 2005; p. 1127-1131.

**Schlamp, A./ Reisch, N./ Müller, O.-A./ Hallfeldt, K./ Reincke, M.:** Tumoren der Nebenniere, in: MANUAL Endokrine Tumoren; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; hg. von B. Göke und H. Fürst, München: Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag, 2006; S. 92-111.

**Schott, M./ Reincke, M./ Ortman, D./ Bornstein, S.R.:** Immunotherapy: New Strategies for the Treatment of Adrenocortical Carcinoma, *Hormone and Metabolic Research* 35(7), 2003; pp. 451-453.

**Schulick, R.D./ Brennan, M.F.:** Long-Term Survival After Complete Resection and Repeat Resection in Patients with Adrenocortical Carcinoma, *Annals of Surgical Oncology* 6(8), 1999; pp. 719-726.

**Scott, K.M./ Nagle, R.B.:** Immunohistochemistry Quality Assurance (chapter 19), in: *Clinical Diagnostic Immunology: Protocols in Quality Assurance and Standardization*, edited by Nakamura and Folds, Blackwell Science, 1998; pp. 178-181.

**Sharkey, R.M./ Goldenberg, D.M.:** Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 56(4), 2006; pp. 226-243.

**Shchemelinin, I./ Šefc, L./ Necas, E.:** Protein Kinase Inhibitors (protein kinase / protein kinase inhibitor / cancer therapy), *Folia Biologica (Praha)* 52, 2006; pp. 137-148.

**Shchemelinin, I./ Šefc, L./ Necas, E. (II):** Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases, *Folia Biologica (Praha)* 52, 2006; pp. 81-101.

**Shibuya, M.:** Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39(5), 2006; pp. 469-478.

**Sidhu, S./ Gicquel, C./ Bambach, C.P./ Campell, P./ Magarey, C./ Robinson, B.G./ Delbridge, L.W.:** Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis, *ANZ Journal of Surgery* 73, 2003; pp. 727-738.

**Slater, E.P./ Diehl, S.M./ Langer, P./ Samans, B./ Ramaswamy, A./ Zielke, A./ Bartsch, D.K.:** Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors, *European Journal of Endocrinology* 154, 2006; pp. 587-598.

**Somjen, D./ Stern, N./ Knoll, E./ Sharon O./ Gayer, B./ Kulik, T/ Kohen, F.:** Carboxy derivates of isoflavones as affinity carriers for cytotoxic drug targeting in adrenocortical H295R carcinoma cells, *Journal of Endocrinology* 179, 2003; pp. 395-403.

**Soon, P.S.H./ McDonald, K./ Robinson, B.G./ Sidhu, S.B.:** Molecular Markers and the Pathogenesis of Adrenocortical Cancer, *The Oncologist* 13, 2008; pp. 548-561.

**Sprich, C.:** Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen an Tissue Mikroarrays *Erfahrungen mit 70 verschiedenen Antikörpern* (Inaugural-Dissertation), Medizinische Fakultät Universität Freiburg, 2006; S. 1, 6-12.

**Stojadinovic, A./ Ghossein, R.A./ Hoos, A./ Nissan, A./ Marshall, D./ Dudas, M./ Cordon-Cardo, C./ Jaques, D.P./ Brennan, M.F.:** Adrenocortical Carcinoma: Clinical, Morphologic, and Molecular Characterization, *Journal of Clinical Oncology* 20(4), 2002; pp. 941-950.

**Suzuki, T./ Sasano, H./ Nisikawa, T./ Rhame, J./ Wilkinson, D.S./ Nagura, H.:** Discerning malignancy in human adrenocortical neoplasms: utility of DNA flow cytometry and immunohistochemistry, *Modern Pathology* 5(3), 1992; pp. 224-231.

**Szolar, D.H./ Korobkin, M./ Reittner, P./ Berghold, A./ Bauernhofer, T./ Trummer, H./ Schoellnast, H./ Preidler, K.W./ Samonigg, H.:** Adrenocortical Carcinomas and Adrenal Pheochromocytomas: Mass and Enhancement Loss Evaluation at Delayed Contrast-enhanced CT, *Radiology* 234, 2005; pp. 479-485.

**Tsuru, N./ Ushiyama, T./ Suzuki, K.:** Laparoscopic Adrenalectomy for Primary and Secondary Malignant Adrenal Tumors, *Journal of Endourology* 19(6), 2005; 702-709.

**Umbas, R./ Schalken, J.A./ Aalders, T.W./ Carter, B.S./ Karthaus, H.F.M./ Schaafsma, H.E./ Debruyne, F.M.J./ Isaacs, W.B.:** Expression of the Cellular Adhesion Molecule E-Cadherin Is Reduced or Absent in High-Grade Prostate Cancer, *Cancer Research* 52, 1992; pp. 5104-5109.

**US National Institutes of Health:** Trastuzumab (Herceptin®) see URL: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/herceptin>, posted 2003 (download: 9.9.2006).

**Van Ditzhuijsen, C.I.M./ van de Weijer, R./ Haak, H.R.; on behalf of the Dutch Adrenal Network:** Adrenocortical carcinoma – review, *The Netherlands Journal of Medicine* 65(2), 2007; pp. 55-60.

**Vierhapper, H.:** Adrenocortical tumors: clinical symptoms and biochemical diagnosis, *European Journal of Radiology* 41, 2002; pp. 88-94.

**Viloria-Petit, A./ Rengfio-Calzado, E.:** Antiepidermal Growth Factor Receptor Antibody: Immunohistochemistry, in: *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*, Volume 3, 2005; p. 79.

**Volante, M./ Sperone, P./ Bollito, E./ Frangipane, E./ Rosas, R./ Daffara, F./ Terzolo, M./ Berruti, A./ Papotti, M.:** Matrix metalloproteinase type 2 expression in malignant adrenocortical tumors: diagnostic and prognostic significance in a series of 50 adrenocortical carcinomas, *Modern Pathology* 19, 2006; pp. 1563–1569, DOI:10.1038/modpathol.3800683

**Wachenfeld, C./ Beuschlein, F./ Zwermann, O./ Mora, P./ Fassnacht, M./ Allolio B./ Reincke, M.:** Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful? *European journal of endocrinology* 145(3), 2001; pp. 335-341.

**Wajchenberg, B.L./ Pereira, M.A.A./ Medonca, B.B./ Latronica, A.C./ Carneiro, P.C./ Alves, V.A.F./ Zerbini, M.C.N./ Liberman, B./ Gomes, G.C./ Kirschner, M.A.:** Adrenocortical Carcinoma. Clinical and Laboratory Observations, *Cancer* 88(4), by the American Cancer Society, 2000; pp. 711-736.

**Wei, X./ Hai, X./ Kufe, D.:** MUC1 Oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor  $\alpha$ , *Molecular Cell* 21, by Elsevier Inc., 2006; pp. 295-305.

**Weiss, L.M./ Bertagna, X./ Chrousos, G.P./ Kawashima, A./ Kleihues, A./ Koch, C.A./ Giordano, T.J./ Medeiros, L.J./ Merino, M.J./ Ordonez, N.G./ Sasano, H.:** Adrenal cortical carcinoma, in: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*, edited by DeLellis et al., Lyon - France (IARC Press), 2004; pp. 139-142.

**Weiss, L.M./ Medeiros, L.J./ Vickery, A.L. Jr.:** Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma, *American J Surg Pathol* 13, 1989; pp. 202-206.

**Welsch, U.:** Nebennierenrinde, in: *Sobotta - Lehrbuch Histologie (Kapitel 11 'Endokrine Organe')*, 2. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, 2006; S. 4-7, 433-435.

**WHO classification of Tumours:** TNM classification of adrenal cortical carcinoma, in: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*, edited by DeLellis et al., Lyon - France (IARC Press), 2004; p. 136.

**Wu, J.T.:** Diagnosis and Management of Cancer Using Serologic Tumor Markers, in: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, edited by Henry, J. B., 20. Edition, W.B. Saunders Company, 2001; pp. 1038-1040.

**Xu, L./Yang, D./ Wang, S./ Tang, W./ Liu, M./ Davis, M./ Chen, J./ Rae, J.M./ Lawrence, T./ Lippman, M.E.:** (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer, *Molecular Cancer Therapeutics* 4(2), 2005; pp. 197-205.

**Zacharieva, S./ Atanassova, I./ Orbetzova, M./ Nachev, E./ Kalinov, K./ Kirilov, G./ Shigarminova, R./ Ivanova, R./ Dashev, G.:** Circulating vascular endothelial growth factor and active renin concentrations and prostaglandin E2 urinary excretion in patients with adrenal tumours, *European journal of endocrinology/ European Federation of Endocrine Societies* 150(3), 2004; pp. 345-349.

**Zhang, P.J./ Genega, E.M./ Tomaszewski, J.E./ Pasha, T.L./ LiVolsi, V.A.:** The Role of Calretinin, Inhibin, Melan-A, BCL-2, and C-kit in Differentiating Adrenal Cortical and

Medullary Tumors: An Immunohistochemical Study, *Mod Pathol* 16(6), 2003; pp. 591–597;  
DOI: 10.1097/01.MP.0000073134.60541.E8

**Zheng, J.-N./ Sun, Y.-F./ Pei, D.-S./ Liu, J.-J./ Ma, T.-X./ Han, R.-F./ Li, W./ Zheng, D.-B./ Chen, J.-C./ Sun, X.-Q.:** Treatment with Vector-expressed Small Hairpin RNAs against Ki67 RNA-induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Renal Carcinoma Cells, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38, 2006; pp. 254-261.

**Zhou, Y./ Li, S./ Hu, Y.P./ Wang, J./ Hauser, J./ Conway, A.N./ Vinci, M.A./ Humphrey, L./ Zborowska, E./ Willson, J.K.V./ Brattain, M.G.:** Blockade of EGFR and ErbB2 by the Novel Dual EGFR and ErbB2 Tyrosine Kinase Inhibitor GW572016 Sensitizes Human Colon Carcinoma GEO Cells to Apoptosis, *Cancer Research* 66(1), 2006; pp. 404-411.

#### **6.4 Bildnachweis**

Alle Bilder sind, soweit keine Quellen angegeben sind, eigene Darstellungen.

### 7 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die bei der Vollendung dieser Arbeit mitgeholfen haben.

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ott für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Müller-Hermelink für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Saeger für die Erstellung der Referenzpathologie und Prof. Alolio für die Bereitstellung der NNR-Ca im Rahmen der FIRM-ACT Studie.

Weiterhin bin ich den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors der Universität Würzburg zu Dank verpflichtet, die mir eine große Hilfe bei der Verfassung des Methodikteils waren, indem sie mir geduldig alle Fragen beantworteten, wenn es um immunhistochemische Vorgehensweisen und diverse Sicherheitsdatenblätter u.ä. ging.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Patrick Adam, der stets ein offenes Ohr und gute Ratschläge hatte, wenn ich bei einer Auswertung oder Formulierung unsicher war. Er war eine unverzichtbare Hilfe bei der Bereitstellung der notwendigen Bilder und ein wichtiger Gesprächspartner in allen Bereichen.

Ich danke auch meinem Mann für die Durchsicht dieser Arbeit. Er hat in der ganzen Zeit viel auf mich verzichten und viel Geduld zeigen müssen.

Zuletzt möchte ich meine Eltern erwähnen, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben, mir wo es nur ging den Rücken freigehalten haben und mich immer wieder aufbauten, wenn ich an mir zweifelte. Für diese unglaubliche Leistung kann ich ihnen nicht genug danken.

## 8 Lebenslauf

### Personalien

Name: Groh

Vorname: Martina, Gabriele

Geburtsort: Schweinfurt in Unterfranken

Geburtsdatum: 27.05.1983

Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

09/1989 bis 07/1993 Besuch der Kliegl-Grundschule in Bad Kissingen

09/1993 bis 06/2002: Besuch des Jack-Steinberger-Gymnasiums in Bad Kissingen

05-06/2002: Ablegen der Reifeprüfung am Jack-Steinberger-Gymnasium

### Hochschulausbildung

10/2002 bis 11/2007: Studium der Fachrichtung Zahnmedizin

10/2003: Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

03/2005: Zahnärztliche Vorprüfung an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg abgelegt.

2006: Promotionsbeginn im Institut für Histopathologie in Würzburg

Staatsexamen 07/2007 bis 11/2007 an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

Promotionsfach: Pathologie

### Beruflicher Werdegang:

12/2007: Beginn der Assistenzzeit in einer Gemeinschaftspraxis in Tauberbischofsheim

09/2008: Wechsel in eine chirurgisch ausgerichtete Praxis in Veitshöchheim