

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

**Expression und prognostische Bedeutung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und
CXCR7 bei malignen Nebennierentumoren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Irina Chifu
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2020

Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Korreferent/Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. N. Schlegel

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

Die Promovendin ist Ärztin

1. Einleitung	
1.1. Die Nebenniere.....	1
1.2. Das Nebennierenkarzinom	1
1.2.1. Epidemiologie, Klinik	1
1.2.2. Pathogenese.....	1
1.2.3. Diagnostik und Staging.....	2
1.2.4. Therapie.....	3
1.2.5. Prognose und Follow-up.....	4
1.3. Phäochromozytome und Paragangliome.....	6
1.3.1. Definition und Epidemiologie.....	6
1.3.2. Klinik.....	6
1.3.3. Pathogenese.....	6
1.3.4. Diagnose.....	7
1.3.5. Dignitätsabklärung.....	7
1.3.6. Therapie.....	8
1.3.7. Prognose und Follow-up.....	8
1.4. Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	8
1.4.1. Allgemeine Informationen	8
1.4.2. Die CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse.....	9
1.4.2.1. Die Rolle der CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse in der normalen Physiologie.....	9
1.4.2.2. Die Rolle der CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse in der Karzinogenese.....	10
1.4.3. CXCR4 und CXCR7 als therapeutische Zielstrukturen.....	11
1.4.4. Die Expression von CXCR4 und CXCR7 in der normalen Nebenniere und in Nebennierentumoren.....	13
1.4.5. Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Geräte.....	16
2.2. Materialien.....	16
2.3. Puffer und Lösungen.....	17
2.4. Kits.....	17
2.5. Methoden.....	18

2.5.1. Immunhistochemie.....	18
2.5.1.1. Protokoll.....	18
2.5.1.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	19
2.5.2. Herstellung von cDNA aus zuvor Kryofixiertem Nebennierenkarzinom- und Phäochromozytomgewebe.....	19
2.5.3. NCI-H295 Zelllinie.....	20
2.5.3.1. Kultivierung der NCI-H295 Zellen.....	20
2.5.3.2. RNA-Isolierung aus NCI-H295 Zellen.....	21
2.5.4. qRT PCR-Analyse des Chemokinrezeptorprofils.....	21
2.5.5. Sammlung klinischer Daten.....	22
2.5.6. Statistische Auswertung.....	22
3. Ergebnisse.....	23
3.1. mRNA-Expression von Chemokinrezeptoren in der normalen Nebenniere und in Nebennierentumoren – Ergebnisse der quantitativen PCR (Realtime-PCR).....	23
3.2. Charakterisierung der Patientenkohorten, deren Tumorgewebeschnitte mittels Immunhistochemie untersucht wurden.....	24
3.2.1. Nebennierenkarzinom-Kohorte.....	24
3.2.2. Phäochromozytom-Kohorte.....	25
3.3. Immunhistochemische Charakterisierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 im Nebennierenkarzinom.....	27
3.3.1. Beschreibung der Expressionsintensität und des Verteilungsmuster.....	27
3.3.2. Korrelationen der immunhistochemischen Ergebnisse mit klinischen Daten zum Krankheitsverlauf im Nebennierenkarzinom.....	29
3.3.3. Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse.....	35
3.4. Immunhistochemische Charakterisierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 im Phäochromozytom.....	38
4. Diskussion.....	40
4.1. Beschreibung des Chemokinrezeptorprofils in Nebennierentumoren.....	40
4.2. Pathophysiologische Relevanz von CXCR4 und CXCR7 in Nebennierenkarzinomen.....	42
4.3. Pathophysiologische Relevanz von CXCR4 und CXCR7 in Phäochromozytomen.....	47

4.4.Möglichkeit einer Chemokinrezeptor-gerichteten Therapie in Nebennierentumoren.....	48
4.4.1. NN-Karzinom.....	48
4.4.2. Phäochromozytom.....	49
5. Zusammenfassung.....	50
6. Literaturverzeichnis.....	51
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	61

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Die Nebenniere

Die paarig angelegten Nebennieren (NNR) sind endokrine Drüsen, die sich retroperitoneal am oberen Nierenpol befinden. Die Nebenniere vereint histologisch und funktionell zwei unterschiedliche Organe: die Nebennierenrinde und das Nebennierenmark. Die Nebennierenrinde, der Ort der adrenalen Steroidbiosynthese, besteht von außen nach innen aus drei Schichten: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. In der Zona glomerulosa werden die Mineralokortikoide (Aldosteron und Desoxykortikosteron), in der Zona fasciculata werden die Glukokortikoide (v.a. Cortison) und in der Zona reticularis werden die Androgene bzw. Androgenvorläufersteroid (Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteron Sulfat, Androstendion und Testosteron) synthetisiert. Das Nebennierenmark entsteht aus dem vegetativen Nervensystem und bildet Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin).

1.2. Das Nebennierenkarzinom

1.2.1. Epidemiologie, Klinik

Die extrem seltenen Nebennierenkarzinome (NN-Karzinom) (Inzidenz 1-2 Fälle/Mio./Jahr) gehen mit einer oftmals schlechten Prognose einher¹⁻³. Die Erstdiagnose erfolgt häufig in einem fortgeschrittenen Stadium¹⁻³. Bis zu 70% der Patienten, bei denen initial eine vollständige Chirurgische Entfernung des Tumors gelingt, weisen ein Rezidiv innerhalb der ersten 3-5 postoperativen Jahren auf⁴. Bei ca. einem Drittel der Patienten bestehen bei Erstmanifestation unspezifische Symptome wie Rückenschmerzen und bei einem Drittel erfolgt die Diagnose des NN-Karzinoms inzidentell¹⁻³. Hormonaktive NN-Karzinome können aufgrund eines klinisch manifesten Cortisol- und/oder Androgenexzesses, seltener auch eines Östrogenexzesses auffallen¹⁻³.

1.2.2. Pathogenese

Die Pathogenese des NN-Karzinoms konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden². p53-Keimbahnmutationen lassen sich bei 50-80% der Kinder und 3-7% der Erwachsenen mit NN-Karzinom nachweisen¹⁻⁴. Die Überexpression von IGF-2 (Insulin like Growth

Factor 2) im Rahmen des Beckwith-Wiedemann Syndroms, die konstitutionelle Aktivierung des Wnt/ β -catenin Signalwegs, sowie die Inaktivierung des APC (Adenomatous polyposis coli) Tumorsuppressorgens spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des NN-Karzinoms²⁻⁴. Zu den seltenen prädisponierenden Faktoren gehören die Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN 1), das Lynch Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die Neurofibromatose Typ 1 (NF1), veränderte microRNA Expressionen, epigenetische Veränderungen, Chromosomenabberationen und MicroRNA Mis-targetings¹⁻³.

Der Nachweis von subkapsulären Stamm-/Progenitorzellen in tierischen Nebennieren macht auch die Theorie einer adrenalen Tumorstammzellnische plausibel¹. Diese Theorie basiert hauptsächlich auf zwei Beobachtungen: 1) Die komplette Regeneration der Nebennierenrinde in Ratten nach einseitiger Nebennierenenukleation und die zentripetale Differenzierung der Ratten-Nebennierenzonen stammt aus subkapsulären proliferativen Zellen und 2) Das Überleben und die Differenzierung dieser subkapsulären Stamm-/Progenitorzellen wird über dieselben Signalwege (IGF-2, Wnt/ β -catenin, cAMP/PKA) reguliert, die häufig in NN-Karzinomen alteriert sind¹. Bisher konnte allerdings keine nebennierenspezifische Stammzelle isoliert bzw. anhand von spezifischen Markern näher beschrieben werden¹.

1.2.3. Diagnostik und Staging

Die initiale Evaluation umfasst eine Schnittbildgebung und eine hormonelle Abklärung⁵. Die Hormondiagnostik muss insbesondere ein Phäochromozytom ausschließen und die Notwendigkeit einer perioperativen Substitutionstherapie mit Glukokortikoiden im Falle eines cortisolproduzierenden Tumors rechtzeitig festlegen⁵. Das Steroidprofil dient zusätzlich der Erfassung geeigneter Parameter für eine frühzeitige laborchemische Rezidiverkennung⁵.

Biopsien werden nur im Falle einer positiven Anamnese für extraadrenale Malignome zum Ausschluss einer Metastase des bekannten Malignoms empfohlen⁵.

Histopathologische Merkmale des NN-Karzinoms sind die positive Expression von SF-1 (steroidogenic factor 1) und ein Weiss-Score >3 ^{5,6}. Für die Prognoseeinschätzung wird i.d.R. die Expression des Tumorproliferationsindex Ki67 analysiert^{5,7}. Ab einem Ki67 $>10\%$ steigt das Rezidivrisiko signifikant an⁷.

Das Staging erfolgt anhand des weltweit anerkannten ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) Staging Systems (Tabelle 1)^{3,8}.

Tabelle 1. ENSAT Staging System für das NN-Karzinom^{3,8}

Staging Systeme	ENSAT
Stage I	T1, N0, M0
Stage II	T2, N0, M0
Stage III	T1-2, N1, M0 T3-4, N0, M0
Stage IV	T1-4, N0-1, M1

T1: Tumorgröße ≤ 5 cm, T2: Tumorgröße > 5 cm, T3: Tumorausbreitung ins umgebende Gewebe oder in lokoregionalen Lymphknoten, T4: Tumorinvasion in benachbarte Organe (ENSAT: auch Tumorthrombus in der Vena cava und Nierenvenen) oder Vorhandensein von Metastasen, N0: keine positiven Lymphknoten, N1: positive Lymphknoten, M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasen

1.2.4. Therapie

Die einzige kurative Therapie des NN-Karzinoms ist die komplette Resektion des Tumors⁵. Patienten mit einem nicht resektablen Tumorrezidiv und Patienten mit metastasiertem inoperablem oder inkomplett resektablem NN-Karzinom erhalten i.d.R. eine systemische Therapie mit Mitotane und Zytostatika⁵. Mitotane (o,p'-DDD, Lysodren®) ist zurzeit die einzige medikamentöse Therapie, die von der FDA (Food and Drug Administration) und EMA (European Medicine Executive Agency) für die Behandlung des NN-Karzinoms zugelassen wurde^{3,5}. Mitotane hemmt die mitochondriale Atmungskette und die CYP11A1- und CYP11B1-vermittelte Steroidsynthese und löst zusätzlich einen lipotoxischen Stress im endoplasmatischen Retikulum durch die Inhibition des SOAT1 Enzyms aus^{2,9}. Dosisanpassungen erfolgen abhängig von der Verträglichkeit und regelmäßigen Blutspiegelmessungen (Zielwert 14-20 mg/L)^{2,3}. Die häufigsten Nebenwirkungen umfassen gastrointestinale und neurologische Beschwerden und stellen häufig den Grund für einen Therapieabbruch dar².

Da die adrenolytische Wirkung von Mitotane auch das normale Nebennierenrindengewebe betrifft, muss eine Substitutionstherapie mit Hydrocortison eingeleitet werden².

In fortgeschrittenen Stadien empfehlen die Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des NN-Karzinoms die Chemotherapie nach EDP-M Schema (Etoposid-Doxorubicin und Cisplatin + Mitotane) als Erstlinientherapie basierend auf den Ergebnissen der einzigen

randomisierten Phase 3 Studie (FIRM-ACT Studie) für lokal fortgeschrittene und metastasierte NN-Karzinome⁵. Zweitlinientherapien umfassen Streptozotocin, Gemcitabine/Capecitabine sowie Therapien im Rahmen klinischer Studien oder individueller Ansätze^{5,10}.

Die verfügbaren zytotoxischen Therapien sind jedoch unbefriedigend hinsichtlich der angestrebten Erfolgsrate angesichts einer medianen Überlebenszeit von ca. 15 Monaten unter der Erstlinientherapie mit EDP-M¹¹. Die beeinträchtigte Wirkung der Zytostatika wird unter anderem auf die tumoröse Überexpression der Effluxpumpe Multidrug-Resistance-Protein 1 zurückgeführt¹²⁻¹⁴. Auch verschiedene Therapieversuche mittels Inhibitoren unterschiedlicher im NN-Karzinom alterierten Signalwege wie IGF-1, mTOR, EGFR oder VEGF erbrachten nur in Einzelfällen einen Zusatznutzen und deuten darauf hin, dass das Targeting eines einzigen Signalwegs unzureichend ist¹⁵⁻²⁴.

Weitere Therapieversuche umfassen auch Radionuklidtherapien. IMTO ist ein Derivat des Metomidats und bindet mit hoher Affinität die adrenokortikale 11 β -Hydroxylase und Aldosteron-Synthase¹⁰. Die Wirksamkeit einer Radionuklidtherapie mit ¹³¹I-IMTO konnte bei 11 Patienten mit erhöhtem Tracer Uptake gezeigt werden¹⁰. Eine partielle Remission über 26 Monate konnte bei einer Patientin und eine Stabilisierung der Erkrankung bei weiteren fünf Patienten erzielt werden¹⁰. Die Anwendbarkeit einer solchen Therapie ist allerdings durch die häufig inhomogene Tracer-Aufnahme, eine zu geringe Tracerverweildauer im Tumorgewebe oder die oft schnelle Progression der Tumorerkrankungen auf einzelne Fälle beschränkt¹⁰.

1.2.5. Prognose und Follow-up

Die prognostische Stratifizierung der NN-Karzinome ist entscheidend für die klinische Behandlung und Planung der Nachsorge und wird aktuell hauptsächlich basierend auf unspezifischen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Resektabilität und Ki67 eingeschätzt⁵. Die drei prognostischen Kriterien beeinflussen sich stark gegenseitig. Gemäß der ENSAT Klassifikation liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei 66-82% für Stadium I, 60% für Stadium II, 24-50% für Stadium III und 0-17% für Stadium IV^{2,25}. Diese wird allerdings im Falle inkompletter Tumoresektion unabhängig vom Stadium bis auf 15-20% reduziert²⁵. Der Ki67 Proliferationsindex wurde anhand einer retrospektiven Analyse an zwei großen Kohorten von insgesamt 569 Patienten mit

lokalisierten Tumorstadien (ENSAT I-III) und R0-Resektionsstatus als wichtigster prognostischer Parameter für diese Patientensubgruppe dargestellt⁷. Basierend auf der hoch signifikanten Korrelation der Ki67 Expression mit der Rezidivrate und dem Gesamtüberleben wurde ein zusätzliches Klassifikationssystem zur Prognoseeinschätzung dieser Tumorsubgruppe vorgeschlagen, welches die NN-Karzinome in Grad 1 (Ki67 < 10%, „risikoarm“), Grad 2 (Ki67 10-19%, „mittleres Risiko“) und Grad 3 (Ki67 ≥ 20%, „Hochrisiko-Patienten“) unterteilt⁷. In fortgeschrittenen Stadien (ENSAT III und IV) hingegen, scheint Ki67 keine entscheidende Rolle zu spielen²⁶. Die Prognose dieser Patientensubgruppe hängt hauptsächlich vom Tumorstadium und insbesondere von der Zahl der Metastasen bei Erstdiagnose ab²⁶. Darüber hinaus, wird die an sich technisch relativ unkomplizierte immunhistochemische Evaluation der Ki67 Expression stark von dem angewandten Protokoll und der intra- und inter-observer-Reproduzierbarkeit beeinflusst, auch wenn erfahrene Pathologen hinzugezogen werden⁴. Der Mangel an einem standardisierten Verfahren diesbezüglich stellt die Ergebnisse und die Prognoseeinschätzung anhand der Ki67 Expression in manchen Fällen als fraglich dar⁴.

Sonstige klinische Parameter wie Alter oder Hormonstatus konnten nur in bestimmten Patientensubgruppen als prognostisch relevant identifiziert werden und werden eher als „Confounder“ betrachtet⁴.

Die Prognose des NN-Karzinoms kann auch mit unterschiedlichen molekularen Markern wie Genexpressionsprofile, genetische Mutationen, chromosomale Alterationen, Methylierungsmuster und Expression von MicroRNAs korreliert werden und bildet die Grundlage für zielgerichtete Therapien⁴. Die Vielfalt und die heterogene Verteilung dieser molekularen Marker erklären teilweise die stark variable Prognose des NN-Karzinoms und erschweren die Einteilung der NN-Karzinome in zuverlässigen prognostisch relevanten Subgruppen⁴.

Bislang existiert kein gut standardisiertes System für eine zuverlässige Prognoseeinschätzung beim NN-Karzinom. Da in 30 bis 70 % der tumorfreien Patienten ein Rezidiv innerhalb der ersten 3 bis 5 Jahre auftreten kann, werden diese Patienten engmaschig alle 3-6 Monate innerhalb der ersten 5 Jahre und anschließend einmal jährlich über insgesamt 10 Jahre beobachtet^{4,5}. Verlaufskontrollen umfassen Klinik,

Hormondiagnostik und bildmorphologische Verfahren⁵. Verlaufskontrollen fortgeschrittener NN-Karzinome unter Chemotherapie erfolgen i.d.R. alle 3 Monate⁵.

1.3. Phäochromozytome und Paragangliome

1.3.1. Definition und Epidemiologie

Die WHO definiert Phäochromozytome als neuroendokrine Tumoren, die in 80% der Fälle von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks abstammen und durch einen Katecholaminexzess manifest werden^{27,28}. Hormoninaktive Paragangliome des Kopf-Hals-Bereichs werden als Paragangliome im engeren Sinne beschrieben^{27,28}.

Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene (Inzidenz 2-8 Fälle/Mio./Jahr) überwiegend benigne Tumoren^{27,28}. Maligne Tumoren kommen jedoch in 10-15% der Phäochromozytome und in 15-35% der Paragangliome vor^{27,28}.

1.3.2. Klinik

Weniger als 1% der symptomatischen hypertensiven Patienten leiden an einem Phäochromozytom²⁹. Das Median-Alter bei Diagnose liegt bei 43 Jahren²⁸. Die Klinik hängt vom Ausmaß und der Art der Katecholamin-Sekretion ab^{27,28}. Das Leitsymptom eines Phäochromozytoms bleibt die hypertensive Entgleisung, die i.d.R. paroxysmal auftritt und durch verschiedene Faktoren wie z.B. Steigerung des abdominellen Drucks durch Miktion, Medikamente (Metoclopramid, Betablocker, Antiemetika), oder tyraminhaltige Lebensmitteln ausgelöst werden kann²⁷⁻²⁹. 10-15% der Patienten bleiben jedoch asymptomatisch, worauf die verzögerte Diagnose und die Entstehung kardiovaskulärer Spät komplikationen zurückzuführen sind²⁷. Die typische Trias von anfallsartigen Palpitationen, Kopfschmerzen und Schweißausbrüchen wird nur bei ca. 25% der Patienten beobachtet^{27,28}.

1.3.3. Pathogenese

Mindestens 35% der Phäochromozytome/Paragangliome sind mit Keimbahnmutationen verbunden²⁸. Ein jüngeres Alter bei Diagnose und multiple extraadrenale Tumoren werden mit einer hereditären Erkrankung assoziiert^{29,30}. Die am häufigsten mit Phäochromozytomen/Paragangliomen assoziierten Syndrome sind Von Hippel-Lindau

(VHL), multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN 2), neurofibromatose Typ 1 (NF 1) und das familiäre Paraganglion-Syndrom^{29,30}.

1.3.4. Diagnose

Da die Prävalenz der Phäochromozytome bei Hypertonikern niedrig ist, werden nur diejenige Patienten gescreent, deren Anamnese und Klinik auf eine sekundäre Hypertonie hinweisen. Die Diagnostik erfolgt stufenweise und umfasst den biochemischen Nachweis des Katecholamin-Exzesses und die gezielte Lokalisierung des Tumors²⁷. Die Bestimmung von Metanephrinen und Normetanephrinen im Plasma bzw. im angesäuerten 24-h-Urin ist aufgrund hoher Sensitivität (95-99%) und Spezifität (90%) die Methode der Wahl für den biochemischen Nachweis eines Katecholamin-Exzesses³¹⁻³⁵. Die Lokalisationsdiagnostik erfolgt mittels Kontrastmittel CT des Abdomens und Beckens, welche um Aufnahmen von Thorax und Hals ergänzt werden sollten, falls kein abdomineller/pelviner Tumor dargestellt werden kann³⁵.

Eine genetische Diagnostik sollte allen Patienten mit einer positiven Familienanamnese, jungem Alter bei Diagnose, klinischen Merkmalen eines typischen Syndroms oder multifokalen oder bilateralen Tumoren angeboten werden³⁵. SDHB, SDHD, VHL, NF1 und RET sind die Gene, die am häufigsten von Keimbahnmutationen betroffen werden^{35,36}. SDHB-Mutationen sind mit höherer Wahrscheinlichkeit eines malignen Phäochromozytoms vergesellschaftet^{35,37}. Zur Vermeidung irrelevanter Diagnostik sowie unnötiger Kosten sollte immer ein auf die Klinik und Biochemie bezogener diagnostischer Algorithmus berücksichtigt werden³⁵.

1.3.5. Dignitätsabklärung

Die WHO definiert ein malignes Phäochromozytom/Paragangliom durch das Vorhandensein von Fernmetastasen im nicht-chromaffinen Gewebe^{37,38}. Hier spielt die Lokalisationsdiagnostik die Hauptrolle bei laborchemisch gesichertem Phäochromozytom/Paragangliom^{35,38}. Ein lokalisierter Tumor schließt jedoch einen malignen Prozess bzw. das Auftreten von Metastasen oder eines Rezidivs im späteren Verlauf nicht aus³⁸. Diesbezüglich muss die Diagnostik um eine histologische Beurteilung nach dem Mehrparameter-Scoring-System von Thompson ergänzt werden³⁷. Der cut-off-Wert zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Tumoren liegt bei 4³⁷⁻⁴⁰.

1.3.6. Therapie

Die Therapie der ersten Wahl ist die Tumorresektion nach ausreichender präoperativer medikamentöser Blockade der α -Rezeptoren, um intra- und postoperative kardiovaskuläre Komplikationen wie hypertensive Entgleisungen, Arrhythmien oder eine postoperative Hypotonie zu vermeiden³⁵.

Patienten mit fortgeschrittenen inoperablen Tumoren kann eine ¹²³I-MIBG-Therapie oder eine Therapie mit Somatostatin-Rezeptoragonisten angeboten werden²⁸.

Basierend auf der morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit zwischen Phäochromozytomen/Paragangliomen und Neuroblastomen, wird die Chemotherapie mit Cyclophosphamid-Vincristin-Dacarbazin (CVD Schema) bei metastasierten MIBG-negativen Phäochromozytomen/Paragangliomen angewendet²⁸.

1.3.7. Prognose und Follow-up

Die Prognose der in toto resezierten benignen Phäochromozytome/Paragangliome ist ähnlich der Prognose bei gesunden Menschen im gleichen Alter⁴¹. Die Patienten sollten jedoch aufgrund des persistierenden Rezidivrisikos regelmäßig klinisch und laborchemisch kontrolliert werden⁴¹. Die erste labordiagnostische Kontrolle (Plasma- und/oder Urin-Metanephrine, Chromogranin A und Methoxytyramin) sollte 14 Tage postoperativ stattfinden^{28,42}. Anschließend sollte die Nachsorge lebenslang mind. 1x jährlich erfolgen^{28,41,42}.

Die 5-Jahres-Überlebensrate der malignen Phäochromozytome/Paragangliome liegt im Durchschnitt bei 50%²⁸.

1.4. Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.4.1. Allgemeine Informationen

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind kleine Signalproteine, die von zahlreichen Geweben konstitutiv exprimiert sind und eine zentrale Rolle in der Zellmigration spielen⁴³⁻⁴⁵. Durch die Bindung an Chemokinrezeptoren wird die Wanderung der Chemokinrezeptor-exprimierenden Zellen in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration ausgelöst⁴³. Die Interaktion zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren ist von großer Bedeutung für die Embryonalentwicklung, Entwicklung und Regulation des Immunsystems, Angiogenese und antiatherogene Prozesse⁴³⁻⁴⁵. Die Chemokin-gesteuerte Rekrutierung von Lymphozyten an den Ort

entzündlicher und nicht-entzündlicher Prozesse ist allerdings auch an der Entstehung und dem Verlauf entzündlicher, metabolischer und maligner Erkrankungen beteiligt⁴⁶.

Die über 50 beschriebenen Chemokine werden in vier Gruppen anhand ihres N-terminalen-Cystein-Rests eingeteilt: CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine^{43,44}. Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren lässt sich aus dem entsprechenden Liganden-Typ (CXCR, CCR, CR und CX3CR) herleiten. Strukturell und funktionell werden die Chemokinrezeptoren in typisch (G-Protein-gekoppelt) und atypisch (nicht G-Protein gekoppelt) eingeteilt^{43,44}.

Die Aktivierung von typischen Chemokinrezeptoren bewirkt eine Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten α - und $\beta\gamma$ ^{46,47}. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit kontrolliert hauptsächlich die Zellmigration durch Aktivierung der PI3K/Akt, PI3K/FAK und PLC/PIP2/PIP3 Signalwege und Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration^{46,47}. Die α -Untereinheit aktiviert unterschiedliche Tyrosinkinasen (Ras, Rho, PI3K, PLA2, PKA) mit Einfluss auf die Proliferation, Adhäsion, Migration und Entartung verschiedener Zelltypen^{46,47}.

Die Rolle atypischer Chemokinrezeptoren ist weiterhin umstritten. Diese können einerseits als „Scavengers“ die lokale Chemokinkonzentration durch Internalisierung, Sequestrierung und Abbau senken (z.B. D6, CXCR7)⁴⁸. Andererseits ermöglichen die atypischen Chemokinrezeptoren die Transzytose der Chemokine durch biologische Barrieren und somit die Chemokinansammlung in schwer zugänglichen mikroanatomischen Bereichen⁴⁸.

1.4.2. Die CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse

Das Chemokin CXCL12 und seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 spielen eine wesentliche Rolle sowohl in der normalen Physiologie als auch in der Entstehung verschiedener pathologischer Zustände.

1.4.2.1. Die Rolle der CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse in der normalen Physiologie:

CXCL12 (Stromal-derived factor-1, SDF-1) wird in zahlreichen embryonalen und adulten Organen exprimiert und gehört zu den effektivsten Chemoattraktanten und Hauptregulatoren der Hämatopoese^{49,50}. CXCL12 bindet sowohl den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 als auch den atypischen Chemokinrezeptor CXCR7^{49,50}.

CXCR4 wird insbesondere von hämatopoietischen Zellen aber auch in verschiedenen Stammzellen, Geweben und Organen (Endothel, Epithel, Leber, Niere, Lunge, Herz, Skelettmuskel, Neuronen) exprimiert^{49,50}. Die CXCL12/CXCR4 Achse steuert dementsprechend das Homing hämatopoietischer Zellen in das Knochenmarkstroma sowie die postentzündliche/posttraumatische Geweberegenerierung und Revaskularisierung und ist notwendig für eine regelrechte embryonale Entwicklung⁴⁹⁻⁵³. CXCR4- und/oder CXCL12-knockout Mäuse sind infolge schwerer kardiovaskulärer und neurologischer Missbildungen nicht lebensfähig^{49,53}.

CXCR7 gehört zu den atypischen Chemokinrezeptoren und signalisiert hauptsächlich über den β -arrestin/MAPK Signalweg^{54,55}. Seine Rolle scheint wichtig für die embryonale Entwicklung, Regulation der Angiogenese sowie Differenzierung der B-Lymphozyten in Plasmazellen zu sein^{54,55}. CXCR7 weist eine 10-fache höhere Affinität für CXCL12 und kann somit als Scavenger für CXCL12 agieren, wodurch die Aktivierung von CXCR4 herunterreguliert wird^{55,56}. Die Co-Expression beider Chemokinrezeptoren kann allerdings auch eine prolongierte Stimulation von CXCR4 durch die Bildung von Heterodimeren hervorrufen^{55,56}.

1.4.2.2. Die Rolle der CXCL12/CXCR4/CXCR7 Achse in der Karzinogenese

Die Expression von CXCR4 wurde in über 23 Malignomen nachgewiesen⁵⁰. CXCR4 scheint vor allem das Metastasierungspotential der Tumorzellen nach dem Prinzip „soil and seed“ zu begünstigen⁵⁰. CXCR4-positive Tumoren („seed“) metastasieren bevorzugt in Organe mit erhöhter CXCL12 Expression („soil“) wie Lymphknoten, Leber, Lunge oder Knochen⁵⁰. Darüber hinaus aktiviert das Zusammenspiel zwischen CXCR4, CXCL12 und dem Tumormikromilieu tumorfördernde Signalwege und Transkriptionsfaktoren, welche das Wachstum, die Neoangiogenese und die Therapieresistenz unterschiedlicher Tumorentitäten fördern^{50,53}. In vitro- und in vivo-Studien konnten die Hemmwirkung verschiedener CXCR4-Antagonisten auf die Proliferation, Angiogenese und Migration nachweisen⁵³.

Die Aggressivität der CXCR4-positiven Tumoren wird unter anderem durch die Theorie der Tumorstammzellen (CSC, cancer stem cells) erklärt⁵⁷. Untersuchungen legen nahe, dass die Rezidivrate und Therapieresistenz eines malignen Tumors auf die Entwicklung von CSC zurückzuführen sind^{57,58}. Tumorstammzellen sind Krebszellen mit

Stammzeleigenschaften, die sich selbst erneuern und verschiedene Tumorzellpopulationen generieren können und somit als Tumorinitiatoren dargestellt werden⁵⁷. Es wird behauptet, dass Tumorstammzellen aus normalen Stamm- oder Progenitorzellen unter hypoxischen Bedingungen sowie durch die Aktivierung verschiedener „klassischer“ Signalwege (Wnt/ β -catenin, Notch, hedgehog, mTOR) abstammen^{59,60}. Die Resistenz verschiedener Tumoren gegenüber etablierten Chemo- und Radiotherapien wird häufig in den Zusammenhang mit Tumorstammzellen gebracht und durch zwei Hauptmechanismen erklärt: 1) das Ruhestadium (G0), in dem sich die Tumorstammzellen befinden, da i.d.R. nur die aktiv im Zellzyklus befindlichen Tumorzellen durch die Therapie angegriffen werden und 2) das Vorhandensein von Effluxpumpen (Multidrug Resistance-Related Proteine), welche die Zytostatika aus der Zelle heraustransportieren^{57,59,60}. Die therapieresistente Tumorstammzellnische gehört zu den entscheidenden prognostischen Faktoren und stellt somit ein „ideales“ Therapieziel dar^{57,58}. Die Identifizierung von Tumorstammzellen ist jedoch durch die erhöhte inter- und intratumorale Heterogenität bzw. den Mangel an einheitlichen Tumorstammzelloberflächenmarkern erschwert^{59,60}. Basierend auf den zunehmenden Erkenntnissen über seine Rolle in der Karzinogenese, Metastasierung und insbesondere in der Therapieresistenz wird CXCR4 als möglicher Tumorstammzellmarker betrachtet^{61,62}. CXCR7 wird ebenso mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und demzufolge einer schlechteren Prognose in unterschiedlichen onkologischen Pathologien korreliert⁵⁰. Es wird angenommen, dass CXCR4 die Hauptrolle bei der CXCL12-vermittelten Metastasierung der Tumorzellen spielt, während CXCR7 eher das Wachstum und Überleben der Tumorzellen durch verstärkte Adhäsion und Neoangiogenese am Ursprungsort bzw. am Ort der Metastasierung beeinflusst^{60,63}. In seiner Rolle als Scavenger für CXCL12 scheint CXCR7 allerdings die Prognose der Tumoren auch positiv zu beeinflussen⁶⁴.

1.4.3. CXCR4 und CXCR7 als therapeutische Zielstrukturen

Die nachgewiesene CXCR4 Überexpression bzw. Korrelation mit einer schlechten Prognose in mehreren Tumoren wirft die Frage auf, ob es sich hierbei um eine diagnostische und insbesondere therapeutische Zielstruktur handeln könnte.

Plerixafor (AMD3100) ist zurzeit der einzige von der FDA zugelassene CXCR4-Antagonist, der hauptsächlich zur Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) für die autologe Stammzelltransplantation bei Patienten mit non-Hodgkin Lymphom (NHL) und multiplem Myelom (MM) angewendet wird⁶⁵. Plerixafor kann allerdings sowohl die Strahlensensitivität als auch die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber von Cisplatin, Doxetacel, Cyclophosphamid und Bevacizumab steigern und die Effektivität der Immuncheckpoint-Inhibitoren positiv beeinflussen^{53,62}. Die Antagonisierung von CXCR4-positiven immunsuppressiven regulatorischen T-Lymphozyten im Ovarial- und Nierenzellkarzinom ermöglicht die Ansammlung von immunkompetenten zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten und fördert somit die Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren^{62,65}.

Für die nichtinvasive in vivo Analyse der CXCR4 Expression wird am meisten das Radionuklid [⁶⁸Ga]Pentixafor verwendet⁶⁶. Die vielversprechenden Ergebnisse der ersten Proof-of-Concept Studien an Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen führten zu weiteren Untersuchungen in soliden Tumoren⁶⁶. Eine erhöhte CXCR4 Expression konnte somit im kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, in neuroendokrinen Tumoren, im Ösophaguskarzinom, im Glioblastom aber auch in Nebennierentumoren gezeigt werden⁶⁶.

Der therapeutische Partner von [⁶⁸Ga]Pentixafor ist Pentixather⁶⁶. Ein CXCR4-gerichtetes theranostisches Konzept konnte erfolgreich bei hämatoonkologischen Neoplasien (multiples Myelom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, akute myeloische Leukämie) eingesetzt werden⁶⁶.

Im Vergleich zu CXCR4 stellt sich die Entwicklung von CXCR7 Liganden problematischer dar. Die Wechselwirkung zwischen CXCR7 und CXCR4 und der umstrittene Einfluss von CXCR7 auf die Prognose verschiedener Tumoren limitieren die Entwicklung von CXCR7 Antagonisten bzw. Agonisten⁶⁴. CCX771, ein hochselektiver CXCR7 Ligand, löst z.B. sowohl „antagonistische“ (antiproliferative, antiangiogenetische) als auch „agonistische“ bzw. tumorfördernde Reaktionen aus⁶⁴. Darüber hinaus können verschiedene CXCR7 Agonisten als Antagonisten an CXCR4 wirken⁶⁴.

1.4.4. Die Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Nebenniere und in Nebennierentumoren

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CXCR4 und CXCR7 sowohl in der gesunden Nebennierenrinde als auch in Nebennierenrindentumoren exprimiert werden⁶⁷⁻⁶⁹. Heinze&Fuß et al. konnten mittels PCR-Analysen eine starke Expression beider Chemokinrezeptoren in der normalen Nebennierenrinde und in hormonaktiven Nebennierenadenomen nachweisen⁶⁹. Die Immunhistochemie zeigte eine besonders starke CXCR4 Färbung am äußeren Cortextrand im subkapsulären Bereich, wohingegen CXCR7 eher ein diffuses Färbungsmuster aufwies⁶⁹. CXCL12 wurde interessanterweise in den inneren Zonen der Nebennierenrinde lokalisiert⁶⁹. Die erhöhte Expression beider Chemokinrezeptoren in der gesunden Nebenniere wirft die Frage auf, welche Rolle diese Chemokinachse in der normalen Nebennierenphysiologie spielen könnte. Insbesondere das komplementäre Verteilungsmuster von CXCR4 und CXCL12 sowohl in der normalen Nebennierenrinde als auch in hormonaktiven (gut differenzierten) Nebennierenadenomen könnte die *in vivo* und *in vitro* beobachtete zentripetale Migration und Differenzierung der subkapsulären adrenalen Stamm-/Progenitorzellen erklären^{1,69}.

Die auf Proteinebene beobachtete erhöhte CXCR4 Expression in Aldosteronproduzierenden Nebennierenadenomen konnte auch *in vivo* mittels [⁶⁸Ga]Pentixafor PET CT bestätigt werden. Anhand des Tracer-Uptakes wurden Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus identifiziert⁶⁹.

CXCR4 und CXCR7 werden auch in NN-Karzinomen exprimiert. Die erste proof-of-concept Studie zur *in-vivo*-Darstellung von CXCR4 mittels [⁶⁸Ga]Pentixafor PET CT in fortgeschrittenen metastasierten NN-Karzinomen (n=30) stuft 70% der Patienten als mögliche Kandidaten für eine CXCR4-gerichtete Therapie bei ausreichendem Tracer Uptake ein⁶⁷. Weiss et al. konnten eine erhöhte CXCR4 Expression auf Proteinebene sowohl in der NCI-H295 Zelllinie als auch in Primärtumoren und Metastasen von NN-Karzinomen nachweisen⁶⁸. CXCR7 wurde in dieser Untersuchung nur in Metastasen analysiert und war signifikant mit der Expression von CXCR4 korreliert⁶⁸. Auch in dieser Studie konnte die Expression von CXCR4 mittels ⁶⁴Cu-Plerixafor *in vivo* in einer Patientin mit metastasiertem NN-Karzinom bewiesen und erstmalig mit der CXCR4 Expression auf Proteinebene korreliert werden⁶⁸.

Die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe aus Frankreich deuten auf eine mögliche Rolle von CXCR7 in der Tumorigenese und Wachstumsregulation beim Phäochromozytom hin⁷⁰. CXCR7 wurde auf mRNA Ebene insbesondere in den malignen Phäochromozytomen exprimiert, wobei die benignen Phäochromozytome eine signifikant schwächere CXCR7 Expression aufwiesen⁷⁰. Durch getrennte Stimulation mit zwei unterschiedlichen CXCR7 Liganden (Adrenomedullin (AM) und CXCL12) konnte die Proliferation verschiedener Phäochromozytomzelllinien induziert werden, wohingegen die Downregulation von CXCR7 eine hemmende Wirkung auf das Proliferationsverhalten aufwies⁷⁰. Die Expression von CXCR4 wurde als gleichmäßig schwach in malignen und benignen Phäochromozytomen dargestellt⁷⁰.

1.4.5. Fragestellung

Die Prognose der Patienten mit NN-Karzinom kann aktuell weder anhand von klassischen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Proliferationsmarker oder Resektionsstatus noch anhand von tumorspezifischen Markern zuverlässig eingeschätzt werden. Außerdem stehen nur wenige oftmals suboptimale Therapieoptionen sowohl für rezidivierende als auch fortgeschrittene NN-Karzinome zur Verfügung. Somit werden nicht nur neue Prognosefaktoren, sondern auch neue therapeutische Zielstrukturen zur Optimierung des Managements des NN-Karzinoms benötigt.

Die beobachtete *in vitro* und *in vivo* Überexpression beider Chemokinrezeptoren sowohl in benignen als auch in malignen Nebennierentumoren sowie die bevorzugte Metastasierung der NN-Karzinome in CXCL12-exprimierende Organe (Lunge, Leber, Knochen) deutet auf eine Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12 Achse in der adrenalen Onkologie hin. Trotz dieser Beobachtungen und trotz zunehmender Evidenz über den Zusammenhang zwischen beiden Chemokinrezeptoren und der Prognose verschiedener Neoplasien wurden bisher keine Studien zur prognostischen Bedeutung von CXCR4 und CXCR7 oder sonstigen Chemokinrezeptoren auf das klinische Ergebnis in Patienten mit NN-Karzinom publiziert. Die bisherigen Daten zu CXCR4 und CXCR7 stammen aus kleinen Patientenkohorten und haben überwiegend einen deskriptiven Charakter.

Ausgehend von diesem Hintergrund ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Chemokinrezeptoren werden generell in NN-Karzinomen und Phäochromozytomen im Vergleich zur normalen Nebenniere exprimiert?
2. Wie stellt sich insbesondere das Expressionsniveau von CXCR4 und CXCR7 in malignen Nebennierentumoren dar?
3. Gibt es einen Zusammenhang mit dem Expressionsniveau bzw. dem Expressionsmuster (membranös/zytoplasmatisch) jedes Chemokinrezeptors und dem klinischen Verlauf des NN-Karzinoms?

Basierend auf Studienergebnissen anderer Untersuchungen wurden zusätzlich folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Metastasen weisen ein höheres Expressionsniveau auf als die Primärtumoren beim NN-Karzinom.
2. Die membranöse CXCR4 Präsentation ist mit einem ungünstigeren Gesamt- bzw. progressionsfreien Überleben assoziiert, während eine vermehrte zytoplasmatische Expression prognostisch eher günstig ist.
3. Die CXCR4 Expression beeinflusst das Metastasierungspotential der NN-Karzinome.
4. CXCR7 beschreibt einen günstigeren Tumorphänotyp beim NN-Karzinom.
5. CXCR4 stellt eine potentielle Zielstruktur für ein theranostisches Konzept für NN-Karzinome dar.

2. Material und Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Lösungen sowie Kits für die Immunhistochemie, RNA-Isolierung und qRT-PCR-Analyse sind den Tabellen 2-5 zu entnehmen.

2.1. Geräte

Tabelle 2. Geräte

Gerät	Beschriftung	Firma
Magnetrührer	Bio Magnetic Stirrer MMS 3000 RET Basic	Grant Bio IKA®
pH-Meter	InLab®Easy DIN	METTLER TOLEDO
Schnellkochtopf	Sicomatic®-T	Silit
Kochplatte	1097 Einzelkochtafel 1000 Watt	ROMMELSBACHER
Wasserkocher	UNOLD Electro 8125 1,0 L	UNOLD
Waage	ABJ 120-4M	KERN
Pipetten	Eppendorf Transferpette	Eppendorf Transferpette
Mikroskop	Primo Vert	Zeiss
Laborofen	Heraeus electronic	Heraeus
Homogenisator	EUROSTAR digital	IKA Labortechnik
Zentrifuge	Biofuge fresco MIKRO 200R	Thermo Scientific Hettich Zentrifugen
Photometer	Nanodrop2000c	Thermo Scientific
Autoklav	Dampfsterilisator 400E	Varioklav®
Mikrotom	HN-40	Reichert Jung
CFX96 real-time Thermocycler	Mastercycler personal	Bio-rad

2.2. Materialien

Tabelle 3. Materialien

Beschriftung	Firma
Pipettenspitzen	Sarstedt
Save Seal Micro Tubes	Sarstedt
PCR Soft Tubes	Biozym Scientific GmbH
QiAshredder Mini Spin Column	QIAGEN
RNeasy Mini Spin Column	QIAGEN
Fettstift	Vector
Objektträger	Thermo scientific
Glashomogenisator	B.Braun

2.3. Puffer und Lösungen

Tabelle 4. Puffer und Lösungen

Beschriftung	Zusammensetzung
Phosphate Buffered Saline (PBS Puffer)	1 L steriles Wasser (B.Braun), 5 PBS Tablette (Sigma Aldrich)
Citronensäuremonohydrat Puffer	840 mg Citronensäuremonohydrat (Merck Millipore), pH 6.5 durch Gabe von 2 NaOH Plätzchen (Sigma-Aldrich) und NaOH 1N (Merck Millipore)
3% H ₂ O ₂ in Methanol	H ₂ O ₂ 30% (Merck), Methanol (Sigma-Aldrich)
Ethanol 90%, 80%, 70%	Ethanol 100% (Sigma-Aldrich), steriles Wasser (B.Braun)
Methanol	Methanol 100%
Hämatoxylin	Hämalaun nach Mayer

2.4. Kits

Tabelle 5. Kits

Beschriftung	Zusammensetzung	Firma
AB Human Serum	AB Human Serum	Invitrogen
Anti-CXCR4 Antikörper [UMB2] (ab124824)	Anti-CXCR4 Antikörper [UMB2] (ab124824)	Abcam
Anti-GPCR RDC1 antibody (ab72100)	Anti-GPCR RDC1 antibody (ab72100)	Abcam
Negative Kontrolle - Rabbit	Rabbit Immunoglobulin Fraction, non-immunized rabbits, solid-phase absorbed	Dako
ADVANCE™ HRP kit	ADVANCE™ HRP Link ADVANCE™ HRP Enzyme	Dako
DAB+, Liquid	DAB+ Chromogen DAB+ Substrate Buffer	Dako
RNeasy Mini Kit	RNeasy Mini Spin Columns Collection Tubes (1.5 ml) Collection Tubes (2 ml) Buffer RLT Buffer RW1 Buffer RPE RNase-Free Water	QIAGEN
QuantiTect® Reverse Transcription	gDNA Wipeout Buffer Quantiscript® Reverse Transcriptase Quantiscript RT Buffer RT Primer RNase-Free Water	QIAGEN
RT ² Profiler™ PCR Array	CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR1, CX3CR1, CXCR2	QIAGEN
Taqman Gene Expression	CCR7, CCR9, CCR10, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7	Applied Biosystems

2.5. Methoden

2.5.1. Immunhistochemie

2.5.1.1. Protokoll

Die immunhistochemische Untersuchung wurde an 2 µm dicken Paraffinschnitten auf silanisierte Objektträger durchgeführt. Es wurden insgesamt 102 Vollschnitte und 93 Gewebemikroarrays (TMA) untersucht. Die 93 TMAs entsprachen 194 Tumorstanzen (2 bis 3 Stanzen pro Gewebe).

Die immunhistochemische Expression von CXCR4 wurde im Vollschnitt (n=102) und im TMA (n=93) untersucht. Aus Ressourcengründen (nicht ausreichend Tumormaterial) konnte die immunhistochemische Analyse der CXCR7 Expression nur für 84 Tumoren im Vollschnitt durchgeführt werden.

Die Schnitte wurden zweimal 12 min in 100% Xylol entparaffiniert und in absteigenden Alkoholkonzentrationen (100%, 90%, 80%, 70%) für je 5 min rehydriert. Der übrig gebliebene Alkohol wurde durch das Spülen von Paraffinschnitten 5mal mit destilliertem Wasser entfernt. Die Vorbehandlung (Antigendemaskierung, Reduzierung von Hintergrundfärbung) bestand aus das Kochen von Schnitten für 13 min in 400 ml Citronensäuremonohydrat-Puffer (hergestellt durch die Mischung von 840 mg 10 mM Citronensäuremonohydrat und 400 ml destilliertem Wasser und die pH-Einstellung mit NaOH auf 6.5) im Druckkochtopf. Der Puffer mit Schnitten wurden 20 min erkalten gelassen und danach wieder mit destilliertem Wasser 5mal gewaschen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist. Die Hemmung endogener Peroxidase fand durch die Inkubation der Schnitten für 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 3% H₂O₂ in Methanol (ca. 150-200 µL/Schnitt) statt. Die Schnitte wurden erneut mit destilliertem Wasser 5mal gewaschen. Die unspezifischen Protein-Antikörper Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit humanem AB Serum (1:5 mit PBS verdünnt, ca. 150-200 µL/Schnitt) für 1 Stunde bei RT blockiert. Die Schnitte wurden direkt danach (ohne Waschen) auf ein Tuch abgekippt. Weiter wurde die Negativkontrolle (NK) mit Rabbit Antikörper (Dako[®], ca. 150-200 µL/Schnitt) und die anderen Schnitte mit CXCR4/CXCR7 Antikörper (Abcam[®], Verdünnung in PBS, ca. 150-200 µL/Schnitt) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden alle Schnitte 5mal im PBS gewaschen (die NK getrennt von den anderen Schnitten). Die Signalverstärkung erfolgte durch die Inkubation mit HRP Link und HRP Enzym (Dako[®]) je für 20 min bei RT gefolgt von der 5maligen Spülung im PBS (die NK

getrennt von den anderen Schnitten). Die Detektion fand durch die Inkubation mit DAB (20 µl DAB Chromogen für je 1000 µl DAB Substrat Buffer, ca. 150-200 µL/Schnitt) für 10 min bei RT statt. Nach der dritten Spülung mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 2 min im Hämalan gegengefärbt und danach 5 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden kurz in 100% Ethanol gespült und anschließend für 20 min bei 56°C trocknen gelassen.

2.5.1.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte durch drei unabhängige Begutachter. Membran und Zytoplasma wurden getrennt beurteilt. Die Färbeintensität wurde mit 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung), 2 (mittelstarke Färbung) oder 3 (starke Färbung) gekennzeichnet. Die Anzahl (%) der gefärbten Zellen wurde mit einem Punktwert geschätzt und in 3 Gruppen geteilt: 0.1 für 0-9%, 0.5 für 10-49% und 1 für 50-100%. Der H-Score wurde durch die Multiplikation der maximalen festgestellten Färbeintensität der membranösen bzw. zytoplasmatischen Färbung mit dem Punktwert für den entsprechenden Zellanteil gerechnet. Es ergaben sich somit Werte (Scores) zwischen 0 und 3. Für die mittels TMA untersuchten Tumoren wurde ein Mittelwert aus den einzelnen ermittelten Werten für die 2-3 Stenzen für jede Gewebeprobe gebildet. Scores \leq 1 definieren eine niedrige Intensität und Scores $>$ 1 eine erhöhte Intensität der Färbung, jeweils für die Membran und das Zytoplasma.

2.5.2. RNA-Isolierung aus zuvor Kryofixiertem Nebennierenkarzinom- und Phäochromozytomgewebe

Das Gewebe wurde in einem zuvor sterilisierten Glas-Homogenisator zusammen mit 600 µL Puffer (Mischung von 594 µL RLT Puffer und 6 µL Mercaptoethanol) gemischt und pulverisiert. Das Gemisch wurde in ein Shredder Tube gegeben und für 3 min bei voller Leistung (10000 rpm) zentrifugiert. Die Säule wurde geworfen und dem Durchlauf 1 Volumen (600 µL) 70% Ethanol dazugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. 600 µL von dem neuen Gemisch wurde in ein Mini Säule Tube gegeben und für 30 sec bei voller Leistung zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die restlichen 600 µL in dasselbe Mini Säule Tube gegeben und wieder für 30 sec bei voller Leistung zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule weiter gehalten und

mit 350 μL RW1 Puffer gewaschen und wieder für 30 sec bei voller Leistung zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und die Säule mit 80 μL Inkubations Mix (10 μL DNase + 70 μL RDD Puffer) für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 350 μL RW1 Puffer dazugegeben und für 30 sec bei voller Leistung zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 μL RPE Puffer gewaschen und nach jedem Waschen bei voller Leistung zentrifugiert (erstmal 30 sec und zum zweiten Mal 2 min). Die Säule wurde auf ein frisches Collection Tube gesetzt und für 1 min bei voller Leistung zentrifugiert. Für die RNA Elution wurde die trockene Säule auf ein steriles 1.5 ml RNA Tube gesetzt, dazu 40 μL RNase freies Wasser gegeben und für 1 min bei voller Leistung zentrifugiert. Eine zweite Elution mit dem ersten Eluat wurde durchgeführt. Die Säule wurde danach verworfen und das Tube mit dem Durchlauf auf Eis gelegt.

Die RNA-Messung wurde mittels Nanodrop 2000 Programm durchgeführt und die RNA-Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{L}$ ausgerechnet. Die Voraussetzung für die cDNA-Umschreibung war eine RNA-Konzentration von mindestens 50 $\text{ng}/\mu\text{L}/\text{Probe}$.

2.5.3. NCI-H295 Zelllinie

Die humane NCI-H295 Zelllinie stammt aus einem primären, invasiv wachsenden Nebennierenkarzinom ab. Da die Zelllinie die wichtigsten Enzyme der Steroidbiosynthese exprimiert, wird die Produktion von Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Sexualsteroiden aufrechterhalten⁷¹.

2.5.3.1. Kultivierung der NCI-H295 Zellen

Tabelle 6. Zusammensetzung des Kulturmediums der NCI-H295 Zelllinie

Reagenzien	Konzentration im Medium
RPMI-1640	
FCS	10%
Insulin	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Transferrin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Natriumselenit	5,2 ng/ml

Tabelle 7. Zusammensetzung des Einfriermediums der NCI-H295 Zelllinie

Reagenzien	Konzentration im Medium
RPMI-1640	
FCS	20%
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	100 µg/ml
Natriumselenit	5,2 ng/ml
DMSO	10%

Das Medium wurde alle 48-72 h gewechselt. Ca. 30% des alten Mediums wurde zwecks Übertragung der von den Zellen produzierten Wachstumsfaktoren wiederverwendet. Die Passagierung erfolgte alle 96-120 h im Wechsel zum Mediumwechsel.

2.5.3.2. RNA-Isolierung aus NCI-H295 Zellen

Zellpellets werden in 350 µl RLT-Puffer gelöst und für 5 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nach Überführen in den QIAshredder wird das Gemisch für 2 min bei 13 200 rpm zentrifugiert und 70% Ethanol (350 µL) dazu gegeben. Das 700 µL Lysat wird auf die RNeasy-Säule gegeben und für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. 700 µL RW1-Puffer wird dazu gegeben und das Gemisch für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird 500 µL RPE-Puffer dazu gegeben und das Gemisch wieder für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µL RPE-Puffer wird das Gemisch für 2 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die daraus entstandene Säule erneut für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µL Rnase-freiem Wasser und erneuter Zentrifugierung für 1 min bei 10 000 rpm wird die RNA direkt verarbeitet oder bei -80° eingefroren.

2.5.4. qRT PCR-Analyse des Chemokinrezeptorprofils

Für die cDNA-Umschreibung wurde diejenige Menge von dem RNA-Eluat genommen, die 1000 ng RNA entsprach. Diese wurde zusammen mit 4 µL gDNA Wipeout Buffer und mit Rnase-freiem Wasser bis zu einem gesamten Volumen von 28 µL in ein 0.2 ml Tube auf Eis gemischt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 42 °C inkubiert und danach mit 12 µL Master Mix (2 µL Quantiscript Reverse Transcriptase + 8 µL Quantiscript RT Buffer + 2 µL RT Primer Mix) gemischt und für 15 min bei 42 °C und weiter für 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis für die sofortige Durchführung des

Chemokinrezeptorenprofils gelegt oder bei -20 °C für eine langfristige Aufbewahrung gelagert.

Die qRT-PCR von Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CCR11, CXCR1, CX3CR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7) wurde mittels eines Thermocyclers von Bio-rad durchgeführt (Programmierung: 1 x 3 min 95°, 50 x 30 s 95°, 50 x 30 s 60°, 50 x 30 s 72°). Die Genexpression wurde auf β -Actin normalisiert.

2.5.5. Sammlung klinischer Daten

Das europäische Register für die Untersuchung von Nebennierentumoren ENS@T (European Network for the Study of Adrenal Tumours) diente zur Erhebung der klinischen Daten. Diese werden regelmäßig überprüft und aktualisiert anhand von medizinischer Dokumentation (stationäre Aufenthalte, ambulante Visiten, Operationsberichte, histopathologische Begutachtungen, interdisziplinäre Tumorkonferenzen). Die registrierten Patienten wurden schriftlich und mündlich aufgeklärt und haben der Nutzung ihrer Daten und Tumorgewebe für Forschungszwecke zugestimmt. Das Register wurde durch die Ethikkommission Würzburg positiv begutachtet (Ethikvotum Nr. 88/11).

2.5.6. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und Darstellung von Daten wurde mittels Microsoft Office (Xcel, Word), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) und SPSS Statistics Version 23 (IBM) durchgeführt. Die Normalverteilung der Ergebnisse wurde mittels Normalverteilungsdiagramm (Q-Q-Diagramm) geprüft. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen erfolgte die Durchführung eines T-Tests für normal verteilte unabhängige Stichproben und mittels Mann-Whitney Test für nicht normal verteilte unabhängige Stichproben. Mit der Pearson- und Spearman-Korrelation wurde der Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen, pathologischen und immunhistochemischen Variablen gemessen. Mittels uni- und multivariater Analyse wurde der Einfluss von klinischen, histopathologischen sowie der immunhistochemischen Expression der Chemokinrezeptoren auf die Prognose des NN-Karzinoms untersucht. Bei der Überlebenszeitanalyse (Gesamtüberleben und

progressionsfreies Überleben) wurde das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet und die Ergebnisse entsprechend mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Ein P-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. mRNA-Expression von Chemokinrezeptoren in der normalen Nebenniere und in Nebennierentumoren – Ergebnisse der quantitativen PCR (Realtime-PCR)

Die initiale Beurteilung des Chemokinrezeptorenprofils mittels Realtime-PCR umfasste 4 normale Nebennieren, 18 Nebennierenrindenzarzinome, 10 Phäochromozytome und die Nebennierenkarzinom-Zelllinie NCI-H295. Es ließen sich mehrere Chemokinrezeptoren sowohl in adrenokortikalem als auch in adrenomedullärem Gewebe nachweisen. Sowohl in der normalen Nebenniere als auch in Nebennierenkarzinomen zeigten CXCR4 und CXCR7 die höchste mRNA-Expression unter allen Chemokinrezeptoren (Abb. 1). In den Phäochromozytomen fand sich quantitativ die höchste mRNA-Expression für CXCR7 (Abb. 2). Weiterhin ließen sich in Phäochromozytomen unter den CXC-Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR5 und in geringerem Umfang auch CXCR4 und bei den CC-Motiv Chemokinrezeptoren insbesondere CCR2 und CCR7 nachweisen (Abb. 2).

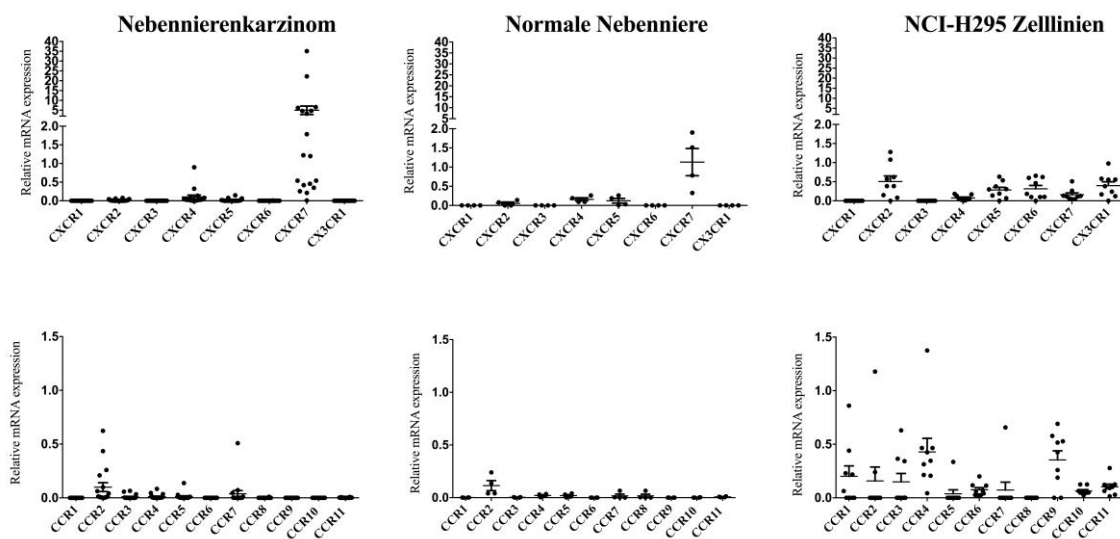


Abb. 1. mRNA-Expressionsanalyse (quantitative PCR) der Chemokinrezeptoren CCR1-11, CXCR 1-7 und CX3CR1 in der normalen Nebenniere (n=4), in Nebennierenrindenzarzinomen (n=18) und in der NCI-H295 Nebennierenkarzinom-Zelllinie. Die relative mRNA Expression wurde auf die Expression der Housekeeping Gen β -Actin normalisiert

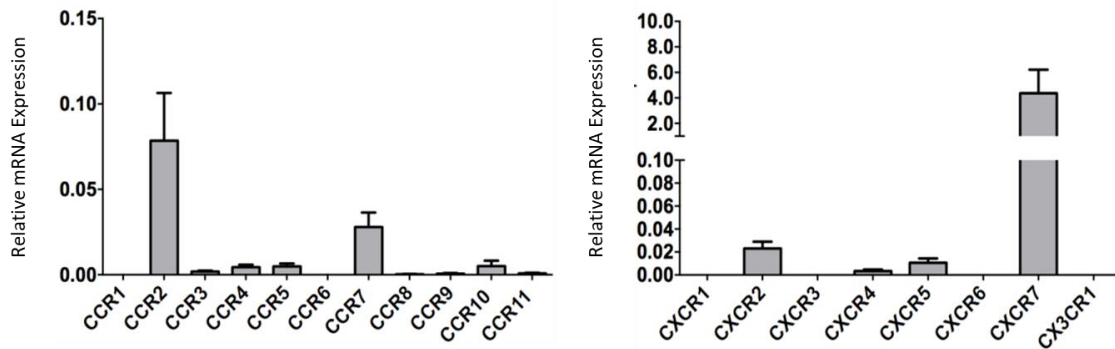


Abb. 2. mRNA-Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren CCR1-11, CXCR 1-7 und CX3CR1 in Phäochromozytomen (n=10). Die relative mRNA Expression wurde auf die Expression der Housekeeping Gen β -Actin normalisiert.

3.2. Charakterisierung der Patientenkohorten, deren Tumorgewebeschnitte mittels Immunhistochemie untersucht wurden

3.2.1. Nebennierenkarzinom-Kohorte

Die Gesamtkohorte für unsere immunhistochemische Auswertung umfasste 195 in Paraffin eingebettete Proben (164 Primärtumoren, 16 Lokalrezidive und 15 Metastasen) von Patienten mit mindestens einem Follow-up. Der Begriff „Patienten“ umfasst sowohl männliche als auch weibliche Studienteilnehmer. Die Charakteristika der untersuchten Patientenproben sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die mediane Überlebenszeit betrug 52 Monate (1-297) für die ganze Patientenkohorte und 66 Monate (1-297) für die Subgruppe der R0-resezierten Patienten. Ein Progress wurde im Median von 23 (1-175) Monaten beobachtet.

Tabelle 8. Patienten mit NN-Karzinom: Charakterisierung der Gesamtkohorte (n=195) bezogen auf demographische und klinische Daten.

Geschlecht weiblich, n (%)	130 (67)
Medianes Alter bei Erstdiagnose, Jahre (Range)	49 (76)
ENSAT Stadium I + II, n (%) III + IV, n (%)	97 (50) 93 (48)
Ki67 niedrig (<10%), n (%) hoch (≥10%), n (%)	39 (20) 132 (68)
Weiss Score niedrig (≤6), n (%) hoch (>6), n (%)	103 (53) 56 (29)
Resektionsstatus R0, n (%) unvollständig/unbekannt, n (%)	97 (50) 98 (50)
Metastasen bei Erstdiagnose Ja, n (%) Nein, n (%)	46 (24) 138 (71)
Metastasen im Verlauf Ja, n (%) Nein, n (%)	155/67* (80/75*) 35/22* (18/25*)

*tumorfreie Patienten mit lokalisierten Tumorstadien (ENSAT I-III)

3.2.2. Phäochromozytom-Kohorte

Fünf maligne und 10 benigne Phäochromozytome wurden immunhistochemisch untersucht. Es handelte sich hierbei ausschließlich um Primärtumoren. Die klinischen Patientendaten sind in Tabelle 9 dargestellt. Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit malignen Phäochromozytomen betrug 72 Monate. Ein Progress wurde bei 2 Patienten dokumentiert, und zwar nach 65 Monaten aufgrund eines Lokalrezidivs und nach 23 Monaten aufgrund fortschreitender Metastasierung.

Tabelle 9. Patienten mit Phäochromozytom: klinische und demographische Charakteristika der Patientengruppen aufgeteilt nach Tumordignität

Patientencharakteristika	Benigne Phäochromozytome (n=10)	Maligne Phäochromozytome (n=5)	p
Geschlecht Weiblich, n (%)	6 (60)	5 (100)	ns
Medianes Alter bei Erstdiagnose, Jahre (Range)	42 (35)	52 (8)	ns
Mediane Tumorgröße, cm (Range)	5.2 (5)	7.5 (5)	<0.01
Resektions-Status			
R0	10	0	ns
R1	0	1	
R2	0	1	
unbekannt	0	3	
Hormon-Exzess			
Adrenalin (A)	1	0	ns
Noradrenalin (NA)	3	1	
Dopamin (D)	0	0	
A+NA	5	2	
A+NA+D	1	1	
unbekannt	0	1	
Fernmetastasen bei Diagnose	-	2	-
Fernmetastasen bei Diagnose	-	1	-
Lymphknotenmetastasen bei Diagnose	-	1	-
Lymphknotenmetastasen im Verlauf	-	1	-
Lokalrezidiv	0	1	ns

3.3. Immunhistochemische Charakterisierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 im Nebennierenkarzinom

3.3.1. Beschreibung der Expressionsintensität und des Verteilungsmusters

CXCR4 wurde in 96% (188/195) und CXCR7 in 100% (84/84) der untersuchten Proben detektiert. Sechs Vollschnitte und 1 TMA waren komplett CXCR4-negativ. In einer Probe (Vollschnitt) konnte die Expression von CXCR4 aufgrund von Gewebeablösung von der Objektträgeroberfläche nicht analysiert werden. Das zelluläre Färbemuster beider Chemokinrezeptoren war entsprechend eines primär membranständigen Rezeptors überwiegend membranös (Tabelle 10, Abb. 3 und 4). Eine nukleäre Lokalisation z.B. infolge einer vermehrten Internalisierung fand sich nur vereinzelt. In ca. 50% aller untersuchten Proben konnte eine erhöhte Membranexpression (H-Score >1) sowohl für CXCR4 als auch CXCR7 gezeigt werden.

Eine signifikante Korrelation zwischen membranöser und intrazellulärer Proteinexpression wurde nur für CXCR4 beobachtet (Spearman's rank correlation, $r_s=0.518$, $p<0.01$). Die CXCR4-Färbung korrelierte mit der CXCR7-Färbung nur auf zytoplasmatischer, jedoch nicht auf membranöser Ebene (Spearman's rank correlation, $r_s=0.291$, $p<0.021$).

Zwischen Primärtumoren, Metastasen und Lokalrezidiven ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsintensität, weder für CXCR4 noch für CXCR7 (Tabelle 11).

Tabelle 10. Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Nebennierenkarzinomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score)

	n	Membranöse Färbung, n (%)		Zytoplasmatische Färbung, n (%)	
		Erhöht (H-Score >1)	Niedrig (H-Score ≤1)	Erhöht (H-Score >1)	Niedrig (H-Score ≤1)
CXCR4	195	96 (49)	98 (50)	26 (13)	138 (71)
CXCR7	84	42 (50)	42 (50)	29 (35)	55 (65)

Tabelle 11. Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Nebennierenkarzinomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score) bezogen auf den Tumorsubtyp (PT=Primärtumor, LR=Lokalrezidiv, M=Metastase)

	Membranöse Färbung H-Score (Mittelwert ±SD)		Zytoplasmatische Färbung H-Score (Mittelwert ±SD)	
	CXCR4	CXCR7	CXCR4	CXCR7
PT	1,4±1	1,6±0,9	0,8±0,6	1,2±0,8
LR	1,1±1	1±0	0,9±0,5	0,3±0,3
M	0,9±1,1	1,6±1,3	0,9±0,6	1,6±0,8

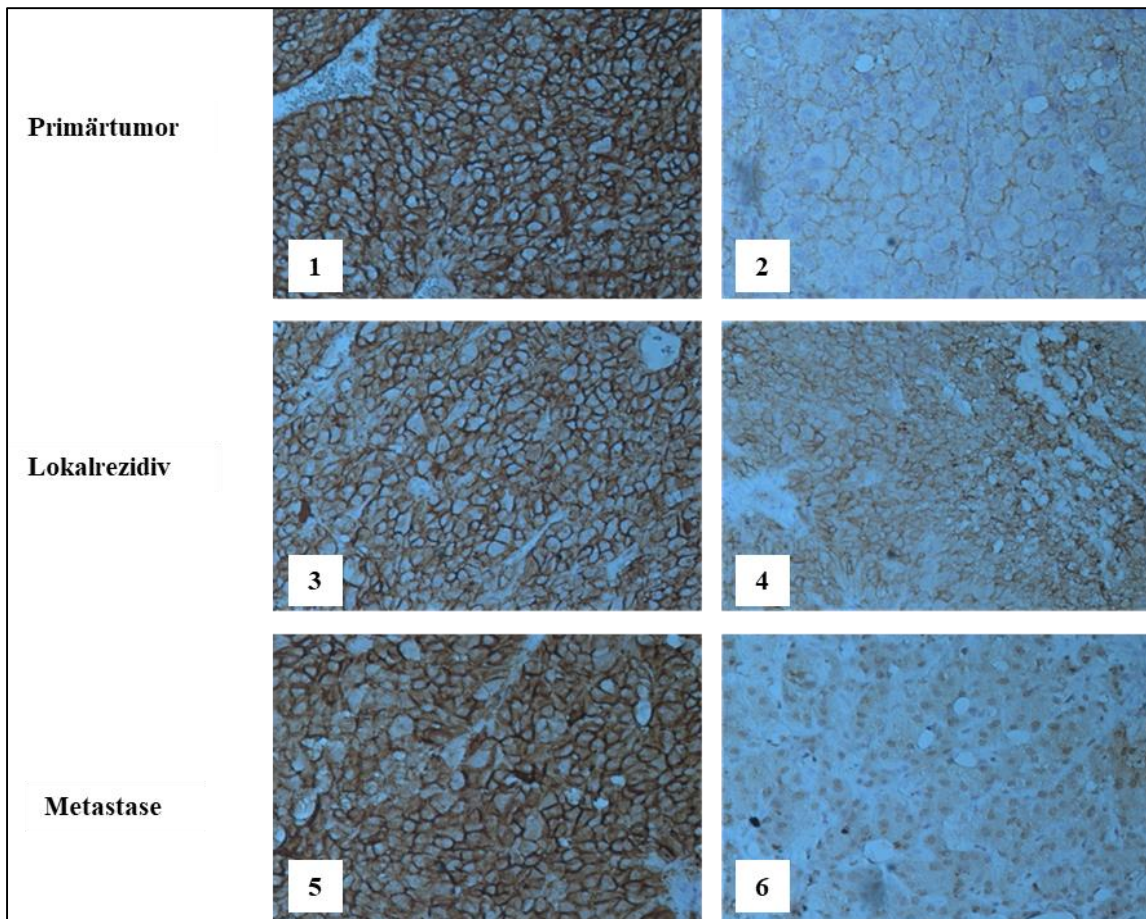


Abb. 3. Immunhistochemische Darstellung von CXCR4 im Nebennierenkarzinom. 1: Primärtumor, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (10fache Vergrößerung), 2: Primärtumor, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (10fache Vergrößerung), 3: Lokalrezidiv, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (10fache Vergrößerung), 4: Lokalrezidiv, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (20fache Vergrößerung), 5: Metastase, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (7,5fache Vergrößerung), 6: Metastase, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (10fache Vergrößerung)

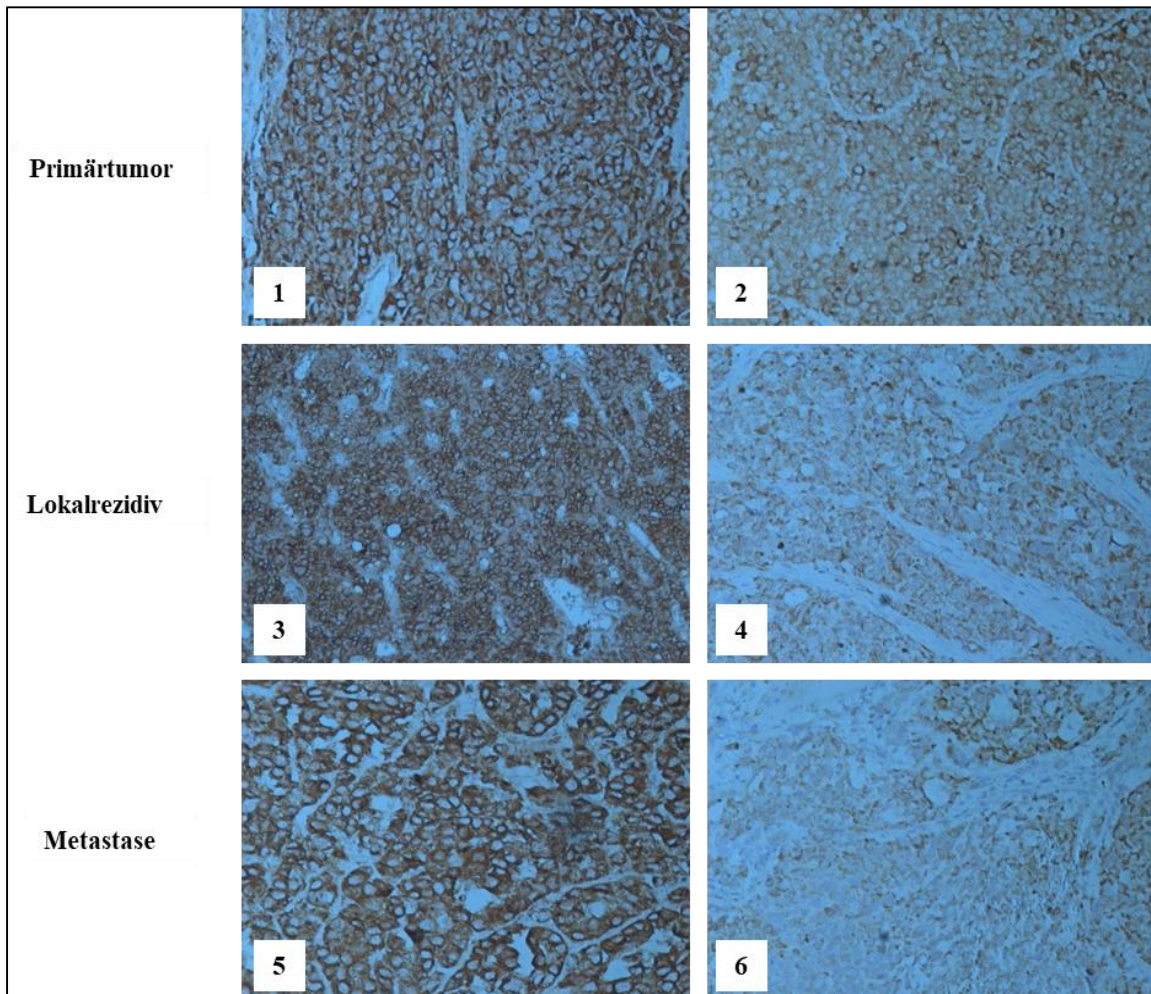


Abb. 4. Immunhistochemische Darstellung von CXCR7 im Nebennierenkarzinom. 1: Primärtumor, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung), 2: Primärtumor, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung), 3: Lokalrezidiv, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung), 4: Lokalrezidiv, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung), 5: Metastase, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (10fache Vergrößerung), 6: Metastase, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung)

3.3.2. Korrelationen der immunhistochemischen Ergebnisse mit klinischen Daten zum Krankheitsverlauf im Nebennierenkarzinom

In der Gesamtkohorte war eine signifikante Korrelation zwischen der membranösen Chemokinrezeptorexpression sowohl von CXCR4 als auch von CXCR7 und dem Ki67-Index erkennbar und zwar positiv für CXCR4 (Spearman's rank correlation, $r_s=0.16$, $p=0.04$) und negativ für CXCR7 (Spearman's rank correlation, $r_s= - 0.25$, $p=0.03$).

Weder CXCR4 noch CXCR7 korrelierten mit der Inzidenz der Metastasen bei Erstdiagnose oder Follow-up (Tabelle 12 und 13).

Tabelle 12. Inzidenz der Metastasen bei Erstdiagnose und Follow-up in der Gesamtkohorte der Patienten mit NN-Karzinom bezogen auf die Intensität und das Muster der CXCR4 Expression

CXCR4	Membranöse Färbung		p	Zytoplasmatische Färbung		p
	erhöht	niedrig		erhöht	niedrig	
Metastasen bei Erstdiagnose (%)	29	21	ns	28	24	ns
Metastasen im Verlauf (%)	83 (82)*	80 (67)*	ns**	73 (77)*	82 (73)*	ns**

* tumorfreie ENSAT I-III Patienten,

** sowohl für die Gesamtkohorte als auch für tumorfreie ENSAT I-III Patienten

Tabelle 13. Inzidenz der Metastasen bei Erstdiagnose und Follow-up in der Gesamtkohorte der Patienten mit NN-Karzinom bezogen auf die Intensität und das Muster der CXCR7 Expression

CXCR7	Membranöse Färbung		p	Zytoplasmatische Färbung		p
	erhöht	niedrig		erhöht	niedrig	
Metastasen bei Erstdiagnose (%)	37	20	ns	41	22	ns
Metastasen im Verlauf (%)	90 (100)*	88 (89)*	ns**	93 (91)*	87 (96)*	ns**

* tumorfreie ENSAT I-III Patienten

** sowohl für die Gesamtkohorte als auch für tumorfreie ENSAT I-III Patienten

Univariate und multivariate Analysen für Prognosefaktoren wurden für die Gesamtkohorte (n=195) und für die Subgruppe der R0-resezierten Patienten (n=97) durchgeführt. Die klassischen Prognosefaktoren wie Ki67, ENSAT-Stadium, Weiss-Score und Resektionsstatus erwiesen sich in der univariaten Analyse auch bei der hier untersuchten Gesamtkohorte als signifikant mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben assoziiert. Für CXCR4 und CXCR7 zeigten sich jedoch weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse signifikante Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens oder des progressionsfreien Überlebens in der Gesamtkohorte (Tabellen 14 und 15). In der univariaten Analyse für die Subgruppe der R0-resezierten Patienten erwiesen sich der Weiss Score und die Tumorgröße als signifikant mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben assoziiert. Auch für diese Subgruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den

Chemokininrezeptoren und dem Gesamtüberleben oder dem progressionsfreien Überleben gezeigt werden (Tabelle 16 und 17).

Tabelle 14. Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben in der Gesamtkohorte (n=195)

	n	Univariate Analyse			Multivariate Analyse	
		Überlebenszeit Monate (Mittelwert±SD)	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
CXCR4 Membranfärbung			0,91 (0,63-1,3)	ns	0,38 (0,13-1,1)	ns
niedrig (≤ 1)	98	55±57				
hoch (>1)	96	49±43				
CXCR4 Zytoplasmfärbung			0,72 (0,41-1,2)	ns	1,8 (0,42-8)	ns
niedrig (≤ 1)	138	47±40				
hoch (>1)	26	72±81				
CXCR7 Membranfärbung			0,76 (0,43-1,3)	ns	0,7 (0,23-2)	ns
niedrig (≤ 1)	42	40±34				
hoch (>1)	42	40±32				
CXCR7 Zytoplasmfärbung			0,92 (0,52-1,6)	ns	0,54 (0,14-2)	ns
niedrig (≤ 1)	55	39±35				
hoch (>1)	29	43±27				
ENSAT			2,5 (1,7-3,6)	<0,01	0,5 (0,13-1,6)	ns
I+II	97	64±47				
III+IV	93	38±51				
Ki67			2 (1,2-3,5)	<0,01	6 (0,9-41,7)	ns
niedrig (<10%)	39	70±52				
hoch ($\geq 10\%$)	132	44±44				
Weiss Score*			1,6 (1,1-2,5)	0,02	1,5 (0,51-4,6)	ns
niedrig (≤ 6)	103	62±55				
hoch (>6)	56	36±30				
Tumorgröße*			1,2 (0,82-1,7)	ns	2 (0,54-7,4)	ns
niedrig (<12 cm)	101	51±48				
hoch (≥ 12 cm)	84	50±53				
Resektionsstatus			3 (2-4,4)	<0,01	28 (6-130)	<0,01
R0	97	66±55				
R1,2,x	98	38±42				
Geschlecht			1 (0,68-1,5)	ns	1,4 (0,31-6,2)	ns
männlich	65	49±49				
weiblich	130	54±51				

*Cut-off-Wert stellt den Median dar

Tabelle 15. Uni- und multivariate Analyse für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtkohorte (n=195)

	n	Univariate Analyse			Multivariate Analyse	
		Überlebenszeit, Monate (Mittelwert±SD)	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
CXCR4 Membranfärbung			0,91 (0,63-1,3)	ns	0,6 (0,26-1,3)	ns
niedrig (≤ 1)	97	26±38				
hoch (>1)	94	20±26				
CXCR4 Zytoplasmafärbung			0,99 (0,63-1,6)	ns	0,7 (0,22-1,9)	ns
niedrig (≤ 1)	136	21±26				
hoch (>1)	26	27±42				
CXCR7 Membranfärbung			1,17 (0,8-1,8)	ns	0,9 (0,37-2)	ns
niedrig (≤ 1)	41	16±28				
hoch (>1)	40	12±15				
CXCR7 Zytoplasmafärbung			0,71 (0,4-1,15)	ns	0,7 (0,3-1,5)	ns
niedrig (≤ 1)	55	13±25				
hoch (>1)	26	17±18				
ENSAT			1,8 (1,3-2,5)	<0,01	2,9 (1,1-7,6)	0,027
I+II	96	28±30				
III+IV	92	17±34				
Ki67			1,9 (1,2-2,8)	<0,01	1,7 (0,5-6)	ns
niedrig ($<10\%$)	38	35±41				
hoch ($\geq 10\%$)	132	17±24				
Weiss Score*			2 (1,4-2,9)	<0,01	1,1 (0,4-2,8)	ns
niedrig (≤ 6)	102	30±38				
hoch (>6)	56	11±13				
Tumorgröße*			1,3 (0,9-1,8)	ns	0,9 (0,3-3,4)	ns
niedrig (<12 cm)	100	25±34				
hoch (≥ 12 cm)	83	18±29				
Resektionsstatus			1,9 (1,4-2,6)	<0,01	4,6 (1,6-13)	<0,01
R0	96	30±37				
R1,2,x	96	16±25				
Geschlecht			0,84 (0,61-1,2)	ns	0,4 (0,15-1,3)	ns
männlich	63	16±18				
weiblich	129	26±37				

*Cut-off-Wert stellt den Median dar

Tabelle 16. Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben in der Subgruppe der R0-rezezierten Patienten (n=97)

	n	Univariate Analyse			Multivariate Analyse	
		Überlebenszeit, Monate (Mittelwert±SD)	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
CXCR4 Membranfärbung			1,3 (0,72-2,4)	ns	0,4 (0,09-2,2)	ns
niedrig (≤ 1)	45	73±65				
hoch (>1)	51	60±44				
CXCR4 Zytoplasmafärbung			0,55 (0,22-1,3)	ns	0,2 (0,01-6,6)	ns
niedrig (≤ 1)	69	56±36				
hoch (>1)	15	102±92				
CXCR7 Membranfärbung			0,7 (0,27-1,8)	ns	0,2 (0,03-1,5)	ns
niedrig (≤ 1)	22	50±36				
hoch (>1)	20	40±20				
CXCR7 Zytoplasmafärbung			1,1 (0,44-3)	ns	2,7 (0,4-18,4)	ns
niedrig (≤ 1)	30	47±32				
hoch (>1)	12	42±23				
ENSAT			1 (0,5-2)	ns	0,3 (0,01-4,9)	ns
I+II	71	67±48				
III+IV	26	63±71				
Ki67			1,6 (0,8-3,5)	ns	0,7 (0,02-20)	ns
niedrig ($<10\%$)	25	71±47				
hoch ($\geq 10\%$)	68	58±49				
Weiss Score*			2,4 (1,2-4,8)	0,011	2,3 (0,3-17)	ns
niedrig (≤ 6)	56	78±58				
hoch (>6)	29	40±25				
Tumorgröße*			2 (1,1-3,7)	0,023	2,5 (0,2-32)	ns
niedrig (<12 cm)	55	70±53				
hoch (≥ 12 cm)	41	59±57				
Geschlecht			0,8 (0,41-1,5)	ns	3,3 (0,4-26)	ns
männlich	33	57±56				
weiblich	64	71±54				

*Cut-off-Wert stellt den Median dar

Tabelle 17. Uni- und multivariate Analyse für das progressionsfreie Überleben in der Subgruppe der R0-resezierten Patienten (n=97)

	n	Univariate Analyse			Multivariate Analyse	
		Überlebenszeit, Monate (Mittelwert±SD)	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
CXCR4 Membranfärbung			1,3 (0,8-2)	ns	0,8 (0,3-2,1)	ns
niedrig (≤ 1)	44	36±47				
hoch (>1)	51	25±27				
CXCR4 Zytoplasmfärbung			1 (0,5-1,9)	ns	0,7 (0,16-3,1)	ns
niedrig (≤ 1)	68	26±28				
hoch (>1)	15	40±52				
CXCR7 Membranfärbung			1,2 (0,7-2,4)	ns	0,5 (0,16-1,6)	ns
niedrig (≤ 1)	21	21±37				
hoch (>1)	20	12±12				
CXCR7 Zytoplasmfärbung			0,9 (0,43-1,8)	ns	0,7 (0,24-1,8)	ns
niedrig (≤ 1)	30	17±32				
hoch (>1)	11	16±12				
ENSAT			1 (0,63-1,8)	ns	5,5 (1,5-19)	<0,01
I+II	70	29±32				
III+IV	26	32±50				
Ki67			1,7 (0,96-2,9)	ns	0,35 (0,05-2,3)	ns
niedrig ($<10\%$)	24	41±47				
hoch ($\geq 10\%$)	68	23±26				
Weiss Score*			2,2 (1,3-3,7)	0,002	0,83 (0,16-4,2)	ns
niedrig (≤ 6)	55	39±43				
hoch (>6)	29	15±15				
Tumorgröße*			1,7 (1,1-2,7)	0,02	2,7 (0,36-20,7)	ns
niedrig (<12 cm)	54	37±40				
hoch (≥ 12 cm)	41	21±31				
Geschlecht			0,8 (0,47-1,2)	ns	0,54 (0,17-1,7)	ns
männlich	32	20±22				
weiblich	64	35±42				

*Cut-off-Wert stellt den Median dar

Eine nur auf die zytoplasmatische CXCR7 Färbung, den Ki67 Index und das ENSAT Stadium begrenzte multivariate Analyse in der Subgruppe der nicht-resektablen Tumoren stellte CXCR7 als günstiger Prognosemarker dar (HR 0,56 (95%CI 0,35-0,9), p=0.034). Das Gesamtüberleben der Patienten mit erhöhter zytoplasmatischen CXCR7-Färbung war im Durchschnitt um 13 Monate länger im Vergleich zu den Patienten mit niedriger Intensität der zytoplasmatischen CXCR7-Färbung in dieser Subgruppe (43±31 vs. 30±37 Monate).

3.3.3 Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse

Wie aus der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier jeweils für die Gesamtkohorte und für die Subgruppe der R0-resezierten NN-Karzinome hervorgeht, weist das Expressionsniveau weder von CXCR4 noch von CXCR7 eine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben oder dem progressionsfreien Überleben der Patienten auf (Abb. 5-8).

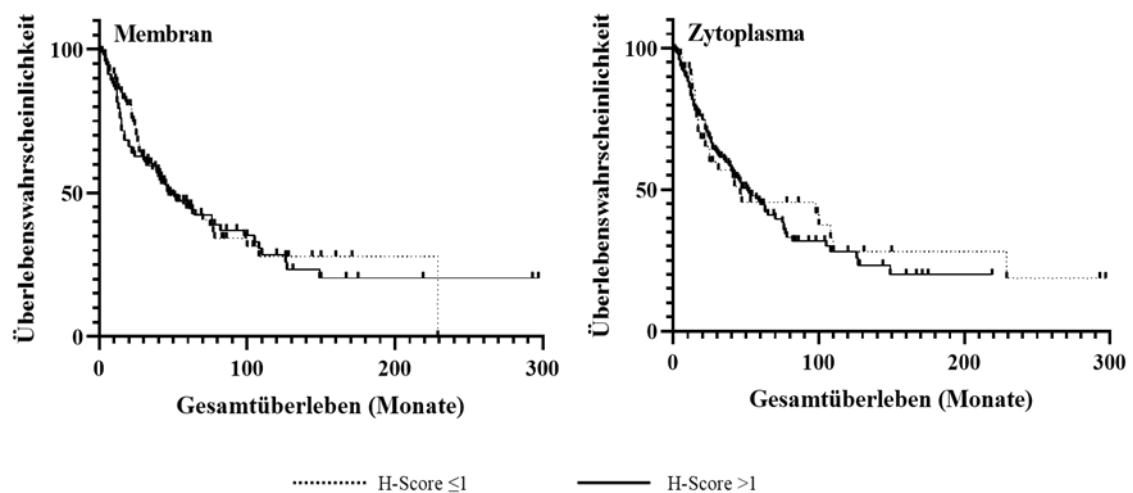


Abb. 5. Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR4

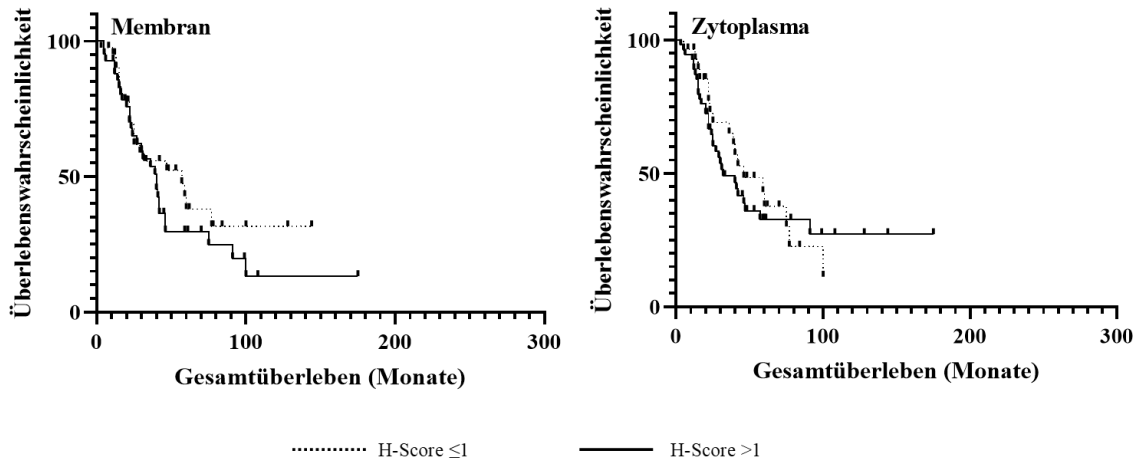


Abb. 6. Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR7

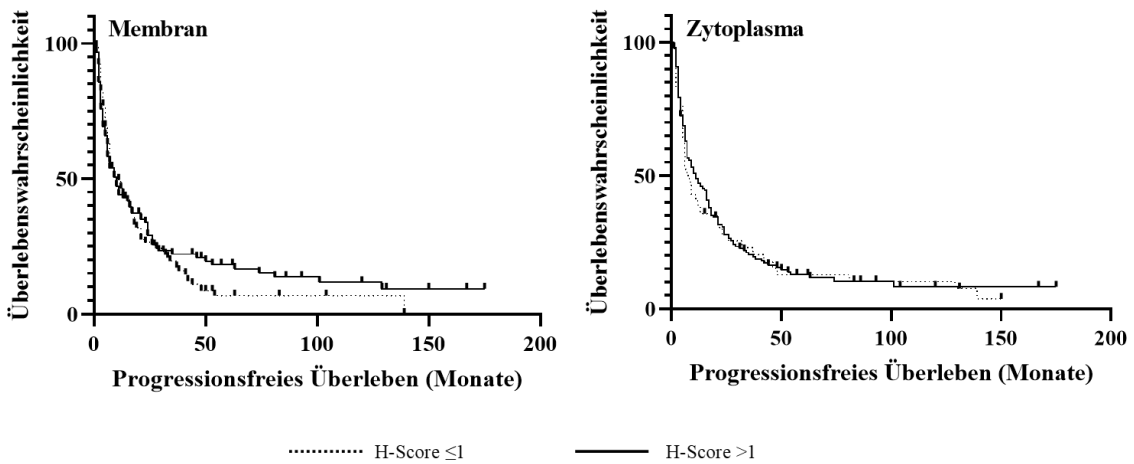


Abb. 7. Kaplan-Meier Analyse zum progressionsfreien Überleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR4

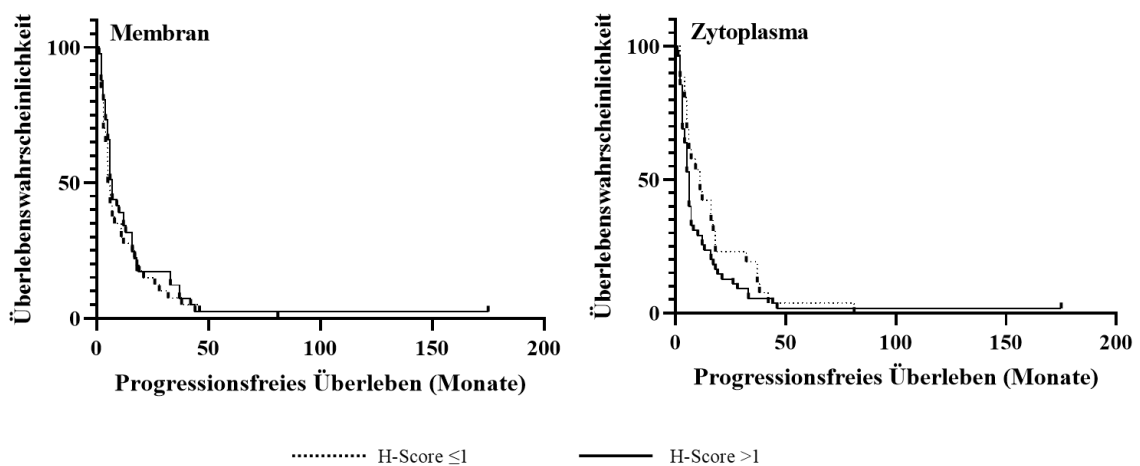


Abb. 8. Kaplan-Meier Analyse zum progressionsfreien Überleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR7

Betrachtet man die Überlebenszeit der Patienten mit einer prognostisch günstigeren Ausgangssituation, so fand sich für Patienten mit niedrigem Tumorstadium (ENSAT-Stadium I und II; n= 97) bei verstärkter zytoplasmatischer CXCR4 Färbung eine signifikant bessere Überlebenszeit (111±72 vs. 55±37 Monate, p=0.021) (Abb. 9). Derselbe Überlebensvorteil einer verstärkten CXCR4 Zytoplasmafärbung lässt sich auch in der Subgruppe der niedrig proliferativen Tumoren (Ki67 <10%; n= 39) zeigen (115±26 vs. 63±53 Monate, p=0.049) (Abb. 10).

Für die anderen Chemokinrezeptor-Färbemuster fanden sich in diesen beiden Subgruppen jedoch keine Unterschiede.

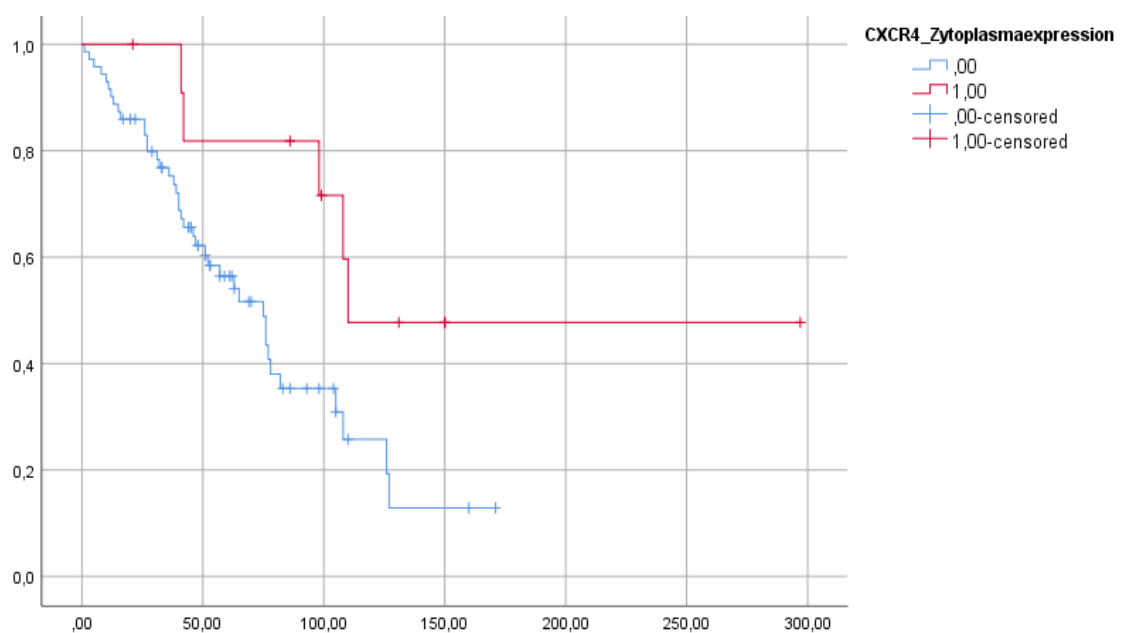


Abb. 9. Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Subgruppe der Patienten mit lokalisierten Tumorstadien (ENSAT Stadium I und II) bezogen auf die zytoplasmatische CXCR4 Expression („0,00“=niedrige Intensität der zytoplasmatischen Färbung, „1,00“=erhöhte Intensität der zytoplasmatischen Färbung)

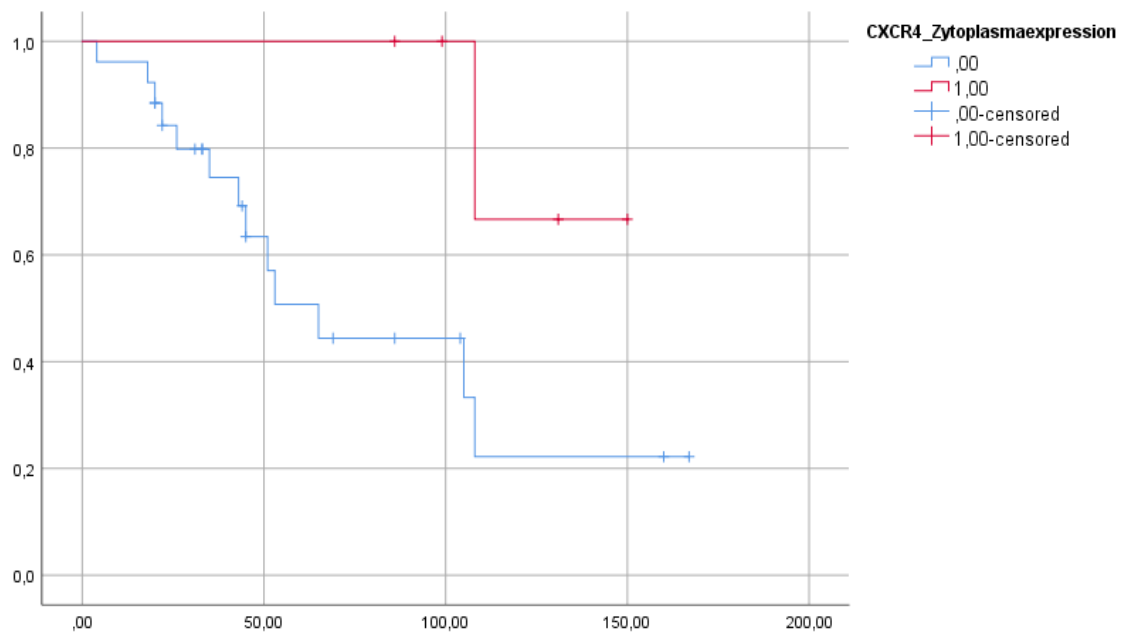


Abb. 10. Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Subgruppe der Patienten mit niedrigem Ki67 (<10%) bezogen auf die zytoplasmatische CXCR4 Expression („0,00“=niedrige Intensität der zytoplasmatischen Färbung, „1,00“=erhöhte Intensität der zytoplasmatischen Färbung)

3.4. Immunhistochemische Charakterisierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 im Phäochromozytom

Im Vergleich zum untersuchten adrenokortikalen Gewebe fand sich in den analysierten adrenomedullären Tumorgeweben generell eine deutlich schwächere Färbung sowohl für CXCR4 als auch für CXCR7 (Tabelle 18, Abb. 11). In quantitativer Hinsicht weisen die Phäochromozytome allerdings eine ähnlich erhöhte CXCR7 Expression wie die Nebennierenkarzinome auf, wobei die CXCR4 Expression deutlich schwächer imponiert (Abb. 1 und 2).

Betrachtet man die Färbungsintensität und das Färbungsmuster der Chemokinrezeptoren bezogen auf die Tumordignität, weisen benigne Phäochromozytome sowohl eine signifikant stärkere zytoplasmatische CXCR4 Färbung als auch eine signifikant stärkere membranöse CXCR7 Färbung im Vergleich zu den malignen Phäochromozytomen auf.

Tabelle 18. Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Phäochromozytomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score) bezogen auf die Tumordignität

	CXCR4		CXCR7	
	Membran H-Score (Mittelwert±SD)	Zytoplasma H-Score (Mittelwert±SD)	Membran H-Score (Mittelwert±SD)	Zytoplasma H-Score (Mittelwert±SD)
Benigne Phäochromozytome	0,1±0,2	0,8±0,4*†	1±0,9*	0,8±0,6
Maligne Phäochromozytome	0,3±0,4	0,4±0,3	0,8±0,2	0,3±0,4†
p	ns	0,04	0,0007	ns

*p<0.05 im Vergleich zu malignen Phäochromozytomen, †p<0.05 im Vergleich zur Membran

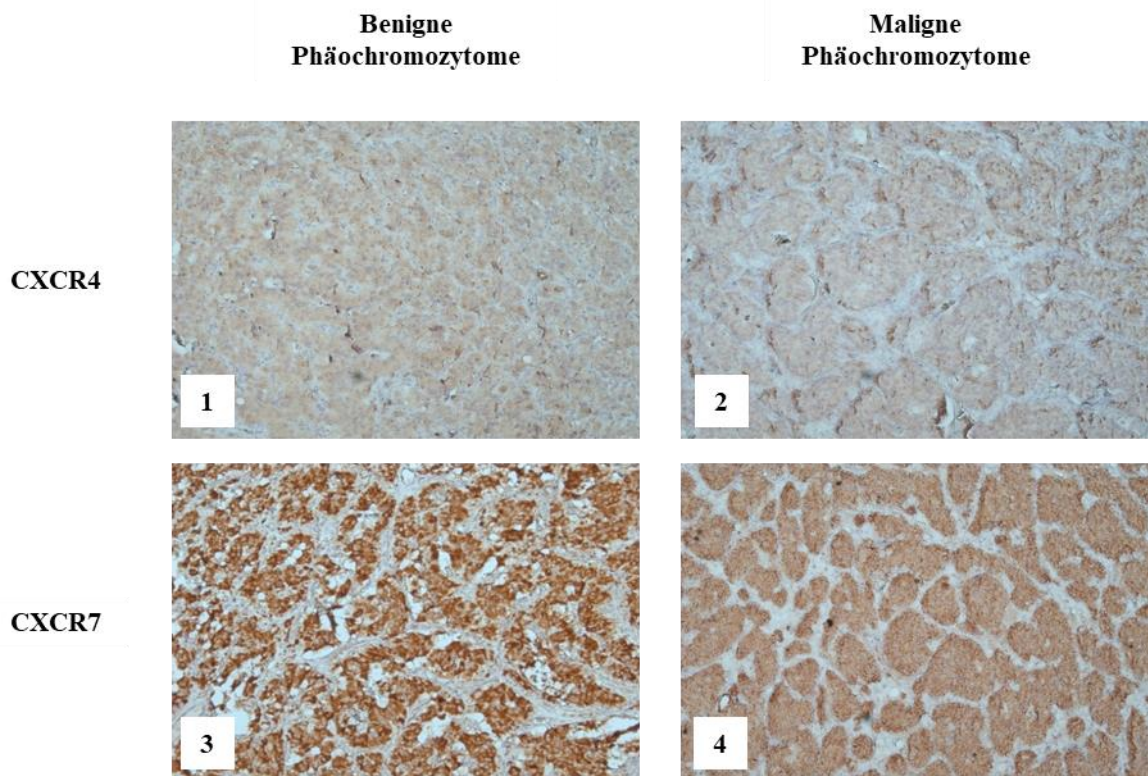


Abb. 11. Immunhistochemische Darstellung von CXCR4 und CXCR7 in benignen und malignen Phäochromozytomen. 1: benignes Phäochromozytom, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (20fache Vergrößerung), 2: malignes Phäochromozytom, schwache membranöse und zytoplasmatische CXCR4 Färbung (20fache Vergrößerung), 3: benignes Phäochromozytom, starke membranöse und zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung), 4: malignes Phäochromozytom, starke zytoplasmatische CXCR7 Färbung (20fache Vergrößerung)

4. Diskussion:

4.1. Beschreibung des Chemokinrezeptorprofils in Nebennierentumoren

Mehrere Chemokinrezeptoren konnten auf mRNA-Ebene in Nebennierenkarzinomen, in NCI-H295-Zellen, in benignen und malignen Phäochromozytomen und auch in der normalen Nebenniere identifiziert werden. Im Gegensatz zu den CC-Chemokinrezeptoren, von denen nur wenige in geringem Umfang nachweisbar waren, finden sich von den CXC-Chemokinrezeptoren insbesondere CXCR4 und CXCR7 in Nebennierenkarzinomen und NCI-H295 Zellen, ähnlich wie in der normalen Nebenniere beobachtbar war.

Über eine hohe Expression von CXCR4 in der humanen NCI-H295 Nebennierenkarzinom-Zelllinie und in Nebennierenkarzinomen wurde kürzlich auch von Weiss et al. berichtet⁶⁸. Der wiederholte Nachweis von CXCR4 und erstmalig im Rahmen unserer Arbeit auch von CXCR7 in NCI-H295 Zellen ist ein starker Hinweis dafür, dass die Herkunft beider Chemokinrezeptoren von Nebennierenzellen und nicht von tumorinfiltrierenden Leukozyten, wie z.B. beim Ösophaguskarzinom⁷² beschrieben, ausgeht. Auch in der Immunhistochemie ließ sich die Expression der Chemokinrezeptoren adrenokortikalen Zellen zuordnen.

Im Vergleich zu Weiss et al. wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur die Intensität, sondern auch die zelluläre Lokalisation von CXCR4 und CXCR7 analysiert. Es fand sich eine überwiegend membranöse Darstellung beider Chemokinrezeptoren. Diese wurde auch in anderen Neoplasien verzeichnet und teilweise mit dem aktivierten und damit verfügbaren Zustand der Rezeptoren und entsprechend einem erhöhten Metastasierungspotential korreliert⁷³⁻⁷⁶. Viele Studien beschreiben demgegenüber eine überwiegend intrazytoplasmatische Lokalisation der Chemokinrezeptoren, welche i.d.R. auch als Ausdruck der mit der Internalisierung einhergehenden Rezeptorinaktivierung interpretiert wird⁷⁷⁻⁸⁰

Die Literatur legt den Fokus hauptsächlich auf den Zusammenhang zwischen der Expressionsintensität der Chemokinrezeptoren und dem klinischen Outcome, da die Lokalisation dieser Strukturen sich stets unter dem Einfluss verschiedener endogener und exogener Faktoren wie Zytokine und antitumorale Therapie sowie durch die Bildung von CXCR4/CXCR7 Heterodimeren ändern kann^{59,60}.

Im Nebennierenmark hingegen spielt CXCR4 quantitativ keine besondere Rolle. Wir konnten sowohl immunhistochemisch als auch auf mRNA-Ebene nur eine schwache Proteinexpression in Phäochromozytomen beschreiben. Fischer et al. detektierten ebenfalls kein CXCR4-Signal im normalen Nebennierenmark sowie in 19 von 20 Phäochromozytomen und Thouënnon et al. beschrieben eine sehr schwache CXCR4 Expression in den analysierten Phäochromozytomzellen^{70,81}.

Die höhere Expression von CXCR7 in Phäochromozytomen hingegen deutet auf eine potentielle Rolle des atypischen Chemokinrezeptors im Nebennierenmark hin. Passend dazu wurde CXCR7 von Thouënnon et al. als Merkmal maligner Phäochromozytome postuliert⁷⁰. Die Autoren beschrieben die Hochregulation des Chemokinrezeptors in malignen Phäochromozytomen und konnten die CXCR7-induzierte Proliferation sowohl in humanen als auch in aus Ratten gewonnenen Phäochromozytom-Tumorzellen nachweisen⁷⁰. Unsere Analyse ergab hingegen eine grenzwertig höhere CXCR7 Expression in den benignen Tumoren, welche nur auf Membranebene eine statistische Signifikanz erreichte. Wegen der kleinen Probenzahl ist uns nicht möglich, Aussagen zu der vermuteten Rolle von CXCR7 weder in dem gesunden Nebennierenmark noch in Phäochromozytomen zu machen. Diesbezüglich sind Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig.

Anders als beim Prostata-, Kolon- und Nierenzellkarzinom für CXCR4^{49,68} oder beim hepatozellulären Karzinom für CXCR7⁸² beschrieben und von uns auch für das Nebennierenkarzinom hypothetisiert, fanden wir keinen Unterschied zwischen Primärtumoren und Metastasen hinsichtlich der Intensität der immunhistochemischen Färbung für CXCR4 (1,4±1 vs. 0,9±1 für Membran und 0,8±0,6 vs. 0,9±0,6 für Zytoplasma) oder CXCR7 (1,6±0,9 vs. 1,6±1,3 für Membran und 1,2±0,8 vs. 1,6±0,8 für Zytoplasma). Dies ist potentiell auch auf die relativ geringe Zahl der untersuchten Metastasen (15 vs. 164) zurückzuführen, kann aber auch vor dem Hintergrund des ortsabhängigen Einflusses der Tumormikroumgebung auf die Expression der Chemokinrezeptoren interpretiert werden. Für eine diesbezügliche aussagekräftigere Auswertung wäre der paarweise Vergleich der Chemokinrezeptorexpression in Proben von Primärtumoren und den jeweils zugehörigen Metastasen in einer repräsentativen Kohorte notwendig.

Der Nachweis einer ähnlich starken Expression von CXCR4 und CXCR7 im gesunden adrenalen Gewebe im Vergleich zu den untersuchten adrenokortikalen Tumoren passt zu bereits publizierten Ergebnissen⁶⁹ und deutet darauf hin, dass das Vorkommen dieser Chemokinrezeptoren in Nebennierenrindentumoren vermutlich hauptsächlich in Zusammenhang mit der physiologisch hohen Expression im normalen Nebennierenkortex interpretiert werden sollte.

Hinsichtlich der potentiellen Rolle der Chemokinrezeptoren in der normalen Nebennierenphysiologie lässt sich anhand publizierter Daten spekulieren, dass CXCR4 die Migration und Differenzierung der kortikalen Nebennierenzellen beeinflusst. Heinze&Fuß et al. beschreiben ein komplementäres Verteilungsmuster von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 in der normalen Nebennierenrinde⁶⁹. CXCR4 fand sich im subkapsulären Bereich, wohingegen CXCL12 in der inneren Zone der Nebennierenrinde lokalisiert wurde⁶⁹. Fischer berichtet ebenso über eine ausschliesslich auf die Z. fasciculata begrenzte CXCR4 Expression in der normalen Nebenniere in seiner Studie zur Beurteilung des monoklonalen CXCR4-Antikörpers UMB-2⁸¹. Dieses Verteilungsmuster überschneidet sich mit dem Konzept der aus Tiermodellen bekannten zentripetalen Entwicklung der Nebennierenrinde durch die Migration von subkapsulären Stamm-/Progenitorzellen in Richtung der Mark-Rinden-Grenze zwecks Differenzierung in reife Zellen der Zona glomerulosa und Zona fasciculata^{83,84}. CXCR4 ist auf verschiedenen embryonalen und adulten Stammzellen exprimiert und seine besondere Lokalisation im subkapsulären Bereich der Nebennierenrinde könnte die Hypothese der von subkapsulär gelegenen Stammzellen ausgehende schrittweise Transdifferenzierung der adrenokortikalen Zellen in der humanen Nebenniere stützen. Allerdings spricht der hohe Anteil CXCR4 positiver Zellen im reifen adrenalen Kortex eher dagegen, dass es sich hier rein um adrenokortikale Stammzellen handeln könnte. Alternativ könnte die Verteilung von CXCR4 und CXCL12 rein für die Organstrukturgebung verantwortlich sein.

4.2. Pathophysiologische Relevanz von CXCR4 und CXCR7 in Nebennierenkarzinomen

Unsere Arbeit analysiert zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen der Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und klinischen Parametern mit besonderem Fokus auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben in einer großen Kohorte von Patienten mit NN-Karzinom.

Trotz nachgewiesener Expression beider Chemokinrezeptoren in jeweils mind. 80% der Tumorproben ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeitanalyse zwischen Patienten mit hoher und Patienten mit geringer CXCR4- bzw. CXCR7-Chemokinrezeptorexpression in der Gesamtkohorte. Dieses Ergebnis passt zu Untersuchungen zu anderen potentiellen Prognosemarkern beim Nebennierenkarzinom. Die Suche nach spezifischen prognostischen Faktoren beim NN-Karzinom ist beeinträchtigt durch die Vielfalt an alterierten Signalwegen und die relativ kleinen untersuchten Kohorten^{6,85-87}. Die Prognose der Karzinome wird generell von vielen Faktoren beeinflusst. Einzelne Faktoren spielen selten allein eine dermaßen stark erkennbare Rolle, dass sie an kleineren Fallzahlen statistisch relevant werden⁸⁸. Der einzige klinisch relevante Prognosemarker für in toto resezierte NN-Karzinome ist basierend auf der aktuellen Datenlage weiterhin der unspezifische Ki67 Proliferationsindex⁹. Weiterhin etabliert sind für fortgeschrittene NN-Karzinome das Tumorstadium und die Zahl der Metastasen bei Erstdiagnose, die in größeren Kohorten validiert wurden⁸⁹. Wir konnten allerdings eine signifikante Korrelation der CXCR4 Membranexpression mit Ki67 in unserer relativ großen Gesamtkohorte zeigen. Somit lässt sich annehmen, dass CXCR4 vermehrt in den rasch progredienten NN-Karzinomen exprimiert wird und ein zusätzlicher, jedoch nicht allein prognoserelevanter Marker dieser aggressiveren Tumorsubgruppe sein könnte.

Anders als vor dem Hintergrund der vorhandenen Literatur erwartet, konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau der Chemokinrezeptoren und dem Metastasierungsstatus der NN-Karzinome nachweisen. Weder das Bestehen einer Metastasierung bei Erstdiagnose in der Gesamtkohorte (24%) noch das Auftreten von Metastasen im Verlauf in der Gesamtkohorte (80%) und in der Subgruppe der tumorfreien Patienten mit lokalisierten Tumoren ENSAT I-III (75%) waren signifikant mit dem Expressionsniveau der Chemokinrezeptoren weder auf membranöser noch auf zytoplasmatischer Ebene assoziiert. Eine stärkere membranöse CXCR4 Färbung war allerdings mit einer höheren Metastasenhäufigkeit in der Subgruppe der tumorfreien Patienten mit ursprünglich lokalisierten Tumoren zusammenhängend (82% vs. 67%) und könnte somit einen gewissen lokalisationsabhängigen Beitrag des Chemokinrezeptors zum Metastasierungspotential in dieser Subgruppe vermuten lassen.

Die von uns beobachtete überwiegend membranöse Lokalisation von CXCR4 wurde auch in anderen Neoplasien verzeichnet und teilweise mit dem aktivierten Zustand des Rezeptors und entsprechend einem erhöhten Metastasierungspotential korreliert⁷⁴⁻⁷⁶. Lee et al. konnten die Migration von Magenkarzinomzellen nur in der CXCR4-exprimierenden KATO III Zelllinie nach Stimulation mit CXCL12 induzieren⁷⁵. Der CXCR4-Antagonist Plerixafor konnte hingegen das Migrationspotential dieser Zelllinie reduzieren⁷⁵. Somit scheint die Präsentation des Chemokinrezeptors an der Zelloberfläche für die Metastasierung einiger Tumorentitäten relevant zu sein. Die Literatur liefert jedoch unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der zellulären Lokalisation des Chemokinrezeptors und legt den Fokus mehr auf den Zusammenhang zwischen der allgemeinen Expressionsintensität von CXCR4 und klinischen Outcomeparametern.

Im Gegensatz zur Membran, scheint eine erhöhte zytoplasmatische CXCR4 Färbung zwei besonderen Patientensubgruppen einen Überlebensvorteil zu bieten, und zwar Patienten mit lokalisierten NN-Karzinomen (ENSAT I und II) und Patienten mit einem niedrigen Ki67 Index (<10%). In beiden Subgruppen stellte sich das Gesamtüberleben signifikant besser für Patienten mit verstärkter zytoplasmatischer CXCR4 Expression dar (111±72 vs. 55±37 Monate, p=0.021 für ENSAT I-II und 115±26 vs. 63±53 Monate, p=0.049 für Ki67<10%). Hier könnte hypothetisiert werden, dass die Internalisierung von CXCR4 einen Schutzmechanismus durch seine Inaktivierung darstellt, welcher irgendwann im Verlauf durch eine tumorbedingte oder Therapie-induzierte Aktivierung des Chemokinrezeptors an der Zelloberfläche reversiert wird. Ein positiver Einfluss der zytoplasmatischen CXCR4 Überexpression auf die Prognose konnte auch beim triple-negativen Brustkrebs demonstriert werden⁹⁰. Die Rezidivrate war signifikant niedriger und das progressionsfreie Überleben signifikant länger in Patienten mit triple-negativem Brustkrebs und erhöhter zytoplasmatischer CXCR4 Expression nach adjuvanter Chemotherapie⁹⁰. Die Autoren konnten darüber hinaus einen signifikanten Zusammenhang mit einem besser differenzierten Tumorsubtyp sowie mit einem früheren Tumorstadium zeigen⁹⁰. Der triple-negative Brustkrebs gehört – ähnlich dem NN-Karzinom – einer Subgruppe sehr aggressiver und therapierefraktärer Tumoren an⁹⁰. Die Entdeckung eines prognoserelevanten Tumormarkers wäre somit auch in diesem Fall von großer Bedeutung. Die Autoren weisen allerdings auf einen möglichen Einfluss der angewandten adjuvanten Chemotherapie auf die CXCR4 Expression hin, da vor allem in

dieser Subgruppe der Patienten mit positiver zytoplasmatischen CXCR4 Expression häufiger eine Anthrazyklin-basierte Therapie appliziert wurde⁹⁰. Die Korrelation mit einem besser differenzierten Tumor sowie mit einem früheren Tumorstadium können allerdings unabhängig davon als Hinweise auf einen günstigeren Tumorphänotyp interpretiert werden.

Die zelluläre Lokalisation von Chemokinrezeptoren in Karzinomen kann ständig durch Interaktionen mit verschiedenen Liganden in der Tumormikroumgebung sowie durch Mutationen beeinflusst werden und somit die Ergebnisse der statistischen Analyse abhängig von dem Zeitpunkt der Untersuchung ändern. CXCR4 wird im gesunden Gewebe nach Bindung von CXCL12 i.d.R. internalisiert und größtenteils inaktiviert⁵³. Durch Mutationen des CXCR4-Gens können allerdings verkürzte CXCR4-Proteine entstehen, die durch die fehlende Kontrolle der Membranexpression dauerhaft stimuliert werden können⁷⁸. Ein Beispiel dafür ist das WHIM Syndrom, welches mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und Malignome einhergeht⁹¹. Darüber hinaus wird die Expression von CXCR4 in Tumoren durch verschiedene Zytokine und Onkoproteine (VEGF, TNF- α , TGF- β) zwecks prolongierter Stimulation sowie durch das lymphozytäre Tumordinfiltrat hochreguliert^{53,62}. Nicht nur „endogene“ sondern auch „exogene“ Faktoren haben einen signifikanten Einfluss auf die Expression von Chemokinrezeptoren. Die Radiotherapie kann die Expression von CXCR4 in Brustkrebs- und Glioblastomzellen durch Induktion einer lokalen entzündlichen Reaktion und Hypoxämie hochregulieren^{61,62}. Eine medikamentöse Induktion des Chemokinrezeptors konnte unter Therapie mit Dacarbazin in einem Mausmodell für malignes Melanom sowie unter Bevacizumab bei Patienten mit Kolonkarzinom nachgewiesen werden⁵³. Demgegenüber konnte *in vivo* mittels [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT in 3 Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen gezeigt werden, dass die Expression von CXCR4 im kurzfristigen Verlauf nach Applikation von 3 unterschiedlichen Therapieprotokollen herunterreguliert wurde⁹². Die immunhistochemische Analyse der Chemokinrezeptorenexpression in Tumoren stellt somit eher eine „Momentaufnahme“ eines dynamischen Systems dar und muss mit Vorsicht und insbesondere mit Rücksicht auf mögliche Einflussfaktoren interpretiert werden. Beweisend dafür ist vor allem die von Weiss et al. beschriebene intraindividuelle Variabilität der CXCR4 Expression, welche anhand immunhistochemischer Analysen von konsekutiv über mehrere Jahre aus denselben Patienten entfernten pulmonalen Metastasen

demonstriert werden konnte⁶⁸. Die Metastasen eines Patienten wiesen innerhalb der ersten 3 Jahre nach der Erstdiagnose eine positive CXCR4 Expression auf, wobei die innerhalb des vierten Jahres gewonnenen Metastasen als schwach positiv oder negativ beschrieben wurden⁶⁸.

Die inverse Korrelation zwischen der CXCR7 Membranexpression und Ki67 und der Überlebensvorteil der Patienten aus der Gruppe der nicht-resektablen Tumoren mit verstärkter zytoplasmatischen CXCR7 Färbung deuten darauf hin, dass CXCR7 eher in wenig aggressiven bzw. langsam wachsenden Tumoren exprimiert wird. Darüber hinaus könnte man aufgrund der signifikanten positiven Korrelation zwischen den zytoplasmatischen Expressionen beider Chemokinrezeptoren spekulieren, dass der beschriebene positive Einfluss von CXCR4 auf die Prognose von Patienten in der „low ENSAT“ (ENSAT I-II) und „low Ki67“ (Ki67<10%) Gruppe teilweise durch die Wechselwirkung mit CXCR7 erklärt werden konnte. Weiss et al. beschrieben ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen CXCR4 und CXCR7 auf mRNA-Ebene in Nebennierenrindenzinometastasen⁶⁸. Die Autoren legten allerdings den Fokus eher auf die tumorfördernde Rolle von CXCR4/CXCR7 Heterodimeren in verschiedenen Neoplasien anhand der Literatur, führten jedoch selbst keine Analyse diesbezüglich durch. Aus dem engen Zusammenspiel zwischen beiden Chemokinrezeptoren können sowohl agonistische als auch antagonistische Interaktionen jeweils mit tumorfördernden und tumorsuppressiven Effekten entstehen, so dass das Ergebnis der ausgelösten Signalkaskaden sich ständig ändern kann^{50,55}.

Die bessere Prognose CXCR7-positiver Tumoren wurde bisher hauptsächlich auf die Scavenger Funktion des Chemokinrezeptors zurückgeführt, wodurch CXCR4 die CXCL12-Gradienten entzogen werden⁹³⁻⁹⁵. Heckmann und Hernandez erklären auf dieser Basis die verminderte Invasivität der CXCR7-positiven Kolon- und Mammakarzinomzellen im Vergleich zu CXCR4-exprimierenden Tumorzellen^{63,93}. Liberman et al. berichten über ein signifikant verzögertes Tumorwachstum sowie über eine signifikant reduzierte Chemotaxie der CXCR7-positiven Neuroblastomzellen im Vergleich zu den hoch proliferativen und mobilen CXCR4-exprimierenden Zellen desselben Tumors⁹⁵. Durch die Entstehung von CXCR4/CXCR7 Heterodimeren ließ sich zusätzlich die Induktion einer konformationellen Änderung von CXCR4 mit verzögerter Aktivierung des Rezeptors zeigen⁹⁶.

Ähnlich wie beim CXCR4, können wir nur von einem partiellen, diesmal positiven Beitrag des Chemokinrezeptors CXCR7 zur Prognose der NN-Karzinome ausgehen. Trotz der relativ großen Kohorte erkennt man weder in der uni-/multivariaten Analyse noch in den Kaplan-Meier Analysen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens oder des Tumorprogresses.

4.3. Pathophysiologische Relevanz von CXCR4 und CXCR7 in Phäochromozytomen

Insgesamt stellt sich die CXCR4 Expression der analysierten Phäochromozytome schwach dar und entspricht somit der vorhandenen, allerdings sehr spärlichen Literatur dazu. In der Studie von Thouënnon wurden 25 Phäochromozytome (9 maligne und 16 benigne) auf spezifische Peptide (NPY, AM, PACAP) und deren Rezeptoren (inkl. CXCR4/Y3 und CXCR7/RDC1) untersucht⁷⁰. Die mittels RT PCR beurteilte CXCR4 Expression stellte sich als sehr schwach (< 1% bezogen auf die Expression der Referenzgene) in 73% der analysierten Proben dar⁷⁰. Der von uns beobachtete signifikante Unterschied in der zytoplasmatischen CXCR4 Expression zwischen benignen und malignen Phäochromozytomen trotz einer insgesamt schwachen Färbung ist vor dem Hintergrund der niedrigen Fahlzall und der generell niedrigen Expression mit Vorsicht zu interpretieren und bedarf einer Evaluation an größeren Kohorten.

Im Vergleich zu CXCR4, zeigte CXCR7 eine deutlich höhere Expression sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma. Passend dazu wird CXCR7 in der Studie von Thouënnon et al. als Merkmal maligner Phäochromozytome dargestellt⁷⁰. Die Autoren beschrieben die Hochregulation des Chemokinrezeptors auf mRNA Ebene in malignen Phäochromozytomen und konnten die CXCR7-induzierte Proliferation sowohl in humanen als auch in aus Ratten gewonnenen Phäochromozytom-Tumorzellen nachweisen⁷⁰. Unsere Analyse ergab hingegen eine grenzwertig höhere CXCR7 Expression in den benignen Tumoren, welche nur auf Membranebene eine statistische Signifikanz erreichte. Wegen der kleinen Probenzahl ist uns allerdings nicht möglich, Aussagen zu der vermuteten Rolle von CXCR7 in der Karzinogenese und Metastasierung von Phäochromozytomen zu machen. Diese bedarf wiederum einer Bestätigung an einer größeren Kohorte.

4.4. Möglichkeit einer Chemokinrezeptor-gerichteten Therapie in Nebennierentumoren

4.4.1. NN-Karzinom

Unabhängig von der prognostischen Relevanz bietet CXCR4 ein mögliches theranostisches Target für NN-Karzinome. Die erste proof-of-concept Studie von Bluemel et al. deutet auf das theranostische Potential von CXCR4 in über 50% der untersuchten Patienten mit metastasiertem NN-Karzinom anhand der Zahl und Intensität mittels ^{68}Ga -Pentixafor-PET/CT dargestellter Läsionen im Vergleich zur „klassischen“ ^{18}F FDG PET CT hin⁶⁷. Weiss et al. konnten darüber hinaus zum ersten Mal die Intensität des Tracer Uptakes mit der Intensität der immunhistochemischen Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in 6 resezierten Metastasen korrelieren⁶⁸.

Unsere Arbeit liefert zusätzliche Evidenz für die Nützlichkeit von CXCR4 zur Etablierung eines theranostischen Konzepts beim NN-Karzinom. Die Mehrheit unserer analysierten Proben besteht aus Primärtumoren und ergänzt somit die überwiegend aus Nebennierenkarzinom-Metastasen entstandene Kohorte von Weiss et al.. Demzufolge wird die Evidenz der für ein solches Verfahren erforderlichen Expression von CXCR4 in allen Tumorkläsionen verstärkt. Weiterhin stellt nicht nur das Vorkommen, sondern auch die überwiegend membranöse Darstellung des Chemokinrezeptors einen Vorteil für ein theranostisches Konzept dar, da die Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an der Zelloberfläche eine Voraussetzung für die Bindung von Liganden, einschließlich der verfügbaren Radiotracer, ist⁹⁷.

Es müssen natürlich weitere Voraussetzungen für die Validierung des Chemokinrezeptors als Zielstruktur erfüllt werden. Unter anderem muss insbesondere für ein therapeutisches Potential ein hoher und anhaltender Uptake in allen Tumorkläsionen nachweisbar sein. In der Arbeit von Bluemel et al. gelang es mittels ^{68}Ga -Pentixafor-PET/CT in mindestens 40% der Patienten nicht, alle Metastasen zu erkennen. Diese inter- und intraindividuelle Tumorerheterogenität, passend zu der von Weiss et al. beobachteten schwankenden CXCR4 Expression auf Proteinebene in Nebennierenkarzinommetastasen, kann somit die In-vivo-Darstellung von CXCR4 stark beeinflussen^{67,98}. Generell zeigt die intraindividuelle Tumorerheterogenität hinsichtlich der Darstellbarkeit einer CXCR4-Expression auch, dass die isolierte Untersuchung einzelner Malignomherde hinsichtlich der CXCR4 Expression nicht ausreichend das Gesamtbild und damit auch die Gesamtprognose widerspiegelt.

Die Ergebnisse von Bluemel und Weiss und unsere Expressionsanalysen bieten Grundlagen für weitere Untersuchung des theranostischen Potentials von CXCR4 in einer größeren Kohorte von Patienten mit NN-Karzinom, wie bereits bei anderen Neoplasien gezeigt⁹⁹⁻¹⁰².

4.4.2. Phäochromozytom

Beim Phäochromozytom scheint eine Radioliganden-Therapie mit einem CXCR4 Antagonist wegen der insgesamt geringen Expression, wie bereits aus anderen Untersuchungen bekannt^{70,81}, wenig sinnvoll. Allerdings könnte ein CXCR7-Ligand eine interessante Option darstellen, insbesondere unter der Annahme einer Rolle in malignen Phäochromozytomen, wie vom Thouënon angedeutet⁷⁰. Diese Aspekte lassen sich allerdings aus Zellversuchen und Studien mit kleinen Fallzahlen ableiten und bedürfen somit weiterer Untersuchungen an repräsentativen Kohorten.

5. Zusammenfassung

Unsere Arbeit bestätigt die aus kleineren Studien bekannte hohe Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 in der normalen Nebenniere und in der Mehrheit der Nebennierenkarzinome. Das auf mRNA Ebene bestätigte Vorkommen beider Chemokinrezeptoren im gesunden Nebennierengewebe deutet auf eine überwiegend für die normale Nebennierenphysiologie wichtige Rolle dieser Chemokinrezeptoren hin. Eine eventuell dennoch bestehende pathophysiologische Relevanz der Rezeptoren wurde ergänzend überprüft. Erstmals wurde hierbei der Zusammenhang zwischen beiden Chemokinrezeptoren und dem klinischen Verlauf bezogen auf die Expressionsintensität und das Expressionsmuster in einer großen Kohorte von Patienten mit Nebennierenkarzinom analysiert. In der für diese seltene Tumorerkrankung relativ großen Zahl von 195 Tumorproben ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 oder CXCR7 und der Überlebenszeit (Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben) erkennen. Weiterhin fand sich kein Zusammenhang mit dem Metastasierungspotential der NN-Karzinome. Metastasen wiesen im Vergleich zu Primärtumoren zudem kein unterschiedliches Expressionsniveau der beiden Rezeptoren auf.

Die signifikante positive Korrelation der membranösen CXCR4 Expression mit dem Proliferationsindex Ki67 deutet jedoch darauf hin, dass CXCR4 mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert ist. Demgegenüber fand sich für die zytoplasmatische Lokalisation des Chemokinrezeptors ein Überlebensvorteil, allerdings nur bei denjenigen Patienten mit bereits relativ günstiger Prognose. CXCR7 hingegen scheint sowohl auf membranöser als auch auf zytoplasmatischer Ebene mit einer günstigeren Prognose des NN-Karzinoms korreliert zu sein. Die in den meisten Nebennierenkarzinomen nachweisbare membranöse Expression von CXCR4 weisen auf eine Eignung dieses Rezeptors als Zielstruktur für CXCR4-Liganden als Theranostika.

Wie bereits aus anderen Untersuchungen bekannt, wird CXCR4 kaum in Phäochromozytomen exprimiert, wobei CXCR7 eine stärkere Präsenz bietet. Auch wenn unsere Fallzahl zu gering für aussagekräftige Konklusionen ist, können wir mindestens hypothetisieren, dass Patienten mit Phäochromozytom von einer Radioliganden-Therapie mit einem CXCR7 Antagonist profitieren könnten. Dies bedarf wiederum einer Bestätigung an einer größeren Kohorte.

6. Literaturverzeichnis

1. Pittaway JFH, Guasti L. Pathobiology and genetics of adrenocortical carcinoma. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018;62(2):105-119. Doi:10.1530/JME-18-0122
2. Else T, Kim AC, Sabolch A, et al. Adrenocortical Carcinoma. *Endocrine Reviews*. 2014;35(2):282-326. doi:10.1210/er.2013-1029
3. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:4551–64. doi: 10.1210/jc.2013-3020
4. Jouinot A, Bertherat J. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Adrenocortical carcinoma: differentiating the good from the poor prognosis tumors. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(5):R215-R230. doi: 10.1530/EJE-18-0027
5. Fassnacht M, Dekkers O, Else T et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(4):1-46. doi: 10.1530/EJE-18-0608
6. Saeger W. Histopathological classification of adrenal tumours. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(Suppl 3):58-62
7. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W et al. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):841-9. doi: 10.1210/jc.2014-3182
8. Lughezzani G, Sun M, Perrotte P et al. The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):713-9. doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.007
9. Sbiera S, Leich E, Liebisch G et al. Mitotane inhibits sterol-O-acyl transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*. 2015;156:3895–3908
10. Hahner S, Kreissl MC, Fassnacht M et al. [131I]iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:914–922
11. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 2012 7;366(23):2189-97. doi: 10.1056/NEJMoa1200966

12. Kirschner LS. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:(1):14–21
13. Gagliano T., Gentilin E., Benfini K. et al. Mitotane enhances doxorubicin cytotoxic activity by inhibiting P-gp in human adrenocortical carcinoma cells. *Endocrine.* 2014; 47: 943. doi:10.1007/s12020-014-0374-z
14. Abraham, J., Bakke, S., Rutt et al. A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma. *Cancer.* 2002; 94: 2333–2343. doi:10.1002/cncr.10487
15. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH et al. Preclinical Targeting of the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2009;94(1):204-212. doi:10.1210/jc.2008-1456
16. Fay AP, Elfiky A, Teló GH et al. Adrenocortical Carcinoma: The Management of Metastatic Disease. *Critical reviews in oncology/hematology.* 2014;92(2):123-132. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.05.009
17. Naing A, LoRusso P, Fu S et al. Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2013;108(4):826-830. doi:10.1038/bjc.2013.46
18. Fraenkel M., Gueorguiev M., Barak D. et al. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine.* 2013;44:187. doi:10.1007/s12020-013-9878-1
19. Xu Y., Qi Y., Zhu Y. et al. Molecular markers and targeted therapies for adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol,* 2014;80:159–168. doi:10.1111/cen.12358
20. Samnotra V, Vassilopoulou-Sellin R, Fojo AT et al. A phase II trial of gefitinib monotherapy in patients with unresectable adrenocortical carcinoma (ACC). *Journal of Clinical Oncology.* 2007;(25):18:15527-15527
21. Quinkler M , Hahner S , Wortmann S et al. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2057–2062
22. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C et al. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):349-56. doi: 10.1530/EJE-09-0804

23. Berruti A, Sperone P, Ferrero A et al. Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(3):451–458
24. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*;16(4):426 – 435
25. Lughezzani G, Sun M, Perrotte P et al. The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation. *Eur J Cancer.* 2010;46(4):713-9. doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.007
26. Libé R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, Bertherat J, Volante M, Quinkler M, Chabre O et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Annals of Oncology* 2015 26 2119–2125
27. Van Berkel A, Lenders JW, Timmers HJ. *Diagnosis of Endocrine Disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma.* *Eur J Endocrinol.* 2014;170(3):109-19
28. Martucci VL, Pacak K. Pheochromocytoma and Paraganglioma: Diagnosis, Genetics, Management, and Treatment. *Current problems in cancer.* 2014;38(1):7-41. doi:10.1016/j.currproblcancer.2014.01.001
29. Subedi N, Prestwich R, Chowdhury F et al. Neuroendocrine tumours of the head and neck: anatomical, functional and molecular imaging and contemporary management. *Cancer Imaging.* 2013;13(3):407-422. doi:10.1102/1470-7330.2013.0034
30. Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *NEJM.* 2002;346(19):1459–1466
31. Jiang S, Dahia PLM. Minireview: the busy road to pheochromocytomas and paragangliomas has a new member, TMEM127. *Endocrinology.* 2011;152:2133–2140
32. Yao L, Schiavi F, Cascon A et al. Spectrum and prevalence of FP/TMEM127 gene mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *JAMA.* 2010;304(23):2611-9. doi: 10.1001/jama.2010.1830

33. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2828-37. doi: 10.1158/1078-0432
34. Qin Y, Yao L, King EE et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nature genetics.* 2010;42(3):229-233. doi:10.1038/ng.533
35. Lenders JWM, Duh QY, Eisenhofer G et al. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014 99:6, 1915-1942. doi: 10.1210/jc.2014-1498
36. Martins R, Bugalho MJ. Paragangliomas/Pheochromocytomas: Clinically Oriented Genetic Testing. *International Journal of Endocrinology.* 2014. doi:10.1155/2014/794187
37. Lowery AJ, Walsh S, McDermott EW et al. Molecular and Therapeutic Advances in the Diagnosis and Management of Malignant Pheochromocytomas and Paragangliomas. *The Oncologist.* 2013;18(4):391-407. doi:10.1634/theoncologist.2012-0410
38. Thompson LD. Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: A clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(5):551-66
39. Agarwal A, Mehrotra PK, Jain M et al. Size of the tumor and pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS): can they predict malignancy? *World J Surg.* 2010;34(12):3022-8. doi: 10.1007/s00268-010-0744-5
40. Li J, Yang C-H. Improvement of preoperative management in patients with adrenal pheochromocytoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2014;7(12):5541-5546
41. Därr R, Lenders JWM, Hofbauer LC et al. Pheochromocytoma – update on disease management. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism.* 2012;3(1):11-26. doi:10.1177/2042018812437356
42. Berruti A, Baudin E, Gelderblom H et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012; 23(7):131-138
43. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4:540-550. doi:10.1038/nrc1388
44. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol.* 2012;226(2):148-57. doi: 10.1002/path.3029

45. Mukaida N, Sasaki S, Baba T. Chemokines in Cancer Development and Progression and Their Potential as Targeting Molecules for Cancer Treatment. *Mediators of Inflammation*.;2014:170381. doi:10.1155/2014/170381
46. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(7):368-76. doi:10.1016/S0165-6147(00)01678-3
47. New DC, Wong YH. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *Journal of Molecular Signaling*. 2007;2:2. doi:10.1186/1750-2187-2-2
48. Ulvmar MH, Hub E, Rot A. Atypical chemokine receptors. *Experimental Cell Research*. 2011;317(5):556-568. doi:10.1016/j.yexcr.2011.01.012
49. Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Advances in cancer research*. 2014;124:31-82. doi:10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1
50. Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer metastasis reviews*. 2010;29(4):709-722. doi:10.1007/s10555-010-9256-x
51. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;97(5):755-762
52. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(11):1928-1936. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162925
53. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *European Journal of Cancer*. 2014;49(1):219 – 230. doi: 10.1016/j.ejca.2012.05.005
54. Asri A, Sabour J, Atashi A et al. Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis. *EXCLI Journal*. 2016;15:134-143. doi:10.17179/excli2014-585
55. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, et al. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. Pockley G, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9175. doi:10.1371/journal.pone.0009175

56. Würth R, Bajetto A, Harrison JK et al. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:144. doi:10.3389/fncel.2014.00144
57. Deshmukh A, Deshpande K, Arfuso F et al. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2016;15:69. doi:10.1186/s12943-016-0555-x
58. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
59. Wang H, Unternaehrer JJ. Epithelial-mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: At the Crossroads of Differentiation and Dedifferentiation. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*. 2019;248:10–20. doi: 10.1002/dvdy.24678
60. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(11):669-680. doi: 10.1038/s41568-018-0056-x
61. Trautmann F, Cojoc M, Kurth I et al. CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol*. 2014;90(8):687-99. doi: 10.3109/09553002.2014.906766
62. Eckert F, Schilbach K, Klumpp L et al. Potential Role of CXCR4 Targeting in the Context of Radiotherapy and Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol*. 2018;9:3018. doi 10.3389/fimmu.2018.03018
63. Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ et al. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research : BCR*. 2011;13(6):R128. doi:10.1186/bcr3074
64. Wang C, Chen W, Shen J. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Front Pharmacol*. 2018;9:641. doi:10.3389/fphar.2018.00641
65. Scala S. Molecular Pathways: Targeting the CXCR4–CXCL12 Axis—Untapped Potential in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(19): 4278-4285. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0914
66. Kircher M, Herhaus P, Schottelius M et al. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Ann Nucl Med*. 2018;32(8):503–511. doi:10.1007/s12149-018-1290-8

67. Bluemel C, Hahner S, Heinze B et al. Investigating the Chemokine Receptor 4 as Potential Theranostic Target in Adrenocortical Cancer Patients. *Clin Nucl Med.* 2017;42(1):e29-e34
68. Weiss ID, Huff LM, Evbuomwan MO et al. Screening of cancer tissue arrays identifies CXCR4 on adrenocortical carcinoma: correlates with expression and quantification on metastases using ⁶⁴Cu-plerixafor PET. *Oncotarget.* 2017;8(43):73387–73406. doi:10.18632/oncotarget.19945
69. Heinze B, Fuss CT, Mulatero P et al. Targeting CXCR4 (CXC Chemokine Receptor Type 4) for Molecular Imaging of Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension.* 2018;71(2):317-325. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09975
70. Thouënon E, Pierre A, Tanguy Y et al. Expression of trophic amidated peptides and their receptors in benign and malignant pheochromocytomas: high expression of adrenomedullin RDC1 receptor and implication in tumoral cell survival. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(3):637-51. doi: 10.1677/ERC-10-0109
71. Wang T, Rainey WE. Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):58–65. doi:10.1016/j.mce.2011.08.041
72. Fang HY, Munch NS, Schottelius M et al. CXCR4 is a potential target for diagnostic PET/ CT imaging in Barrett's Dysplasia and Esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(5):1048–61
73. Wang H, Tao L, Qi K et al. CXCR7 functions in colon cancer cell survival and migration. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2015;10(5):1720-1724. doi:10.3892/etm.2015.2748
74. Tachezy M, Zander H, Gebauer F et al. CXCR7 expression in esophageal cancer. *Journal of Translational Medicine.* 2013;11:238. doi:10.1186/1479-5876-11-238
75. Lee, H.J., Kim, S.W., Kim et al. Chemokine receptor CXCR4 expression, function, and clinical implications in gastric cancer. *International Journal of Oncology.* 2009; 34(2):473-480. doi:10.3892/ijo_00000172
76. Okuyama Kishima M, de Oliveira CEC, Banin-Hirata BK et al. Immunohistochemical Expression of CXCR4 on Breast Cancer and Its Clinical Significance. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2015;2015:891020. doi:10.1155/2015/891020
77. Hattermann K, Holzenburg E, Hans F et al. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast

- cancer cells. *Cell and Tissue Research*. 2014;357(1):253-266. doi:10.1007/s00441-014-1823-y
78. Neve Polimeno M, Ierano C, D'Alterio C et al. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not. *Cellular and Molecular Immunology*. 2015;12(4):474-482. doi:10.1038/cmi.2014.102
79. Wehler TC, Graf C, Biesterfeld S et al. Strong Expression of Chemokine Receptor CXCR4 by Renal Cell Carcinoma Correlates with Advanced Disease. *Journal of Oncology*. 2008:626340. doi:10.1155/2008/626340
80. Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H et al. Stromal Cell-Derived Factor-1 α and CXCR4 Expression in Hemangioblastoma and Clear Cell-Renal Cell Carcinoma: von Hippel-Lindau Loss-of-Function Induces Expression of a Ligand and Its Receptor. *Cancer Research*. 2005; 65(14). doi:10.1158/0008-5472
81. Fischer T, Nagel F, Jacobs S et al. Reassessment of CXCR4 Chemokine Receptor Expression in Human Normal and Neoplastic Tissues Using the Novel Rabbit Monoclonal Antibody UMB-2. *PLoS One*. 2008;3(12):e4069. doi: 10.1371/journal.pone.0004069
82. Lin L, Han MM, Wang F, Xu LL, Yu HX, Yang PY. CXCR7 stimulates MAPK signaling to regulate hepatocellular carcinoma progression. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1488. doi:10.1038/cddis.2014.392
83. Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical Stem and Progenitor Cells—Implications for Adrenocortical Carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;351(1):2-11. doi:10.1016/j.mce.2011.12.006
84. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(50):21185-21190. doi:10.1073/pnas.0909471106
85. Kovach AE, Nucera C, Lam QT, Nguyen A, Dias-Santagata D, Sadow PM. Genomic and immunohistochemical analysis in human adrenal cortical neoplasia reveal beta-catenin mutations as potential prognostic biomarker. *Discoveries (Craiova)*. 2015;3(2):e40. doi:10.15190/d.2015.32
86. Waldmann J, Patsalis N, Fendrich V et al. Clinical impact of TP53 alterations in adrenocortical carcinomas. *Langenbecks Arch Surg*. 2012 Feb;397(2):209-16. doi: 10.1007/s00423-011-0868-6

87. Ip JC, Pang TC, Glover AR, et al. Immunohistochemical validation of overexpressed genes identified by global expression microarrays in adrenocortical carcinoma reveals potential predictive and prognostic biomarkers. *Oncologist*. 2015;20(3):247–256. doi:10.1634/theoncologist.2014-0392
88. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and β -catenin. *Am J Pathol*. 2012;181(3):1017–1033. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.026
89. Libé R, Borget I, Ronchi CL et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann Oncol*. 2015;26(10):2119-25. doi: 10.1093/annonc/mdv329
90. Shim B, Jin MS, Moon JH et al. High Cytoplasmic CXCR4 Expression Predicts Prolonged Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy. *J Pathol Transl Med*. 2018;52(6):369–377. doi:10.4132/jptm.2018.09.19
91. Kallikourdis M, Trovato AE, Anselmi F et al. The CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T-cell immunologic synapse. *Blood*. 2013;122(5):666–673. doi:10.1182/blood-2012-10-461830
92. Lapa C, Luckerath K, Kircher S et al. Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy. *Br J Haematol*. 2018;184(3):440-443. doi 10.1111/bjh.15096
93. Heckmann D, Maier P, Laufs S et al. The Disparate Twins: A Comparative Study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -Induced Gene Expression, Invasion and Chemosensitivity of Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20(3):604-616. doi: 10.1158/1078-0432
94. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M et al. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. Pockley G, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9175. doi:10.1371/journal.pone.0009175
95. Liberman J, Sartelet H, Flahaut M et al. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 Axis in the Malignant Progression of Human Neuroblastoma. *PLoS ONE*. 2012;7(8): e43665. doi:10.1371/journal.pone.0043665
96. Levoye A, Balabanian K, Baleux F et al. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*. 2009;113(24):6085-93. doi: 10.1182/blood-2008-12-196618

97. Vag T, Gerngross C, Herhaus P et al. First Experience with Chemokine Receptor CXCR4-Targeted PET Imaging of Patients with Solid Cancers. *J Nucl Med.* 2016;57(5):741-6. doi: 10.2967/jnumed.115.161034
98. Bluemel C, Lapa C, Schirbel A et al. A theranostic approach for adrenocortical neoplasia based on high adrenal CXCR4 expression. *J Nucl Med.* 2015; 56(3): 145.
99. Lapa C, Lückcrath K, Rudelius M et al. [68Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer--initial experience. *Oncotarget.* 2016;7(8):9288–9295. doi:10.18632/oncotarget.7063
100. Derlin T, Jonigk D, Bauersachs J et al. Molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 in non-small cell lung cancer using 68 Ga-pentixafor PET/CT: comparison with 18F-FDG. *Clin Nucl Med.* 2016;41(4):e204-5. doi: 10.1097/RLU.0000000000001092
101. Habringer S, Lapa C, Herhaus P et al. Dual targeting of acute leukemia and supporting niche by CXCR4-directed theranostics. *Theranostics.* 2018;8(2):369–83
102. Lapa C, Hanscheid H, Kircher M et al. Feasibility of CXCR4-directed radioligand therapy in advanced diffuse large B cell lymphoma. *J Nucl Med.* 2019;60(1):60-64. doi: 10.2967/jnumed.118.210997

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: mRNA-Expressionsanalyse (quantitative PCR) der Chemokinrezeptoren CCR1-11, CXCR 1-7 und CX3CR1 in der normalen Nebenniere (n=4), in Nebennierenrindenzinomen (n=18) und in der NCI-H295 Nebennierenkarzinom-Zelllinie.

Abbildung 2: mRNA-Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren CCR1-11, CXCR 1-7 und CX3CR1 in Phäochromozytomen (n=10)

Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung von CXCR4 im Nebennierenkarzinom

Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung von CXCR7 im Nebennierenkarzinom

Abbildung 5: Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR4

Abbildung 6: Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR7

Abbildung 7: Kaplan-Meier Analyse zum progressionsfreien Überleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR4

Abbildung 8: Kaplan-Meier Analyse zum progressionsfreien Überleben für die Gesamtkohorte bezogen auf die Intensität der membranösen und zytoplasmatischen Färbung für CXCR7

Abbildung 9: Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Subgruppe der Patienten mit lokalisierten Tumorstadien (ENSAT Stadium I und II) bezogen auf die zytoplasmatische CXCR4 Expression

Abbildung 10: Kaplan-Meier Analyse zum Gesamtüberleben für die Subgruppe der Patienten mit niedrigem Ki67 (<10%) bezogen auf die zytoplasmatische CXCR4 Expression

Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung von CXCR4 und CXCR7 in benignen und malignen Phäochromozytomen

Tabelle 1: ENSAT Staging System für das NN-Karzinom

Tabelle 2: Geräte

Tabelle 3: Materialien

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Kits

Tabelle 6: Zusammensetzung des Kulturmediums der NCI-H295 Zelllinie

Tabelle 7: Zusammensetzung des Einfriermediums der NCI-H295 Zelllinie

Tabelle 8: Patienten mit NN-Karzinom: Charakterisierung der Gesamtkohorte (n=195) bezogen auf demographische und klinische Daten

Tabelle 9: Patienten mit Phäochromozytom: klinische und demographische Charakteristika der Patientengruppen aufgeteilt nach Tumordignität

Tabelle 10: Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Nebennierenkarzinomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score)

Tabelle 11: Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Nebennierenkarzinomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score) bezogen auf den Tumorsubtyp (PT=Primärtumor, LR=Lokalrezidiv, M=Metastase)

Tabelle 12: Inzidenz der Metastasen bei Erstdiagnose und Follow-up in der Gesamtkohorte der Patienten mit NN-Karzinom bezogen auf die Intensität und das Muster der CXCR4 Expression

Tabelle 13: Inzidenz der Metastasen bei Erstdiagnose und Follow-up in der Gesamtkohorte der Patienten mit NN-Karzinom bezogen auf die Intensität und das Muster der CXCR7 Expression

Tabelle 14: Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben in der Gesamtkohorte (n=195)

Tabelle 15: Uni- und multivariate Analyse für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtkohorte (n=195)

Tabelle 16: Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben in der Subgruppe der R0-resezierten Patienten (n=97)

Tabelle 17: Uni- und multivariate Analyse für das progressionsfreie Überleben in der Subgruppe der R0-resezierten Patienten (n=97)

Tabelle 18: Immunhistochemische Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in der Gesamtkohorte von Phäochromozytomen: Darstellung des Verteilungsmusters (membranös, zytoplasmatisch) und der Färbungsintensität (H-Score) bezogen auf die Tumordignität

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

An der ersten Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Stefanie Hahner für die Möglichkeit einer Doktorarbeit in der Endokrinologie und die tatkräftige Betreuung, geduldige Beratung und exzellentes Mentoring bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Bruno Allolio und Herrn Prof. Fassnacht, die mir die Chance gegeben haben, die von mir angestrebte Karriere als Wissenschaftlerin und Klinikerin an einem der besten Zentren für Endokrinologie aufzubauen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Britta Heinze, die meine Arbeit im Labor engmaschig supervidiert und meine Fragen „rund um die Uhr“ beantwortet hat.

Danke möchte ich außerdem Frau Dr. Cristina Ronchi und Frau Dr. Barbara Altieri für die Unterstützung bei der statistischen Interpretation und graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Desweiteren bedanke ich mich bei der gesamten Abteilung für Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg. Diese Arbeit wäre ohne so viele helfende und begabte Hände nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets auf meinem Weg durch das Studium und durch das Leben begleitet haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Irina Oana Chifu
Geburtsdatum: 06.01.1989
Geburtsort: Iași, Rumänien
Klinikadresse: Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik I,
Oberdürrbacher Str. 6, 97090 Würzburg
Email: chifu_i@ukw.de

Berufserfahrung:

03/15 Erlangung der Approbation als Ärztin (Regierung von
Unterfranken)
Seit 04/15 Assistenzärztin für Endokrinologie am Universitätsklinikum
Würzburg, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und
Poliklinik I, Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie

Schul- und Berufsbildung

10/2008 – 09/2014 Studium der Humanmedizin
Universität für Medizin und Pharmazie “Gr.T.Popa“, Iași,
Rumänien
16/09/2014 Abschluss des Studiums mit dem Vortrag der Diplomarbeit zum
Thema „Die Wirkung der Therapie mit Wachstumshormon bei
Kindern mit Wachstumsdefizit“, Schwerpunkt Endokrinologie,
Universität für Medizin und Pharmazie “Gr.T.Popa“, Iași,
Rumänien
Koordinator: Prof. Dr. med. Carmen Vulpoi
2004 – 2008 Gymnasium
Colegiul Național Iași, Iași, Rumänien
Abschluss: Abitur (Fachrichtung Mathematik-Informatik)

Kongressbeiträge und Vorträge

- 03/2019 Neue diagnostische Standards bei Diabetes insipidus (Vortrag), Frühjahrssitzung der AG Hypophyse und Hypophysentumore der DGE, 62. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Göttingen
- 03/2019 Assessment of tissue sodium content by ²³Na-MRI in patients with adrenal (Postersession), 62. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Göttingen
- 03/2019 Assessment of tissue sodium content by ²³Na-MRI in patients with adrenal (Postersession), ENDO 2019, New Orleans
- 06/2018 Management der moderat und schwer symptomatischen Hyponatriämie – eine prospektive observationelle monozentrische Studie (Postersession), 50. Gemeinsame Jahrestagung DGIIN & ÖGIAIN, Köln
- 05/2018 Assessment of tissue sodium content by ²³Na-MRI in patients with primary adrenal insufficiency – a pilot study (oral communication), 20th European Congress of Endocrinology, Barcelona
- 03/2018 Management of moderate and severe symptomatic hyponatremia – a prospective observational single-center study (Postersession), 61. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Bonn
- 05/2017 Impact of the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 on metastatic potential and survival in adrenocortical carcinoma (Postersession). 59. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 21. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel und Frühjahrestagung 2016 der Schweizerischen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie (DACH-Tagung der DGE, ÖGES und SGED), München

- 05/2016 Impact of the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 on metastatic potential and survival in adrenocortical carcinoma (Postersession), Endocrine Abstracts (2016) 41 EP15
doi:10.1530/endoabs.41.EP15. 18th European Congress of Endocrinology, München
- 09/2014 The Impact of GH Replacement Therapy in Children Born Small-for-Gestational-Age: growth Response and Safety Profile (Postersession), 53rd Annual Meeting ESPE, 2014, Dublin, Ireland

Stipendien und wissenschaftliche Preise

- 10/2012 – 08/2013 Erasmus Stipendium
„Albert Ludwigs“ Universität Freiburg, Medizinische Fakultät, Freiburg im Breisgau
- 2018 Posterpreis der DGE, 13. Deutsche Nebennierenkonferenz der Sektion Nebenniere, Steroide und Hypertonus 2018
- Seit 05/2019 Forschungsfreistellung (SFB/TRR 205 Nebenniere)

Publikationen

- 1) Refardt J, Sailer COO, Chifu I, Winzeler B, Schnyder I, Fassnacht M, Fenske WK, Christ-Crain M. The challenges of sodium measurements - indirect versus direct ion selective method. Eur J Endocrinol. 2019. doi: 10.1530/EJE-19-0101
- 2) Fenske W, Refardt J, Chifu I, Schnyder I, Winzeler B, Drummond J, Ribeiro-Oliveira A Jr, Drescher T, Bilz S, Vogt DR, Malzahn U, Kroiss M, Christ E, Henzen C, Fischli S, Tönjes A, Mueller B, Schopohl J, Flitsch J, Brabant G, Fassnacht M, Christ-Crain M. A Copeptin-Based Approach in the Diagnosis of Diabetes Insipidus. N Engl J Med. 2018;379(5):428-439
- 3) Refardt J, Sailer CO, Winzeler B, Betz MJ, Chifu I, Schnyder I, Fassnacht M, Fenske W, Christ-Crain M. FGF-21 levels in polyuria-polydipsia syndrome. Endocr Connect. 7(12):1501-1506. doi: 10.1530/EC-18-0469.

4) Chifu I, Fenske W. New Diagnostic Standard in Diabetes Insipidus. Dtsch Med Wochenschr. 2018;143(24):1739-1744. doi: 10.1055/a-0660-5366.

Mitgliedschaften in wissenschaftlichen Gesellschaften

- 1) Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) seit 2015
- 2) Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) seit 2015
- 3) Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) seit 2016
- 4) European Society for Endocrinology (ESE) seit 2016

Kenntnisse

Fremdsprachen: Englisch: C1
 Deutsch: C1

Klinische Studien

EudraC T-Nr.	Phase	Indikation	Funktion	Zeitraumen der Teilnahme an den Studien
		Adipositas (randomisierte Studie: Op vs. konservative Therapie; WAS-Studie)	Mitglied der Prüfgruppe	Seit 2015
2010-024621-20	II	Phäochromozytom (Sunitinib vs. Placebo: FIRST-MAPPP)	Mitglied der Prüfgruppe	Seit 2015
		Polyurie/Polydipsie-Syndrom: (Copeptin in the Differential Diagnosis of Diabetes Insipidus, CODDI)	Mitglied der Prüfgruppe	2016-2017

		Nebennierentumor mit subklinischem Cushing-Syndrom (randomisierte Studie: Op vs. konservative Therapie) (Chiracic)	Mietglied der Prüfgruppe	Seit 2017
		Hyponatriämie - Studie zum Management der moderat und schwer symptomatischen Hyponatriämie	Mietglied der Prüfgruppe	Seit 2017
2016-000136-17		Prospektive, randomisierte, multizentrische klinische Prüfung zum Einfluss von Therapeutischem Drug Monitoring (TDM) von Piperacillin auf die Organ- funktionen und das Überleben von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (Target)	Mietglied der Prüfgruppe	Seit 2019
		Register und Biomaterialsammlung von Patienten mit chronischer Nebenniereninsuffizienz: Datenerhebung zu Diagnostik, Therapie und dem Krankheitsverlauf der chronischen Nebenniereninsuffizienz	Mietglied der Prüfgruppe	Seit 2019

2018-004159-19		Use of Copeptin Measurement after Arginine Infusion for the Diagnosis of Diabetes Insipidus - the CARGOx Study	Mitglied der Prüfgruppe	Seit 2019
----------------	--	--	-------------------------	-----------

Würzburg, 07.10.2020