

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

***TP53* Mutationen und Polymorphismen bei erwachsenen Patienten mit  
Nebennierenrindenzarzinom**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Leonie Judith Maria Herrmann  
aus Würzburg**

**Würzburg, März 2012**

**Referent:** Prof. Dr. med. Bruno Allolio

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 27.02.2014

**Die Promovendin ist Ärztin**

## WIDMUNG

Für meine Familie, verwandt und gefunden:

Freunde, die mich sehen

Familie, die mir Halt & Heimat gibt

geliebte Schwester, mit der ich zwei bin

Eltern, die mir Erde und Himmel, Wurzeln und Flügel geben

und besonders für den einen der nicht mehr ist.

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Referentenblatt

Widmung

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Aminosäuren	viii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen und theoretischer Hintergrund</b>	<b>3</b>
2.1 Das Nebennierenrindenzarzinom	3
2.2 Tumorsuppressor <i>p53</i>	5
2.2.1 <i>p53</i> - das Protein	5
a) Struktur und Regulierung von <i>p53</i>	5
b) Funktion und Interaktion von <i>p53</i>	6
c) Störung der <i>p53</i> Proteinfunktion	7
2.2.2 <i>TP53</i> - das Gen	8
a) Allgemein	8
b) Keimbahnmutationen und Li-Fraumeni Syndrom	8
c) Somatische Mutationen und Loss of Heterozygosity	11
d) Polymorphismen	11
2.3 <i>TP53</i> und das Nebennierenrindenzarzinom	14
2.3.1 Mutationen	14
a) Genomisch	14
b) Somatisch	15
2.3.2 Polymorphismen	16
<b>3. Fragestellung der Arbeit</b>	<b>17</b>

---

<b>4.</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	Patienten	19
4.1.1	Ethikantrag	19
4.1.2	Patientenrekrutierung	19
4.1.3	Materialsammlung und Lagerung	19
4.2	Material	21
4.2.1	Geräte	21
4.2.2	Materialien	22
4.2.3	Chemikalien	22
4.2.4	Puffer und Lösungen	22
4.2.5	Kits	23
4.2.6	Primer	24
4.3	Methoden	25
4.3.1	DNS Extraktion	25
	a) genomisch	25
	b) somatisch	25
4.3.2	Photometrische Quantifizierung von DNS	26
4.3.3	Polymerase Kettenreaktion	26
4.3.4	Sequenzierung	29
4.3.5	Analyse Sequenzierungsdaten	30
4.3.6	DNS-Gelelektrophorese	30
4.3.7	Aufreinigung des PCR Amplifikats	31
	a) Gelextraktion	31
	b) PCR Purifikation	32
4.3.8	Fragmentlängenanalyse	32
4.3.9	Immunhistochemie	33
4.3.10	Haplotypanalyse	34
4.3.11	Sammlung klinischer Daten und Auswertung	34

---

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
5.1	Experimentelle Daten	36
5.1.1	<i>TP53</i> Mutationen	36
	a) Genomisch	36
	b) Somatisch	39
	c) Familiär	40
5.1.2	Loss of Heterozygosity Analyse	41
5.1.3	Immunhistologie	43
5.1.4	Haplotypanalyse	44
5.1.5	Polymorphismen	45
5.2	Klinische Daten und statistische Auswertung	51
5.2.1	<i>TP53</i> Mutationsanalyse	51
	a) Kasuistiken der Patienten mit <i>TP53</i> Keimbahnmutation	51
	b) Klinische Daten von Familienmitgliedern mit <i>TP53</i> Mutation	55
	c) Klinische und statistische Daten der Patienten ohne <i>TP53</i> Mutation	56
	d) Statistische Auswertung der <i>TP53</i> Mutationsanalyse	59
5.2.2	<i>TP53</i> Polymorphismusanalyse	63
	a) Klinische und statistische Daten des Gesamtkollektivs	63
	b) Verteilung der einzelnen <i>TP53</i> Polymorphismen Auswirkung auf das Überleben	65
	c) Vergleich der <i>TP53</i> Polymorphismen bei Nebennierenrindencarzinom Patienten und Kontrollkollektiven	68
	d) Analyse der Auswirkung mehrerer <i>TP53</i> Polymorphismen auf klinische Parameter	69

---

	<b>Seite</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>73</b>
6.1 <i>TP53</i> Mutationen	73
6.1.1 Allgemein	73
6.1.2 <i>TP53</i> Mutationen genomisch und somatisch	73
6.1.3 Klinik	76
6.1.4 Li-Fraumeni Syndrom Klassifikationen und <i>TP53</i> Mutationsscreening	78
6.2 <i>TP53</i> Polymorphismen	82
6.2.1 Allgemein	82
6.2.2 Einzelne <i>TP53</i> Polymorphismen	82
6.2.3 Mehrere <i>TP53</i> Polymorphismen	85
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aquadest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CI	Confidence Interval/Konfidenzintervall
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Natriumacetat
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	3,3- Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNS	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA Blut	mit Ethylendiamintetraacetat (Antikoagulation) versetztes Blut
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
FIRM-ACT	First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
HCl	Hydrogenchlorid
hpf	High power field
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Hazard Ratio
IARC	International Agency for Research on Cancer/Internationale Agentur für Krebsforschung

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ki67	Proliferationsmarker (nukleares Protein, das mit zellulärer Proliferation & ribosomaler RNA-Transkription assoziiert ist)
LFL	Li-Fraumeni-Like Syndrom
LFS	Li-Fraumeni Syndrom
LOH	Loss Of Heterozygosity/Verlust der Heterozygotie
M	Mol
MDM2	Murine Double Minute 2 Protein
min	Minuten
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MIRA-1	Von Maleimid abgeleitetes Protein das Wildtyp Konformation, Funktion und DNS-Bindungsaktivität von mutiertem <i>p53</i> wiederherstellt
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NNR-Ca/NNR-Cas	Nebennierenrindenkarzinom/e/s
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OP	Operation
<i>p53</i>	Tumorsuppressorprotein <i>p53</i>

p.a.	pro analysi (Reinheit entsprechend der Anforderung ‚zur Analyse‘)
PBS	Phosphate Buffered Saline/Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
PD	Primärdiagnose
pH	pH-Wert (Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung)
pM	Pikomol
PRIMA-1	<i>p53</i> Reactivation and Induction of Massive Apoptosis (stellt selektiv die Aktivität von mutiertem <i>p53</i> in der Zelle wieder her)
ROS	Reactive Oxygen Species/Sauerstoffradikale
rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Abweichung
sec	Sekunden
SNP/SNPs	Single Nucleotide Polymorphism/s
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-(Natrium)Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
<i>TP53</i>	Gen des <i>p53</i> Tumorsuppressorproteins
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrogenchlorid
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats/Minisatelliten-DNS
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
WHO	World Health Organisation/Weltgesundheitsorganisation

## AMINOSÄUREN

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nummerierung	Bezeichnung	Seite
Abbildung 1	<i>p53</i> Proteinstruktur	5
Abbildung 2	<i>p53</i> Aktivierung, Hauptregulierung und Antwort	6
Abbildung 3	<i>p53</i> Funktionseinheiten mit den jeweils kodierenden <i>TP53</i> Exons	8
Abbildung 4	Agarosegel mit PCR Produkt aus somatischer DNS	31
Abbildung 5	Sequenz der <i>TP53</i> Keimbahnmutationen von <i>Patient 1, 2, 3</i> und <i>4</i>	37
Abbildung 6	Sequenz der <i>TP53</i> Mutationen <i>Patient 1, 2, 3</i> und <i>4</i>	39
Abbildung 7	Familiäre <i>TP53</i> Mutationen	40
Abbildung 8	LOH Nachweis: VNTR1 Region <i>TP53</i>	41
Abbildung 9	LOH Nachweis: VNTR4 Region <i>TP53</i>	42
Abbildung 10	<i>p53</i> Immunhistologie von <i>Patient 1-4</i>	43
Abbildung 11	<i>p53</i> Immunhistologie der Mutter von <i>Patientin 3</i>	43
Abbildung 12	Haplotypanalyse SNP179 <i>TP53</i>	44
Abbildung 13	<i>P34P, P36P</i> und <i>P47S</i> Polymorphismen in Exon 4 von <i>TP53</i>	46
Abbildung 14	<i>R72P</i> Polymorphismus in Exon 4 von <i>TP53</i>	47
Abbildung 15	<i>R213R</i> und <i>V217M</i> Polymorphismus in Exon 6 von <i>TP53</i>	47
Abbildung 16	<i>G360A</i> Polymorphismus in Exon 10 von <i>TP53</i>	48
Abbildung 17	<i>Intron 2</i> Polymorphismus in <i>Intron 2</i> von <i>TP53</i>	48
Abbildung 18	<i>Intron 3</i> Polymorphismus in <i>Intron 3</i> von <i>TP53</i>	49
Abbildung 19	<i>Intron 6</i> Polymorphismus in <i>Intron 6</i> von <i>TP53</i>	49
Abbildung 20	<i>Intron 9</i> Polymorphismus in <i>Intron 9</i> von <i>TP53</i>	50
Abbildung 21	Überleben von NNR-Ca Patienten mit und ohne <i>TP53</i> Mutation	62
Abbildung 22	Überleben von NNR-Ca Patienten mit <i>TP53</i> Polymorphismus Variation	67
Abbildung 23	Verteilung von <i>TP53</i> Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten	69

## TABELLENVERZEICHNIS

Nummerierung	Bezeichnung	Seite
Tabelle 1	Stadieneinteilung des NNR-Ca nach ENSAT	3
Tabelle 2	<i>TP53</i> : Codonverteilung der Exons	8
Tabelle 3	LFS: Klassifikationen	9
Tabelle 4	Kriterien zur <i>TP53</i> Testung des <i>TP53</i> Workshop Lyon	10
Tabelle 5	Nicht-synonyme <i>TP53</i> Polymorphismen (validiert)	12
Tabelle 6	Geräte	21
Tabelle 7	Materialien	22
Tabelle 8	Puffer und Lösungen	22
Tabelle 9	Kits	23
Tabelle 10	Primer	24
Tabelle 11	PCR Ansatz	27
Tabelle 12	PCR <i>TP53</i> Exon 4, 5, 6 und 10	28
Tabelle 13	PCR <i>TP53</i> VNTR 1 und 4	28
Tabelle 14	PCR <i>TP53</i> Haplotypanalyse SNP179 (rs ID # rs9894946)	28
Tabelle 15	NNR-Ca Patientenkollektiv der <i>TP53</i> Mutationsanalyse	36
Tabelle 16	NNR-Ca Patientenkollektiv der <i>TP53</i> Polymorphismusanalyse	45
Tabelle 17	<i>TP53</i> Polymorphismen	46
Tabelle 18	Klinische Daten von NNR-Ca Patienten mit <i>TP53</i> Mutation	52
Tabelle 19	Histologische und klinische Daten von <i>Patient 1, 2, 3</i> und <i>4</i>	53
Tabelle 20	NNR-Ca Patienten mit Zweitmalignom	56
Tabelle 21	Familienanamnese der NNR-Ca Patienten	57
Tabelle 22	Prozentuale Verteilung von NNR-Ca Patienten mit und ohne Mutation nach Erstdiagnosealter	59
Tabelle 23	Klinische Daten von NNR-Ca der <i>TP53</i> Polymorphismus Analyse	64
Tabelle 24	<i>TP53</i> Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten	65
Tabelle 25	Vergleich der Verteilung von <i>TP53</i> Polymorphismen zwischen NNR-Ca Patienten und gesunden kaukasischen Kontrollgruppen	68
Tabelle 26	Einfluss klinischer und histologischer Faktoren auf das Überleben von NNR-Ca Patienten	71
Tabelle 27	Überleben von NNR-Ca Patienten im Zusammenhang mit den Polymorphismen <i>R72P</i> , <i>Intron 2</i> , <i>Intron 3</i> und <i>Intron 6</i>	72

## 1. Einleitung

*„A complete understanding of the mechanisms of the development of cancer is very unlikely to come about in the foreseeable future, making impossible reliance on a single approach to prevent cancer and deaths from the disease. Translational research in its broadest meaning is of paramount importance, covering the spectrum from translating cutting-edge scientific discovery into new approaches to cancer treatment to translating information about cancer risk factors into changes in population behaviour.“<sup>1</sup> (1)*

Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC), eine Initiative der Weltgesundheitsorganisation (WHO), schätzt, dass sich die Inzidenz maligner Tumore bis zum Jahr 2030 mehr als verdreifachen wird. Dies ist zurückzuführen auf kontinuierliches Wachstum und Alterung der Weltbevölkerung.

Allein in Deutschland stiegen die Behandlungskosten für maligne Neubildungen laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes in den Jahren 2002-2008 um 30,6 % auf 18,1 Millionen Euro im Jahr (2). Es wird, nicht nur für den betroffenen Patienten und seine Familie, sondern auch für die Gemeinschaft der Bevölkerung, zunehmend wichtiger Maßnahmen der Früherkennung und neue Behandlungswege zu erschließen.

Von höchster Wichtigkeit, sowohl für das Verständnis der Pathogenese als auch im Hinblick auf Prävention und spezifische Therapien, ist dabei die Erforschung molekularer Veränderungen und deren Auswirkung auf das Tumorverhalten. Erkenntnisse aus dem Bereich der Grundlagenforschung können zur Erschließung neuer Ansätze, zum frühzeitigen Erkennen von Tumorerkrankungen und zu tumorspezifischer Anpassung von Behandlungsstrategien führen.

Einen besonderen Bereich stellt die Forschung im Bereich der selten vorkommenden malignen Neubildungen dar. Durch die geringe Zahl erkrankter Menschen ist Forschung nur mit sehr kleinen Fallzahlen möglich (1). Dies erschwert die Erhebung statistisch

---

<sup>1</sup> Es ist sehr unwahrscheinlich, dass in absehbarer Zukunft die Mechanismen der Krebsentstehung vollständig verstanden werden, was es unmöglich macht, auf einen einzigen Ansatz zu vertrauen, der Krebs und Todesfälle aufgrund dieser Erkrankung verhindert. Translationale Forschung, in ihrer weitesten Bedeutung, ist von höchster Wichtigkeit, da sie das Spektrum von der Übertragung neuester wissenschaftlicher Entdeckungen in neue Ansätze für Krebstherapien, bis hin zur Übertragung der Informationen über Krebsrisikofaktoren in Veränderungen des Bevölkerungsverhaltens abdeckt.

auswertbarer Daten aus molekularbiologischer und klinischer Forschung und deren Umsetzung in den Patienten zu Gute kommende Handlungsweisen.

Zu den seltenen malignen Neubildungen gehört auch das Nebennierenrindenzarzinom (NNR-Ca) mit einer Inzidenz von 1-2/1000000 (1, 3). Das NNR-Ca gehört neben Sarkomen, Hirntumoren, Brustkrebs und Leukämie zu den Kerntumoren, durch die das selten vorkommende autosomal dominante Tumor-Prädispositions Syndrom, das Li Fraumeni Syndrom (LFS) gekennzeichnet ist (4). Das LFS wird mit Keimbahnmutationen im Gen des Tumorsuppressors *p53* in Verbindung gebracht (5). Trotz sich ständig weiterentwickelnder Therapieansätze, Instrumente der Risikoeinschätzung und der Versorgung von NNR-Ca Patienten in spezialisierten Zentren, sind die Überlebensraten im Gesamten zwar hierdurch verbessert, insgesamt aber nach wie vor niedrig. Als Beispiel des Erfolgs translationaler Forschung in diesem Bereich kann das *TP53* Keimbahnmutationsscreening bei Kindern mit Nebennierenrindenzarzinom in Brasilien angeführt werden (6, 7). Dabei wurde eine Hotspotmutation gefunden, die als Instrument zur Identifizierung von Risikopatienten verwendet werden kann und die im Weiteren, durch Überwachung der betroffenen Patienten, eine frühzeitige Diagnose des NNR-Ca ermöglicht.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung gibt es nur wenige Studien zu *TP53* Keimbahnveränderungen bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca. Die vorhandenen Mutationsanalysen liegen nur für kleine Patientenzahlen vor (7-11). Darüber hinaus gibt es bisher nur zwei Studien zu *TP53* Polymorphismen beim NNR-Ca (12, 13). Daraus geht hervor, dass es keine ausreichenden Daten zu *TP53* Keimbahnveränderungen bei Erwachsenen mit NNR-Ca gibt. Die vorliegende Arbeit versucht diese Lücke zu schließen. In einem großen Kollektiv betroffener Patienten wurden *TP53* Keimbahnmutationen und -polymorphismen und ihre Auswirkung auf klinische Faktoren untersucht. Mit Hilfe dieser Studie sollen neue Erkenntnisse in diesem Teilbereich zeitnah in klinische Empfehlungen und mögliche Änderungen von Therapie und Vorsorge umgesetzt werden.

## 2. Grundlagen und theoretischer Hintergrund

### 2.1 Das Nebennierenrindenzkarzinom

Das NNR-Ca ist ein seltener maligner Tumor des endokrinen Systems, dessen Inzidenz bei 1-2/1000000 (3) liegt. Frauen sind im Verhältnis 1,5: 1 häufiger betroffen als Männer (14, 15). Es wird eine bimodale Altersverteilung beschrieben, wobei der erste Kulminationspunkt im Kindesalter liegt, nicht selten im Kontext eines Li-Fraumeni (4) (Kap. 2.3) oder Beckwith-Wiedemann Syndroms (16, 17), der zweite in der vierten und fünften Lebensdekade (18). Es liegt in ca. 60 % ein Hormon produzierender Tumor vor. Meist besteht eine vermehrte Cortisol- und oftmals auch Androgen-Produktion, die durch ein schnell voranschreitendes Cushing-Syndrom und Zeichen der Virilisierung auffällig wird (19, 20). Seltener sind Östrogen und Aldosteron produzierende NNR-Cas. Patienten mit einem endokrin inaktiven Tumor werden meist durch die Auswirkung der tumorösen Raumforderung und deren Folgen im Abdomen (Druckgefühl im Oberbauch, Übelkeit, Erbrechen) oder Rückenschmerzen auffällig.

Bevorzugte Metastasierungswege sind die lokale Streuung ins Abdomen und die Ausbreitung der Tumorzellen über die Blutbahn in Leber und Lunge.

Zur Einschätzung der Lage, Größe und Ausbreitung des Tumors wird eine Computertomographie (CT) oder Kernspintomographie (MRT) des Brustkorbs und des Abdomens durchgeführt, die zusammen mit den laborchemischen Parametern (Glukokortikoidexzess, Sexualhormone mit Vorläufern, Mineralkortikoidexzess) und der Klinik zur Beurteilung des Tumors herangezogen wird. Die klinische Stadieneinteilung des NNR-Ca erfolgt unter anderem nach einem Schema, das von der European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) erstellt wurde (Tab. 1).

**Tabelle 1 | Stadieneinteilung des NNR-Ca nach ENSAT**

<b>Grad</b>	<b>ENSAT 2008</b>	
I	T1, N0, M0	T1 Tumor ≤5 cm; T2 Tumor >5cm; T3 Tumordinfiltration in umgebendes Gewebe; T4 Tumordinvasion in umgebende Organe und venöser Tumorthrombus in V. cava/V. renalis; N0 kein Lymphknoten betroffen; N1 positive(r) Lymphknoten; M0 keine Fernmetastasen; M1 Fernmetastasen. (3)
II	T2, N0, M0	
III	T1-2, N1, M0	
	T3-4, N0-1, M0	
IV	T1-4, N0-1, M1	

Die komplette Resektion des NNR-Ca ist die einzige Maßnahme, die zur Heilung führen kann.

Eine anschließende histologische Beurteilung und Klassifizierung des NNR-Ca erfolgt unter anderem nach einem Schema, das 1984 von L. Weiss eingeführt wurde (21). Verschiedenen histologischen Merkmalen (Kernatypen, Mitoserate, atypische Mitosen etc.) werden dabei Werte zugeordnet, die in der Zusammenschau eine Einteilung in malignes oder benignes Gewebe ermöglichen. Das Ergebnis ist ein Wert von 0 bis 9, wobei 0 bis 4 als benigner und 5 bis 9 als maligner Bereich gewertet wird (21). Alternative Schemata zur histologischen Beurteilung des NNR-Ca wurden 1979 von Hough *et al.* und 1985 von van Slooten *et al.* erstellt (22, 23).

Die einzige aktuell zugelassene spezifische medikamentöse Therapie besteht in der Behandlung mit dem Adrenolytikum Mitotane (24, 25). Dies wird derzeit beim fortgeschrittenen NNR-Ca und teils auch in der adjuvanten Therapie eingesetzt. Weitere häufig eingesetzte Chemotherapien bestehen aus einer Kombination von Etoposid, Doxorubicin und Cis-Platin (26) oder aus einer Monotherapie mit Streptozotocin (27), in der Regel in Kombination mit Mitotane. Verschiedene weitere Therapieoptionen unter Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren befinden sich derzeit in Erprobung (28-30). Außerdem wird die Radiotherapie zum Stabilitätserhalt bzw. zur Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen als Maßnahme der palliativen Versorgung angewandt (31). Rezidive des NNR-Ca werden nach Möglichkeit durch Resektion und weiterführende Chemotherapie behandelt (20, 32). Trotz sich ständig weiterentwickelnder Therapiewege und der Versorgung von NNR-Ca Patienten in spezialisierten Zentren, sind die Überlebensraten individuell zwar sehr variabel, im Gesamten jedoch noch niedrig. So liegen die 5 Jahres Überlebensraten in Stadium I bei 84 %, in Stadium II bei 63 %, in Stadium III bei 51 % und in Stadium IV bei 15 % (3). Der überwiegende Teil der Patienten wird erst in einem bereits fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert.

## 2.2 Tumorsuppressor *p53*

### 2.2.1 *p53* - das Protein

#### a) Struktur und Regulierung von *p53*

Das Tumorsuppressorprotein *p53* (*p53*) wurde 1979 entdeckt (33-36). Es verdankt seinen Namen seinem Molekulargewicht von 53 kDa.

*p53* gliedert sich in 5 Funktionseinheiten (Abb. 1), die aus insgesamt 393 Aminosäuren (AS) gebildet werden.



#### **Abbildung 1 | *p53* Proteinstruktur**

Schematische Darstellung der Proteinstruktur von *p53* mit seinen Funktionsdomänen

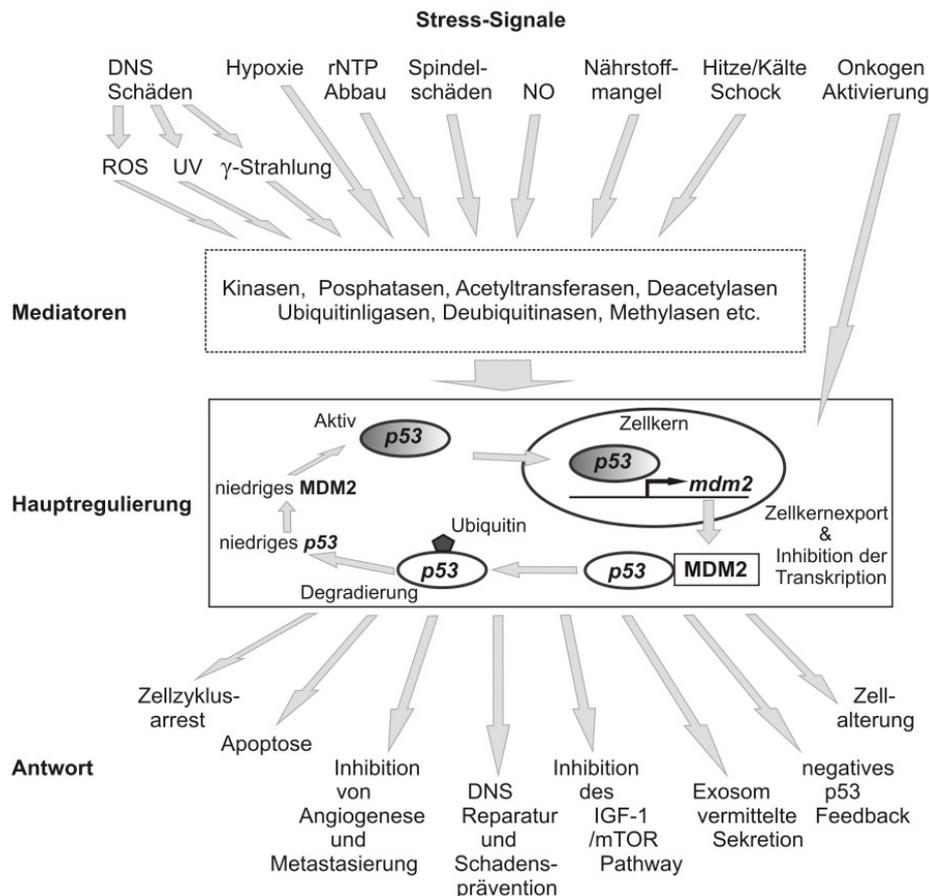
Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich die Transaktivierungsdomäne, die sich aus den AS 1-63 zusammensetzt. Daran schließt sich eine Prolin-reiche Domäne an, die die AS 64-92 umfasst. In der Mitte des Proteins (AS 94-292) liegt die DNS-Bindungsdomäne, an die sich die Tetramerisierungsdomäne mit den AS 326-355 anschließt. Das C-terminale Ende beinhaltet eine regulatorische Region die aus den AS 363-393 gebildet wird (37).

*p53* ist ein instabiles Protein, das in geringen Mengen hauptsächlich im Zellkern vorliegt. Abhängig von Zell- und Gewebetyp hat es eine kurze Halbwertszeit von 20-30 min (38) und findet sich während des Zellzyklus auch im Zytoplasma (39, 40). Mit seinem Hauptregulator, dem Protein Murine Double Minute 2 (MDM2) (Abb. 2), bildet es einen autoregulatorischen Feedback Zirkel: MDM2, eine E3-Ubiquitinligase, macht *p53* für die Proteolyse zugänglich und kann es, durch binden und inaktivieren seiner Transaktivierungsdomäne, ins Zytoplasma transportieren. Da MDM2 ein Transkriptionsziel von *p53* ist, können große Mengen *p53* MDM2 induzieren, wohingegen niedrige Mengen von *p53* die MDM2 Menge herabsetzen und dadurch eine erhöhte Aktivität von *p53* hervor rufen (41).

## b) Funktion und Interaktion von *p53*

Eingebettet in ein komplexes Regulierungssystem interagiert *p53* direkt mit Proteinen wie MDM2 (Kap. 2.2.1a) und beeinflusst das Geschehen in der Zelle außerdem durch seine Rolle als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene. Zu den induzierten Genen gehören *p21*, das einen Arrest des Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase bewirkt, und das proapoptotisch wirkende Bax Protein (41).

Durch Stresssignale wie Hypoxie, Hitze- oder Kälteschock, Onkogenaktivierung und Desoxyribonukleinsäure (DNS) Schädigung durch ultraviolettes (UV) Licht oder radioaktive Strahlung (Abb. 2) kommt es, vermittelt durch eine Vielzahl von Mediatoren (Abb. 2), zur Aktivierung von *p53* (42).



**Abbildung 2 | *p53* Aktivierung, Hauptregulierung und Antwort**

Stresssignal vermittelte Aktivierung von *p53* über eine Vielzahl von Mediatoren und die daraus resultierenden Mechanismen in der Zelle. DNS Desoxyribonukleinsäure. rNTP Nukleintriphosphate. NO Stickstoffmonoxid. ROS Reactive oxygen species (Sauerstoffradiakle). UV Ultraviolette Strahlung.

Abbildung modifiziert nach (41, 42)

Durch Phosphorylierung und Acetylierung des als Tetramer vorliegenden Proteins, geht *p53* in seine aktive Form über. Durch verschiedene Signalwege und Anlagerung von *p53* an die DNS als Transkriptionsfaktor kann es eine Fülle von Mechanismen zur Bewältigung von DNS- und Zellschädigung einleiten (Abb. 2). Zu den wichtigsten Aufgaben von *p53* gehören die Initiierung des Zellzyklusarrests, die Verhinderung von Metastasierung und Angiogenese und die Einleitung der Apoptose (43-45).

In der Literatur als ‚Wächter des Genoms‘ beschrieben, sorgt *p53* für die Unversehrtheit der genetischen Information und ihre intakte Weitergabe an neu entstehende Zellen (38).

### c) Störung der *p53* Funktion

Durch Veränderungen im Gen von *p53* kann es zu einer Beeinträchtigung oder dem kompletten Ausfall der *p53* Funktion kommen. Es wurden Störungen der DNS-Bindekapazität mit fehlender Transkriptionsaktivität und fehlerhafte Faltung des Proteins, mit einhergehender Unfähigkeit die zur Ausübung der Funktion nötige Tetramer Konformation zu bilden, beschrieben. Darüber hinaus wurde eine mögliche Aktivität als Protoonkogen diskutiert (46-48).

Ist die korrekte Funktion von *p53* nicht mehr gegeben, kann es zur Weitergabe von fehlerhafter DNS und damit zur Entstehung maligner Zellen kommen. Eine Besonderheit von fehlerhaftem *p53* ist die Akkumulation des Proteins im Zellkern, die immunhistologisch dargestellt werden kann (49, 50). Ein Rückschluss von *p53* positiver Immunhistologie auf ein Vorhandensein von *TP53* Veränderungen ist jedoch nicht möglich, da es nicht in allen Fällen von Mutationen im *TP53* zu einer Akkumulation von *p53* kommt (51-53).

## 2.2.2 TP53 - das Gen

### a) Allgemein

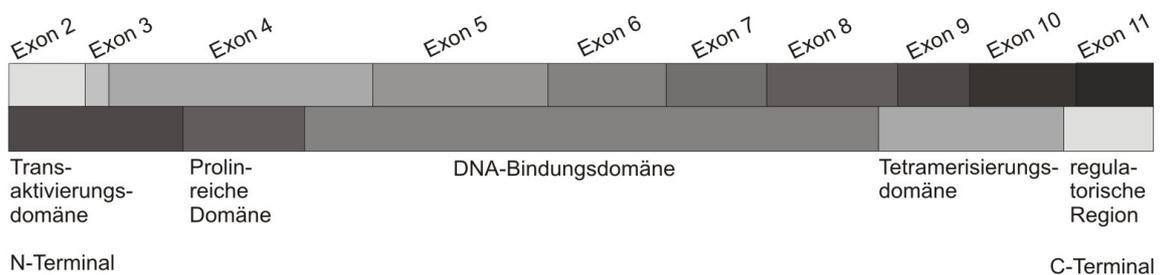
*TP53*, das Gen von *p53*, liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 und ist ca. 20 kb groß. Es besteht aus 11 Exons, von denen die Exons 2-11 für *p53* kodieren. Die Aufteilung der 397 Codons auf die 10 kodierenden Exons setzt sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2 | TP53: Codonverteilung der Exons**

Exon	2	3	4	5	6
Codon	1-25	26-32	33-125	126-186	187-224
Exon	7	8	9	10	11
Codon	225-260	261-306	307-331	332-367	368-397

### b) Keimbahnmutationen und Li-Fraumeni Syndrom

Keimbahnmutationen im *TP53* finden sich gehäuft in den Exons 4-8 (Abb. 3). Diese Region codiert für die Desoxyribonukleinsäure-Bindungsdomäne, in deren Bereich sich auch die meisten Hotspot Mutationen finden (Codon 175, 176, 220, 245, 248, 249, 273 und 282). Im Abschnitt der für die Tetramerisierungsdomäne codiert findet sich ein weiterer Hotspot, eine Mutation in Codon 337 (Kap. 2.3.1a) (54).



**Abbildung 3 | p53 Funktionseinheiten mit den jeweils kodierenden TP53 Exons**

Missense Mutationen machen mit 75 % den größten Teil der *TP53* Mutationen aus (55). Je nach Lokalisation der Mutation kann diese Auswirkungen auf die Funktion von *p53*

haben. Mutationen in der Region die für die DNS-Bindungsdomäne kodieren, können zu einem Verlust der sequenzspezifischen DNS Bindung führen (48). *TP53* Mutationen in der Tetramerisierungsdomäne können den Verlust der Fähigkeit von *p53* ein Tetramer zu bilden zur Folge haben (56, 57).

Im Jahr 1969 wurde von Li und Fraumeni erstmals ein autosomal dominantes Syndrom (Tab. 4) mit einer Prädisposition für Sarkome beschrieben, das in betroffenen Familien außerdem mit weiteren Malignomen assoziiert war (4). Eine Arbeitsgruppe um Malkin fand 1990 einen Zusammenhang des Li-Fraumeni Syndroms mit *TP53* Keimbahnmutationen (5). Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Malignome mit Keimbahnmutationen des *TP53* in Verbindung gebracht und die Definition des LFS weiterentwickelt (Tab. 3). Patienten mit LFS oder Li-Fraumeni-like Syndrom (LFL) haben ein erhöhtes Risiko mehrere Primärtumore zu entwickeln (58). Studien fanden *TP53* Keimbahnmutationen bei ca. 70 % der betroffenen Patienten (59-62). Die verschiedenen Li-Fraumeni Klassifikationen dienen unter anderem zur Einschätzung, ob bei einem Patienten ein *TP53* Mutationsscreening durchgeführt werden sollte.

### **Tabelle 3 | LFS: Klassifikationen**

PD Primärdiagnose

<b>Bezeichnung</b>	<b>Kriterien</b>
Klassisches Li-Fraumeni Syndrom (LFS) (4)	Patient mit Sarkom PD <45 Jahre UND Verwandter ersten Grades mit einem Tumor PD <45 Jahre UND Verwandter ersten oder zweiten Grades mit einem Tumor PD <45 Jahre oder einem Sarkom (jedes Alter).
Li-Fraumeni-like Syndrom nach Birch (LFL-B) (60)	Kind mit einem Tumor oder ein Patient mit Sarkom, Hirntumor oder NNR-Ca <45 Jahre UND Erst- oder zweitgradig Verwandter mit einem LFS Tumor (Sarkom, Brustkrebs, Hirntumor, NNR-Ca oder Leukämie) jeden Alters UND Verwandter ersten oder zweiten Grades mit einem Tumor PD <60 Jahre.

---

Li-Fraumeni-like Syndrom nach Eeles (LFL-E) (63)	Patient mit Sarkom (jedes Alter) UND 2 der folgenden Kriterien (können auch in nur einem Verwandtem vorkommen): Brustkrebs PD <50 Jahre und/oder Hirntumor, Leukämie, NNR-Ca, Melanom, Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom mit PD <60 Jahre ODER Sarkom (jedes Alter).
Li-Fraumeni-like Syndrom nach Chompret (64)	Patient mit einem LFS Tumor (Knochen-sarkom, Weichteilsarkom, Hirntumor, NNR-Ca, Brustkrebs) PD <36 Jahre UND mindestens ein erst- oder zweitgradig Verwandter mit einem LFS Tumor (außer Brustkrebs, wenn der Indexpatient Brustkrebs hat) PD <46 Jahre UND/ODER Patient mit mehreren Primärtumoren (außer mehrere Brustkarzinome), davon mindestens 2 aus dem LFS Spektrum wobei PD <36 Jahre beim ersten Primärtumor ODER ein Patient mit NNR-Ca jeden Alters

---

Darüber hinaus gibt es eine Empfehlung zum *TP53* Mutationsscreening des dritten Internationalen *p53* Mutationsworkshops Lyon (65) (Tab. 4).

**Tabelle 4 | Kriterien zur *TP53* Testung des *TP53* Workshop Lyon (65)**

PD Primärdiagnose; LFS Li-Fraumeni Syndrom

---

**Ein Patient sollte als Kandidat angesehen werden, wenn**

---

- er/sie einen Tumor aus dem LFS Spektrum hat (Knochensarkom, Weichteilsarkom, Hirntumor, NNR-Ca, Brustkrebs) mit einer PD <36 Jahre oder jedem Tumor der in der Kindheit auftritt,
  - ein erst- oder zweitgradig Verwandter mit einem Tumor aus dem LFS Spektrum (außer Brustkrebs, wenn der Indexpatient Brustkrebs hat) PD <46 Jahre,
  - ein Patient mit multiplen Primärtumoren (außer multiplum primärem Brustkrebs), davon mindestens 2 aus dem LFS Spektrum wobei PD <46 Jahre beim ersten Primärtumor
  - ein Patient mit NNR-Ca ODER choroidalem Plexuskarzinom ODER -papillom PD <15 Jahre ODER ein Rhabdomyosarkom PD <5 Jahre (Palmero et al., 2010).
- 

Es gibt nur wenige Daten zur Prävalenz von Keimbahnmutationen bei Patienten, bei denen die Kriterien des LFS nicht zutreffen. Am besten untersucht ist diesbezüglich die

Gruppe der Brustkrebs Patienten. *TP53* Keimbahnmutationen finden sich hier in 2,1-7,4 % der Fälle (66-68).

#### c) Somatische Mutationen und Loss of Heterozygosity

Nach Knudsons ‚Second Hit‘ Hypothese (69) führt erst das Zusammenspiel von mehreren molekularen Veränderungen zur Tumorentstehung. Eine oder mehrere Mutationen im Gen eines Tumorsuppressors auf einem Allel und der Verlust des gesunden anderen Allels werden dabei als grundlegender Eingriff in die Integrität der DNS und als wichtiger Aspekt bei der Tumorgenese gesehen. Der Verlust des gesunden Allels, auch als Verlust der Heterozygotie oder Loss of Heterozygosity (LOH) bezeichnet, führt zur Expression des durch Genmutation veränderten Proteins.

Abhängig von der Tumorentität finden sich in 38-50 % *TP53* Mutationen im Tumorgewebe (54). Die meisten somatischen Mutationen (86 %) sind in den Codons 125 bis 300 lokalisiert, was der DNS-Bindungsdomäne entspricht (70). Anders als bei anderen Proteinen sind die meisten *TP53* Mutationen Substitutionen einzelner Basen, die zur Änderung einer AS, aber nicht zu verringerter Expression des Proteins führen. Im Gegensatz dazu können in Zellen mit mutiertem *TP53* immunhistochemisch erhöhte *p53* Konzentrationen nachgewiesen werden (71).

#### d) Polymorphismen

Variationen in der DNS Sequenz die in über 1 % der gesunden Bevölkerung vorkommen, werden als Polymorphismus bezeichnet (72). Da es sich meist um den Austausch einer einzigen Base handelt, ist die Bezeichnung Single Nukleotid Polymorphismus (SNP/SNPs) gebräuchlich. Darüber hinaus gibt es Polymorphismen in Form von Deletionen oder Insertionen einer oder mehrerer Nukleotide (72).

Im *TP53* wurden bis heute 85 Polymorphismen gefunden von denen über 90% intronisch lokalisiert sind (54). Funktionelle Auswirkungen sind nur bei wenigen Polymorphismen untersucht worden. Zu diesen gehört unter anderem ein intronischer Polymorphismus, der mit einem erhöhten Risiko für maligne Tumore einhergeht (73-76). Er besteht aus einer 16 Basenpaare (bp) langen Insertion in Intron 3 (77). Die

Arbeitsgruppe um Gemignani konnte eine Verbindung zwischen dem Vorhandensein der Insertion an der Stelle des *Intron 3<sup>2</sup>* Polymorphismus mit einer verringerten Zahl von *TP53* Transkriptionsprodukten nachweisen (74). So führt die Insertion möglicherweise zu einer veränderten messenger Ribonukleinsäuren (mRNA) Verarbeitung und könnte damit das erhöhte Risiko der Malignomentwicklung bewirken (74).

Von 19 bisher in den Exons identifizierten Polymorphismen sind 8 synonym (78), der Basenaustausch bewirkt also keine Veränderung der kodierten AS. Dennoch kann eine Änderung von Proteinexpression, -faltung und -funktion, oder eine neue Spleißstelle hervorgerufen werden (78-80). Candeias *et al.* konnten 2008 zeigen, dass durch einen stillen Austausch in Codon 36 (CCG zu CCT, beide Varianten kodieren für Prolin) eine Verminderung der *p53* Apoptoseinduktion hervorgerufen wurde (81).

Von den 11 nicht-synonymen *TP53* Polymorphismen sind 4 (Tab. 5) durch mehrere Berichte über ihr Vorkommen in der Bevölkerung oder Einschluss des Polymorphismus in die HapMap Database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) validiert. Für die SNPs in Codon 47 (82) und Codon 72 (83) wurde eine Auswirkung auf den *p53* Signalweg beschrieben.

**Tabelle 5 | Nicht-synonyme *TP53* Polymorphismen (validiert)**

C Cytosin, T Thymin, G Guanin, A Adenin

<b>Exon</b>	4	4	6	10
<b>Codon</b>	47	72	217	360
<b>Basenaustausch</b>	CCG>TCG	CGC>CCC	GTG>ATG	GGG>CGG
<b>Aminosäuren-Austausch</b>	Prolin> Serin	Arginin> Prolin	Valin>Methionin	Glycin>Arginin

Die Serin Variante des Codon 47 SNP (Tab. 5) wurde mit einer Häufigkeit von 4,7 % bis jetzt nur in einer Bevölkerungsgruppe afrikanischer Abstammung beschrieben (82). Er liegt in der *TP53* Region die für die Transaktivierungsdomäne kodiert. Der Austausch von Prolin zu Serin führt zu geringerer Phosphorylierung des Proteins und

<sup>2</sup> Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen wurden, zum besseren Verständnis, mit eigens gewählten Bezeichnungen versehen (Tab. 17, S.46)

bewirkt eine verminderte Aktivierung pro-apoptotischer Zielgene, wodurch es zu einem erhöhten Krebsrisiko kommen kann (84, 85). Studien zu funktionellen Auswirkungen des SNP waren aufgrund verschiedener Testsysteme nicht einheitlich. Zum einen führte die Serin Variante des Codon 47 Polymorphismus zu einer Aktivierung der Apoptose (86), zum anderen konnte in einer Messung der *p53* Aktivität in Säugerzellen eine Reduktion der Apoptose beobachtet werden (87).

Der am meisten untersuchte Polymorphismus im *TP53* ist in Codon 72 lokalisiert (Tab. 5). Er liegt im vorderen Segment von Exon 4, welches für die Prolin-reiche Domäne von *p53* kodiert. In seiner Verteilung in der Bevölkerung finden sich geographische Unterschiede, denen abhängig vom Breitengrad vorwiegend die Kodierung CGC für Arginin oder CCC für Prolin zu Grunde liegt. Studien fanden eine Zunahme der Prolin Variante in Richtung Äquator (88, 89).

Bisher ist unklar, welche Rolle die Prolin-reiche Domäne bei der Regulation und Funktion von *p53* spielt (78). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Arginin Variante des Codon 72 Polymorphismus effektiver Apoptose induziert und durch Stress beeinflusste Zellen besser vor neoplastischer Entwicklung schützt als die Prolin Variante (78, 90, 91).

Es gibt weit mehr als 100 Studien über den Codon 72 Polymorphismus, die eine Assoziation mit einem erhöhten Krebsrisiko untersuchen (92). Die mittlerweile vorliegenden Metaanalysen, die für Brust- (93), Magen- (94), und Lungenkrebs (95) zur Verfügung stehen, konnten kein erhöhtes Risiko für die Krebsentstehung nachweisen.

## 2.3 *TP53* und das Nebennierenrindenzkarzinom

### 2.3.1 Mutationen

#### a) Genomisch

Das NNR-Ca gehört zu den Tumoren mit den häufigsten *TP53* Keimbahnmutationen, wobei die meisten Studien dazu bei Kindern mit Nebennierenrindenzkarzinom durchgeführt wurden (54). Darüber hinaus ist das NNR-Ca ein Kerntumor des LFS, welches in besonderer Weise mit *TP53* Keimbahnmutationen in Verbindung steht (Kap. 2.2.2b). Mutationen bei Patienten mit NNR-Ca sind gehäuft in den Codons 5-8 (54) im Bereich der DNS-Bindungsdomäne lokalisiert. Darüber hinaus findet sich bei Kindern mit Nebennierenrindenzkarzinom ein Hotspot in Codon 337 im Bereich der Tetramerisierungsdomäne in Exon 10 (54).

Untersuchungen von Erwachsenen mit NNR-Ca beschränken sich auf einige wenige Patienten, wobei bislang meist nur eine Analyse von Einzelfällen durchgeführt wurde. Barzon *et al.* haben 2001 eine Gruppe von 10 NNR-Ca Patienten auf *TP53* Keimbahnmutationen untersucht (8). Es wurden keine Mutationen gefunden, wobei alle kodierenden Exons sequenziert wurden. Ide *et al.* haben 2010 einen einzelnen NNR-Ca Patienten in allen Exons untersucht und eine Mutation in Exon 5 (P177R<sup>3</sup>) gefunden (9). Bei der Analyse von 180 Familien mit LFS wurde bei einem Patienten mit NNR-Ca eine Mutation in Codon 214 in Exon 6 (H214R) gefunden (96). Weitere erwachsene NNR-Ca Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation wurden bei Screening Untersuchungen von Exon 10 in Brasilien gefunden. So fanden Pinto *et al.* 2005 bei 2 von 7 untersuchten Patienten die R337H Mutation (10). Bei einer weiteren Untersuchung von Exon 10 bei NNR-Ca Patienten wurde die R337H Mutation bei einem Patienten gefunden (11). In weiteren Studien wurden, ohne vorangegangene Sequenzierung, erwachsenen NNR-Ca Patienten Keimbahnmutationen zugeschrieben, da bei Verwandten ersten Grades eine *TP53* Keimbahnmutation identifiziert wurde (97-99). Bei zwei dieser Studien wurde den Patienten eine Mutation in Codon 125 in Exon 4 (T125T) zugeschrieben (97, 99). Bei der dritten Studie wurden drei Patienten

---

<sup>3</sup> Mutationen und Polymorphismen die in einem Exon liegen, werden in dieser Arbeit entsprechend der üblichen Darstellung mittels Angabe des betroffenen Codons in der Mitte, umgeben von den Einbuchstabencodes der kodierten AS benannt.

identifiziert, denen Mutationen in den Codons 173 (V173M), 197 (V197M) und 337 (R337H) attribuiert wurden (98).

Die bisher größte Studie die sich mit *TP53* Mutationen beim erwachsenen Patienten mit NNR-Ca befasst, wurde 2001 von Latronico *et al.* erstellt (7). Darin wurde Exon 10 bei 37 erwachsenen Patienten mit einem Nebennierentumor untersucht. Fünf Patienten (ca. 13 %) im Alter von 19-36 Jahren wiesen die R337H Mutation (Tab. 6) auf (7). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass in dieser Studie nur ein Exon untersucht wurde und keine ausreichende Differenzierung zwischen benignen und malignen Nebennierentumoren vorgenommen wurde (7).

Weitaus mehr *TP53* Keimbahnmutationen sind bei Kindern mit einem Nebennierenrindentumor beschrieben. Hervorzuheben ist dabei die Mutation in Codon 337 die zu einem Aminosäuretausch von Arginin zu Histidin führt. Sie liegt in der Tetramerisierungsdomäne kodierenden Region. Erstmals im Jahr 2000 bei einem Patienten mit NNR-Ca von Chompret *et al.* beschrieben (100), wurde die Mutation Anfang des Jahrtausends in einem hohen Prozentsatz (77,7-97,2 %) bei Kindern mit Nebennierentumor im Süden Brasiliens gefunden (6, 7). Weitere Untersuchungen zeigten eine niedrige Penetranz der Mutation (101). Funktionsanalysen des mutierten *p53* zeigten, dass bei physiologischem pH (pH 7) keine Beeinträchtigung der Proteinfunktion vorliegt (102). Eine Änderung des pHs in Richtung höherer pH-Werte führt dazu, dass eine Salzbrücke, die zur korrekten Faltung des Proteins und damit zum Erhalt seiner Funktion nötig ist, nicht mehr ausgebildet werden kann (102).

Garritano *et al.* konnten 2010 nachweisen, dass die Verbreitung der Mutation in Brasilien auf einen Gründereffekt zurückzuführen ist, der eine familiäre Ausbreitung der Mutation entlang von Einwandererstraßen nach Brasilien zeigte (103). Eine zusätzlich untersuchte Familie aus Portugal, in der ein Kind mit NNR-Ca die Mutation in der Keimbahn aufwies (100), zeigte denselben Genotyp wie das brasilianische Kollektiv (103). Der nachgewiesene Zusammenhang der Fälle führte zur Vermutung, dass die Mutation ursprünglich in Portugal auftrat und dann durch Auswanderer nach Brasilien weiterverbreitet wurde (103).

## b) Somatisch

Somatische *TP53* Mutationen werden bei 25-44 % der NNR-Cas gefunden (13, 104). Im Bereich der somatischen *TP53* Mutationen beim NNR-Ca finden sich mehr Daten von erwachsenen Patienten. Häufig wurden bei kleinen Patientengruppen die Exons 5-8 sequenziert (104, 105), weshalb die meisten Mutationen im Bereich der DNS-Bindungsdomäne in den Exons 5-8 beschrieben wurden (104-106).

Der Verlust der Heterozygotie (Kap. 2.2.2c) wird in 50-80 % der NNR-Cas gefunden (106, 107). Libe *et al.* haben darüber hinaus 2007 gezeigt, dass der Verlust eines Allels des *TP53* in nur 5 von 12 Tumoren (41,7 %) mit somatischer *TP53* Mutation vorlag (13).

### 2.3.2 Polymorphismen

Zu *TP53* Polymorphismen bei erwachsenen Patienten mit einem NNR-Ca gibt es sehr wenige Daten. Ignaszak-Szczepaniak *et al.* haben 2006 die Sequenzvarianten des Codon 72 Polymorphismus (Kap. 2.2.2d) bei polnischen Patienten mit einem Nebennierentumor und einer gesunden Kontrollgruppe untersucht (12). Dabei wurden 17 NNR-Ca Patienten im Alter von 23-55 Jahren, darunter 11 Frauen und 6 Männer, mit 50 gesunden Probanden im Alter von 40-55 verglichen. Die Gruppe der gesunden Probanden bestand aus 25 Männern und 25 Frauen, die keine hormonellen und radiologischen Auffälligkeiten der Nebennieren zeigten und deren Familienanamnese keine NNR-Cas aufwies. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass das Vorhandensein eines Prolin Allels in Codon 72 mit einem 3,05-fach erhöhtem Risiko für das Auftreten eines NNR-Ca verbunden war und identifizierten das Prolin Allel so als möglichen Risikofaktor für die Karzinogenese des NNR-Ca (12).

Auf somatischer Ebene ist bisher nur eine Studie von Libe *et al.* bekannt, in der kein aggressiveres Verhalten von NNR-Cas mit dem Codon 72 Polymorphismus nachgewiesen wurde (13).

### 3. Fragestellung der Arbeit

Veränderungen im *TP53* können zu einer Änderung der Funktion des p53 und damit zur Entstehung von malignen Neubildungen führen. Keimbahnmutationen im *TP53* stehen im Besonderen mit dem LFS (4) in Verbindung, zu dessen Kerntumoren unter anderem das NNR-Ca gehört. In Untersuchungen von Keimbahnveränderungen des *TP53* bei Patienten mit NNR-Ca wurde der Fokus bisher meist auf die Exons 4-8 gelegt (96, 98, 99). Des Weiteren gibt es nur wenige Arbeiten zu Keimbahnmutationen bei erwachsenen NNR-Ca Patienten, die sich meist auf die Beschreibung von Einzelfällen (9, 11, 99) oder sehr kleine Gruppen (n=10) beschränken (8).

Die in Brasilien und Portugal gefundene R337H Hotspot Mutation wurde mit dem Nebennierenrindentumor im Kindesalter in Verbindung gebracht (6, 108). Untersuchungen zu erwachsenen Patienten mit NNR-Ca in einem großen europäischen Kollektiv gibt es bisher nicht. Zu *TP53* Polymorphismen auf Keimbahnebene beim erwachsenen NNR-Ca Patienten gibt es nur eine Untersuchung für ein kleines europäisches Kollektiv (12). Aufgrund dieser Datenlage sollte in dieser Arbeit ein möglichst großes, klinisch gut charakterisiertes Kollektiv erwachsener NNR-Ca Patienten hinsichtlich aller kodierenden *TP53* Exons untersucht werden.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

#### 1. ***TP53* Keimbahnmutationsstatus bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca:**

Wie hoch ist die Mutationsrate?

Welche Mutationen treten auf?

Gibt es in Mitteleuropa eine so auffallende Häufung von Mutationen assoziiert mit dem NNR-Ca wie in Brasilien?

Gibt es eine Korrelation zwischen *TP53* Mutationen und klinischem Verlauf?

#### 2. ***TP53* Mutationen der Keimbahn im Tumorgewebe:**

Finden sich die in der Keimbahn nachgewiesenen Mutationen auch auf somatischer Ebene?

Kann ein Loss of Heterozygosity (LOH), mit dem Verlust eines Allels, nachgewiesen werden?

Wird mutiertes *TP53* als *p53* im Tumorgewebe exprimiert?

**3. *TP53* Polymorphismen bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca:**

Welche Polymorphismen kommen vor?

Wie unterscheidet sich die Verteilung der Genotypen zu einem gesunden Kollektiv?

Gibt es eine Korrelation zwischen *TP53* Polymorphismen und klinischem Verlauf?

## **4. Patienten, Material und Methoden**

### 4.1 Patienten

#### 4.1.1 Ethikantrag

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Ethikantrag Nummer: 93/02). Patienten mit einem histologisch oder morphologisch diagnostizierten NNR-Ca wurde eine Einverständniserklärung über die personenbezogene Datenaufnahme ins Deutsche Nebennierenrindenzarzinom Register vorgelegt. Darüber hinaus wurde das Einverständnis zur Verwendung von Tumorgewebe und Blut zu wissenschaftlichen Zwecken eingeholt. Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Information der Patienten über den Studieninhalt durch ärztliche Mitarbeiter und nach ausreichender Bedenkzeit wurde die Einverständniserklärung durch den Patienten schriftlich erteilt.

#### 4.1.2 Patientenrekrutierung

Die untersuchten Patienten sind Teil des Deutschen Nebennierenrindenzarzinom Registers, das aktuell Daten von über 600 Patienten mit NNR-Ca umfasst. Im Rahmen des Registers wurden Patienten aus Deutschland (n=131) und in kleiner Zahl aus ganz Europa (n=11) rekrutiert, die ein zusätzliches Einverständnis zur Untersuchung von Blut und Gewebeproben erteilt hatten. Die Zuweisung erfolgte durch behandelnde Ärzte anderer Kliniken und Hausärzte. Des Weiteren wurden Patienten aufgenommen, die über die Internetseite <http://www.nebennierenkarzinom.de/> Kontakt zum Register aufnahmen.

#### 4.1.3 Materialsammlung und Lagerung

Klinische Daten, Blut und Tumorgewebe, in Form von Formalin fixiertem in Paraffin gebettetem Tumorgewebe, wurden durch die behandelnden Kliniken zur Verfügung gestellt.

Das Tumorgewebe wurde, soweit vorhanden, durch den Referenzpathologen Prof. Dr. Saeger (Praxis für Pathologie, Marienkrankenhaus, Hamburg) begutachtet, um eine sichere Zuordnung der Tumore als NNR-Ca zu gewährleisten.

Den Patienten wurde eine Tumorbanknummer zugeordnet und klinische Daten, sowie vorhandene Biomaterialien (Gewebe, Blut), wurden pseudonymisiert in das Deutsche Nebennierenrindenzarzinom Register aufgenommen.

Die Lagerung der Formalin fixierten in Paraffin gebetteten OP-Resektat Blöcke erfolgte bei Raumtemperatur (RT) unter Lichtausschluss. Das Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Blut wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Geräte

**Tabelle 6 | Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Zentrifugen	Rotanta/RPC	Hettich
	Biofuge fresco	Heraeus
	ThermoScientific	Heraeus
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf
	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Wärmeschrank	Autoblot-MicroHybridization	Bellco Glass inc.
Heizblock	Thriller	peqlab
Vortexer	MS1 minishaker	IKA
PCR Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf
	Mastercycler gradient	Eppendorf
Mikrowelle	Q.U.I.C.K. cookmate	DAEWOO
Waage	SBA32	Scaltec
Gelelektrophorese	Joule Box™ System	Stratagene
	Sub-Cell GT MINI	BioRad
Mikrotom	HN-40	Reichert-Jung
Geldokumentation	Biodoc Analyze	Biometra
	Powershot A 620	Canon
	Biometra P93D (Drucker)	Mitsubishi
UV-Transilluminator	Ultraviolet Transilluminator	IBI Kodak
pH-Meter	pH 720	InoLab®
Pipetten	Eppendorf research	Eppendorf
Mikroskop	Axioskop 2 plus	Zeiss
Mikroskop	14.2 SPOT Insight Camera	Diagnostic Instruments, Inc.
	SPOT Basic Software	Diagnostic Instruments, Inc.

#### 4.2.2 Materialien

**Tabelle 7 | Materialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
S-Monovette Kalium-EDTA	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
SaveSeal Micro Tubes	Sarstedt
Cellstar Tubes	Greiner bio one
Cuvetten	Eppendorf
SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	R. Langenbrinck

#### 4.2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck und J. T. Baker bezogen und waren vom Reinheitsgrad p.a.. Davon abweichende Bezugsquellen werden im Text erwähnt.

#### 4.2.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 8 | Puffer und Lösungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Paraffin Extraktions Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 % Tween 20, 2 mg/ml Proteinase K
TAE-Puffer	40 mM Tris, 10 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, pH 8 (Essigsäure)
Citronensäuremonohydrat Puffer	10 mM Citronensäuremonohydrat, pH 6,5 NaOH

#### 4.2.5 Kits

**Tabelle 9 | Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle/Firma</b>
FlexiGene DNA Extraction Kit	Puffer FG1 Puffer FG2 Puffer FG3 QIAGEN Protease	Qiagen
Platinum® <i>Pfx</i> DNA polymerase	Platinum® <i>Pfx</i> DNA polymerase <i>Pfx</i> Amplification Buffer Enhancer MgSO <sub>4</sub>	Invitrogen
Nucleo Spin Extract II	Binding Buffer NT Wash Buffer NT3 Elution Buffer NE NucleoSpin® Extract II Columns Collection tubes	Peqlab
QIAquick® Gel Extraction Kit	MinElute™ Spin Columns Collection tubes Buffer QG Buffer PE Buffer EB	Qiagen
MinElute® PCR Purification Kit	MinElute™ Spin Columns Collection tubes Buffer PBI Buffer PE Buffer EB	Qiagen
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder 6x DNA Loading Dye	Fermentas Fermentas
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	Gene Ruler 50bp DNA Ladder 6x DNA Loading Dye	
DNARelease™	DNARelease™ Additive Gel loading dye	Finnzymes
AB Human Serum	AB Human Serum	Invitrogen

ADVANCE™ HRP kit	ADVANCE™ HRP Link	DAKO
	ADVANCE™ HRP Enzyme	
DAB+, Liquid	DAB+ Chromogen	DAKO
	DAB+ Substrate Buffer	
Monoklonaler Maus Anti-Mensch Antikörper p53 Protein	Clone DO-7	DAKO
Universal Negativ Kontrolle - Maus	Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM	DAKO

#### 4.2.6 Primer

Das Primerdesign für Exon 4, 5, 6 und 10 (109), VNTR1 (110), VNTR2 (111) und SNP179 (103) von *TP53* wurde mit GENTle (Manske M, University of Cologne, Germany, <http://gentle.magnusmanske.de/>) geprüft und von der Firma Biomers HPLC gereinigt hergestellt.

**Tabelle 10 | Primer**

Primernamen	Amplimer 5'-3'	Größe (bp)	Annealing Temperatur (°C)
Exon 4	AAGACCCAGGTCCAGATGAA GGTGAAGAGGAATCCCAA	306	55
Exon 5	ATCTGTTCACTTGTGCCCTG ATCAGTGAGGAATCAGAGGC	309	57
Exon 6	GAGAGACGACAGGGCTGGTT AAGCAGCAGGAGAAAGCCCC	272	63
Exon 10	CATGTTGCTTTTGTACCGTC TTTCCAACCTAGGAAGGCAG	268	57
VNTR 1	Fam6-ACTCCAGCCTGGGCAATAAGAGCT ACAAAACATCCCCTACCAAACAGC	112-137	64
VNTR 4	Fam6-AGGGATACTATTCAGCCCCGAGGTG ACTGCCACTCCTTGCCCATTC	103-135	60
SNP 179	CACCCACTGACCCTAACAC TCAAAGGGCTTCTTGGGATA	224	53

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 DNS Extraktion

#### a) genomisch

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte aus EDTA Blut. Die DNS wurde unter Verwendung des FlexiGen DNS Kit extrahiert und anschließend in 250 µl Aqua destillata (Aquadest) aufgenommen und eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der DNS im Photospektrometer bestimmt (Kap. 4.3.2). Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### b) somatisch

Zur Gewinnung von DNS aus Tumorgewebe wurden von in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Tumorstücken am Mikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt.

Die Extraktion der DNS erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll (112). Zur Entparaffinierung wurden 5 Gewebeschnitte, nach Zugabe von 1 ml Xylen, gevortext und anschließend unter leichtem Schütteln 15 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurden die Proben 10 min mit 16000 g bei RT zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit 100 %igem, 95 %igem und 70 %igem Ethanol. Dabei wurden die Proben, nach Resuspension des Pellet auf dem Vortexer, jeweils 10 min mit 10000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann bei RT ca. 10 min getrocknet und mit 200 µl Paraffin Extraktions Puffer versetzt und anschließend 16-24 h bei 55 °C inkubiert. Die darauf folgende Inaktivierung der Proteinase K erfolgte bei 99 °C für 20 min im Heizblock. Nach zweimaligem Zentrifugieren (10 min, 16000 g, RT) und anschließendem Verwerfen des Pellet wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der DNS wurde im Photospektrometer bestimmt (Kap. 4.3.2). Die Lagerung der gewonnenen DNS erfolgte bei -20 °C.

#### 4.3.2 Photometrische Quantifizierung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNS aus Blut und Tumorgewebe erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 260 nm und 280 nm. Hierzu wurden die Proben in entsprechender Verdünnung, nach Eichung des Photometers mit Aquadest, gemessen. Die Konzentration wurde nach Sambrook *et al.* (1989) über folgende Formel berechnet (113):

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}} \times V \times F$$

c = Konzentration Ausgangslösung

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA)

V = Verdünnungsfaktor

Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer DNS Konzentration von 50 µg/ml. Zum Nachweis einer möglichen Verunreinigung der DNS durch Proteine erfolgte die Berechnung des Quotienten aus der Absorption bei 260 und 280 nm. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm sollte bei DNS zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein Wert <1,6 weist auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

#### 4.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Im Jahr 1993 wurde die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) (114, 115) mit einem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Sie gehört heute zu den grundlegenden Methoden der Molekularbiologie.

Die PCR dient der selektiven Vervielfältigung spezifischer DNS-Abschnitte mit Hilfe von einem Primerpaar das den gewünschten Bereich der Nukleinsäure eingrenzt. Eine Amplifizierung von Nukleinsäuren erfolgt in drei temperaturabhängigen Schritten: Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. Im ersten Schritt erfolgt die Auftrennung des DNS Doppelstrangs durch Hitzedenaturierung. An die resultierenden Einzelstränge können sich nun die Primer anlagern (Primer-Annealing) und im Elongationsschritt werden die Einzelstränge durch eine hitzestabile Polymerase komplementär amplifiziert.

Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNS bei 94 °C.

Die Temperatur für das Primer-Annealing errechnet sich aus der Länge und Basenzusammensetzung der verwendeten Primer nach der Wallace-Formel (113) wie folgt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

$T_m$  = Temperatur

A = Anzahl Adenin    T = Anzahl Thymin    G = Anzahl Guanin    C = Anzahl Cytosin

Der darauf folgende Elongationsschritt und die dafür benötigte Temperatur sind von der verwendeten Polymerase abhängig.

Diese drei Hauptschritte der PCR werden in aufeinander folgenden Zyklen bis zu 40 x wiederholt, um eine hohe Amplifikationsrate des Replikats zu erreichen. Ein vorangehender Schritt zur initialen Denaturierung der DNS und ein nachfolgender Schritt zur Komplettierung der Elongation werden nur einmal durchgeführt.

Folgender Ansatz (Tab. 13) wurde für alle nachfolgend aufgeführten PCR Programme (Tab. 14, Tab. 15, Tab. 16) verwendet, wobei der Volumeneinsatz der Proben nach photometrisch gemessener Menge für 400 ng DNS pro Ansatz berechnet und Aquadest entsprechend einem Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$  zugefügt wurde.

**Tabelle 11 | PCR Ansatz**

<b>Reagenz</b>	<b>Eingesetzte Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Polymerase	0,4 $\mu\text{l}$	1 U
10x PCR Puffer	10 $\mu\text{l}$	1x
Primer sense	2 $\mu\text{l}$	20 pM
Primer antisense	2 $\mu\text{l}$	20 pM
dNTPs	2 $\mu\text{l}$	10 mM pro dNTP
MgSO <sub>4</sub>	5 $\mu\text{l}$	1 mM
DNS Template	x $\mu\text{l}$	400 ng
Aquadest	x $\mu\text{l}$	

Die PCR wurde im PCR Cycler mit der jeweils entsprechenden Temperatur für die Primer (Tab. 12) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 12 | PCR TP53 Exon 4, 5, 6 und 10**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung der DNS	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung der DNS	94 °C	30 sec	
Annealing der Primer	x °C*	30 sec	40 Zyklen
Elongation	68 °C	45 sec	
Komplettierung	68 °C	10 min	1 Zyklus

\*Temperatur Primer (Kap. 4.2.6)

**Tabelle 13 | PCR TP53 VNTR 1 und 4**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung der DNS	94 °C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung der DNS	94 °C	1 min	
Annealing der Primer	x °C*	2 min	35 Zyklen
Elongation	72 °C	45 sec	
Komplettierung	72 °C	5 min	1 Zyklus

\*Temperatur Primer (Kap. 4.2.6)

**Tabelle 14 | PCR TP53 Haplotypanalyse SNP179 (rs ID # rs9894946)**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung der DNS	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung der DNS	94 °C	30 sec	
Annealing der Primer*	53 °C	30 sec	40 Zyklen
Elongation	72 °C	45 sec	
Komplettierung	72 °C	10 min	1 Zyklus

\*Primer (Kap. 4.2.6)

Die Analyse der PCR Amplifikate erfolgte auf 2 %igen Agarosegelen (Kap. 4.3.6).

#### 4.3.4 Sequenzierung

Im Jahr 1977 wurde von Sanger eine Methode zur Sequenzierung der DNS entwickelt, die sich einer Kettenabbruch-Synthese bei der PCR bedient (116). Die Methode folgt dabei den Grundsätzen der PCR (Kap. 4.3.3). Anders als bei der PCR zur Vervielfältigung ganzer DNS Abschnitte wird hier pro Ansatz nur ein Primer zugegeben. Zusätzlich zu den dNTPs werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), die durch das fehlen der 3'-Hydroxygruppe eine Verknüpfung mit dem nächsten dNTP verhindern und dadurch einen Abbruch der Synthese hervorrufen, beigefügt. So entstehen unterschiedlich lange Fragmente der amplifizierten DNS, die anschließend durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Mit Hilfe eines Detektors können die durch einen Laser angeregten fluoreszenzmarkierten Fragmente in ein Chromatogramm umgesetzt werden. Dabei gibt die Abfolge der 4 unterschiedlichen Farbsignale der ddNTPs direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNS-Stranges wieder (117).

Die Sequenzierung der genomischen DNS wurde als Auftragsarbeit durch BioGlobe GmbH, Hamburg (Metabion International) mit der Methode nach Sanger durchgeführt.

Um die in dieser initialen Sequenzanalyse gefundenen Keimbahnmutationen zu bestätigen wurden die entsprechenden Exons aus der zuvor gewonnenen genomischen DNS (Kap. 4.3.1a) mittels PCR (Kap. 4.3.3) amplifiziert. Die anschließende Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech, Konstanz, ebenfalls mit der Methode nach Sanger, ausgeführt. Dies wurde für alle Mutationen dreimal wiederholt.

Die Analyse der somatischen Veränderungen in *TP53* wurde auf die Exons der Patienten beschränkt, die eine Keimbahnmutation aufwiesen. Die entsprechenden Exons wurden aus der zuvor gewonnenen somatischen DNS (4.3.1b) mittels PCR amplifiziert (Kap. 4.3.3) und ebenfalls in einer Auftragsarbeit durch GATC Biotech, Konstanz sequenziert. Zur Bestätigung der Ergebnisse erfolgte die Analyse der entsprechenden Exonabschnitte ebenfalls dreimal wie zuvor beschrieben.

#### 4.3.5 Analyse der Sequenzierungsdaten

Alle Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme GENTle (Manske M, University of Cologne, Germany, <http://gentle.magnusmanske.de/>) und 4Peaks (Mekentosj, <http://mekentosj.com/4peaks>) analysiert und einzelne Sequenzabschnitte wurden zur Dokumentation mit 4Peaks (Mekentosj, <http://mekentosj.com/4peaks>) in eine Bilddatei umgewandelt. Die resultierenden Bilddateien wurden mit CorelDRAW® (Corel Corporation) zusammengefügt.

#### 4.3.6 DNS-Gelelektrophorese

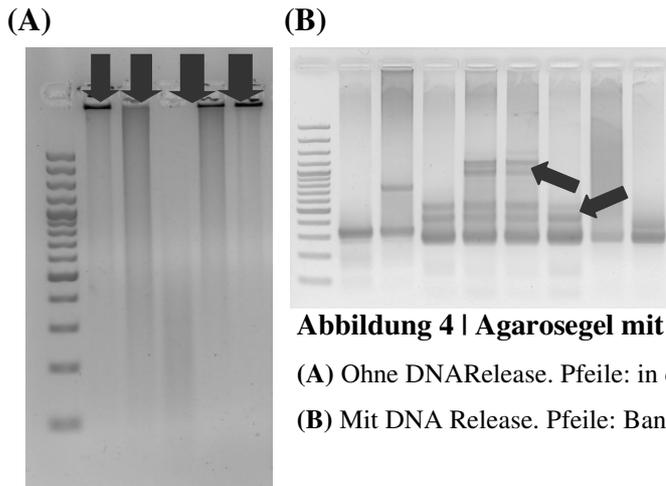
Zur Analyse der PCR-Amplifikate wurden 2 %ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde Agarose (w/v) durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer gelöst. Nach vollständiger Lösung der Agarose und Abkühlen auf ca. 60 °C wurden Gele, unter Verwendung der zu den Gelelektrophoresegeräten gehörigen Kammersysteme (Kap. 4.2.1), gegossen. Nach der Auspolymerisierung wurden die Gele bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurde das PCR Produkt im Verhältnis 1:6 mit Loading dye versetzt und auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer je nach verwendetem System bei

20 V/cm	Joule Box™ System
14 V/cm	Sub-Cell GT MINI

Anschließend wurden die Gele 20 min in einem Ethidiumbromidbad (0,6µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer (v/v)) gefärbt, um die in der vorangegangenen PCR amplifizierten DNS-Fragmente sichtbar zu machen.

Bei der Analyse der Amplifikate aus somatischer DNS mittels Gelelektrophorese zeigte sich, dass sich das Amplifikat teilweise nicht aus den Geltaschen lösen ließ. (Abb. 4A).



**Abbildung 4 | Agarosegel mit PCR Produkt aus somatischer DNS**

(A) Ohne DNARelease. Pfeile: in den Taschen verbliebenes PCR Produkt.

(B) Mit DNA Release. Pfeile: Banden von PCR Nebenprodukten .

Durch Zellreste die bei der DNS Extraktion nicht vollständig entfernt werden, kann es zu einer Retention der amplifizierten DNS in den Geltaschen kommen. Das Problem konnte durch Wechsel des Ladepuffers gelöst werden. Der fortan benutzte DNARelease Ladepuffer beinhaltet Proteinase K, die Zellreste verdaut und so die ungehinderte Wanderung der amplifizierten DNS Stücke durch das Gel ermöglicht (Abb. 4B).

In der PCR können durch vorzeitiges Beenden der Amplifizierung Abbruchstücke und durch unspezifische Primerbindung Nebenprodukte entstehen, welche sich durch zusätzliche Banden in der Gelanalyse darstellen (Abb. 4B). Da diese Amplifikate das Ergebnis der Sequenzierung stören, müssen sie entfernt werden (Kap 4.3.7a). Fanden sich nach der PCR keine unspezifischen Nebenprodukte, wurde das Amplifikat wie in Kap. 4.3.7b beschrieben aufgereinigt.

#### 4.3.7 Aufreinigung des PCR Amplifikats

##### a) Gelextraktion

Zur Entfernung unspezifischer Fragmente, die als Nebenprodukt bei der PCR entstehen können, kann eine Aufreinigung über ein Agarosegel erfolgen. Hierzu wurde das komplette PCR Produkt, wie in Kapitel 4.3.7 beschrieben, über Gelelektrophorese aufgetrennt und gefärbt. Anschließend wurde das entsprechende DNS-Fragment bei 312 nm UV-Licht mit 70 %iger Anregung mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung und Extraktion der DNS aus dem Agarosegel erfolgte unter

Verwendung des Nucleo Spin Extract II Kit oder des QIAquick<sup>®</sup> Extraction Kit über das Säulenverfahren.

Die aufgereinigte DNS wurde in Aquadest eluiert, anschließend die Konzentration im Nanodrop bestimmt (Kap. 4.3.3) und bis zur weiteren Verwendung bei der Sequenzierung (Kap. 4.3.4) bei 4 °C gelagert.

#### b) PCR Purifikation

Die Entfernung von PCR Reagenzien (dNTPs, Taq-Polymerase, Primer, MgSO<sub>4</sub>), die die nachfolgende Sequenzierungsreaktion stören können, erfolgte nach dem Protokoll und unter Verwendung des MinElute Kit über das Säulenverfahren. Die aufgereinigte DNS wurde in Aquadest eluiert und die Konzentration im Nanodrop bestimmt (Kap. 4.3.3). Anschließend Lagerung der DNS bis zur weiteren Verwendung bei der Sequenzierung (Kap. 4.3.4) bei 4 °C.

#### 4.3.8 Fragmentlängenanalyse

Zur Analyse eines möglichen Allelverlusts im Tumor werden hochpolymorphe Bereiche im Genom verwendet, hierzu gehören Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Regionen. Diese nicht kodierenden Regionen im Genom, in denen sich Basen tandemartig in unterschiedlicher Länge wiederholen, liegen auf dem mütterlichen und dem väterlichen Allel vor.

Zur Identifizierung eines möglichen Allelverlusts muss auf genomischer Ebene eine VNTR Region identifiziert werden, die sich auf den beiden vorhandenen Allelen in ihrer Länge unterscheidet. Zur Amplifizierung der VNTR Regionen erfolgt zunächst eine PCR mittels sequenzspezifischer fluoreszenz-markierter Primer. Die gewonnenen Produkte werden dann elektrophoretisch aufgetrennt. Bei unterschiedlicher Länge der Amplifikate kann die Differenz, bis zu einer Base genau, über die Messung des Fluoreszenzsignals dargestellt werden. Liegt auf somatischer Ebene der Verlust eines Allels in dieser Region vor, zeigt sich das durch den Wegfall nur eines der beiden Signale.

Die Auftrennung und Analyse der in der VNTR1 und VNTR4 PCR (Kap. 4.3.4) gewonnenen Produkte wurde als Auftragsarbeit durch Seq-IT Kaiserslautern durchgeführt. Zunächst wurde dort die Auftrennung im Kapillarsequenzer Abi 3130xl (Applied Biosystems) mit dem Längenstandard HD 400 Box durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung mit der Genemapper v3.2 Software von Applied Biosystems.

#### 4.3.9 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der *p53* Expression wurde an Schnitten von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe durchgeführt.

4 nacheinander gefertigte 5 µm Paraffinschnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen, zweimal 12 min in 100 % Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) für je 5 min rehydriert. Die Entfernung noch vorhandenen Ethanol erfolgte durch Spülung der Schnitte mit destilliertem Wasser.

Um das Antigen zu demaskieren und unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Schnitte anschließend 13 min bei 120 °C in Citronensäuremonohydrat Puffer im Druckkochtopf gekocht. Nachfolgend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Die Hemmung endogener Peroxidase-Aktivität erfolgte durch Inkubation der Schnitte für 10 min bei RT mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (v/v). Erneute Spülung der Schnitte mit destilliertem Wasser. Unspezifische Protein-Antikörper Bindungsstellen wurden mit 20 % AB Human Serum in PBS für eine Stunde bei RT blockiert. Danach wurde ein Schnitt eines Tumors mit monoklonalem Maus Anti-Mensch Antikörper p53 Protein (1:150 in PBS), und ein weiterer Schnitt desselben Tumors als Negativkontrolle mit Universal Negativ Kontrolle-Maus Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurden die Schnitte 5mal mit PBS gespült. Die Signalverstärkung erfolgte durch 2x 20 min Inkubation mit dem Peroxidase basierten ADVANCE™ HRP Kit und anschließender Spülung mit PBS. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde DAB+, Liquid für 10 min appliziert. Nach Spülung der Schnitte mit Aquadest erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 2 min. Anschließend wurde erneut mit Aquadest und 100 %igem Ethanol gespült.

Eine Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgte durch mindestens zwei unabhängige Begutachter. Die Darstellung der gefärbten Schnitte in Bildern erfolgte bei 10- und 40-facher Vergrößerung.

#### 4.3.10 Haplotypanalyse

Der Nachweis einer möglichen Verwandtschaft eines NNR-Ca Patienten mit der R337H Keimbahnmutation dieser Arbeit mit dem zuvor beschriebenen brasilianischen Kollektiv (Kap. 2.3.1a) erfolgte nach dem Vorgehen von Garritano *et al.* (103). Garritano *et al.* konnten in einer umfassenden Haplotypanalyse von *TP53* einen SNP identifizieren, durch den, aufgrund seines Vorkommens im von der R337H Keimbahnmutation betroffenen Kollektiv, ein Gründereffekt bei der Verteilung der Mutation nachgewiesen werden konnte (103). Dieser Nachweis des Gründereffekts erfolgte über den SNP179 (SNP link rs#9894946) in Intron 10 von *TP53*. Im SNP179 wurde in der Studie von Garritano *et al.* Thymin (revers: Adenin) bei allen 48 untersuchten Patienten auf dem Allel mit der R337H Mutation gefunden (103). Dagegen ist die häufigste Variante bei Kaukasiern mit 58-67 % Guanin (118). Die Darstellung des SNP179 beim Patienten mit der R337H Keimbahnmutation dieser Arbeit erfolgte durch PCR (Kap. 4.3.3), DNS-Gelelektrophorese (Kap. 4.3.6), Aufreinigung (Kap. 4.3.7) und anschließende Sequenzierung (Kap. 4.3.4) der genomischen DNS des Patienten.

#### 4.3.11 Sammlung klinischer Daten und statistische Auswertung

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte im Rahmen des Deutschen Nebennierenkarzinom Registers.

Die statistische Auswertung und Darstellung der klinisch und experimentell erhobenen Daten wurde mit den Programmen Excel (Microsoft), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) und SPSS (IBM) durchgeführt. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mittels Log-rank-Test (Mantel-Cox), t-Test, oder Chi-Quadrat Test.

Die multivariate Statistik wurde nach Cox berechnet. Als signifikant wurden alle Werte kleiner als 5 %, also  $p < 0,05$ , gewertet.

Die Darstellung der statistischen Daten dieser Arbeit erfolgt in Kaplan-Meier-Kurven oder tabellarisch.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Experimentelle Daten

In den folgenden Kapiteln wird zunächst auf die *TP53* Mutationsanalyse eingegangen, wobei die Daten bezüglich der Ergebnisse der genomischen (Kap. 5.1.1a), somatischen (Kap. 5.1.1b) und familiären Analyse der NNR-Ca Patienten untergliedert sind. Darauf folgt die Darstellung der Ergebnisse aus der LOH Analyse (Kap. 5.1.2), der Immunhistologie (Kap. 5.1.3) und der Haplotypanalyse (Kap. 5.1.4). In Kapitel 5.1.5 finden sich die Daten der *TP53* Polymorphismus Analyse.

#### 5.1.1 *TP53* Mutationen

##### a) Genomisch

Eine klinisch gut charakterisierte Gruppe von 103 NNR-Ca Patienten (Tab. 15) wurde auf *TP53* Keimbahnmutationen untersucht.

**Tabelle 15 | NNR-Ca Patientenkollektiv der *TP53* Mutationsanalyse**

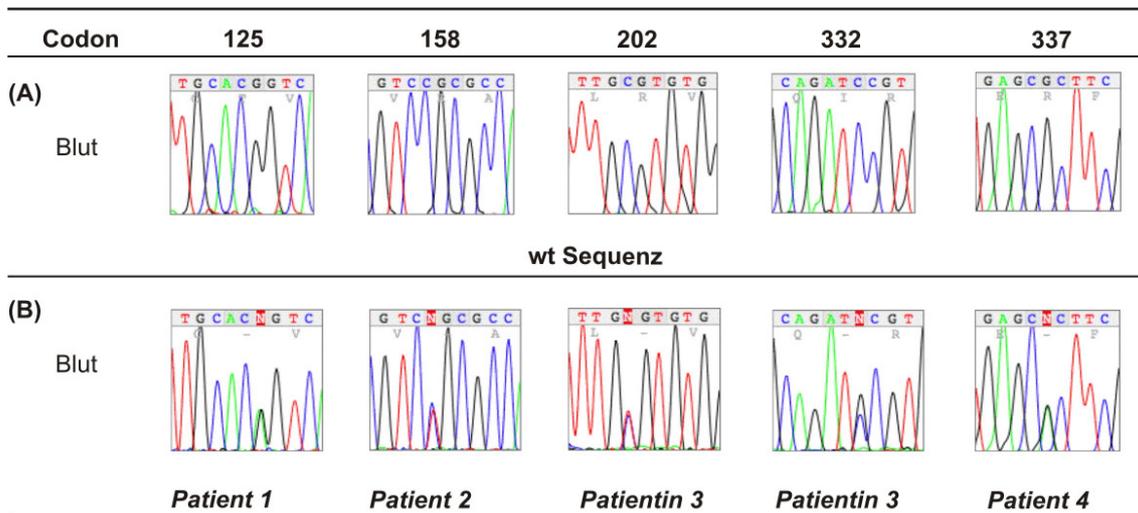
ED Erstdiagnose. N nein. J ja. nb nicht bekannt.

	<b>Männer</b> (n=41)	<b>Frauen</b> (n=62)
<b>Alter bei ED</b> (Jahre)	49 (18-77)	51 (20-78)
Median (Intervall)		
<b>Überleben nach ED</b> (Jahre)	5,8 (0,5-27,2)	4,1 (0,1-28,2)
Median (Intervall)		
<b>ENSAT Stadium bei ED</b>	I=7% II=37% III=27% IV=29%	I=5% II=37% III=29% IV=25% nb 3%
<b>Tumorgröße</b> (cm)	12,2 (4,5-30)	10,0 (3-20)
Median (Intervall)		
<b>Zweitmalignom</b>	J 17,1% N 82,9%	J 9,7% N 90,3%

Bei 3 Patienten wurde eine Keimbahnmutation gefunden, eine weitere Patientin wies 2 Keimbahnmutationen im *TP53* auf. Zusätzlich wurde bei 80 Patienten dieses Kollektivs

eine Sequenzierung der Exons 2 und 3 durchgeführt, die keine weiteren Sequenzveränderungen im *TP53* Gen zeigen konnte.

Bei *Patient 1* zeigte sich eine heterozygote Mutation in Exon 4 im Bereich der DNS-Bindungsdomäne. Der Austausch von Guanin zu Adenin an der dritten Position von Codon 125 (Abb. 3) führt zu keinem Wechsel der kodierten AS Tyrosin. Dennoch wurde eine Auswirkung der Mutation auf das Splicing mit der Entstehung abnormer Transkripte von *p53* beschrieben (97, 119). Die Mutation wurde zudem zuvor als Verursacher einer Prädisposition für Krebs in einer Familie identifiziert, in der ein Mitglied an einem NNR-Ca erkrankt war (97). Des Weiteren konnte sie in der Keimbahn und im Tumorgewebe von NNR-Ca Patienten nachgewiesen werden (97, 119).



**Abbildung 5 | Sequenz der *TP53* Keimbahnmutationen von *Patient 1, 2, 3* und *4***

(A) *TP53* Wildtyp (wt) Vergleichssequenz eines Nebennierenrindenzinoms Patienten ohne Mutation.

(B) Sequenz der Keimbahnmutation des jeweiligen Patienten.

Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Nucleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: A Alanin, C Cystein, E Glutaminsäure, F Phenylalanin, H Histidin, I Isoleucin, L Leucin, M Methionin, Q Glutamin, R Arginin, T Threonin, V Valin.

Die Mutation die bei *Patient 2* auftrat wurde heterozygot in Exon 5, das ebenfalls den Bereich der DNS-Bindungsdomäne kodiert, gefunden (Abb. 5). Ein Austausch von Cytosin zu Thymin an der ersten Position von Codon 158 hat einen AS Wechsel von

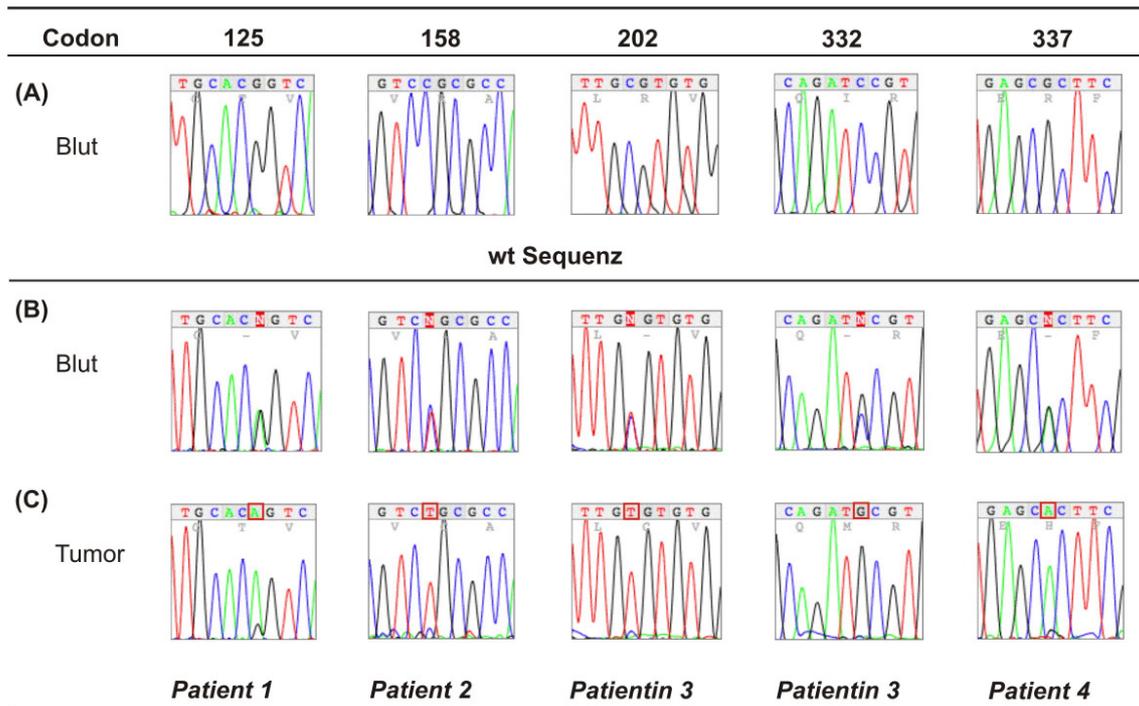
Arginin zu Cystein zur Folge. Es wurde gezeigt, dass dieser Wechsel eine Änderung der Funktion und Temperatursensitivität von *p53* in Hefezellen bewirkt (120-123).

In der Analyse der Keimbahn Daten von *Patientin 3* fanden sich zwei heterozygote Mutationen (Abb. 5). Die erste im Bereich der DNS-Bindungsdomäne in Codon 202 mit einem Austausch von Cytosin zu Thymin an der ersten Position. Dies führt zu einer AS Substitution von Cystein für Arginin. Eine weitere Mutation fand sich in Codon 332 im Bereich der Tetramerisierungsdomäne in Exon 10. Der Nukleotid Tausch von Cytosin zu Guanin führt zu einer AS Konversion von Isoleucin zu Methionin. Bis jetzt wurden diese Mutationen nicht im NNR-Ca beschrieben und es wurden keine Analysen zur Auswirkung der Mutationen auf die Funktion von *p53* durchgeführt.

Bei *Patient 4* wurde die in Brasilien gehäuft auftretende R337H Mutation in Exon 10 heterozygot gefunden (Abb. 3). Der Austausch von Guanin zu Adenin an der zweiten Position von Codon 337 führt zu einem AS Wechsel von Arginin zu Histidin. Funktionsanalysen dieser Mutation ergaben ein intakt funktionierendes *p53* bei physiologischem pH (102). Ändert sich der pH in Richtung alkalisch kann eine Salzbrücke, die zur korrekten Faltung des Proteins und damit zum Erhalt seiner Funktion nötig ist, nicht mehr ausgebildet werden (102).

b) Somatisch

Die Analyse der somatischen Veränderungen in *TP53* wurde auf die Exons der Patienten beschränkt, die eine Keimbahnmutation aufwiesen. Die Auswertung der Ergebnisse aus der Sequenzierung (Kap. 4.3.5) konnte die somatische Mutation homozygot bei allen Patienten bestätigen (Abb. 6).



**Abbildung 6 | Sequenz der *TP53* Mutationen Patient 1, 2, 3 und 4**

(A) *TP53* Wildtyp (wt) Vergleichssequenz von NNR-Ca Patienten ohne Mutation.

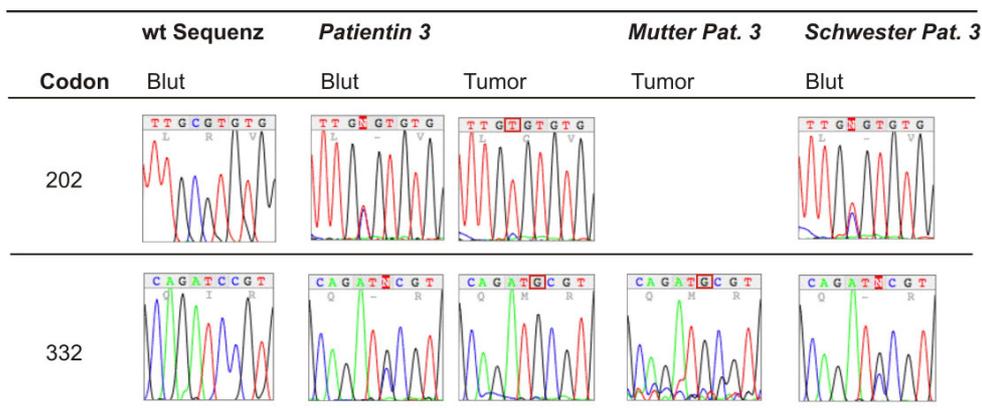
(B) Sequenz mit der Keimbahnmutation des jeweiligen Patienten in rot markiert.

(C) Sequenz mit der somatischen Mutation des jeweiligen Patienten, durch rote Umrahmung markiert.

Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Nucleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: A Alanin, C Cystein, E Glutaminsäure, F Phenylalanin, H Histidin, I Isoleucin, L Leucin, M Methionin, Q Glutamin, R Arginin, T Threonin, V Valin.

c) Familiär

Die Familienanamnese der Patienten mit Keimbahnmutation ergab bei *Patientin 3*, dass Mutter und Onkel ebenfalls an einem Nebennierentumor erkrankt und verstorben waren. Zur Analyse des familiären Mutationsstatus wurde DNS aus einem sehr kleinen Stück Metastasengewebe der, an einem NNR-CA verstorbenen, *Mutter von Patientin 3* extrahiert. Die anschließend durchgeführte PCR erbrachte nur geringe Mengen zur Sequenzierung verwendbaren Materials. Dies wurde zum einen auf das Alter des verwendeten Gewebes zurückgeführt, das bei Extraktion der DNS ca. 20 Jahre zuvor asserviert worden war. Zum anderen führt die veraltete Einbettungsmethode von Gewebe mit wesentlich längeren Fixierungszeiten in Formalin zu einer Zerstörung der DNS Integrität. Daher wurde bei der Analyse der Exons der Fokus auf die bei *Patientin 3* erstmals beschriebene Mutation in Exon 10 (Kap. 5.1.1a) gelegt. Diese Mutation in Codon 332 wurde homozygot bei der *Mutter von Patientin 3* gefunden (Abb. 7).



**Abbildung 7 | Familiäre TP53 Mutationen**

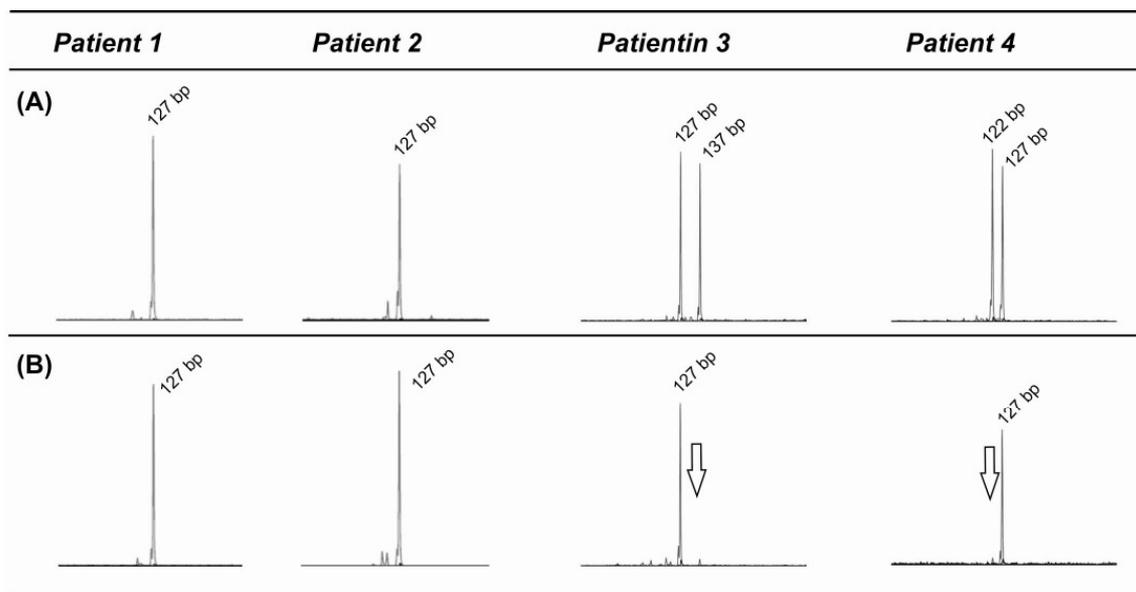
Vergleich der Wildtyp (wt) Sequenz mit den Sequenzen von Patientin 3 und Familienmitgliedern. Keimbahnmutationen rot markiert. Somatische Mutation durch rote Umrahmung markiert. Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Nukleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: C Cystein, I Isoleucin, L Leucin, M Methionin, Q Glutamin, R Arginin, V Valin.

Zur Detektion von *TP53* Keimbahnmutationen in der Familie von *Patientin 3* wurde DNS aus dem Blut der *Schwester von Patientin 3* extrahiert. Durch Sequenzierung und Analyse der Exons 6 und 10, konnten die bei *Patientin 3* bereits beschriebenen Mutationen heterozygot bei der Schwester ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 7).

### 5.1.2 Loss of Heterozygosity Analyse

Um einen möglichen Allelverlust im Tumorgewebe mit somatischer Expression des kranken Allels nachzuweisen, wurde zunächst ein Bereich im *TP53* bestimmt, der in seiner Länge variabel und damit zur Unterscheidung der Allele geeignet ist.

Der in *TP53* Intron 1 liegende Abschnitt VNTR1 ist 112-137 bp lang (110). Eine PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern wurde mit genomischer und somatischer DNS von *Patient 1-4* durchgeführt



**Abbildung 8 | LOH Nachweis: VNTR 1 Region *TP53***

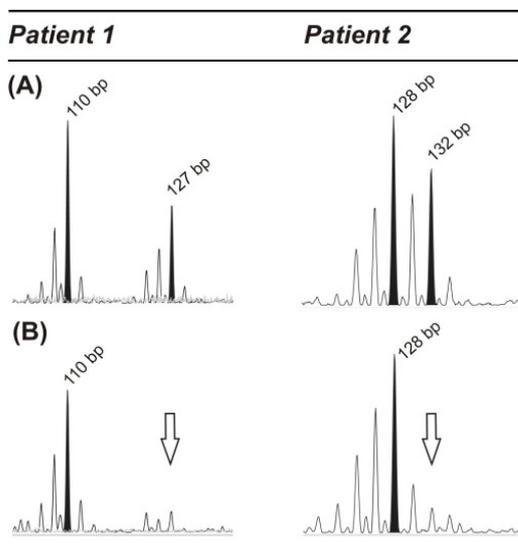
(A) Darstellung der Länge der VNTR1 Mikrosatelliten Region in der Keimbahn von *Patient 1-4*.  
(B) Länge der VNTR1 Region im Tumorgewebe der Patienten. Die Pfeile weisen auf den Verlust einer VNTR Region und damit auf einen Allelverlust hin. bp Basenpaar.

Die anschließende Auswertung ergab keinen Längenunterschied der VNTR1 Region auf den beiden Keimbahnallelen bei *Patient 1* und *Patient 2* (Abb. 8). Durch Überlagerung zweier 127 bp langer VNTR1 Regionen kommt es zur Darstellung nur eines Peaks in der Keimbahn (Abb. 8A). Somit konnte bei diesen Patienten in der VNTR1 Region keine Beurteilung eines Allelverlusts im Tumorgewebe vorgenommen werden.

Bei *Patientin 3* zeigte die Analyse zwei unterschiedlich lange VNTR1 Regionen in der Keimbahn. Der Verlust eines Peaks mit verbleibendem Peak der 127 bp langen VNTR1 Region weist auf den Verlust des Allels mit der 137 bp langen VNTR1 Region im Tumor hin (Abb. 8).

Die Darstellung der zwei unterschiedlich langen VNTR1 Regionen in der Keimbahn und das Fehlen der 122 bp langen VNTR1 Region im Tumor (Abb. 8B) zeigen einen Allelverlust im somatischen Gewebe bei *Patient 4*.

Da der VNTR1 Nachweis bei *Patient 1* und *Patient 2* nicht aussagekräftig war, wurde ein weiterer bereits beschriebener hochpolymorpher Bereich für den Nachweis eines Allelverlusts herangezogen. VNTR4 ist eine Region die kurz nach dem vierten Exon von *TP53* in Intron 4 liegt und im Bereich von 103-135 bp variabel lang ist (111). Die Analyse (Kap. 4.3.8) des Amplifikats zeigte bei *Patient 1* und *Patient 2* unterschiedlich lange VNTR4 Regionen auf den Allelen im Blut (Abb. 9A).



**Abbildung 9 | LOH Nachweis: VNTR4 Region *TP53***

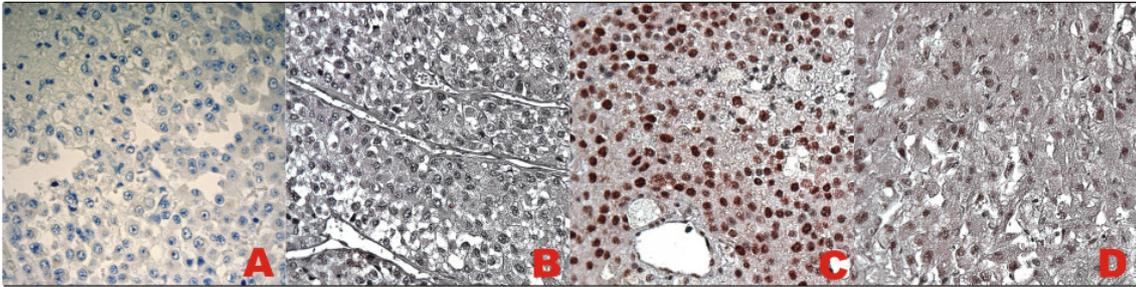
(A) Länge der VNTR4 Region in der Keimbahn von *Patient 1* und *2*.

(B) Länge der VNTR4 Region im Tumorgewebe von *Patient 1* und *2*. Die Pfeile weisen auf den Verlust einer VNTR Region und damit auf einen Allelverlust hin. bp Basenpaar.

Der Wegfall der 127 bp langen VNTR4 Region im Tumorgewebe bei *Patient 1* (Abb. 9B), ist mit dem Verlust eines Allels gleichzusetzen. Auch bei *Patient 2* findet sich der Verlust eines Allels, bei dem die Einbuße der 132 bp langen VNTR4 Region im Tumorgewebe zum Verbleib des Allels mit der 128 bp langen VNTR4 Region führt. Somit war bei allen 4 untersuchten Patienten ein LOH mit Verlust des gesunden Allels nachzuweisen.

### 5.1.3 *p53* Immunhistologie

Um die Expression von *p53* im Tumorgewebe darzustellen wurde die immunhistochemische Färbung von *p53* im NNR-Ca Gewebe der Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation durchgeführt.

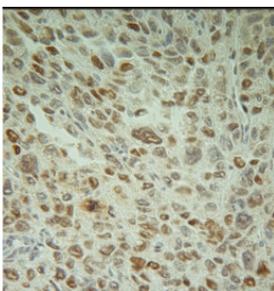


**Abbildung 10 | *p53* Immunhistologie von Patient 1-4**

Immunhistochemische Färbung von *p53* in Nebennierenrindenkarzinomgewebe von Patient 1-4, Vergrößerung 400x. (A) Patient 1: negativ (mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Saeger, Hamburg) (B) Patient 2: negativ (C) Patientin 3: stark positiv (D) Patient 4: positiv

Bei Patient 1 konnte keine erhöhte Expression von *p53* im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 10A). Auch bei Patient 2 (Abb. 10B) zeigte das Gewebe keine positive Färbung des Tumorsuppressorproteins. Im Gegensatz dazu war die immunhistochemische Färbung des NNR-Ca Gewebe von Patientin 3 mit hoher nukleärer Akkumulation von *p53* stark positiv (Abb. 10C). Die Färbung des Gewebes einer Metastase eines NNR-Ca der Mutter von Patientin 3 zeigte ebenfalls eine positive *p53* Färbung (Abb. 11).

Des Weiteren wurde eine positive Färbung von *p53* im Tumorgewebe von Patient 4 gefunden (Abb. 10D).



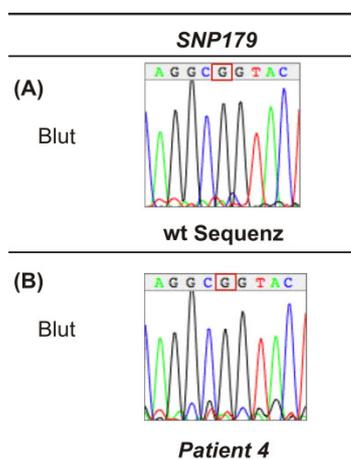
**Abbildung 11 | *p53* Immunhistologie der Mutter von Patientin 3**

Immunhistochemische Färbung von *p53* in Metastasengewebe des Nebennierenrindenkarzinoms der Mutter von Patientin 3, Vergrößerung 400x mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Saeger, Hamburg). *p53* Färbung: positiv.

#### 5.1.4 Haplotypanalyse

Garritano et al. wiesen 2010 einen Gründereffekt bei der Verbreitung der R337H Keimbahnmutation im *TP53* bei an einem Nebenniereneindentumor erkrankten Kindern und deren Familien im Süden Brasiliens nach (103). Weitere Analysen ergaben eine Verbindung des brasilianischen R337H Kollektivs mit einer portugiesischen R337H Familie, in der ein Kind ebenfalls an einem Nebennierenrindentumor erkrankt war (103). Die brasilianischen R337H Träger wiesen, ebenso wie die portugiesische R337H Familie, den gleichen Genotyp im SNP179 auf. Da *Patient 4* ebenfalls als Träger der *R337H* Mutation in der Keimbahn identifiziert wurde, erfolgte zur Dokumentation der möglichen Verwandtschaft mit dem portugiesisch-brasilianischen Kollektiv die Analyse des SNP179 Genotyps.

Bei *Patient 4* wurde an der Stelle des SNP179 Guanin, welches in der Mehrheit der kaukasischen Bevölkerung gefunden wird, homozygot im Blut nachgewiesen (Abb. 12). Der Verwandtschaftsnachweis im brasilianisch-portugiesischen Kollektiv beruht jedoch auf dem Vorhandensein von Thymin in SNP179 auf dem Trägerallel der R337H Mutation.



**Abbildung 12 | Haplotypanalyse SNP179 *TP53***

Sequenz der Haplotypanalyse des SNP179

(rs ID # rs9894946).

(A) Sequenz mit dem im kaukasischen Kollektiv vorherrschenden SNP179 Allel G/G (CGFID\_5167; SNP500CANCER)

(B) Sequenz mit dem SNP179 Allel von *Patient 4*

### 5.1.5 Polymorphismen

Zur Untersuchung der Polymorphismen bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca wurde, zusätzlich zu den unter 5.1.1a dargestellten Daten der Sequenzierung des *TP53* bei 103 Patienten, eine Gruppe von 37 weiteren Patienten aus dem deutschen Nebennierenkarzinom Register rekrutiert. Bei einigen Patienten konnten nicht alle untersuchten Bereiche sequenziert werden. Dies führte bei der Analyse der *TP53* Polymorphismen zu einer unterschiedlichen Zahl evaluierbarer Abschnitte.

Insgesamt wurden bei 142 NNR-Ca Patienten (Tab. 16) 11 Polymorphismen im *TP53* untersucht.

Davon waren 7 in den 10 kodierenden Exons und 4 in den dazwischen liegenden Introns lokalisiert. Die Benennung der in einem Exon gelegenen Polymorphismen erfolgte anhand des Codons und der kodierten AS (Tab. 17). Die Benennung der in einem Intron gelegenen Polymorphismen erfolgte anhand der Lokalisation (z.B. Polymorphismus c.74+38C>G liegt in Intron 2, Benennung *Intron 2*) (Tab. 17).

**Tabelle 16 | NNR-Ca Patientenkollektiv der *TP53* Polymorphismusanalyse**

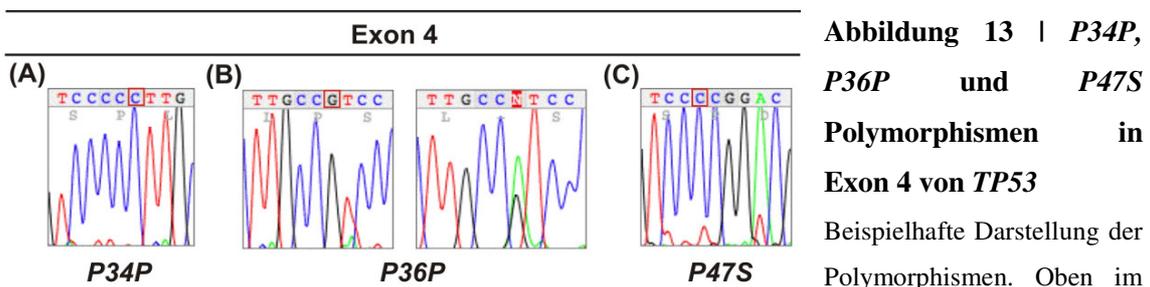
ED Erstdiagnose. N nein. J ja. nb nicht bekannt.

	<b>Männer (n=52)</b>	<b>Frauen (n=90)</b>
<b>Alter bei ED (Jahre)</b>	48 (18-77)	49 (18-79)
Median (Intervall)		
<b>Überleben nach ED (Jahre)</b>	3,3 (0,1-27,2)	2,5 (0,1-28,2)
Median (Intervall)		
<b>ENSAT Stadium bei ED</b>	I=5,8% II=38,5% III=25% IV=30,8%	I=4,4% II=33% III=25,6% IV=28,9% nb 4,4%
<b>Tumorgroße (cm)</b>	12 (3,3-30)	10,0 (3-20)
Median (Intervall)		
<b>Hormonaktivität</b>	J 40,4% N 40,4% nb 19,2%	J 64,4% N 21,1% nb 14,4%

**Tabelle 17 | TP53 Polymorphismen**

Bezeichnung	Exon/ Intron	Codon	Nukleinsäuren Wechsel	Aminosäuren Wechsel	Kodierung	SNP links#
<i>Intron 2</i>	Intron 2	-	-	-	c.74+38C>G	1642785
<i>Intron 3</i>	Intron 3	-	-	-	c.96+41_96 +56ins16	17878362
<i>P34P</i>	Exon 4	34	CCC>CCA	Pro>Pro	c.102C>A	11575998
<i>P36P</i>	Exon 4	36	CCG>CCA	Pro>Pro	c.108G>A	1800370
<i>P47S</i>	Exon 4	47	CCG>TCG	Pro>Ser	c.139C>T	1800371
<i>R72P</i>	Exon 4	72	CGC>CCC	Arg>Pro	c.215C>G	1042522
<i>R213R</i>	Exon 6	213	CGA>CGG	Arg>Arg	c.639A>G	1800372
<i>V217M</i>	Exon 6	217	GTG>ATG	Val>Met	c.649G>A	35163653
<i>Intron 6</i>	Intron 6	-	-	-	c.672+62G>A	1625895
<i>Intron 9</i>	Intron 9	-	-	-	c.993+12T>C	1800899
<i>G360A</i>	Exon 10	360	GGG>CGG	Gly>Ala	c.1079G>	35993958

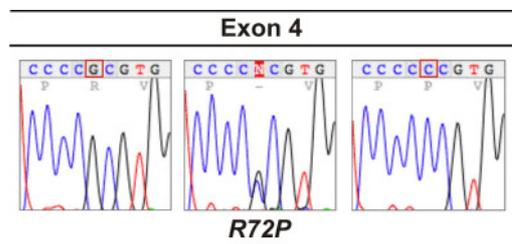
Die zwei zuerst untersuchten Polymorphismen in Exon 4, die keinen AS Tausch herbeiführen und daher als stille Polymorphismen bezeichnet werden, liegen im für die Transaktivierungsdomäne kodierenden Bereich. Für *P34P* (Tab. 17), der für Prolin kodiert, wurde in keiner der 131 auswertbaren Sequenzen der NNR-Ca Patienten Adenin an der dritten Stelle von Codon 34 gefunden (Abb. 13A).



Beispielhafte Darstellung der Polymorphismen. Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Polymorphismuslokalisierung durch rote Umrahmung markiert. (A) Sequenz Codon 33, 34 und 35. (B) Sequenz Codon 35, 36 und 37. Linkes Bild: Codon 36 Polymorphismus homozygot CCG. Rechtes Bild: Codon 36 Polymorphismus heterozygot CCG/CCA. (C) Sequenz Codon 46, 47 und 48. Nukleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: D Asparaginsäure, L Leucin, P Prolin, S Serin.

In Codon 36, welches ebenfalls für Prolin kodiert, wurde der *P36P* (Tab. 17) Polymorphismus in 4 von 131 Fällen heterozygot gefunden (Abb. 13B). Der ebenfalls in Exon 4 lokalisierte *P47S* Polymorphismus (Tab. 17) hatte, bei allen 131 evaluierbaren Patienten, an der ersten Stelle von Codon 47 die Nukleinsäure Cytosin und kodierte somit für die AS Prolin (Abb. 13C).

Der bisher einzige im NNR-Ca untersuchte Polymorphismus ist in Codon 72 in Exon 4 lokalisiert (Kap. 2.2.2d und 2.3.2). *R72P* (Tab. 17) konnte bei 130 Patienten ausgewertet werden. Davon waren 89 homozygot für Arginin, 34 Träger eines Arginin und eines Prolin kodierenden Allels und 7 homozygot für Prolin (Abb. 14).

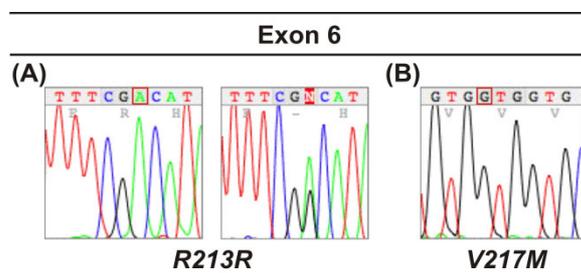


**Abbildung 14 | *R72P* Polymorphismus in Exon 4 von *TP53***

Beispielhafte Darstellung des Polymorphismus. Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Polymorphismuslokalisierung durch rote Umrahmung

markiert. Sequenz Codon 71, 72 und 73. Linkes Bild: Codon 72 homozygot CGC. Mittleres Bild: Codon 72 heterozygot CGC/CCC. Rechtes Bild: Codon 72 homozygot CCC. Nukleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: P Prolin, R Arginin, V Valin

Von den zwei in Exon 6 untersuchten Polymorphismen gehört *R213R* (Tab. 17) zu den stillen Polymorphismen. Bei einem der 133 Patienten wurde *R213R* heterozygot gefunden, alle anderen wiesen Adenin homozygot an der dritten Stelle von Codon 213 auf (Abb. 15A).



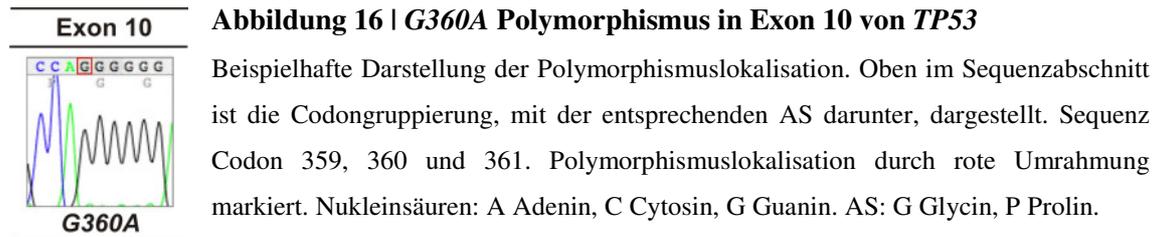
**Abbildung 15 | *R213R* und *V217M* Polymorphismen in Exon 6 von *TP53***

Beispielhafte Darstellung der Polymorphismen. Oben im Sequenzabschnitt ist die Codongruppierung, mit der entsprechenden AS darunter, dargestellt. Polymorphismuslokalisierung durch rote Umrahmung

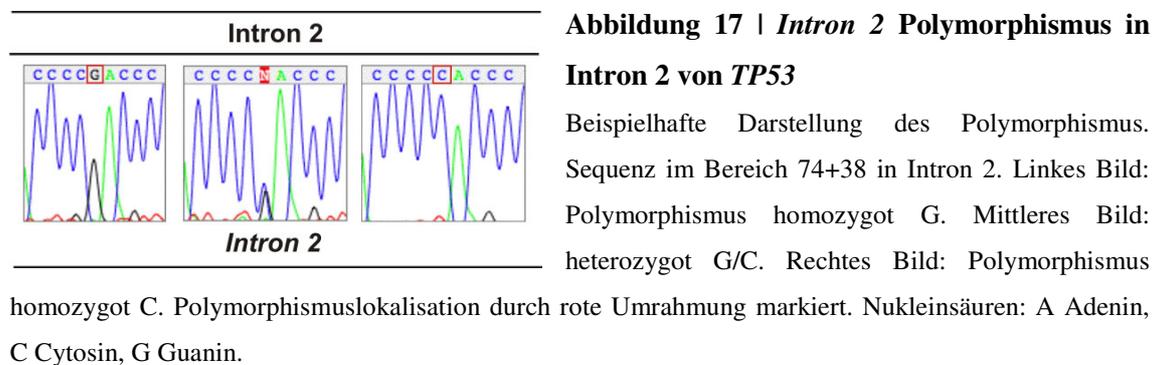
markiert. (A) Sequenz Codon 212, 213 und 214. Linkes Bild: Codon 213 Polymorphismus homozygot CGA. Rechtes Bild: Codon 213 Polymorphismus heterozygot CGA/CGG. (B) Sequenz Codon 216, 217 und 218. Nukleinsäuren: A Adenin, T Thymin, C Cytosin, G Guanin. AS: F Phenylalanin, H Histidin, R Arginin.

Der andere in Exon 6 lokalisierte Polymorphismus *V217M* (Tab. 17) wurde bei 133 Patienten untersucht, wobei sich in keinem Fall die Sequenz ATG, die für Methionin kodiert, fand (Abb. 15B).

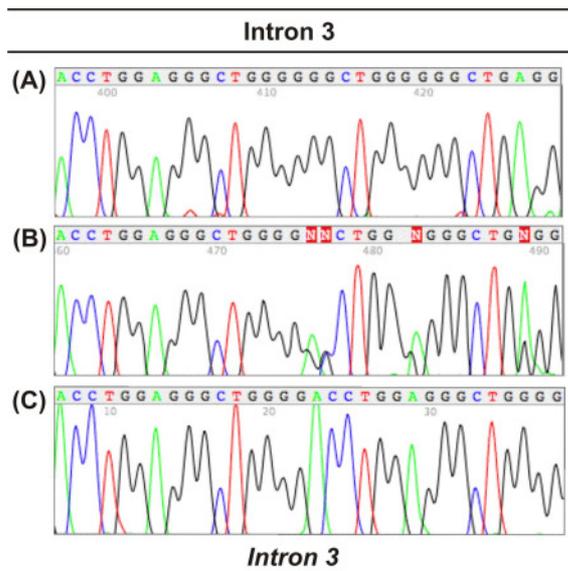
Der vierte nicht synonyme und validierte Polymorphismus (Tab. 7) befindet sich in Exon 10. *G360A* (Tab. 6) kodierte bei allen 137 evaluierbaren Patienten für Glycin (Abb. 16).



Darüber hinaus wurden vier in einem Intron gelegene Polymorphismen untersucht. Der in Intron 2 an Position 74+38 gelegene *Intron 2* Polymorphismus (Tab. 17) konnte bei 111 Patienten ausgewertet werden. Dabei zeigten 75 Patienten Guanin homozygot, 28 Patienten Guanin/Cytosin heterozygot und 8 Patienten Cytosin homozygot (Abb. 17).



Der einzige in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus der nicht zu den SNPs gehört, ist der *Intron 3* (Tab. 17) Polymorphismus. Er besteht aus einer 16 Basenbaar langen Insertion (96+41\_96+56ins16) an Stelle 96+41 in Intron 3 von *TP53*. Von 133 Patienten hatten 111 keine Insertion an der Position 96+41 und 16 eine Insertion (96+56ins16) auf nur einem Allel (Abb. 18). Die Insertion wurde bei 6 Patienten auf beiden Allelen gefunden (Abb. 18).



**Abbildung 18 | Intron 3 Polymorphismus in Intron 3 von TP53**

Beispielhafte Darstellung des Polymorphismus. Sequenz im Bereich 96+41 in Intron 3.

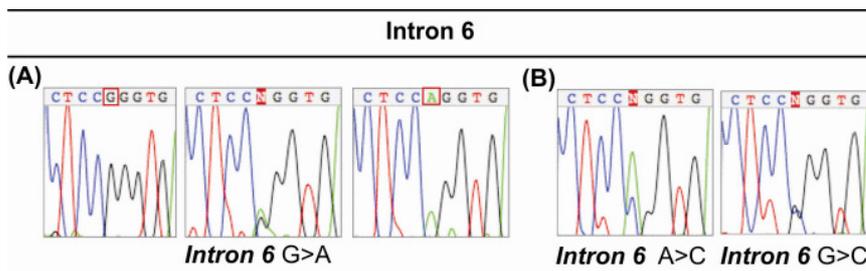
(A) keine Insertion homozygot.

(B) ein Allel mit Insertion, ein Allel ohne Insertion.

(C) Insertion homozygot.

Nukleinsäuren: A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin.

In Intron 6 ist ein Polymorphismus beschrieben, der an Stelle 672+62 einen Wechsel von Guanin zu Adenin als Ursache hat.



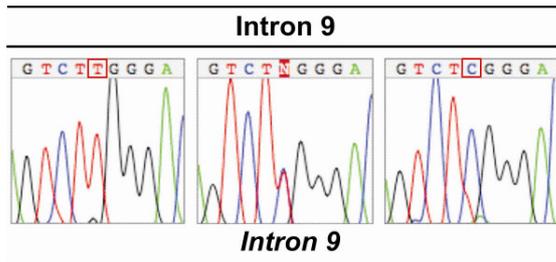
**Abbildung 19 | Intron 6 Polymorphismus in Intron 6 von TP53**

Beispielhafte Darstellung der Polymorphismen. (A) Sequenz im Bereich 672+62 in Intron 6. Linkes Bild: Polymorphismus homozygot G. Mittleres Bild: heterozygot G/A. Rechtes Bild: Polymorphismus homozygot A. (B) Linkes Bild: Polymorphismus heterozygot A/C. Rechtes Bild: heterozygot G/C. Polymorphismuslokalisierung durch rote Umrahmung markiert. Nukleinsäuren: A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin.

Von 121 evaluierbaren Patienten wurde bei 100 Patienten im *Intron 6* (Tab. 6) Polymorphismus Guanin homozygot gefunden (Abb.19A). Heterozygot waren 13 Patienten und homozygot für Adenin waren 6 Patienten (Abb. 19A).

Darüber hinaus wurde bei einem Patienten an der Stelle des *Intron 6* Polymorphismus ein Allel Guanin und ein Allel Cytosin und bei einem weiteren Patienten ein Allel Adenin und ein Allel Cytosin gefunden (Abb. 19B).

Der Nukleinsäuretausch von Thymin zu Cytosin an Stelle 993+12 in Intron 9 ist der letzte in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus. Der *Intron 9* (Tab. 6) Polymorphismus wurde bei 137 Patienten untersucht. Dabei waren 132 Patienten homozygot für Thymin, 4 heterozygot und 1 homozygot für Cytosin (Abb. 20).



**Abbildung 20 | *Intron 9* Polymorphismus in *Intron 9* von *TP53***

Beispielhafte Darstellung des Polymorphismus. Sequenz im Bereich 993+12 von Intron 9. Linkes Bild: Polymorphismus homozygot T. Mittleres Bild: heterozygot T/C. Rechtes Bild:

Polymorphismus homozygot C. Polymorphismuslokalisierung durch rote Umrahmung markiert. Nukleinsäuren: A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin.

## 5.2 Klinische Daten und statistische Auswertung

In den folgenden Kapiteln wird zuerst auf die klinische und statistische Auswertung der *TP53* Mutationsanalyse bei NNR-Ca Patienten eingegangen (Kap. 5.2.1). Darauf folgt die Beschreibung der Klinik und die statistische Auswertung der Daten der *TP53* Polymorphismusanalyse (Kap. 5.2.2).

### 5.2.1 *TP53* Mutationsanalyse

Zunächst erfolgt die Darstellung der Klinik von Patienten mit *TP53* Mutation (Kap. 5.2.1a) und Familienmitgliedern von *Patientin 3* mit *TP53* Mutation (Kap. 5.2.1b). Daran schließt sich die statistische Auswertung der klinischen Daten der Patienten ohne *TP53* Mutation an (Kap. 5.2.1c) und schließlich folgt die statistische Auswertung der *TP53* Mutationsanalyse der NNR-Ca Patienten (Kap. 5.2.1d).

#### a) Kasuistiken der Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation

Bei *Patient 1* wurde im Alter von 21 Jahren ein NNR-Ca diagnostiziert (Tab. 18). Abdominelle Beschwerden, der Verlust von 25 kg Körpergewicht innerhalb eines halben Jahres und ein tastbarer Tumor auf der linken Seite führten zu stationärer Aufnahme.

Da vor der operativen Entfernung des Tumors kein Hormonstatus veranlasst wurde, konnte eine Hormonproduktion des NNR-Ca nur retrospektiv beurteilt werden, wobei weder die klinischen Aspekte noch der postoperative Hormonstatus auf ein Hormonungleichgewicht hinwiesen. Der Patient hatte keine Zweitmalignome in der Vorgeschichte. Eine Familienanamnese konnte nicht erhoben werden, da der Patient adoptiert worden war.

Nach Entfernung (R0; Tab. 19) eines 15 cm großen NNR-Ca, wurde eine adjuvante Therapie mit Mitotane begonnen. Die Diagnose von Metastasen im Hüftknochen 6 Monate nach Adrektomie, die retrospektiv schon bei Erstdiagnose vorhanden waren, führte zu einer Einstufung ins ENSAT Stadium IV (Kap. 2.1). Weitere 7 Monate später wurde eine Metastase im linken Femur durch Radiotherapie versorgt. Zu diesem Zeitpunkt wurde Mitotane abgesetzt, der Patient in die First International Randomized

trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment (FIRM-ACT) Studie ([www.firm-act.org](http://www.firm-act.org); [www.clinicaltrials.com](http://www.clinicaltrials.com) identifier: NCT00094497) eingeschlossen und die Therapie mit Streptozotocin eingeleitet. Für 5 Monate konnte so eine Stabilisierung der Krankheit erreicht werden. Wegen neu aufgetretener Knochenmetastasen wurde innerhalb der FIRM-ACT Studie ein Cross over zu Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin veranlasst, unter denen die Krankheit stabil schien. Hirnmetastasen mit konsekutivem Hirnödem führten 26 Monate nach Erstdiagnose zum Tod des Patienten.

**Tabelle 18 | Klinische Daten von NNR-Ca Patienten mit TP53 Mutation**

‚ED‘ und ‚Überleben nach ED‘ in Jahren. ED Erstdiagnose. m männlich. w weiblich. (p) paternal. (m) maternal. n.u. nicht untersucht. n.i. nicht informativ. NNR Nebennierenrinde. Ca Karzinom. † verstorben.

Patient	Ge- schlecht	ED	Über- leben nach ED	Weiss Score	ENSAT bei ED	Tumor- größe (cm)	Hormon- aktivität	Zweit- malignom	Familien- anamnese
1	m	21†	2,1	6	IV	15	n.u.	keine	n.i.
2	m	39†	2,6	5	III	12	Kortisol	Terato-Ca des Hodens	Onkel (p): Leukämie (73†) Großvater: (m) Leukämie (<70†) (p) Lungen-Ca (>70†)
3	w	30†	1,7	8	IV	14,5	Kortisol, Androgen, Aldosteron	keine	Mutter: NNR-Ca (<40†) Großvater (m): Magen-Ca (†) Onkel (m): NNR-Ca (†)
4	m	71	10	6	II	12	Kortisol, Östrogen, Androgen	Sigma-Ca Prostata-Ca	Vater: Prostata-Ca (62†) Tochter: Mamma- Ca (37†)

*Patient 2* zeigte mit 39 Jahren Zeichen von Hyperkortisolismus die zur Diagnose eines NNR-Cas führten. Aus der Vorgeschichte des Patienten war ein geheiltes Teratokarzinom des Hodens, die Erstdiagnose erfolgte als der Patient 20 Jahre alt war, bekannt. Beide Großväter des Patienten waren in höherem Alter an einem Malignom

erkrankt und verstorben (Tab. 18). Ein Onkel väterlicherseits verstarb im Alter von 73 an Leukämie.

Nach der Adrenaektomie links mit der Entfernung eines 12 cm großen Tumors (R0; Tab. 19) folgte eine Bestrahlung des Tumorbetts mit 50 Gy. Das Krankheitsstadium wurde als ENSAT III eingestuft. Vier Monate nach Erstdiagnose wurde eine adjuvante Therapie mit Mitotane gestartet, die nach 21 Monaten abgesetzt wurde. Nach 12 Monaten tumorfreien Überlebens wurde eine neu aufgetretene Lebermetastase durch Radiotherapie behandelt. Weitere 4 Monate später folgte die Bestrahlung eines Lokalrezidivs. Zudem wurden 9 Monate später Lebermetastasen und 28 Monate nach Erstdiagnose eine einzelne intraabdominelle Lymphknotenmetastase operativ entfernt. Einen weiteren Monat später wurde der Patient in die FIRM-ACT Studie aufgenommen und eine zytotoxische Chemotherapie wurde begonnen. Er verstarb 32 Monate nach Erstdiagnose des NNR-Ca.

**Tabelle 19 | Histologische und klinische Daten von Patient 1, 2, 3 und 4**

ED Erstdiagnose. neg negativ. pos positiv. R0 Entfernung des Tumors im Gesunden. Mikroskopisch kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar. R1 Makroskopisch wurde der Tumor entfernt. Mikroskopisch sind kleine Tumoranteile im Resektionsrand nachweisbar. *p53* Färbung: Kap. 5.1.3. Ki67 : Proliferationsmarker (zeigt an, welche Zellen sich im Wachstum befinden).

Patient	Ki67	<i>p53</i>	Mikroskopisch	Metastasen bei ED	OP Resultat
1	10-20%	neg	keine Kapsel- oder Gefäßinvasion	Skelett (retrospektiv)	R0
2	20-30%	neg	Tumoreinbruch in Venen, Kapselüberschreitung	Lymphknotenmetastasen	R0
3	30%	pos	Tumorzapfen in V. cava, sonst keine Kapselüberschreitung	Tumorzapfen in V. cava, Lungenmetastase	R1
4	10%	pos	Tumoreinbruch in Venen, keine Kapselüberschreitung	nein	R0

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose war *Patientin 3* 30 Jahre alt (Tab. 18). Symptome eines Hyperkortisolismus mit Hypertension, Gewichtszunahme und Mondgesicht führten zur Aufnahme der Patientin, bei der ein Hormonexzess von Kortisol, Aldosteron und

Androgenen festgestellt wurde. Die Bildgebung von Abdomen und Brustraum zeigte einen Tumor der rechten Nebenniere und eine Verschattung der unteren rechten Lunge, mit dem Hinweis auf eine Metastase. In der Vorgeschichte waren keine Malignome aufgetreten. Es wurde eine Adrenalektomie mit der Entfernung eines Vena cava Zapfens und die zusätzliche Entfernung des unteren rechten Lungenlappens durchgeführt. Der Tumor war 14,5 cm groß und zeigte in der histopathologischen Untersuchung 30 % Ki67 positive Tumorzellen (Tab. 19). Zwei Monate nach der Operation (OP) wurde eine orale Therapie mit Mitotane begonnen, auf die nach 2 Monaten eine Radiotherapie des Tumorbetts (35 Gy) folgte. Bei Therapiebeginn mit Mitotane wurde ein benignes Hamartochondrom in der Lunge diagnostiziert. Sechs Monate nach Erstdiagnose wurden neu aufgetretene Lebermetastasen operativ entfernt, einen Monat später gefolgt von einer Entfernung eines Lokalrezidivs und Metastasen der rechten und linken Lunge. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Überweisung der Patientin in das Universitätsklinikum Würzburg und der Einschluss in die FIRM-ACT Studie. Mehrere Zyklen mit Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin, gefolgt von Streptozotocin und weiteren Zyklen mit Carboplatin und Gemcitabine wurden, wegen eines Fortschreitens der Krankheit, abgebrochen. Die Patientin starb 20 Monate nach Diagnose an weit fortgeschrittenem NNR-Ca.

Eine intensive Recherche zeigte eine positive Familienanamnese für maligne Neubildungen. Die Mutter der Patientin war ca. 20 Jahre zuvor an einem Nebennierentumor verstorben (Kap. 5.2.2). Der Halbbruder der Mutter von *Patientin 3* war zuvor an einem NNR-Ca verstorben. Des Weiteren war auf der maternalen Seite der Patientin der Großvater an einem Magenkarzinom verstorben.

Bei *Patient 4* wurde bei einer Ultraschall-Routineuntersuchung im Rahmen einer Darmkrebs Nachsorge im Alter von 71 Jahren ein Tumor der rechten Nebenniere festgestellt (Tab. 18). Er war mit 65 Jahren an Darmkrebs und im Alter von 74 außerdem an einem Prostatakarzinom erkrankt. Der Vater des Patienten verstarb mit 62 Jahren an einem Prostatakarzinom und die Tochter von *Patient 4* war im Alter von 37 Jahren an Brustkrebs verstorben.

Bei Diagnosestellung wurden erhöhte Cortisol- und Östrogenspiegel festgestellt. Der Patient hatte sich 2 Jahre vor Erstdiagnose des NNR-Ca einer Brustverkleinerung

unterzogen. Bei der operativen Entfernung des Tumors wurde ein 14 cm großes NNR-Ca in toto entfernt (R0; Tab. 19), wobei keine Metastasen gefunden wurden.

Der Adrenektomie folgte die Bestrahlung des Tumorbetts (51 Gy) und es wurde eine adjuvante Therapie mit Mitotane begonnen. Diese wurde nach 8 Monaten wegen Gewichtsverlust, Müdigkeit und Geschmackstörungen auf Wunsch des Patienten abgebrochen. Zwei Jahre nach Erstdiagnose wurde eine Lungenmetastase diagnostiziert, wobei der Patient jedwede Therapie verweigerte. Die folgende Überwachung der Metastase zeigte nur eine langsame Progression der Läsion. Bis heute sind keine anderen Metastasen oder ein Rezidiv des Tumors bekannt. Seit bei *Patient 4* vor 10 Jahren eine NNR-Ca diagnostiziert wurde, nimmt der Patient regelmäßig an Nachsorgeuntersuchungen teil. Er wird vom Tumor im täglichen Leben nicht beeinträchtigt.

b) Klinische Daten von Familienmitgliedern von *Patientin 3* mit *TP53* Mutation

Bei der *Mutter von Patientin 3* wurde im Alter von 32 Jahren ein Tumor der rechten Nebenniere diagnostiziert. Bei der folgenden Adrenektomie wurde ein 24 cm großer Tumor entfernt, wobei eine Ruptur der Tumormasse während der OP eine R0 Resektion verhinderte. Der Tumor wurde durch den Pathologen des behandelnden Klinikums histologisch als Phäochromozytom eingeordnet. Ein Jahr nach Erstdiagnose wurden neu aufgetretene Lebermetastasen reseziert. Sie verstarb mit 38 Jahren an den Folgen der Tumorerkrankung.

Im Blut der *Mutter von Patientin 3* wurde vor der operativen Entfernung des Tumors keine erhöhte Katecholaminsekretion festgestellt, jedoch wurden im Urin erhöhte 17-Ketosteroid Werte gefunden, welche retrospektiv auf ein NNR-Ca hinweisen. Gewebe zur erneuten Beurteilung des Tumors lag in Form einer Metastase des Tumors vor. Die durch den Referenzpathologen für NNR-Ca Prof. Dr. W. Saeger (Marienkrankenhaus, Hamburg) durchgeführte histologische Beurteilung, erbrachte die Einordnung des Gewebes als eindeutig zu einem NNR-Ca gehörig.

Die *Schwester von Patientin 3* ist im Alter von 30 Jahren gesund.

c) Klinische und statistische Daten der Patienten ohne *TP53* Mutation

Von den 103 NNR-Ca Patienten bei denen *TP53* auf Keimbahnebene untersucht wurde, wiesen 99 Patienten keine Mutation im *TP53* auf. Darunter befanden sich 61 weibliche und 38 männliche Patienten mit NNR-Ca.

Der jüngste Patient der 99 NNR-Ca Patienten ohne eine *TP53* Keimbahnmutation war bei Erstdiagnose 18, der Älteste 79 Jahre alt. Der Altersmittelwert lag bei  $50,6 \pm 13,72$  Jahren (Median 50,6 Jahre). Das mittlere Überleben der Patienten betrug  $57,7 \pm 67,79$  Monate (Median 35,4 Monate; Intervall 1,6-339,0 Monate).

Die mittlere Tumorgröße betrug  $10,9 \pm 4,5$  cm (Median 10,0 cm; Intervall 3-30 cm), wobei bei 3 Patienten keine Information zur Größe des Tumors vorlag. Der Tumor zeigte bei 53 (64,6 %) von 82 Patienten Hormonaktivität, wobei bei den restlichen 17 Patienten vor OP keine Hormondiagnostik durchgeführt worden war.

Die Einteilung der Patienten nach der ENSAT Klassifikation ergab, dass 6 Patienten in das Stadium ENSAT I eingeordnet werden konnten (6,1 %), gefolgt von 37 Patienten (37,4 %) in Stadium II, 28 Patienten (28,3 %) in Stadium III und 26 Patienten (26,3 %) in Stadium IV. Der Mittelwert lag bei  $2,8 \pm 0,9$ . Bei 2 Patienten (2 %) konnte aufgrund fehlender Daten keine Zuordnung zu einem ENSAT Stadium vorgenommen werden.

Bei 10 Patienten war in der Vorgeschichte ein Malignom bekannt (Tab. 20).

**Tabelle 20 | NNR-Ca Patienten mit Zweitmalignom**  
m männlich, w weiblich, Ca Karzinom

Geschlecht	Alter bei ED (in Jahren)	Überleben (in Monaten)	verstorben	Zweitmalignom
w	45,7	48,2	nein	Papilläres Schilddrüsen-Ca
w	46,0	339,0	nein	Mamma-Ca.
m	64,6	6,1	ja	Prostata-Ca.
m	67,8	138,9	nein	Basaliom, Neurofibrom
w	58,1	52,2	nein	duktales Mamma-Ca
w	65,3	57,2	ja	duktales Mamma-Ca
w	65,8	18,8	nein	Basaliom
m	34,4	153,7	ja	Papilläres Schilddrüsen-Ca
m	34,4	326,3	nein	Prostata-Ca
m	60,5	81,0	ja	Akut Myeloische Leukämie

Darunter befanden sich 2 Patienten mit Prostatakarzinom, 3 Patienten mit Mammakarzinom, 2 Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom, 2 Patienten mit Basaliom und 1 Patient mit Akuter Myeloischer Leukämie (Tab. 20).

Insgesamt konnten bei 41 Patienten Angaben zur Familienanamnese bezüglich maligner Neubildungen erhoben werden, wobei 20 Patienten keine Malignome in der Familienanamnese aufwiesen. Bei 21 Patienten wurden Angaben zu mindestens einem Verwandten mit einer malignen Neubildung dokumentiert (Tab. 21).

**Tabelle 21| Familienanamnese der NNR-Ca Patienten**

Ca Karzinom, ED Erstdiagnose, J Jahre, w weiblich, m männlich, †verstorben

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei ED</b>	<b>Überleben in Monaten</b>	<b>verstorben</b>	<b>Familienanamnese</b>
A	w	31,9	42,7	nein	Mutter: Mamma-Ca (ED mit 55 J, lebt tumorfrei) Bruder: Schilddrüsen-Ca (ED mit 35 J, lebt tumorfrei)
B	w	40,4	38,7	ja	Vater: Prostata-Ca Großeltern: Darm-Ca
C	w	45,2	117,7	nein	Vater: Lebertumor Zwillingsbruder der Mutter: Darm-Ca (75 J †) Großmutter: Rückenmarkskrebs (<70 J †)
D	w	45,4	57,3	nein	Mutter: Lungen-Ca (Raucherin; ED mit 56 J, 59 J †) Cousin väterl.: Mamma-Ca (ED mit 45 J, 47 J †)
E	w	48,8	63,0	nein	Vater: Kehlkopf-Ca
F	w	52,7	40,4	nein	Mutter: Sarkom Oberschenkel (ED mit 49 J), Mamma-Ca (ED mit 79 J), Basaliom (ED mit 89 J), lebt Vater: Nieren-Ca (ED mit 56 J, 76 J †) Großmutter mütterl.: Darm-Ca (ED mit 79 J, 89 J †)
G	w	55,3	38,5	nein	Schwester: 'Krebsleiden' (52 J †)

H	w	58,1	52,2	nein	Vater: Darm-Ca (ED mit 82 J, 82 J †) Bruder: Darm-Ca (ED mit 50 J, lebt) Nichte: Darm-Ca (ED mit 24 J, lebt)
I	w	58,9	12,7	ja	Mutter: Mamma-Ca Vater: Darm-Ca, Prostata-Ca
J	w	77,7	14,9	ja	Schwester: Lymphom
K	w	79,7	1,6	ja	Schwester: gynäkolog. Malignom (†)
L	m	17,8	9,4	nein	Großvater mütterl.: Nieren Tumor (65 J †) Onkel mütterl.: Prostata-Ca (60 J †); Urgroßmutter väterl.: Unterleibs- Ca, Magen-Ca Urgroßvater väterl.: Leukämie Schwester Großvater väterl.: Mamma Ca (65 J †)
M	m	40,0	53,3	nein	Vater: Prostata-Ca (ED mit 62 J, 63 † bei OP)
N	m	42,6	101,8	ja	Onkel: Magen-Ca
O	m	44,9	22,4	ja	Tante: Pankreas-Ca
P	m	50,6	42,6	nein	Vater: Hoden- und Magen-Ca Mutter: Darm-Ca, Uterus-Ca
Q	m	57,8	40,0	ja	Mutter: Leukämie
R	m	60,8	26,2	ja	Vater: Kehlkopf-Ca (77 J †) Mutter: Mamma-Ca (87 J †)
S	m	61,6	80,1	nein	Vater: Pankreas-Ca (ED mit 57 J, 57 J †)
T	m	66,4	42,5	ja	Vater: Lungen-Ca (59 J †) Bruder: Malignom (58 J †) Sohn: Hirntumor (35 J †)
U	m	77,3	49,6	ja	Bruder: Hirntumor (†)

Eine ausführliche Familienanamnese mit genauer Tumorentität, Grad der Verwandtschaft, Erkrankungs- und Sterbealter konnte bei 6 (Patient A, D, F, H, M, S) von 21 Patienten erhoben werden (Tab. 20). Von diesen Patienten konnte nur 1 Patient

dem LFL nach Birch (60) (Tab. 3) zugeordnet werden (Patient A, Tab. 21). Unvollständige Familienanamnesen waren bei 15 Patienten vorhanden (Tab. 21). Da hier Angaben zu genauer Tumorentität, Grad der Verwandtschaft, Erkrankungs- und Sterbealter fehlen, konnte keine Einordnung in eine Li-Fraumeni Klassifikation vorgenommen werden.

Bei 7 der 99 NNR-Ca Patienten ohne Mutation wurde keine Mitotane Therapie durchgeführt. Bei einem Patienten wurde die Therapie nur vor, bei 33 Patienten vor und nach Entfernung des Tumors gegeben. Nach operativer Entfernung des Tumors wurden 58 Patienten einer oralen Mitotane Therapie zugeführt und 10 erhielten strahlentherapeutische Maßnahmen. Bei 60 Patienten wurden eine oder mehrere Chemotherapien durchgeführt. Am Ende des Erhebungszeitraums (06/2010) waren 61 der 99 NNR-Ca Patienten ohne *TP53* Mutation verstorben.

#### d) Statistische Auswertung der *TP53* Mutationsanalyse

Von 103 NNR-Ca Patienten die in dieser Arbeit untersucht wurden, war es bei 4 Patienten (3,9 %) möglich, mindestens eine Mutation im *TP53* zu identifizieren.

Um die Beteiligung der Patienten mit Mutation am Kollektiv verschiedener Altersgruppen zu ermitteln, wurden spezifische Altersgrenzen, unter anderem die der Li-Fraumeni Klassifikationen (Tab. 3), verwendet.

**Tabelle 22 | Prozentuale Verteilung von NNR-Ca Patienten mit und ohne Mutation nach Erstdiagnosealter**

AG Altersgrenze. LFS Li-Fraumeni Syndrom (4). LFL-E Li-Fraumeni like Syndrom nach Eeles (63). Chompret (64).

Altersgrenze in Jahren	AG nach	jünger n (%)	davon mit Mutation < AG n (%)	älter n (%)	davon mit Mutation > AG n (%)
36	Chompret	16 (15,5)	2 (12,5)	87 (84,5)	2 (2,3)
40		23 (22,3)	3 (13,0)	80 (77,6)	1 (1,2)
45	LFS	40 (38,8)	3 (7,5)	63 (61,2)	1 (1,6)
50,6	Median	52 (50,5)	3 (5,8)	51 (49,5)	1 (2,0)
60	LFL-E	76 (73,8)	3 (3,9)	27 (26,2)	1 (3,7)

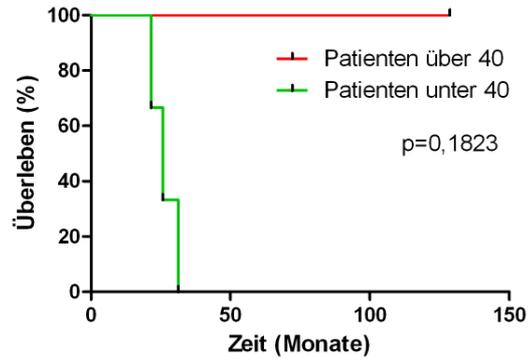
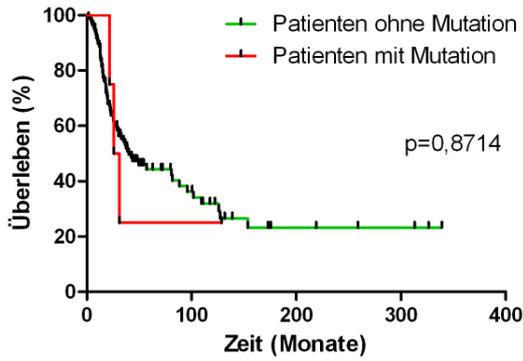
Die Gruppe, in der die Patienten bei Erstdiagnose jünger oder älter als 36 Jahre waren (Tab. 22), ist die einzige, bei der 2 Patienten unter der Altersgrenze und 2 Patienten darüber zu finden waren. In dieser Gruppe waren 12,5 % der Patienten unter 36 Jahre und 2,3 % der Patienten über 36 Jahre Träger einer *TP53* Keimbahnmutation. Dabei wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass *Patient 2* und *Patient 4*, die in die Gruppe der über 36 Jährigen fielen, 32 Jahre Altersunterschied bei Erstdiagnose aufwiesen.

Drei der NNR-Ca Patienten mit *TP53* Mutation (Kap. 5.2.1) waren bei Erstdiagnose des Tumors jünger als 40 Jahre, was einem Prozentsatz von 13,0 % entspricht. *Patient 4* war der einzige Patient (1,2 %) über 40 Jahre mit einer Mutation in *TP53*, er war bei Erstdiagnose 71 Jahre alt (Kap. 5.2.1).

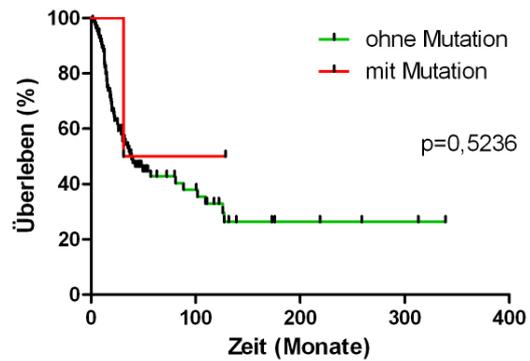
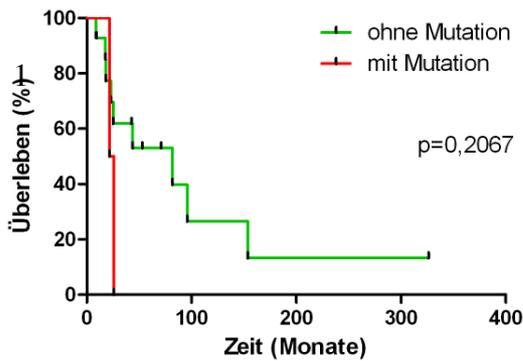
Die Einteilung der Patienten nach den Altersgrenzen 45, 46 und 60 Jahre ergab für die unter den Altersgrenzen liegenden Patienten abnehmende, für die über den Altersgrenzen liegenden Patienten zunehmende Werte der prozentualen Anteile (Tab. 22).

Die Analyse der Überlebenszeit aller Patienten mit *TP53* Mutation erbrachte im Vergleich mit der Gesamtkohorte der Patienten ohne *TP53* Mutation keinen statistisch relevanten Unterschied (Abb. 21A Linkes Bild). Eine Gegenüberstellung des Überlebens von Patienten mit Mutation unter 40 Jahren erbrachte ebenfalls keinen statistisch relevanten Unterschied (Abb. 21A Rechtes Bild). Anschließend wurde eine Analyse der Überlebenszeit der Patienten mit und ohne Mutation in den in Tab. 21 dargestellten Altersgruppen durchgeführt (Abb. 21B, C, D, E, F, G). Der altersabhängige Vergleich der Überlebenszeit erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 21B, C, D, E, F, G).

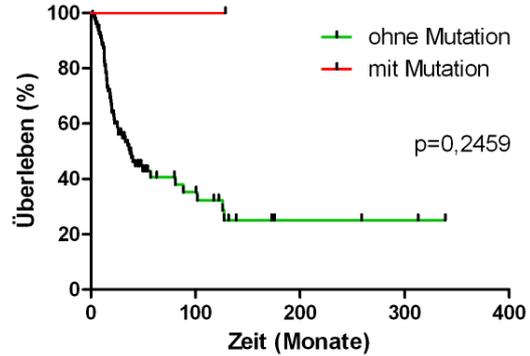
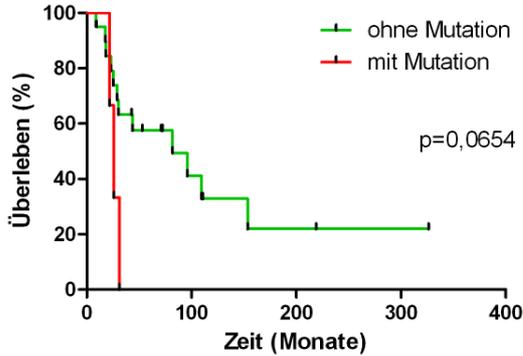
(A) Linkes Bild: Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Rechtes Bild: Patienten mit *TP53* Mutation (Altersgrenze 40 Jahre)



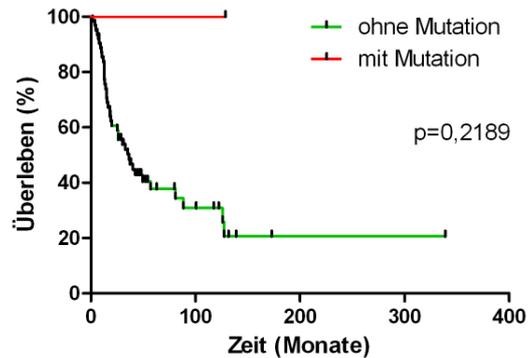
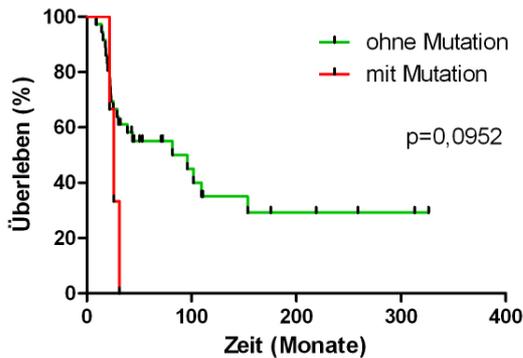
(B) Altersgrenze nach Chompret (36 Jahre)

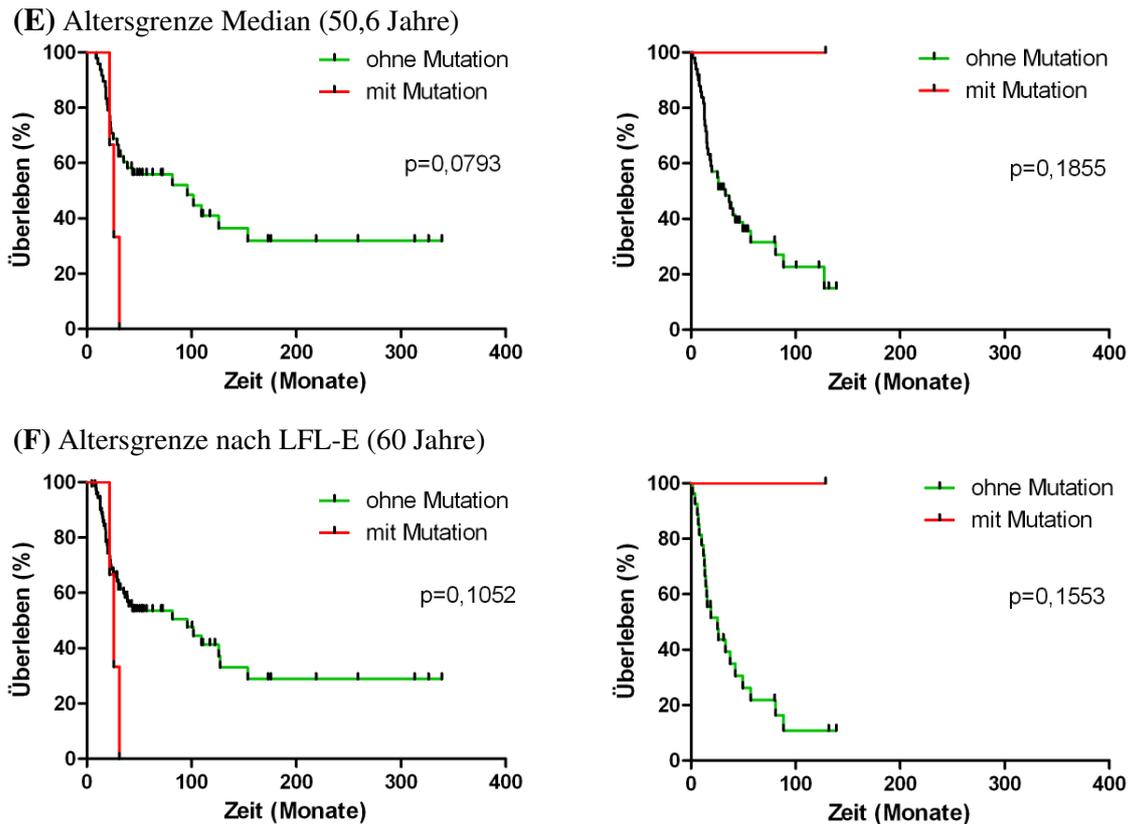


(C) Altersgrenze 40 Jahre



(D) Altersgrenze nach LFS (45 Jahre)





**Abbildung 21 | Überleben von NNR-Ca Patienten mit und ohne *TP53* Mutation**

- (A) Linkes Bild: Vergleich der Gesamtkohorte von Patienten mit ( $n=4$ ) versus Patienten ohne ( $n=99$ ) *TP53* Mutation. Rechtes Bild: Vergleich der Patienten mit *TP53* Mutation ( $n=4$ ; Altersgrenze 40 Jahre)
- (B) Vergleich der Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Altersgrenze nach Chompret (36 Jahre). Linkes Bild: Patienten <36 Jahre mit Mutation ( $n=2$ ), ohne Mutation ( $n=14$ ). Rechtes Bild: Patienten >36 Jahre mit Mutation ( $n=2$ ), ohne Mutation ( $n=85$ ).
- (C) Vergleich der Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Altersgrenze 40 Jahre. Linkes Bild: Patienten <40 Jahre mit Mutation ( $n=3$ ), ohne Mutation ( $n=20$ ). Rechtes Bild: Patienten >40 Jahre mit Mutation ( $n=1$ ), ohne Mutation ( $n=79$ ).
- (D) Vergleich der Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Altersgrenze nach LFS (45 Jahre). Linkes Bild: Patienten <45 Jahre mit Mutation ( $n=4$ ), ohne Mutation ( $n=37$ ). Rechtes Bild: Patienten >45 Jahre mit Mutation ( $n=1$ ), ohne Mutation ( $n=62$ ).
- (E) Vergleich der Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Altersgrenze Median (50,6 Jahre). Linkes Bild: Patienten <50,6 Jahre mit Mutation ( $n=3$ ), ohne Mutation ( $n=49$ ). Rechtes Bild: Patienten >50,6 Jahre mit Mutation ( $n=1$ ), ohne Mutation ( $n=50$ ).
- (F) Vergleich der Patienten mit versus Patienten ohne *TP53* Mutation. Altersgrenze nach LFL-E (60 Jahre). Linkes Bild: Patienten <60 Jahre mit Mutation ( $n=3$ ), ohne Mutation ( $n=73$ ). Rechtes Bild: Patienten >60 Jahre mit Mutation ( $n=1$ ), ohne Mutation ( $n=26$ ).

## 5.2.2 *TP53* Polymorphismusanalyse

Im folgenden Kapitel wird zunächst auf die klinischen und statistischen Daten der NNR-Ca Patienten des Gesamtkollektivs der *TP53* Polymorphismusanalyse eingegangen (Kap. 5.2.2a). Darauf folgt die Darstellung der Verteilung der einzelnen *TP53* Polymorphismen und die statistische Auswertung der Auswirkung der einzelnen Polymorphismen auf klinische Parameter (Kap. 5.2.2b). Anschließend folgt der Vergleich der *TP53* Polymorphismus Verteilung zwischen der untersuchten Gruppe der NNR-Ca Patienten und gesunden Kontrollkollektiven (Kap. 5.2.2c). Abschließend findet sich die Analyse der Auswirkung des Vorhandenseins mehrerer Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten auf klinische Parameter (Kap. 5.2.2d).

### a) Klinische und statistische Daten des Gesamtkollektivs

Von 142 analysierten Patienten waren 52 NNR-Ca Patienten (36,6 %) Träger von mindestens einem Allel der seltenen Variante der untersuchten *TP53* Polymorphismen. Die klinischen Daten der 52 Patienten mit der seltenen Variante der untersuchten *TP53* Polymorphismen und der 90 Patienten mit der häufigen Variante der *TP53* Polymorphismen finden sich, geordnet nach Polymorphismusstatus, in Tab. 23.

Der jüngste Patient der 142 NNR-Ca Patienten der *TP53* Polymorphismusanalyse war bei Erstdiagnose 18, der Älteste 79 Jahre alt. Der Altersmittelwert lag bei  $49,5 \pm 14,25$  Jahren. Das mittlere Überleben der Patienten betrug  $53,7 \pm 60,48$  Monate (Median 34,2 Monate; Intervall 1,2-339,0 Monate). Die mittlere Tumorgroße betrug  $11,2 \pm 4,5$  cm (Median 10,0 cm; Intervall 3-30 cm), wobei bei 4 Patienten keine Information zur Größe des Tumors vorlag. Der Tumor zeigte bei 79 (66,4 %) von 119 Patienten Hormonaktivität und bei 17 Patienten (14,3 %) konnte keine Hormonaktivität nachgewiesen werden, wobei bei den restlichen 23 Patienten (19,3%) vor OP keine Hormondiagnostik durchgeführt worden war.

Die Einteilung der Patienten nach der ENSAT Klassifikation ergab, dass 7 Patienten ins Stadium ENSAT I fielen (5,8 %), gefolgt von 53 Patienten (44,2 %) in Stadium II, 36 Patienten (25,3 %) in Stadium III und 42 Patienten (29,6 %) in Stadium IV. Der Mittelwert lag bei  $2,8 \pm 0,9$ . Bei 4 Patienten (2,8 %) konnte, auf Grund fehlender Daten, keine Zuordnung zu einem ENSAT Stadium vorgenommen werden.

**Tabelle 23 | Klinische Daten von NNR-Ca der TP53 Polymorphismus Analyse**

ED Erstdiagnose. SD Standard Abweichung. pos positiv. neg negativ. n.b. nicht bekannt.

	<b>Patienten mit der häufigen Variante der TP53 Polymorphismen</b> n=90 (63,4%)	<b>Patienten mit mindestens einem Allel der seltenen Variante der TP53 Polymorphismen</b> n=52 (36,6%)	<b>p-Wert</b>
<b>Alter bei ED (Jahre)</b>			0,2737
Mittelwert ± SD	50,6 ± 14,2	47,5 ± 14,3	
Median (Intervall)	49,7 (18,7-79,7)	48,7 (18,0-77,7)	
<b>Überleben nach ED (Monate)</b>			0,2408
Mittelwert ± SD	57,3 ± 64,9	47,4 ± 51,99	
Median (Intervall)	38,6 (1,2-339,0)	25,5 (4,8-258,9)	
<b>ENSAT Stadium bei ED (n)</b>			0,5530
Mittelwert ± SD	2,7 ± 0,9178	2,9 ± 0,9468	
I	4 (4,4%)	3 (5,8%)	
II	38 (42,2%)	15 (28,8%)	
III	21 (23,3%)	15 (28,8%)	
IV	24 (26,7%)	18 (34,6%)	
n.b.	3 (3,3%)	1 (1,9%)	
<b>Tumorgröße (cm)</b>			0,6463
Mittelwert ± SD	11,4 ± 4,5	10,8 ± 4,6	
Median (Intervall)	10,0 (3,0-24,0)	10,75 (3,0-30,0)	
<b>Hormonaktivität (n)</b>			0,0094
pos.	54 (60,0%)	25 (48,0%)	
neg.	15 (16,7%)	16 (30,8%)	
n.b.	12 (13,3%)	11 (21,2%)	

Der einzige Patient der neben einer Mutation auch eine seltenere Variante eines Polymorphismus im TP53 aufwies, war *Patient 1* (Kap. 5.1.1 und 5.2.1). Bei ihm wurden der *Intron 2*, *Intron 3* und *R72P* Polymorphismus jeweils heterozygot gefunden. Am Ende des Erhebungszeitraums (06/2010) waren 83 der 142 NNR-Ca Patienten verstorben.

b) Verteilung der einzelnen *TP53* Polymorphismen und Auswirkung auf das Überleben

Die in Kap. 5.1.5 bereits beschriebene Verteilung der Sequenzänderungen jedes einzelnen in dieser Arbeit untersuchten *TP53* Polymorphismus findet sich, zusammen mit den prozentualen Anteilen, in Tab. 24.

Auf der linken Seite der Tabelle finden sich die in einem Exon lokalisierten Polymorphismen. Bei den in Exon 4 untersuchten Polymorphismen *P34P* und *P47S* wurde jeweils nur die für Prolin kodierende Variante gefunden (Tab. 24). Die anderen in Exon 4 lokalisierten Polymorphismen *P36P* und *R72P* zeigten mit 96,9 % bzw. 68,5 % ein vorwiegendes Vorliegen der homozygoten Prolin bzw. Arginin Variante (Tab. 24). Beim *P36P* Polymorphismus lag bei 96,9 % der Patienten CCG homozygot vor, die übrigen 3,1 % zeigten den Polymorphismus heterozygot (CCG/CCA). Für *R72P* waren 26,1 % der Patienten heterozygot und 5,4 % homozygot für Prolin (Tab. 24).

**Tabelle 24 | *TP53* Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten**

A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin. NoIns kein 16 bp langes Insert an der Stelle des *Intron 3* Polymorphismus. Ins 16 bp langes Insert an der Stelle des *Intron 3* Polymorphismus.

<b><i>P36P</i></b>				<b><i>Intron 2</i></b>					
	CCG/CCG	CCG/CCA	CCA/CCA		G/G	G/C	C/C		
n=131	127 (96,9%)	4 (3,1%)	0 (0=%)	n=111	75 (67,6%)	28 (25,2%)	8 (7,2%)		
<b><i>R72P</i></b>				<b><i>Intron 3</i></b>					
	CGC/CGC	CGC/CCC	CCC/CCC		NoIns/NoIns	NoIns/Ins	Ins/Ins		
n=130	89 (68,5%)	34 (26,1%)	7 (5,4%)	n=133	111 (83,5%)	16 (12,0%)	6 (4,5%)		
<b><i>R213R</i></b>				<b><i>Intron 6</i></b>					
	CGA/CGA	CGA/CGG	CGG/CGG		G/G	G/A	A/A	G/C	A/C
n=133	132 (99,2%)	1 (0,8%)	0 (0%)	n=121	100 (82,6%)	13 (10,7%)	6 (5,0%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)
<b><i>P34P</i></b>	<b><i>V217M</i></b>		<b><i>Intron 9</i></b>						
n=131 nur CCC (Pro)	n=133 nur GTG (Val)				T/T	T/C	C/C		
<b><i>P47S</i></b>	<b><i>G360A</i></b>		n=137	132 (96,4%)	4 (2,9%)	1 (0,7%)			
n=131 nur CCG (Pro)	n=137 nur GGG (Gly)								

Bei den 2 in Exon 6 lokalisierten Polymorphismen wurde bei *R213R* ein Patient (0,8 %) mit heterozygotem Status gefunden. *V217M* wies bei allen untersuchten Patienten nur

die Valin Variante auf (Tab. 24). Der in Exon 9 gelegene Polymorphismus *G360A* wurde nur homozygot für Glyzin kodierend gefunden (Tab. 24).

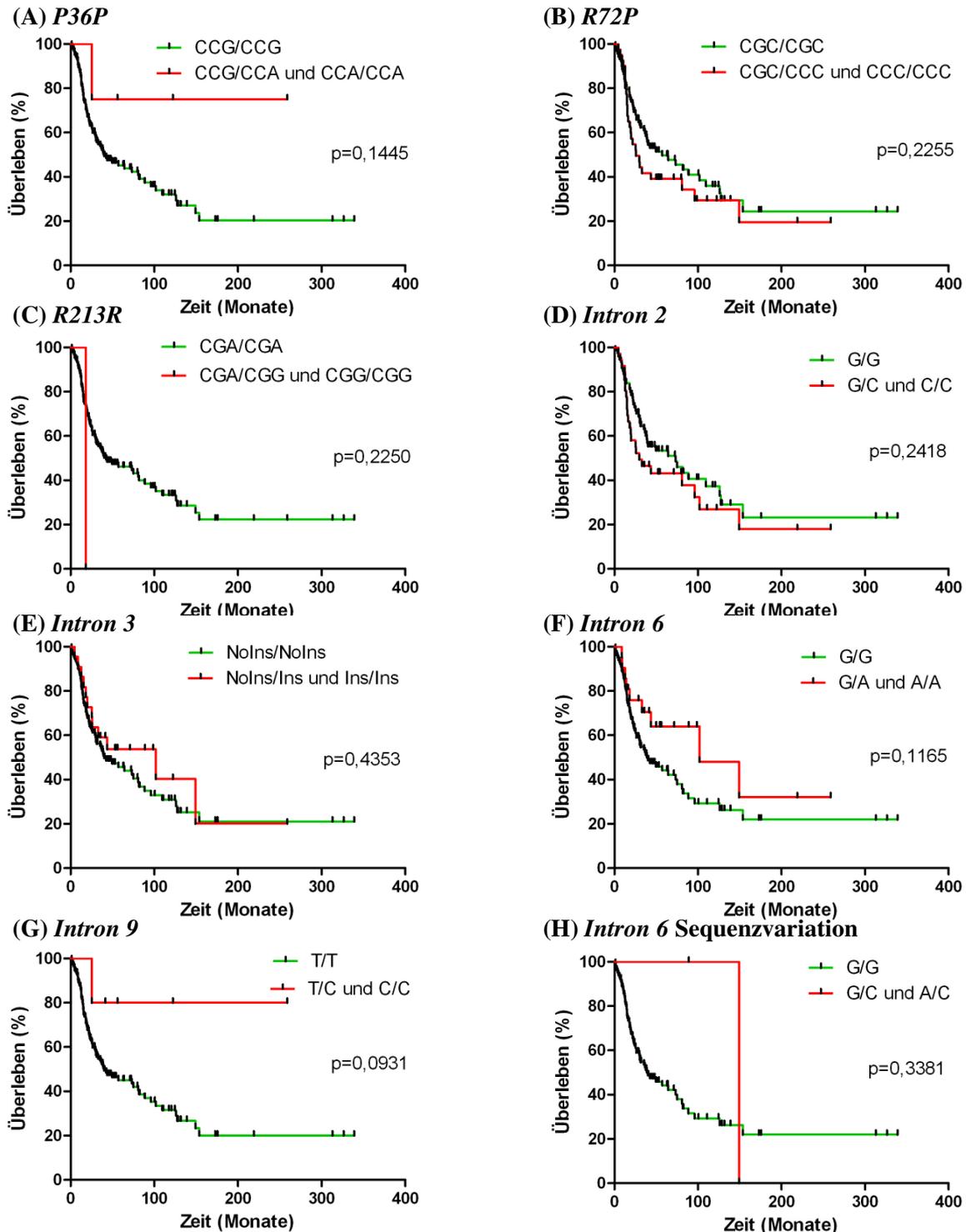
Auf der rechten Seite der Tabelle (Tab. 23) sind die in einem der Intron von *TP53* gelegenen Polymorphismen dargestellt.

Bei 25,2 % der Patienten lag der *Intron 2* Polymorphismus heterozygot vor und bei 7,2 % Prozent wurde Cytosin homozygot gefunden (Tab. 24). An der Stelle des *Intron 3* Polymorphismus hatten 83,5 % keine Insertion, 12 % zeigten die 16bp lange Insertion auf einem Allel und 4,5 % wiesen die Insertion auf beiden Allelen auf (Tab. 24).

Der *Intron 6* Polymorphismus lag bei 82,6 % der NNR-Ca Patienten homozygot für Guanin vor, heterozygot waren 10,7 % und bei 5% der Patienten wurde Adenin auf beiden Allelen gefunden. Darüber hinaus wurde bei einem Patienten (0,8 %) an der Stelle des *Intron 6* Polymorphismus auf einem Allel Guanin, auf dem anderen Allel Cytosin gefunden. Des Weiteren wurde bei einem Patienten (0,8 %) an der Stelle des *Intron 6* Polymorphismus auf einem Allel Adenin und auf dem anderen Allel Cytosin gefunden (Tab. 24).

*Intron 9* zeigte bei 96,4 % der Patienten Thymin homozygot, bei 2,9 % Thymin und Cytosin heterozygot und bei 0,7 % Cytosin homozygot.

Bei der Analyse der Auswirkung der einzelnen *TP53* Polymorphismen auf das Überleben der NNR-Ca Patienten wurde der Mantel-Cox Test verwendet. Dabei wurden homo- und heterozygote Träger der selten vorkommenden Variante des jeweils untersuchten Polymorphismus, Trägern der in Europa vorwiegend vorliegenden homozygoten Variante gegenüber gestellt. Es konnte keine signifikante Auswirkung einzelner Polymorphismen auf die Überlebenszeit dokumentiert werden (Abb. 22).



**Abbildung 22 | Überleben von NNR-Ca Patienten mit TP53 Polymorphismus Variation**

- (A) *P36P* Patienten mit CCG/CCG (n=127) versus Patienten mit CCG/CCA, CCA/CCA (n=4) Genotyp  
 (B) *R72P* Patienten mit CGC/CGC (n=89) versus Patienten mit CGC/CCC, CCC/CCC (n=41) Genotyp  
 (C) *R213R* Patienten mit CGA/CGA (n=132) versus Patient mit CGA/CGG (n=1) Genotyp.  
 (D) *Intron 2* Patienten mit G/G (n=75) Genotyp versus Patienten G/C und C/C (n=36) mit Genotyp.  
 (E) *Intron 3* Patienten mit NoIns/NoIns (n=111) versus Patienten mit No Ins/Ins, Ins/Ins (n=22) Genotyp.  
 (F) *Intron 6* Patienten mit G/G (n=100) versus Patienten mit G/A und A/A (n=21) Genotyp.  
 (G) *Intron 9* Patienten mit T/T (n=132) versus Patienten mit T/C und C/C (n=5) Genotyp.  
 (H) *Intron 6* Patienten mit G/G (n=100) Genotyp versus Patienten mit Sequenzvariation an der Stelle des Intron 6 Polymorphismus (n=2).

c) *TP53* Polymorphismen bei Nebennierenrindenzarzinom Patienten und Kontrollkollektiven

Zum Vergleich der Polymorphismusverteilung bei NNR-Ca Patienten gegenüber der bei gesunden Probanden, wurden Vergleichsdaten aus gesunden kaukasischen Kollektiven herangezogen. Daten waren hier für die *TP53* Polymorphismen *R72P* (12), *Intron 2* (124), *Intron 3* (125), *Intron 6* (126) und *Intron 9* (127) vorhanden.

Signifikante Unterschiede der Verteilung der Polymorphismusvarianten zwischen den NNR-CA Patienten und den Kontrollgruppen ergaben sich bei *Intron 2* bei den Gruppen, die jeweils Guanin oder Cytosin homozygot aufwiesen. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede bei *Intron 3*, bei den Gruppen mit keiner Insertion auf einem oder beiden Allelen, und bei *Intron 6*, bei den Gruppen die homozygot oder heterozygot Guanin aufwiesen, gefunden (Tab. 25).

**Tabelle 25 | Vergleich der Verteilung von *TP53* Polymorphismen zwischen NNR-Ca Patienten und gesunden kaukasischen Kontrollgruppen**

NNR-Ca Nebennierenrindenzarzinom. \* signifikant wenn  $p < 0,05$

Polymorphismus	NNR-Ca Patienten	Kontrollgruppe	p-Wert*
<b><i>R72P</i></b>	n=130	n=50 <sup>(12)</sup>	
CGC/CGC	89 (68,5%)	38 (76%)	0,3651
CGC/CCC	34 (26,1%)	12 (24%)	0,8500
CCC/CCC	7 ( 5,4%)	0 ( 0%)	0,1927
<b><i>Intron 2</i></b>	n=111	n=110 <sup>(124)</sup>	
G/G	75 (67,6%)	28 (25,4%)	<b>&lt;0,0001</b>
G/C	28 (25,2%)	41 (37,3%)	0,1455
C/C	8 ( 7,2%)	41 (37,3%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b><i>Intron 3</i></b>	n=133	n=563 <sup>(125)</sup>	
NoIns/NoIns	111 (83,5%)	385 (68,4%)	<b>0,0004</b>
NoIns/Ins	16 (12,0%)	166 (29,5%)	<b>&lt;0,0001</b>
Ins/Ins	6 ( 4,5%)	12 ( 2,1%)	0,1301
<b><i>Intron 6</i></b>	n=121	n=295 <sup>(126)</sup>	
G/G	100 (82,6%)	192 (65,1%)	<b>0,0004</b>
G/A	13 (10,7%)	87 (29,5%)	<b>&lt;0,0001</b>
A/A	6 ( 5,0%)	16 ( 5,4%)	1,0000
<b><i>Intron 9</i></b>	n=137	n=103 <sup>(127)</sup>	
T/T	132 (96,4%)	99 (96,1%)	1,0000
T/C	4 ( 2,9%)	4 ( 3,9%)	0,7277
C/C	1 ( 0,7%)	0 ( 0%)	1,0000

d) Analyse der Auswirkung mehrerer *TP53* Polymorphismen auf klinische Parameter

Da in diesem Abschnitt die Analyse mehrerer gleichzeitig vorliegender Polymorphismen in einem Patienten erfolgt, wurden nur Patienten (n=73) in die Analyse aufgenommen, bei denen alle in dieser Arbeit analysierten Polymorphismen vollständig ausgewertet werden konnten.

In dieser Gruppe wiesen 48 Patienten (65,8 %) die in Europa häufig vorkommende Variante der 11 untersuchten *TP53* Polymorphismen homozygot auf. Die anderen 25 Patienten (34,2 %) waren Träger von einem oder mehreren *TP53* Polymorphismen mit der selteneren Variante auf mindestens einem Allel (Abb. 23).

Patient	Geschlecht	Alter bei ED	Überleben (in Monaten)	P36P	R72P	R213R	Intron 2	Intron 3	Intron 6	Intron 9
I	m	36	30	White	Light Gray	White	White	White	White	White
II	m	51	18	White	White	Light Gray	White	White	White	White
III	w	44	12	White	White	White	Light Gray	White	White	White
IV	w	40	21	White	Light Gray	White	White	White	White	White
V	m	18	9	White	Light Gray	White	White	White	White	White
VI	w	51	16	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
VII	w	46	88	White	Light Gray	White	Light Gray	Light Gray	Black	White
VIII	w	24	29	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
IX	m	44	19	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
X	w	49	13	White	Dark Gray	White	Dark Gray	White	White	White
XI	w	38	111	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XII	w	31	95	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XIII	m	60	81	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XIV	m	69	7	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XV	m	58	15	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XVI	w	65	18	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XVII	w	77	14	White	Light Gray	White	Light Gray	White	White	White
XVIII	w	60	14	White	Light Gray	White	Light Gray	White	Light Gray	White
XIX	m	42	101	White	Light Gray	White	Light Gray	Light Gray	Light Gray	White
XX	w	35	43	White	Dark Gray	White	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray	White
XXI	w	32	8	White	Light Gray	White	Light Gray	Light Gray	Light Gray	White
XXII	m	55	12	White	Dark Gray	White	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray	White
XXIII	m	61	33	White	Light Gray	White	Light Gray	Light Gray	Dark Gray	White
XXIV	m	49	18	White	Light Gray	White	Light Gray	Light Gray	Light Gray	White
XXV	m	40	258	Light Gray	Dark Gray	White	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray

**Abbildung 23 | Verteilung von *TP53* Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten**

Alter bei ED (Erstdiagnose) in Jahren. m männlich. w weiblich. Weiße Felder: Polymorphismus homozygot, in der Bevölkerung vorwiegend vorliegende Variante. Hellgraue Felder: Polymorphismus heterozygot. Dunkelgraue Felder: Polymorphismus homozygot, abweichend von der in der Bevölkerung vorwiegend vorliegenden Sequenz. Schwarzes Feld: Sequenzvariation (G/C) abweichend vom *Intron 6* Polymorphismus (G/A).

Von den 25 Patienten mit der seltenen Variante der untersuchten *TP53* Polymorphismen wiesen 5 Patienten (20 %) nur einen Polymorphismus mit dem seltener vorkommenden Allel auf, 12 Patienten (48 %) wiesen 2 Polymorphismen, 2 Patienten (8 %) wiesen 3 Polymorphismen, 5 Patienten (20 %) wiesen 4 Polymorphismen und 1 Patient (4 %) wies 6 Polymorphismen mit der seltener vorkommenden Variante auf. Abb. 23 zeigt die Verteilung der *TP53* Polymorphismen bei NNR-Ca Patienten. Hervorzuheben ist hier der hohe Prozentsatz an Trägern von 2 oder mehr Polymorphismen mit dem seltener vorkommenden Allel (80 %).

Um einen möglichen Einfluss der Sequenzvariationen der *TP53* Polymorphismen auf das Überleben der Patienten zu eruieren und weiterführend zu analysieren, ob sich das Vorhandensein des selteneren Allels der *TP53* Polymorphismen als prädiktiver Marker eignet, wurde zunächst eine univariate Kaplan-Meier Überlebensanalyse vorgenommen. Zum Vergleich wurde weiterhin der Einfluss verschiedener anderer Parameter auf das Überleben der Patienten, ebenfalls mittels univariater Kaplan-Meier Überlebensanalyse, untersucht (Tab. 26).

Für folgende Parameter wurde eine univariate statistische Auswertung vorgenommen: *TP53* Polymorphismus, Alter bei Erstdiagnose, ENSAT, Geschlecht, Tumorgröße, Ki67 Färbung im Tumorgewebe, *p53* Färbung im Tumorgewebe, Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose, Kapselinfiltration des Primärtumor und Gefäßinfiltration des Primärtumor. Die Auswertung der einzelnen Daten ergab signifikante Unterschiede im Überleben der Patienten für die Parameter *TP53* Polymorphismus, ENSAT, Ki67, Lymphknotenbefall und Gefäßinfiltration. Annähernd signifikante Werte wurden für das Alter bei Erstdiagnose gefunden (Tab. 26).

Die statistisch signifikanten und annähernd signifikanten Werte wurden in einer multivariaten Regressionsanalyse nach Cox weiter untersucht, um die Faktoren zu identifizieren die auch bei Einbeziehung mehrerer Variablen eine Auswirkung auf das Überleben der Patienten haben. Dabei ergaben sich signifikante Werte für *TP53* Polymorphismen, ENSAT und Gefäßinfiltration und annähernd signifikante Werte für das Alter bei Erstdiagnose (Tab. 26).

**Tabelle 26 | Einfluss klinischer und histologischer Faktoren auf das Überleben von NNR-Ca Patienten**

ED Erstdiagnose. HR Hazard Ratio. CI Konfidenzintervall \* signifikant wenn  $p < 0,05$

Parameter	n	<u>Univariate Analyse</u>			<u>Multivariate Analyse</u>			
		Mittleres Überleben (Monate)	HR	95% CI	p*	HR	95% CI	p*
<b>TP53 Polymorphismus</b>			0,434	0,22-0,83	<b>0,013</b>	0,367	0,17-0,78	<b>0,009</b>
häufige Variante	48	73,5						
seltene Variante	25	19,4						
<b>Alter bei ED</b>			0,554	0,30-1,01	0,054	1,024	0,99-1,05	0,060
≤46 Jahre	35	81,8						
>46 Jahre	38	35,4						
<b>ENSAT</b>			0,103	0,04-0,23	<b>&lt;0,0001</b>	2,546	1,61-4,02	<b>&lt;0,0001</b>
I-III	50	88,5						
IV	22	16,5						
<b>Geschlecht</b>			0,981	0,54-1,77	0,949			
Männer	30	40,0						
Frauen	43	38,7						
<b>Tumorgröße</b>			1,262	0,70-2,28	0,439			
≤10,5cm	37	38,7						
>10,5cm	36	43,6						
<b>Ki67</b>			0,476	0,23-0,97	<b>0,042</b>	1,017	0,99-1,04	0,151
<10	13	88,5						
≥10	39	35,4						
<b>p53</b>			0,747	0,27-2,06	0,574			
ohne	22	81,8						
mit	9	29,7						
<b>Lymphknotenbefall</b>			0,114	0,03-0,40	<b>0,0007</b>	0,795	0,32-1,96	0,619
ohne	47	81,0						
mit	8	22,8						
<b>Kapselinfiltration</b>			0,732	0,37-1,44	0,365			
ohne	33	73,5						
mit	26	37,5						
<b>Gefäßinfiltration</b>			0,39	0,20-0,75	<b>0,005</b>	0,423	0,20-0,89	<b>0,022</b>
ohne	22	95,9						
mit	40	33,1						

In einer weiteren univariaten Analyse wurde die Auswirkung der Polymorphismen *R72P*, *Intron2*, *Intron 3* und *Intron 6* auf das Überleben einzeln untersucht (Tab.27). Dabei ergaben sich signifikante Werte für *R72P* und *Intron2*. Aufgrund der geringen Zahl von Trägern mit der seltenen Variante der Polymorphismen wurde dies für *P36P*, *R213R* und *Intron 9* nicht untersucht.

**Tabelle 27 | Überleben von NNR-Ca Patienten im Zusammenhang mit den Polymorphismen *R72R*, *Intron 2*, *Intron 3* und *Intron 6* (n=73)**

ED Erstdiagnose. HR Hazard Ratio. CI Konfidenzintervall \* signifikant wenn  $p < 0,05$ . # ein Patient mit G/C (Abb. 23)

Poly-morphismus	n	Mittleres Überleben (Monate)	p*	Poly-morphismus	n	Mittleres Überleben (Monate)	HR	95% CI	p*
<b><i>R72P</i></b>			<b>0,0216</b>				0,39	0,19-0,80	<b>0,0097</b>
CGC/CGC	52	73,5		CGC/CGC	52	73,5			
CGC/CCC	17	19,4		CGC/CCC	21	19,4			
CCC/CCC	4	28,3		CCC/CCC					
<b><i>Intron 2</i></b>			<b>0,0373</b>				0,42	0,21-0,85	<b>0,0176</b>
G/G	53	73,5		G/G	53	73,5			
G/C	16	18,7		G/C	20	18,7			
C/C	4	28,3		C/C					
<b><i>Intron 3</i></b>			0,8774				0,92	0,38-2,24	0,8630
NoIns/NoIns	65	40,0		NoIns/NoIns	65	40,0			
NoIns/Ins	5	33,1		NoIns/Ins	8	38,3			
Ins/Ins	3	43,6		Ins/Ins					
<b><i>Intron 6</i></b>			0,8598				0,79	0,33-1,89	0,5976
G/G	64	40,0		G/G	64	40,0			
G/A <sup>#</sup>	4	59,9		G/A <sup>#</sup>	9	33,1			
A/A	5	33,1		A/A					

## 6. Diskussion

### 6.1 *TP53* Mutationen bei Patienten mit Nebennierenrindenzarzinom

#### 6.1.1 Allgemein

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die ein großes Kollektiv erwachsener NNR-Ca Patienten auf Keimbahnmutationen in allen kodierenden Exons von *TP53* analysiert. Bisher wurden nur kleine Gruppen (8) oder einzelne erwachsene NNR-Ca Patienten (9) auf Keimbahnmutationen im *TP53* untersucht. Im Rahmen von *TP53* Familienanalysen bei Verdacht von LFS oder LFL (96-99, 119) und der gezielten Suche nach einzelnen Mutationen (7, 11) wurden weitere erwachsene NNR-Ca Patienten mit *TP53* Keimbahnmutationen identifiziert. In der bisher einzigen anderen Arbeit die das Vorkommen von Keimbahnmutationen bei sporadisch vorkommenden NNR-Cas bei Erwachsenen untersucht, wurde bei keinem der 10 Patienten eine Keimbahnmutation gefunden (8). Im Gegensatz dazu wurden bei Kindern mit NNR-Ca Keimbahnmutationen des *TP53* in 50-82 % der Fälle dokumentiert (109, 128).

Es gibt nur wenige Daten zu *TP53* Mutationsraten bei erwachsenen Patienten mit Malignomen, die nicht dem LFS oder den dazugehörigen abgewandelten Klassifikationen zugeordnet werden können. Die meisten Daten sind für junge Frauen mit Brustkrebs vorhanden, wobei hier eine Mutationsrate von 2,1-7,4 % beschrieben wurde (66-68). Die in dieser Arbeit dokumentierte Keimbahnmutationsrate von 3,9 % bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca ist damit vergleichbar.

#### 6.1.2 *TP53* Mutationen genomisch und somatisch

In dieser Arbeit wurden bei 103 Patienten insgesamt 5 Keimbahnmutationen im *TP53* gefunden, die in den Exons 4,5,6 und 10 lokalisiert waren (Kap. 5.1.1a). Es konnte keine Häufung einer einzelnen Mutation, wie es in Brasilien der Fall war (6, 7), festgestellt werden.

Von den in dieser Arbeit dokumentierten Mutationen lagen 3 innerhalb des für die DNS-Bindungsdomäne kodierenden Bereichs. In diesem Bereich wurden bisher die meisten Keimbahnmutationen beschrieben (54) (Kap. 2.3.1a). Dagegen werden Mutationen im Bereich der Tetramerisierungsdomäne von *p53* seltener gefunden (54)

(Kap. 2.3.1a). In dieser Arbeit wurde bei 2 Patienten jeweils eine Mutation in dem für die Tetramerisierungsdomäne kodierenden Bereich dokumentiert. Es erscheint möglich, dass *TP53* Mutationen in dieser Region für das Auftreten eines NNR-Cas kausativ verantwortlich sind (129), beziehungsweise in besonderem Maß mit einem adrenalen Phänotyp assoziiert sind.

Die Mutation innerhalb der DNS-Bindungsdomäne in Exon 4, genauer Codon 125, die zu verändertem Spleiß-Verhalten führt, wurde beim NNR-Ca bereits beschrieben (97, 119). In unserem Kollektiv wurde sie bei einem bei Erstdiagnose 21 Jahre alten Mann gefunden. Obwohl der Austausch von Guanin zu Adenin an der Stelle nicht zu einem Austausch der kodierten AS führt, wurden 1998 von Varley *et al.* unterschiedlich lange Transkripte des Gens gefunden (97). In der Arbeit von Varley *et al.* aus dem Jahr 1998 wird weiterhin die Möglichkeit diskutiert, dass der gezeigte Zusammenhang der T125T Mutation mit dem NNR-Ca ein erster Nachweis einer Genotyp-Phänotyp Korrelation zwischen *TP53* Mutationen und Krebsart sein könnte (97). Dass die Mutation in der vorliegenden Arbeit erneut bei einem Patienten mit NNR-Ca gefunden wurde, könnte diese These untermauern.

*Patient 2*, Träger der Codon 158 Mutation in Exon 5, war bei Erstdiagnose 39 Jahre alt. Die bei *Patient 2* gefundene Mutation in Exon 5 wurde zuvor beim NNR-Ca noch nicht beschrieben, konnte allerdings bei mehreren Tumorentitäten, unter anderem Thymus- und Lungenkarzinomen, nachgewiesen werden (54). Funktionelle Analysen dieser Mutation in Hefezelllinien konnten eine Veränderung im Verhalten und der Temperatursensitivität von *p53* nachweisen (120-123).

Bei *Patientin 3*, der einzigen Frau mit einer genomischen *TP53* Mutation in dieser Arbeit, wurden 2 Mutationen gefunden: eine Mutation in Codon 202, innerhalb dem für die DNS-Bindungsdomäne kodierenden Bereich, in Exon 6 und eine Mutation in Codon 332 in Exon 10, im für die Tetramerisierungsdomäne kodierenden Bereich. Beide Mutationen wurden zuvor nicht im NNR-Ca beschrieben. Die Mutation in Codon 332 wurde zuvor auch bei keinem anderen Tumor beschrieben (54).

In der Familienanamnese der Patientin fiel eine Häufung von NNR-Cas auf. Die Mutter der Patientin, sowie ein Halbbruder der Mutter waren an einem NNR-Ca verstorben. Die Mutation in Exon 10 die bei *Patientin 3* gefunden wurde, konnte auch bei der Mutter nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten beide Mutationen die bei

*Patientin 3* auftraten, in der genomischen DNS der Schwester der Patientin heterozygot dokumentiert werden.

Der Nachweis der Mutationen in den beiden Exons und das gehäufte Auftreten von NNR-Cas in der Familie legen einen Zusammenhang der Mutationen mit der Entwicklung des NNR-Cas nahe, obwohl der genaue Einfluss der Mutationen auf den klinischen Phänotyp momentan noch nicht bekannt ist. Allerdings führt die neu beschriebene Mutation I332M außerhalb der DNS-Bindungsdomäne in Exon 10 die bei Mutter und Tochter, beide an hoch aggressivem NNR-Ca verstorben, nachgewiesen werden konnte, in besonderem Maße zur Vermutung, dass diese Mutation mit dem Phänotyp im Zusammenhang stehen könnte. Darüber hinaus wurden Mutationen im Bereich außerhalb der DNS-Bindungsdomäne bereits mit einem adrenalen Phänotyp in Verbindung gebracht (129). Weiterhin wurde die Mutation R337H, die nur 5 Codons von der I332M Mutation entfernt, ebenfalls im Bereich der Tetramerisierungsdomäne von *p53* liegt, gehäuft mit dem Auftreten von NNR-Cas bei Kindern im Süden Brasiliens assoziiert (6, 7).

Die in Exon 10 lokalisierte R337H Mutation wurde in der vorliegenden Arbeit bei einem bei Erstdiagnose 71 jährigen Mann gefunden. Die Zweitmalignome in Sigma und Prostata und die Familienanamnese des Patienten, der Vater war an einem Prototakarzinom, die Tochter mit 37 Jahren an Brustkrebs verstorben, legen nahe, dass die Mutation auch mit anderen Tumoren assoziiert sein könnte. In Brasilien wurde die Mutation außer bei Kindern mit Nebennierenrindentumor ebenfalls bei Erwachsenen mit Brustkrebs gefunden (130). Durch den klinischen Verlauf bei *Patient 4* wird darüber hinaus ersichtlich, dass sich die *TP53* Mutation auch in höherem Alter und mit einem weniger aggressiven Verhalten des NNR-Cas manifestieren kann.

Die Mutation führt bei Werten die über dem physiologischem pH liegen zum Funktionsverlust von *p53* (102). Obwohl die Mutation in geringem Maß auch bei Patienten mit anderen Malignomen gefunden wurde (130), scheint die pH-Sensitivität im Zusammenhang mit der hohen Zahl der Keimbahnmutationsträger mit Nebennierenrindentumor im Kindesalter (97 %) (6) eine Assoziation mit Nebennierenrindengewebe zu implizieren (102, 108). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene Patient mit R337H Mutation nicht mit den in Portugal und Brasilien dokumentierten Fällen, mit der

genomischen R337H Mutation, in verwandtschaftlicher Beziehung steht (Kap. 5.1.4). Die Manifestation des NNR-Cas im Zusammenhang mit der R337H Mutation auch außerhalb des portugiesisch-brasilianischen Kollektivs könnte als weiterer Hinweis auf einen möglichen Genotyp-Phänotyp Zusammenhang gewertet werden.

Um zu eruieren, ob die Mutationen, die in der Keimbahn der Patienten gefunden wurden, im Tumorgewebe nachgewiesen werden können, wurden die entsprechenden Bereiche der *TP53* Exons aus DNS des Tumorgewebes sequenziert. Alle Mutationen die bei den Patienten in der Keimbahn heterozygot gefunden wurden, konnten im Tumor des jeweiligen Patienten homozygot nachgewiesen werden (Kap. 5.1.1b). Die weitere Analyse ergab bei diesen Patienten den Verlust eines *TP53* Allels im Tumor (Kap. 5.1.2). Damit liegt nach Knudsons Second Hit Hypothese (69), mit einer *TP53* Mutation auf einem Allel und dem zusätzlichen Verlust des gesunden anderen Allels, die Inaktivierung beider Allele vor. Dies könnte zum Verlust der *p53* Funktion und damit zur Begünstigung der Tumorentstehung bei den Patienten geführt haben.

Libe *et al.* fanden 2007 bei 100 % der Patienten mit somatischer *TP53* Mutation eine zelluläre Akkumulation von *p53* (13). Im Gegensatz dazu zeigte die immunhistochemische Darstellung des Proteins in der vorliegenden Arbeit bei 3 von 5 NNR-Ca Patienten mit somatischer *TP53* Mutation eine Anfärbung von *p53* im Tumor (Kap. 5.1.3). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen bei Magenkarzinomen und Blasenkrebs (52, 53), bei denen ebenfalls keine enge Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer *TP53* Mutation und *p53* Färbung gefunden wurde. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass aufgrund der *p53* Immunhistochemie keine suffiziente Aussage über das Vorliegen einer *TP53* Mutation getroffen werden kann.

### 6.1.3 Klinik

Betrachtet man den klinischen Verlauf der NNR-Ca Patienten mit *TP53* Mutation, wird eine hohe Variabilität ersichtlich. Dabei waren die bei Erstdiagnose unter 40 jährigen von einem wesentlich aggressiveren Verlauf der Erkrankung betroffen, als der einzige ältere Patient (Kap. 5.2.1a). Die unter 40 jährigen lagen in den Bereichen Alter bei Erstdiagnose und Überleben nach Erstdiagnose jeweils unter dem Durchschnitt des

Kollektivs ohne Mutation. *Patient 4*, der einzige ältere Patient, lag in beiden Bereichen über dem Durchschnitt der Gesamtkohorte ohne Mutation (Tab. 22). In der Einteilung nach dem ENSAT Schema lagen die jüngeren Patienten im Bereich des Median der Gesamtkohorte oder darüber, *Patient 4* darunter (Tab. 22). Weiter ist auffällig, dass 2 der 4 Patienten (50 %) mit *TP53* Mutation Zweitmalignome in der Anamnese aufwiesen, wohingegen nur 10 % der Patienten ohne Mutation von einer malignen Neoplasie betroffen waren.

Hervorzuheben ist außerdem, dass 2 von 3 Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation, die einer adjuvanten Radiotherapie zugeführt wurden, ein Lokalrezidiv im Bereich des bestrahlten Bereichs entwickelten (Kap. 5.2.1a). Bei einem der Patienten mit Lokalrezidiv wurde darüber hinaus eine Bestrahlung von Lebermetastasen durchgeführt die ebenfalls nach der Bestrahlung wieder auftraten. Dies könnte auf eine verringerte Strahlensensibilität des Tumors hinweisen. Jedoch konnte im weiteren Verlauf der Krankheit bei keinem der beiden Patienten ein Zweittumor im Bereich der Bestrahlung nachgewiesen werden, was an der kurzen Überlebenszeit der Patienten gelegen haben könnte. Weiterhin war die Bestrahlung von Knochenmetastasen bei *Patient 1* nicht effektiv, während generell nachgewiesen werden konnte, dass die Radiotherapie des NNR-Cas effektiv ist (131).

Wie bereits beschrieben hatten die NNR-Ca Patienten mit *TP53* Mutation unter 40 Jahren eine wesentlich kürzere Überlebenszeit als der ältere Patient. Der statistische Vergleich der Überlebenszeiten der jungen Patienten mit *TP53* Mutation gegenüber der des 71 Jahre alten Patienten kann aufgrund der geringen n-Zahl nur sehr eingeschränkt beurteilt werden. Der Vergleich konnte keinen signifikanten Unterschied nachweisen (Abb. 21A Rechtes Bild). Jedoch könnte bei einem p-Wert von 0,1823 und der optischen Diskrepanz der Überlebenskurven (Abb. 21A Rechtes Bild) in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf von einem Trend ausgegangen werden.

Die jungen Patienten lagen bei Erstdiagnosealter und Überleben wesentlich unter dem der Gesamtkohorte, jedoch konnte aufgrund der geringen Patientenzahl mit Mutation wiederum keine statistisch relevante Auswirkung auf das Überleben nachgewiesen werden (Kap. 5.2.1d).

Auch konnte insgesamt kein signifikanter Einfluss der Mutationen auf das Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Kap. 5.2.1d), wobei hier ebenfalls die Anzahl der Patienten zur Erstellung eines statistisch relevanten Ergebnisses zu gering war.

Auch eine Einteilung der Patienten nach den Altersgrenzen aus den verschiedenen Klassifikationen des LFS und des LFL (Kap. 2.2.2b) brachte keine signifikanten Unterschiede beim Überleben der Patienten mit und ohne *TP53* Mutation (Abb. 21B, C, D, E, F).

Dennoch scheint die Einteilung des Kollektivs in Altersgruppen sinnvoll, da die *Patienten 1, 2 und 3* bei Erstdiagnose wesentlich jünger waren als *Patient 4* (Kap. 5.2.1) und sich klinisch von den gleichaltrigen Patienten ohne *TP53* Keimbahnmutation unterschieden.

Eine klare Abgrenzung der jüngeren Patienten mit Mutation erreicht man mit der Altersgrenze bei 40 Jahren. Hier sind 13,0 % der NNR-Ca Patienten unter 40 Jahren Träger einer *TP53* Mutation, wohingegen nur 1,2 % der Patienten über 40 Jahren eine Keimbahnmutation aufweisen (Tab. 22). Die Gegenüberstellung des Überlebens der bei Erstdiagnose unter 40 Jährigen mit und ohne *TP53* Mutation zeigt hier außerdem einen annähernd signifikanten p-Wert ( $p=0,0654$ ; Abb. 21C, Kap. 5.2.2d). So könnte man hier von einem Trend ausgehen, bei dem bei Patienten unter 40 Jahren mit Mutation im *TP53* gegebenenfalls mit einem verkürzten Überleben gegenüber den Gleichaltrigen Patienten ohne Mutation zu rechnen ist.

#### 6.1.4 Li-Fraumeni Syndrom Klassifikationen und *TP53* Mutationsscreening

Die verschiedenen Klassifikationen des LFS beruhen auf einer Einteilung der Patienten nach Kerntumoren (Sarkom, Brustkrebs, Hirntumor, NNR-Ca, Leukämie), verschiedenen Altersgrenzen und der Familienanamnese der Indexpatienten (Tab. 3) (4, 60, 63, 64). Diese sollten erfüllt sein, um den Patienten einem *TP53* Screening zu unterziehen. Wendet man diese zur Einteilung der Patienten mit NNR-Ca an, fallen alle Patienten dieser Arbeit in die LFL Klassifikation nach Chompret (64) (Tab. 3), da hier grundsätzlich alle Patienten mit NNR-Ca mit eingeschlossen werden. Von den Patienten ohne *TP53* Mutation, bei denen eine ausreichende Familienanamnese vorhanden war ( $n = 6$ ), konnte nur eine Patientin einem Li-Fraumeni Schema zugeordnet werden. Teilt

man die Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation in die verschiedenen Li-Fraumeni Syndrom Klassifikationen, ausgenommen LFL nach Chompret (64) (Tab. 3), ein, fällt auf, dass nur ein Patient nach den Syndromeinteilungen als LFL klassifiziert werden konnte. Obwohl bei den anderen Patienten verschiedene Malignome in der Familienanamnese auftraten und 2 Patienten darüber hinaus Zweitmalignome aufwiesen (Tab. 18), kann nur *Patientin 3*, nach den zu Grunde liegenden Kriterien, der Klassifikation LFL nach Birch (60) zugeordnet werden. Als einziger Patient der *TP53* Mutationspatienten trifft für *Patientin 3* außerdem die Empfehlung zum *TP53* Mutationsscreening des dritten Internationalen *p53* Mutationsworkshops (65) (Tab. 4) zu. Hier scheint außerdem ein familiäres NNR-Ca vor zu liegen, da eine, der bei *Patientin 3* gefundenen Mutationen, somatisch bei der Mutter und beide Mutationen genomisch bei der Schwester nachgewiesen wurden. Zusätzlich war ein Onkel von *Patientin 3* an einem NNR-Ca verstorben.

Eine Einteilung der Patienten nach den Kriterien des LFS/LFL zur Entscheidung ob ein *TP53* Mutationsscreening durchgeführt werden soll, scheint beim NNR-Ca weniger sinnvoll. Zum einen müssten, wendet man die Kriterien nach Chompret (64) an, alle Patienten mit NNR-Ca einer *TP53* Testung unterzogen werden. Zum anderen wären in dieser Arbeit 3 der 4 Patienten mit *TP53* Mutation nach den übrigen Klassifikationen nicht als Kandidaten für eine *TP53* Testung identifiziert worden.

Zur Erstellung einer sinnvollen Empfehlung für ein *TP53* Screening von Keimbahnvariationen bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca müssen verschiedene Gesichtspunkte bedacht werden.

Obwohl Libe *et al.* 2007 (13) bei 100 % der NNR-Ca Patienten mit positiver *p53* Färbung eine somatische *TP53* Mutation im Tumor fanden und für diese Patienten ein schlechteres Überleben dokumentieren konnten, zeigten in dieser Arbeit nur 3 von 5 NNR-Ca Patienten mit *TP53* Mutation eine Färbung von *p53*. Daher kann die immunhistochemische Färbung von *p53* nicht als Mittel zum Nachweis einer *TP53* Mutation angeführt werden.

Die 2001 von Chompret *et al.* (64) erstellte Empfehlung zur Testung des *TP53* Mutationsstatus schließt alle Patienten mit NNR-Ca, ohne Einbeziehung des Erkrankungsalters, ein. Diese Empfehlung leitet sich aus der hohen Mutationsrate bei

Kindern mit Nebennierenrindentumor ab (64). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse genomischer Mutationen im *TP53* zeigt, dass die Mutationsrate bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca wesentlich niedriger ist (3,9 %) als bei betroffenen Kindern (50-82 %) (109, 128). Die Empfehlung von Chompret *et al.* aus dem Jahr 2001 (64) scheint als Kriterium für ein *TP53* Screening bei erwachsenen NNR-Ca Patienten eher ungeeignet.

Andere Klassifikationen, die zur Selektion geeigneter Patienten für ein Screening dienen könnten, sind die LFS oder LFL Klassifikationen nach Li und Fraumeni (4) Birch *et al.* (60) und die Empfehlung zum Mutationsscreening des *p53* workshop (65). In der vorliegenden Arbeit wäre nur einer der NNR-Ca Patienten mit genomischer *TP53* Mutation durch eine der LFL Klassifikationen und der Empfehlung des *p53* workshop für ein *TP53* Mutationsscreening erfasst worden. Daher erscheint die Erstellung neuer Kriterien für erwachsene Patienten mit NNR-Ca sinnvoll.

In der statistischen Analyse der Überlebensdaten zeigte sich ein schlechteres Überleben der bei Erstdiagnose unter 40 jährigen Mutationsträger gegenüber den erkrankten Gleichaltrigen, wobei hier kein signifikanter p-Wert erreicht wurde ( $p=0,0654$ ; Abb. 21C, Kap. 5.2.2d). Der einzige Patient über 40 Jahre mit Keimbahnmutation war bei Erstdiagnose über 70 Jahre alt und zeigte ein erheblich längeres Überleben mit einem weniger aggressiven Verlauf der Erkrankung als die unter 40 jährigen NNR-Ca Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation. Daher scheint eine Empfehlung für ein Mutationsscreening bei NNR-Ca Patienten unter 40 Jahren sinnvoll. Hier sollte auch immer die Familienanamnese und das Vorhandensein von Zweitmalignomen berücksichtigt werden.

Des Weiteren sollte immer auch die seelische Belastung des Patienten und seiner Familie beachtet werden (66). Es muss daher eine umfassende Aufklärung mit genetischer Beratung des Patienten und seiner Angehörigen vor der Durchführung der *TP53* Analyse erfolgen. Allerdings scheint es, gerade im Hinblick auf Radiotherapie und deren Beeinflussung von *TP53*, sinnvoll, Patienten mit einer Mutation zu identifizieren und diese Patienten alternativen Therapiewegen zuzuführen.

Es gibt mehrere Ansätze die Fähigkeit von *p53* die Apoptose einzuleiten wiederherzustellen. So kann in der Krebszelle durch kleine Moleküle (z.B. PRIMA-1, MIRA-1) die mutiertes *p53* reaktivieren die Funktionen des Proteins

wiedererlangt werden (54). Eine weitere Möglichkeit *p53* zu reaktivieren stellen Virus basierte Therapien dar, bei denen das intakte Gen von *p53* durch einen Virus in die Zellen transportiert wird. Ein Beispiel hierfür ist ADVEXIN (Ad5CMV-p53), ein adenoviraler Vektor mit *TP53*, der bereits in klinischen Studien getestet wurde (132). Patienten bei denen durch ein Mutationsscreening eine *TP53* Mutation festgestellt wurde und bei denen, aufgrund der veränderten oder ausgefallenen *p53* Funktion, chemo- und radiotherapeutische Ansätze keine Auswirkung auf den Tumor zeigten, könnten von diesen neuen Therapieansätzen profitieren.

## 6.2 *TP53* Polymorphismen

### 6.2.1 Allgemein

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die ein großes Kollektiv erwachsener NNR-Ca Patienten (n=142) auf mehrere *TP53* Polymorphismen untersucht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten die im europäischen Kollektiv seltener vorgefundene Variante der *TP53* Polymorphismen bei 36,6 % der 142 untersuchten NNR-Ca Patienten nachweisen (Kap. 5.2.2a).

Der Einfluss von *TP53* Polymorphismen auf die Entstehung und den weiteren klinischen Verlauf von NNR-Cas wurde bisher nur beim *R72P* Polymorphismus in Exon 4 untersucht (12). In einer polnischen Studie wurde beim Vorliegen mindestens eines Prolin Allels des *R72P* Polymorphismus ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des NNR-Cas gegenüber einem gesunden Kontrollkollektiv belegt (12). Eine französische Studie die sich auf somatischer Ebene mit dem *R72P* Polymorphismus beschäftigt, konnte keinen Einfluss des Polymorphismus auf die Tumorbiologie nachweisen (13).

Verschiedene Studien haben sich mit *TP53* Polymorphismen bei anderen Malignomen beschäftigt (73, 82). Studien einzelner Polymorphismen weisen im Vergleich mit gesunden Kontrollkollektiven auf ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von malignen Neubildungen hin (12). Metaanalysen widerlegen diesen Effekt (94, 95). Wurde der Einfluss mehrerer gleichzeitig vorliegender *TP53* Polymorphismen untersucht, konnte ein erhöhtes Risiko für Krebsentstehung gefunden werden (133).

### 6.2.2 Einzelne *TP53* Polymorphismen

Von 11 untersuchten Polymorphismen wurden 7 (*P36P*, *R72P*, *R213R*, *Intron 2*, *Intron 3*, *Intron 6*, *Intron 9*) mit den beschriebenen selteneren Sequenzvariationen (Tab. 24) bei den untersuchten Patienten gefunden (Kap. 5.1.5; Kap. 5.2.2b). Besonders hervorzuheben ist hier der *Intron 6* Polymorphismus, der bei zwei Patienten eine Abweichung vom üblichen Genotyp des Polymorphismus zeigte (Abb. 19). Die abweichenden Genotypen wurden bisher nicht beschrieben oder als Polymorphismus in einer größeren Bevölkerungsstudie validiert. Die Sequenzvariationen an der Stelle des

*Intron 6* Polymorphismus könnten intronische Mutationen darstellen. Lehman *et al.* haben 2000 gezeigt, dass eine in *Intron 6* gelegene Mutation ein verlängertes Überleben der Zelle und Inhibierung der Chemotherapie induzierten Apoptose zur Folge hatte (134). Die Bedeutung der entdeckten Sequenzvariationen für die Tumorbiologie wird jedoch widersprüchlich diskutiert, da andere Gruppen keinen Einfluss der Mutationen auf die Klinik der betroffenen Patienten fanden (135).

Eine Gegenüberstellung der Patienten mit der Sequenzvariation an der Stelle des *Intron 6* Polymorphismus und der Patienten mit der häufiger vorkommenden Sequenz des Polymorphismus zeigte keinen signifikanten Unterschied beim Überleben (Abb. 22H), was aufgrund der geringen Patientenzahl nur einschränkend beurteilt werden kann. Im Rahmen dieser Studie konnte daher kein Einfluss der Sequenzvariationen an der Stelle des *Intron 6* auf die Klinik nachgewiesen werden, wobei Funktionsanalysen des Proteins mit den Sequenzvariationen nicht durchgeführt wurden.

Bei der Analyse der einzelnen Polymorphismen auf die Überlebenszeit der Patienten wurde ebenfalls kein signifikanter Einfluss festgestellt (Kap. 5.2.2b). Allerdings kann teilweise von einem Trend gesprochen werden (Abb. 22). Besonders wird dies bei *Intron 9* sichtbar (Abb. 22G). Ein p-Wert von 0,0931 zeigt hier einen Trend zu besseren Überlebensdaten der Patienten mit der selteneren Variante des *Intron 9* Polymorphismus an (Abb. 22G). Das Vorhandensein der selteneren Polymorphismus Variante scheint bei *P36P* (Abb. 22A) und *Intron 6* (Abb. 22F) ebenfalls mit einem Trend zu verlängertem Überleben assoziiert zu sein. Im Gegensatz dazu scheinen Patienten mit den seltenen Varianten des *R72P* (Abb. 22B) und des *Intron 2* (Abb. 22D) Polymorphismus ein kürzeres Überleben gegenüber den Patienten mit der jeweils häufigeren Variante des Polymorphismus zu haben.

Um im Weiteren einen möglichen Einfluss der *TP53* Polymorphismen auf das Risiko der NNR-Ca Entstehung zu untersuchen, wurde anschließend ein Vergleich zwischen den untersuchten NNR-Ca Patienten und gesunden europäischen Kontrollgruppen (12, 124-127) durchgeführt. Dies zeigte im Hinblick auf die Verteilung der Polymorphismen bei 3 *TP53* Polymorphismen signifikante Unterschiede (Tab. 22).

Betrachtet man den *Intron 2* Polymorphismus wiesen signifikant weniger NNR-Ca Patienten (7,2 %) die seltene Variante des Polymorphismus auf als die Individuen

der Kontrollgruppe (37,3 %) (Tab. 25). Es zeigte sich außerdem, dass signifikant mehr NNR-Ca Patienten Träger der häufigen Variante des Polymorphismus (67,6 %) waren als gesunde Probanden (25,4 %) (Tab. 25). Ein erhöhtes Risiko an einem NNR-Ca zu erkranken scheint daher mit der häufigen Variante des *Intron 2* Polymorphismus verbunden zu sein.

An der Stelle des *Intron 3* Polymorphismus, scheint das Fehlen der 16 Basenpaar langen Insertion mit einem erhöhten Risiko an einem NNR-Ca zu erkranken verbunden zu sein. Über 80 % der NNR-Ca Patienten hatten keine Insertion an der Stelle des *Intron 3* Polymorphismus, wohingegen weniger als 70 % der gesunden Probanden diese Konstellation aufwiesen (Tab. 25). Schon das Vorliegen der Insertion auf nur einem Allel scheint eine protektive Wirkung zu haben. Nur 12 % der NNR-Ca Patienten hatten die Insertion auf einem Allel, dem gegenüber standen 29,5 % der gesunden Individuen der Kontrollgruppe (Tab. 25). Vergleicht man diese Daten mit dem Überleben, scheint die Insertion nicht nur mit einem geringeren Risiko an einem NNR-CA zu erkranken verbunden zu sein, sondern auch einen günstigen Effekt auf das Überleben der betroffenen NNR-Ca Patienten zu haben (Abb. 22E).

Ähnlich verhält es sich bei *Intron 6* (Tab. 25). Beim Überleben zeigte sich bei *Intron 6* ebenfalls ein Trend zum verlängerten Überleben bei Patienten mit dem seltenen Allel des Polymorphismus. Es finden sich außerdem signifikant mehr Individuen mit der häufigen Variante des Polymorphismus unter den NNR-Ca Patienten (82,6 %) als unter den gesunden Probanden der Kontrollgruppe (65,1 %). Dies könnte als Hinweis auf ein erhöhtes Risiko an einem NNR-Ca zu erkranken für Individuen die die häufige Variante des Polymorphismus an der Stelle aufweisen interpretiert werden. Auch hier schient das Vorliegen nur eines Allels mit der seltenen Variante des Polymorphismus das Risiko an einem NNR-Ca zu erkranken zu vermindern.

Bei den anderen Polymorphismen für die Daten von Probanden aus der Bevölkerung vorlagen (*R72P* und *Intron 9*), fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung (Tab. 25). Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Polymorphismen keinen Einfluss auf das Risiko an einem NNR-Ca zu erkranken haben. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl mit dem *Intron 9* Polymorphismus (n=5) und der geringen Zahl der Individuen in der Kontrollgruppe des *R72P* Polymorphismus (n=50) können diese Ergebnisse allerdings nur eingeschränkt bewertet werden.

### 6.2.3 Mehrere *TP53* Polymorphismen

Eine Analyse mehrerer gleichzeitig vorliegender *TP53* Polymorphismen wurde beim NNR-Ca bisher nicht durchgeführt. Von 73 NNR-Ca Patienten waren 34,2 % Träger von einem oder mehreren *TP53* Polymorphismen mit der seltenen Variante des Polymorphismus auf mindestens einem Allel (Abb. 23). Die Daten dieser Studie konnten darüber hinaus zeigen, dass NNR-Ca Patienten mit der selteneren Variante der *TP53* Polymorphismen in 80 % der Fälle Träger von 2 oder mehr Polymorphismen mit mindestens einem Allel der seltenen Variante waren (Kap. 5.2.2d).

Um zu analysieren, ob sich *TP53* Polymorphismen zur Einteilung der NNR-Ca Patienten in Gruppen mit potentiell erhöhtem Risiko für einen maligneren Verlauf der Erkrankung eignen, wurde eine uni- und multivariate Analyse verschiedener Faktoren durchgeführt (Tab. 26). NNR-Ca Patienten mit der seltenen Variante der *TP53* Polymorphismen zeigten in der multivariaten Analyse ein wesentlich schlechteres Überleben als Patienten mit der häufigen Variante der Polymorphismen. Da in dieser Arbeit die p-Werte für das ENSAT Schema (p-Wert <0,0001) und *TP53* Polymorphismen (p-Wert 0,009) beide signifikant waren (Tab. 26), kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der *TP53* Polymorphismen mit dem ENSAT korreliert und möglicher Weise einen Einfluss auf die Tumorbilogie hat. Allerdings ist die ENSAT Stadieneinteilung (p-Wert <0,0001) weiterhin am Besten dazu geeignet, eine Einteilung der Patienten in adäquate Gruppen zu gewährleisten und das damit verbundene Therapiemanagement auf diese Gruppen abzustimmen.

Um herauszufiltern, ob einer der Polymorphismen im besonderen Maß Einfluss auf das Ergebnis der uni- und multivariaten Analyse hatte, wurden zusätzlich vier der Polymorphismen einzeln untersucht (Tab. 27). Dabei zeigte sich durch eine signifikant geringere Überlebenszeit der Patienten mit den seltenen Varianten von *R72P* (p=0,0097) und *Intron 2* (p=0,0176), dass diese Polymorphismen für den Effekt verantwortlich scheinen. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Anzahl der Patienten mit der selteneren Variante der Polymorphismen auf mindestens einem Allel bei den anderen zwei Polymorphismen *Intron 3* (n=8) und *Intron 6* (n=9) eher gering war. Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass die meisten Patienten gleichzeitig Träger vom selteneren Allel im *R72P* und *Intron 2* waren (Abb. 23). Als Ausnahme beim Einfluss der Polymorphismen auf das Überleben ist Patient XXV zu erwähnen, der

Träger der seltenen Variante von *R72P*, *Intron 2*, *Intron 3* und *Intron 6* in homozygoter Form und *P36P* und *Intron 9* in heterozygoter Form war. Unter den Trägern der selteneren Form der *TP53* Polymorphismen wies er die längste Überlebenszeit auf (21,5 Jahre). Bei diesem Patienten scheint das Vorliegen der seltenen Variante der Polymorphismen keinen Einfluss auf das Überleben gehabt zu haben.

Dennoch hat das Vorhandensein der häufigen Variante der untersuchten Polymorphismen im Kollektiv einen signifikant positiven Effekt auf die Überlebenszeit der NNR-Ca Patienten (Tab. 26).

Aus den oben ausgeführten Punkten geht hervor, dass die seltenen Varianten der Polymorphismen einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben scheinen. Dabei scheint die Kombination mehrerer vorliegender Polymorphismen mit dem seltenen Allel eher eine Rolle zu spielen als einzeln vorkommende Polymorphismen. Patienten die alle untersuchten Polymorphismen in der in Europa häufiger vorkommenden Variante aufwiesen, hatten mit einem mittleren Überleben von 73,5 Monaten eine signifikant ( $p=0,013$ ) längere Überlebenszeit.

Daher scheint es sinnvoll weiterführende Untersuchungen nicht auf einen *TP53* Polymorphismus zu beschränken, sondern den Einfluss mehrerer *TP53* Polymorphismen zu analysieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen weisen auf eine Beteiligung der Polymorphismen am Tumorgeschehen hin. Im Hinblick auf *TP53* Polymorphismen erscheint ein allgemeines Screening zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht sinnvoll. Es ist abzuwarten, ob durch eine Erschließung neuer Therapiewege die auf der Wiederherstellung der *p53* Funktion basieren, die Information über das Vorliegen molekularer Veränderungen im *TP53* an Wichtigkeit zunimmt. Damit könnte auch eine umfassende Analyse von *TP53* Polymorphismen, die beim jetzigen Wissensstand nicht sinnvoll erscheint, bei Patienten mit NNR-Ca an Bedeutung gewinnen.

## 7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht *TP53* Keimbahnmutationen und -polymorphismen und ihre Auswirkung auf klinische Faktoren bei einem großen Kollektiv von erwachsenen NNR-Ca Patienten. Damit wurde der Versuch unternommen, die Lücke der Datenlage zu *TP53* Keimbahnveränderungen bei Erwachsenen mit NNR-Ca in einem ersten Schritt zu schließen. Zu diesem Zweck wurde DNS aus Blut und teilweise aus Tumorgewebe von Patienten aus dem Deutschen Nebennierenrindenzinom Register extrahiert und die Exons 2 bis 11 von *TP53* sequenziert. In Fällen bei denen eine Keimbahnmutation identifiziert werden konnte, wurde darüber hinaus der Nachweis der Mutation und eines LOH im Tumorgewebe und die immunhistochemische Färbung von *p53* vorgenommen. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte unter Einbeziehung des klinischen Verlaufs der Krankheit bei den Patienten.

In dieser Arbeit konnten vier NNR-Ca Patienten (3,9 %) mit mindestens einer Keimbahnmutation im *TP53* identifiziert werden, bei den unter 40-jährigen entspricht dies einem Anteil von 13,0 %. Zwei der 5 identifizierten Mutationen traten außerhalb der Hot Spot Region in Exon 10 auf (R337H und I332M). Darüber hinaus konnten 3 der 5 Mutationen zum ersten Mal im NNR-Ca nachgewiesen werden, darunter eine Mutation (I332M) die mit einer zweiten Mutation (R202C) auf demselben Allel kombiniert auftrat. Diese kombinierten Mutationen waren mit einer besonderen Familienanamnese assoziiert, da Mutter und Onkel der Indexpatientin zuvor ebenfalls an einem NNR-Ca verstorben waren. Die Mutationen konnten teilweise auch bei der Mutter und Schwester der Indexpatientin nachgewiesen werden.

Die in Brasilien besonders bei Kindern auftretende R337H Mutation (6, 7) wurde bei einem 71 jährigen Patienten gefunden, der einen gutartigeren Verlauf des NNR-Ca aufwies als die jüngeren Patienten mit *TP53* Keimbahnmutation. Darüber hinaus konnte eine verwandtschaftliche Verbindung des Patienten mit dem brasilianischen Kollektiv ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der Auswertung verschiedener Altersgruppen und den entsprechenden Überlebensdaten der Patienten konnte eine Empfehlung für eine Altersgrenze erstellt werden, unter der ein *TP53* Mutationsscreening erwogen werden sollte (<40 Jahre) (136).

Die Auswertung der Polymorphismen zeigte bei 3 von 5 Polymorphismen eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Genotyp Frequenzen der analysierten *TP53* Polymorphismen (*Intron2*, *Intron3*, *Intron6*). Der Vergleich des Überlebens von NNR-Ca Patienten mit der häufiger vorkommenden Variante der Polymorphismen mit den Patienten mit der selteneren Variante, konnte keine signifikanten Unterschiede beim Überleben zeigen. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Polymorphismen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte (Medianes Überleben: 73,5 Monate bei Patienten mit der häufigen Variante, 19,4 Monate bei Patienten mit der seltenen Variante; HR 0,4; 0,2-0,8 95% CI; p-Wert 0,013).

Diese Daten legen nahe, dass bei erwachsenen Patienten mit NNR-Ca ein *TP53* Screening auf Keimbahnebene sinnvoll sein könnte. Da bei Patienten unter 40 Jahren eine hohe Mutationsrate gefunden wurde (13%), wäre gerade hier die Kenntnis des *TP53* Mutationsstatus von Nutzen, da dies einen unmittelbaren Einfluss auf die Betreuung der Patienten und die familiäre Vorsorge haben könnte. Bevor dies in die klinische Routine übernommen werden kann, müssen jedoch neue Behandlungsstrategien für betroffene Patienten erarbeitet werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Boyle P, Levin B eds. 2008 World Cancer Report 2008. Lyon
2. GBE-Bund 2010 Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Alter, Geschlecht, ICD10. In: gbe-bund, URL: [https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=47785004&nummer=553&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=27192746#SOURCES](https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=47785004&nummer=553&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=27192746#SOURCES) (Stand:02.03.2012)
3. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B, Group GACR, Tumors ENftSoA 2009 Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* 115:243-250
4. Li FP, Fraumeni JF, Jr. 1969 Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71:747-752
5. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. 1990 Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238
6. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9330-9335
7. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB 2001 An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4970-4973
8. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palù G, Boscaro M 2001 Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol* 145:207-212
9. Ide H, Terado Y, Tokiwa S, Nishio K, Saito K, Isotani S, Kamiyama Y, Muto S, Imamura T, Horie S 2010 Novel germ line mutation p53-P177R in adult adrenocortical carcinoma producing neuron-specific enolase as a possible marker. *Jpn J Clin Oncol* 40:815-818
10. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC 2005 Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2976-2981
11. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LL 2005 Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res* 37:231-235
12. Ignaszak-Szczepaniak M, Horst-Sikorska W, Sawicka J, Kaczmarek M, Slomski R 2006 The TP53 codon 72 polymorphism and predisposition to adrenocortical cancer in Polish patients. *Oncol Rep* 16:65-71

13. Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J 2007 Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res* 13:844-850
14. Wooten MD, King DK 1993 Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer* 72:3145-3155
15. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C 2001 Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* 25:891-897
16. Beckwith J 1963 Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele, hyperplasia of kidneys and pancreas, and Leydig-cell hyperplasia: Another Syndrome? In: Western Society for Pediatric Research. Los Angeles
17. Wiedemann HR 1964 [FAMILIAL MALFORMATION COMPLEX WITH UMBILICAL HERNIA AND MACROGLOSSIA--A "NEW SYNDROME"?]. *J Genet Hum* 13:223-232
18. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA 2000 Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88:711-736
19. Koschker AC, Fassnacht M, Hahner S, Weismann D, Allolio B 2006 Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114:45-51
20. Libè R, Fratticci A, Bertherat J 2007 Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer* 14:13-28
21. Weiss LM 1984 Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 8:163-169
22. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH 1979 Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol* 72:390-399
23. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ 1985 Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer* 55:766-773
24. Bergenstal D, Lipsett M, Moy R, Hertz R 1959 Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in men by o,p-DDD. In: 341
25. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A 2007 Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. In: *N Engl J Med. United States: 2007 Massachusetts Medical Society.*; 2372-2380
26. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L 2005 Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. In: *Endocr Relat Cancer. England*; 657-666
27. Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Grondal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B 2000 Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of

- adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol* 11:1281-1287
28. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M 2008 Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2057-2062
  29. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M 2010 Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* 162:349-356
  30. Gross DJ, Munter G, Bitan M, Siegal T, Gabizon A, Weitzen R, Merimsky O, Ackerstein A, Salmon A, Sella A, Slavin S, Israel Glivec in Solid Tumors Study G 2006 The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocr Relat Cancer* 13:535-540
  31. Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, Kenn W, Hahner S, Allolio B, Flentje M 2009 Radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer* 115:2816-2823
  32. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B, Medscape 2011 Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol* 7:323-335
  33. Lane DP, Crawford LV 1979 T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263
  34. Linzer DI, Levine AJ 1979 Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. In: *Cell. United States*; 43-52
  35. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ 1979 Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:2420-2424
  36. Kress M, May E, Cassingena R, May P 1979 Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31:472-483
  37. Hainaut P, Wiman K eds. 2007 25 years of p53 research. Netherlands
  38. Levine AJ 1997 p53, the cellular gatekeeper for growth and division. In: *Cell. United States*; 323-331
  39. David-Pfeuty T, Chakrani F, Ory K, Nouvian-Dooghe Y 1996 Cell cycle-dependent regulation of nuclear p53 traffic occurs in one subclass of human tumor cells and in untransformed cells. *Cell Growth Differ* 7:1211-1225
  40. Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G 1996 Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* 16:1126-1137
  41. Pecorino L 2005 *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Oxford
  42. Levine AJ, Hu W, Feng Z 2006 The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13:1027-1036
  43. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC 1991 p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53
  44. Levine AJ, Momand J, Finlay CA 1991 The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-456

45. Harris CC, Hollstein M 1993 Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329:1318-1327
46. Lin J, Teresky AK, Levine AJ 1995 Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* 10:2387-2390
47. Epstein CB, Attiyeh EF, Hobson DA, Silver AL, Broach JR, Levine AJ 1998 p53 mutations isolated in yeast based on loss of transcription factor activity: similarities and differences from p53 mutations detected in human tumors. *Oncogene* 16:2115-2122
48. Bullock AN, Henckel J, Fersht AR 2000 Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* 19:1245-1256
49. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP 1991 Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699-1703
50. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL 1990 Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. In: *Lancet*. England; 675-679
51. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Evans TR, Sansom OJ 2010 Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 246-251
52. Quek ML, Quinn DI, Daneshmand S, Stein JP 2003 Molecular prognostication in bladder cancer--a current perspective. *Eur J Cancer* 39:1501-1510
53. Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S 2004 Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev* 30:451-459
54. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M 2007 Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622-629 R15
55. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P 2002 The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19:607-614
56. Mateu MG, Fersht AR 1998 Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J* 17:2748-2758
57. Kawaguchi T, Kato S, Otsuka K, Watanabe G, Kumabe T, Tominaga T, Yoshimoto T, Ishioka C 2005 The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation library. *Oncogene* 24:6976-6981
58. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Jr., Li FP 1998 Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 90:606-611
59. Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni J, Jr., Li FP, Friend SH 1995 Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet* 56:608-615

60. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D, et al. 1994 Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298-1304
61. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, Evans DG, Birch JM 1997 Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 57:3245-3252
62. Evans DG, Birch JM, Thorneycroft M, McGown G, Laloo F, Varley JM 2002 Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 39:941-944
63. Eeles RA 1995 Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-124
64. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugieres L, Pages S, Feunteun J, Bonaïti-Pellie C 2001 Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 38:43-47
65. Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P 2010 Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol* 22:64-69
66. Laloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, Antoniou A, Hartley R, Shenton A, Seal S, Bulman B, Howell A, Evans DG 2006 BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer* 42:1143-1150
67. Ginsburg OM, Akbari MR, Aziz Z, Young R, Lynch H, Ghadirian P, Robidoux A, Londono J, Vasquez G, Gomes M, Costa MM, Dimitrakakis C, Gutierrez G, Pilarski R, Royer R, Narod SA 2009 The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30. *Fam Cancer* 8:563-567
68. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, Caron O, Bressac-de Paillerets B, Berthet P, Dugast C, Bonaïti-Pellie C, Stoppa-Lyonnet D, Frébourg T 2009 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol* 27:e108-109; author reply e110
69. Knudson AG, Jr. 1971 Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823
70. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P 2010 TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001008
71. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR 1991 Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5006-5010
72. Wikipedia 2011 Polymorphism. In: Wikipedia, URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymorphismus> (Stand 02.03.2012)
73. Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, Vesprini D, Abrahamson J, Lerman C, Godwin A, Moslehi R, Olipade O, Brunet JS, Stickeler E, Kieback DG, Kreienberg R, Weber B, Narod SA, Runnebaum IB 1999 Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. *Br J Cancer* 81:179-183
74. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F 2004 A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. In: *Oncogene*. England; 1954-1956

75. Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F 2008 Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* 8:32
76. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, Donati V, Fontanini G 2008 Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. In: *Cancer Invest. United States*; 168-172
77. Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B 1993 Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* 8:1703-1705
78. Whibley C, Pharoah P, Hollstein M 2009 p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9:95-107
79. Strauss BS 2000 Role in tumorigenesis of silent mutations in the TP53 gene. In: *Mutat Res. Netherlands*; 93-104
80. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM 2007 A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. In: *Science. United States*; 525-528
81. Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, Daskalogianni C, Maslon MM, Naski N, Bourougaa K, Calvo F, Fahraeus R 2008 P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. In: *Nat Cell Biol. England*; 1098-1105
82. Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC 1993 Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet* 53:752-759
83. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV 1987 Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7:961-963
84. Feng L, Hollstein M, Xu Y 2006 Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. In: *Cell Cycle. United States*; 2812-2819
85. Kurihara A, Nagoshi H, Yabuki M, Okuyama R, Obinata M, Ikawa S 2007 Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. In: *Genes Cells. England*; 853-861
86. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C 2003 Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 8424-8429
87. Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME 2005 The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. In: *J Biol Chem. United States*; 24245-24251
88. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L 1994 Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266-270
89. Sjalander A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G 1996 p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 46:41-48

90. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M 2003 The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. In: *Nat Genet. United States*; 357-365
91. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breyskens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X 2006 iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. In: *Nat Genet. United States*; 1133-1141
92. NCBI 2012 p53 codon 72 polymorphism cancer risk. In: *Pubmed*, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=p53%20codon%2072%20polymorphism%20cancer%20risk> (Stand: 02.03.2012)
93. 2006 Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. In: *J Natl Cancer Inst. United States*; 1382-1396
94. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT 2007 P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer* 121:1481-1486
95. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS 2003 TP53 polymorphisms and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis* 18:377-385
96. Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hogervorst FB, Kluijft I, Sijmons RH, Aalfs CM, Wagner A, Ausems MG, Hoogerbrugge N, van Asperen CJ, Gomez Garcia EB, Meijers-Heijboer H, Ten Kate LP, Menko FH, van 't Veer LJ 2010 TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet* 47:421-428
97. Varley JM, Chapman P, McGown G, Thorncroft M, White GR, Greaves MJ, Scott D, Spreadborough A, Tricker KJ, Birch JM, Evans DG, Reddel R, Camplejohn RS, Burn J, Boyle JM 1998 Genetic and functional studies of a germline TP53 splicing mutation in a Li-Fraumeni-like family. *Oncogene* 16:3291-3298
98. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P 2007 The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96-102
99. Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MR, Giles GG, Hopper JL, Southey MC 2010 Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Res* 70:4795-4800
100. Chompret A, Brugières L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichy F, Abel A, Hua D, Ligot L, Dondon MG, Bressac-de Paillerets B, Frébourg T, Lemerle J, Bonaïti-Pellié C, Feunteun J 2000 P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 82:1932-1937
101. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SB, Boffetta P, Ribeiro RC 2006 Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 43:91-96

102. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW 2002 A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 9:12-16
103. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S, Tavtigian SV, Hainaut P, Achatz MI 2010 Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 31:143-150
104. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, Chrousos GP 1994 p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 78:790-794
105. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU 1993 p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer* 54:408-410
106. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG 2002 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3467-3474
107. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M 1996 Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 56:4219-4223
108. Hainaut P 2002 Tumor-specific mutations in p53: the acid test. *Nat Med* 8:21-23
109. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, Evans DG, Harris M, Kelsey AM, Birch JM 1999 Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 65:995-1006
110. Hahn M, Serth J, Fislage R, Wolfes H, Allhoff E, Jonas V, Pingoud A 1993 Polymerase chain reaction detection of a highly polymorphic VNTR segment in intron 1 of the human p53 gene. *Clin Chem* 39:549-550
111. Jones MH, Nakamura Y 1992 Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 5:89-90
112. Turbett GR, Barnett TC, Dillon EK, Sellner LN 1996 Single-tube protocol for the extraction of DNA or RNA from paraffin-embedded tissues using a starch-based adhesive. *Biotechniques* 20:846-850, 852-843
113. Sambrook J 2001 *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. ed: Cold Spring Harbour Press
114. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H 1986 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
115. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA 1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
116. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467

117. Wikipedia 2011 DNA-Sequenzierung: Didesoxymethode nach Sanger In: Wikipedia, URL: [http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung#Didesoxymethode\\_nach\\_Sanger](http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung#Didesoxymethode_nach_Sanger) (Stand 02.03.2012)
118. NCI o.J. Sequence View NT\_010718:7174180-7174729 Chr17:7570806-7571355. In: NCI, URL: <http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/sequenceSubmit.do> (Stand 03.02.2012)
119. Warneford SG, Witton LJ, Townsend ML, Rowe PB, Reddel RR, Dalla-Pozza L, Symonds G 1992 Germ-line splicing mutation of the p53 gene in a cancer-prone family. *Cell Growth Differ* 3:839-846
120. Marutani M, Tonoki H, Tada M, Takahashi M, Kashiwazaki H, Hida Y, Hamada J, Asaka M, Moriuchi T 1999 Dominant-negative mutations of the tumor suppressor p53 relating to early onset of glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 59:4765-4769
121. Shiraishi K, Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Sakayori M, Ishida T, Takeda M, Kanamaru R, Ohuchi N, Ishioka C 2004 Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *J Biol Chem* 279:348-355
122. Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Aprile A, Inga A, Tada M, Menichini P, Abbondandolo A, Fronza G 2003 Characterization of the p53 mutants ability to inhibit p73 beta transactivation using a yeast-based functional assay. *Oncogene* 22:5252-5260
123. Resnick MA, Inga A 2003 Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9934-9939
124. Pleasants L, Hansen M 1994 Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. *Hum Genet* 93:607-608
125. Tan X, Nieters A, Hoffmeister M, Beckmann L, Brenner H, Chang-Claude J 2007 Genetic polymorphisms in TP53, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of colorectal cancer: evidence for gene-environment interaction? *Pharmacogenet Genomics* 17:639-645
126. De Feo E, Persiani R, La Greca A, Amore R, Arzani D, Rausei S, D'Ugo D, Magistrelli P, van Duijn C, Ricciardi G, Boccia S 2009 A case-control study on the effect of p53 and p73 gene polymorphisms on gastric cancer risk and progression. *Mutat Res* 675:60-65
127. Graziani D, Romagnoli S, Cassani B, Alfano R, Roncalli M, Coggi G 1999 An Ava I polymorphism in the TP53 gene. *Mol Cell Probes* 13:393-395
128. Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D 1994 High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst* 86:1707-1710
129. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA 2003 Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63:6643-6650
130. Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P 2008 Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a

- breast cancer screening program in Southern Brazil. In: *Cancer Lett. Ireland*; 21-25
131. Hermsen IG, Groenen YE, Dercksen MW, Theuws J, Haak HR 2010 Response to radiation therapy in adrenocortical carcinoma. *J Endocrinol Invest* 33:712-714
  132. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I, Chiappori A, Thompson P, Williams N, Bepler G, Simon G, Janssen W, Lee JH, Menander K, Chada S, Gabrilovich DI 2006 Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. In: *Clin Cancer Res. United States*; 878-887
  133. Osorio A, Martinez-Delgado B, Pollan M, Cuadros M, Urioste M, Torrenteras C, Melchor L, Diez O, De La Hoya M, Velasco E, Gonzalez-Sarmiento R, Caldes T, Alonso C, Benitez J 2006 A haplotype containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Hum Mutat* 27:242-248
  134. Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S, Shields PG, Modali R, Turner BC 2000 Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res* 60:1062-1069
  135. Marsh A, Spurdle AB, Turner BC, Fereday S, Thorne H, Pupo GM, Mann GJ, Hopper JL, Sambrook JF, Chenevix-Trench G 2001 The intronic G13964C variant in p53 is not a high-risk mutation in familial breast cancer in Australia. *Breast Cancer Res* 3:346-349
  136. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M, Willenberg HS, Quinkler M, Reisch N, Zink M, Allolio B, Hahner S 2011 TP53 Germline Mutations in Adult Patients with Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*

## DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bruno Allolio möchte ich besonders für seine wissenschaftliche Betreuung und fachliche Unterstützung danken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Sein stetiges Interesse und seine Begeisterung für das Thema haben mir immer wieder neue Bereiche erschlossen.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten, bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Priv.-Doz. Dr. med. Stefanie Hahner, die mir die Gelegenheit bot, im endokrinologischen Labor tätig zu werden und mir den Freiraum gab, eigene Ideen umzusetzen und mich mit konstruktiver Kritik inhaltlich begleitete.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Martin Fassnacht bedanken, durch dessen finanzielle Unterstützung mir die Teilnahme an zahlreichen Kongressen ermöglicht wurde.

Ganz besonders danke ich Dr. rer. nat. Britta Heinze für ihr außergewöhnliches Engagement, zahlreiche Tipps und hervorragende methodische Unterstützung. Dipl. Biol. Silviu Sbiera danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen technischen Fragen. Mein Dank gilt weiterhin Dr. med. Cristina Ronchi für die Einführung in die statistische Datenanalyse. Außerdem möchte ich mich bei Luitgard Krauss für ihre technische Unterstützung bei der Anfertigung von Paraffinschnitten und Immunhistologie bedanken. Martina Zink danke ich für die Einführung in die experimentellen Arbeitsweisen des Labors, ihr offenes Ohr und ihre Freundschaft.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des endokrinologischen Labors und der endokrinologischen Studienambulanz, die durch ihre ständige Hilfsbereitschaft und gute Laune dazu beitrugen, dass mir die Arbeit in der Forschungsgruppe großen Spaß gemacht hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir durch unermüdliche Unterstützung meinen Weg ermöglicht haben.