

Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

**Immunhistochemischer Nachweis von  
Insulin-like Growth Factor-Bindeproteinen (IGFBP)-1-6  
in Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen**

Cordula Abels

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer

Die Dissertation wurde am 12.01.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 26.09.2007 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1    Charakterisierung von Kraniopharyngeomen	8
2.2    Charakterisierung von Hypophysenadenomen	10
2.3    Charakterisierung der GH-IGF-Achse	12
2.3.1  Insulin-like growth factors	13
2.3.2  IGF-Rezeptoren	15
2.3.3  IGF-Bindeproteine	15
2.3.4  IGFBP-Proteasen	16
2.4    Problemstellung	17
<b>3. Methoden</b>	<b>19</b>
3.1    Durchführung der immunhistochemischen Färbung	20
3.2    Immunreaktive Beurteilung	22
3.3    Durchführung der Immunelektronenmikroskopie	23
3.4    Serumuntersuchungen	24
3.5    Statistische Analyse	24
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1    Ergebnis der Positivkontrolle	25
4.2    Charakteristika der Studienpopulation	25
4.3    Klinische Symptomatik der Hypophysentumoren	28
4.4    Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an den Hypophysentumoren	31
4.4.1  Zytoplasmatische und nukleäre Reaktion	31
4.4.2  Paranukleäre Anfärbung	33
4.5    Ergebnis der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung	35
4.6    Subklassifikation und Hormonaktivität	35
4.7    Vergleich Kraniopharyngeome - Hypophysenadenome	40
4.8    Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumoren	43
4.9    Ergebnisse von Hormonuntersuchungen im Serum	44
4.10   Binär logistische Regression	51
4.11   Charakteristische immunhistochemische Abbildungen	51

<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1 Studienpopulation	61
5.2 Histologische und klinische Aspekte der Hypophysentumoren	62
5.2.1 Kraniopharyngeome	62
5.2.2 Hypophysenadenome	63
5.3 Bedeutung von IGF in der Karzinogenese	65
5.4 Hypophysentumoren und die IGF-Achse	66
5.5 IGFBP als IGF-Modulatoren und eigenständige Mitogene	68
5.5.1 IGFBP-1	70
5.5.2 IGFBP-2	71
5.5.3 IGFBP-3	72
5.5.4 IGFBP-4	73
5.5.5 IGFBP-5	73
5.5.6 IGFBP-6	74
5.5.7 IGFBP-related proteins	74
5.6 Vergleich beider Tumoren der Sellaregion	75
5.6.1 Immunhistochemischer Nachweis der IGFBP	75
5.6.1.1 Zytoplasmatische Anfärbung	75
5.6.1.2 Paranukleäre Reaktion	76
5.6.1.3 Nukleäre Anfärbung der IGF-Bindeproteine	78
5.6.2 Proliferationsmarker Ki-67 bei Hypophysentumoren	81
5.6.3 Rezidivneigung	83
5.7 Beziehung der IGFBP-Expression zu Hormonserumwerten, Subklassifikation, Rezidivrate und histologischer Hormonaktivität	86
5.8 Aktuelles zur Pathogenese von Hypophysentumoren	88
5.9 GH-IGF-Achse und therapeutische Aussichten	90
5.10 Schlussfolgerung	92
<b>6. Zusammenfassung und abschließende Bewertung</b>	<b>93</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>108</b>

## 1. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotin-peroxidase complex</i>
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Ak/ AK	Antikörper
ALS	<i>acid labile subunit</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aqua (bi)dest.	Aqua (bi)destillata
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BP	Bindeprotein
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca.	Carcinoma (Karzinom)
CT	Computertomographie
et al.	et alii
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GH	growth hormone
hCG	humanes Choriongonadotropin
H. E.	Hämatoxylin-Eosin(-Färbung)
histolog.	histologisch(e)
HIT/ HIT-ENDO	Hirntumor/ bzw. Kraniopharyngeom-Studie der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hyp.ad.	Hypophysenadenom
IGF(-I/ -II)	<i>insulin-like growth factor (1/ insulin-like growth factor 2)</i>
IGFBP(-rP)	<i>insulin-like growth factor binding protein (-related protein)</i>
IGF-I-R/ IGF-II-R	Typ-I-(oder -II-) IGF-Rezeptor (= IGF-I-(oder -II-)Rezeptor)
IgG	Immunglobulin G
kDa	kilo-Dalton
Ki-67	nukleäres Antigen
LH	luteinisierendes Hormon
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M/ mM	Molar(ität)/ Millimolar(ität)

MIB-1	monoklonaler Antikörper gegen das Kernantigen <i>Ki-67</i>
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µU	Mikro-Einheiten ( <i>units</i> )
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NI	<i>nuclear index</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NNR	Nebennierenrinde
NSD	Nebenschilddrüse
oGTT	oraler Glukose-Toleranz-Test
OP	Operation
PBG	Lösung aus PBS/ BSA und Gelatine
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pH	pondus hydrogenii (Maß für Wasserstoffionenkonzentration)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTH	Parathormon
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TNF(-α)	Tumor-Nekrose-Faktor(-α)
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

Hirntumore sind die häufigsten soliden Neoplasien im Kindesalter und machen etwa 20 Prozent aller Krebserkrankungen im Kindesalter aus (Creutzig et al., 2003). Dabei handelt es sich in etwa 50 Prozent der Fälle um benigne Tumoren unterschiedlicher Entität. Viele der gutartigen Hirntumoren haben eine günstige Prognose, zudem haben zahlreiche Fortschritte im Behandlungsregime ihre Prognose weiter verbessert (Rashidi et al., 2003).

Bei Hypophysentumoren, die in der Regel benigne sind, handelt es sich meistens um Kraniopharyngeome oder Hypophysenadenome, die insgesamt etwa 15 bis 20 Prozent der intrakraniellen Tumoren stellen (Asthagiri, Lopes, 2006). Dabei machen Kraniopharyngeome im Kindesalter 80 bis 90 Prozent der Neubildungen der Sellaregion aus. Trotz ihrer histologischen Benignität können sie aggressiv wachsen und das umgebende Gewebe und den Knochen infiltrieren (Lafferty, Chrousos, 1999).

Wachstumsfaktoren können die Zellteilung stimulieren oder inhibieren, aber auch, wie zum Beispiel der *nerve growth factor*, ohne mitotischen Effekt eine Differenzierung und Hypertrophie auf zellulärer Ebene induzieren.

Der größte Unterschied zwischen den sogenannten *peptide growth factors* und klassischen Hormonen besteht darin, dass die Wachstumsfaktoren an vielen verschiedenen Stellen im Körper entstehen und meist primär auf benachbarte Gewebe (parakrin) oder auf die eigenen Herkunftszellen (autokrin) wirken. Im Gegensatz dazu wirken Hormone vornehmlich endokrin auf entfernte Gewebe.

Speziell die *insulin-like growth factors* (IGF), die zu den Peptid-Wachstumsfaktoren gehören, sind essentiell für die Replikation der meisten Zelllinien (Russell, van Wyk, 1995).

Als Mitogen und antiapoptotisches Agens könnte IGF eine wichtige Rolle in der Karzinogenese übernehmen. Viele neoplastische Zellen exprimieren oder überexprimieren IGF-I-Rezeptoren, die bei Aktivierung durch IGF-I eine mitogene Wirkung vermitteln. Bei der Karzinogenese scheint eine Häufung molekularer Alterationen in spezifischen Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen beteiligt zu sein. Ein schneller Zellwechsel könnte die Rate solcher Alterationen erhöhen, wobei die IGF-Achse eine

Determinante der zellulären Umsatzrate ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass IGF-I für das Überleben transformierter Zellen wichtig ist (Giovannucci, 1999).

Eng mit der GH-IGF-Achse verknüpft sind Wachstumsstörungen. Im Kindesalter beruhen sie in 3 bis 12 Prozent auf einem Wachstumshormonmangel, wobei bei der Hälfte dieser Fälle die Ursache in einer lokalen Läsion der Hypophyse liegt, die meistens durch Hypophysentumoren, selten durch eine Hypoplasie der Hypophyse verursacht wird (Brown, 1996).

Das gegensätzliche Phänomen eines Überschusses an Wachstumshormon führt bei Kindern zum Riesenwuchs und nach Schluss der Epiphysenfugen zur Akromegalie. Das klinische Bild wurde 1886 erstmals von Pierre Marie beschrieben und 1887 von Minkowski mit einem hypophysären Tumor assoziiert (Asa, 1998). Bei einer Akromegalie, charakterisiert durch einen chronisch erhöhten GH-Spiegel mit IGF-I-Hypersekretion, ist mit einer erhöhten Epithelzellproliferation im Kolon und einem erhöhten Risiko für benigne und maligne Kolon-Tumoren zu rechnen. Das zirkulierende IGF-I könnte direkt zu dem erhöhten Risiko beitragen, es könnte aber auch ein Marker für die IGF-Bioaktivität im Gewebe sein (Giovannucci, 1999).

Aus diesen Gründen erscheint die Ausprägung oder Verteilung der GH-IGF-Achse gerade auch in der Hypophysenregion interessant. Im Kindesalter liegt das Augenmerk eindeutig auf dem Kraniopharyngeom. Da dieser Tumor jedoch insgesamt trotzdem selten auftritt, haben wir als Vergleich das zwar ätiologisch differente, aber ebenfalls in der Sellaregion lokalisierte Hypophysenadenom herangezogen, wobei interessanterweise die Hypophyse selbst die Wachstumshormon ausschüttende Drüse ist.

Nach unseren Kenntnissen wurde das Verteilungsmuster der IGF-Bindeproteine in menschlichen Tumoren der Hypophysenregion bisher noch nicht untersucht, obwohl solche Untersuchungen neue Einblicke in die Entstehungsmechanismen derartiger Tumoren liefern könnten.

## **2.1 Charakterisierung von Kraniopharyngeomen**

Kraniopharyngeome sind dysontogenetische Mittellinientumoren mit Raumforderndem Charakter ohne morphologische Malignitätskriterien (Müller et al., 2003). Sie entstehen aus Resten des Epithels der Rathke-Tasche und eventuell auch aus Epi-



thelmetaplasien der endokrinen Parenchymzellen der späteren Pars tuberalis der Hypophyse und sind primär supra- oder intrasellär lokalisiert (Saeger, 2003<sup>a</sup>). Zuerst von Erdheim im Jahre 1904 beschrieben, wurde die Bezeichnung als Kraniopharyngeom 1932 von Cushing vorgenommen.

Kraniopharyngeome machen etwa 3 Prozent aller intrakraniellen Tumoren und etwa 8 bis 10 Prozent der kindlichen Hirntumoren aus (Melmed, 1995; Creutzig et al., 2003).

Sie treten mit einer Inzidenz von 0,5 bis 2/10<sup>6</sup> im Jahr auf und können grundsätzlich in jedem Lebensalter vorkommen. Die Häufigkeitsgipfel liegen jedoch in Kindheit und Adoleszenz (30 bis 50 Prozent; Müller et al., 2003) und bei einem kleinen weiteren Gipfel im 6. Lebensjahrzehnt (Asa, 1998). In der Bundesrepublik erkrankten etwa 40 Kinder und Jugendliche pro Jahr an einem Kraniopharyngeom (Müller, Sörensen, 2006<sup>b</sup>). Im deutschen Kinderkrebsregister wurden von 1980 bis 2001 385 Patienten registriert - dabei lag der Median des Alters bei Diagnosestellung bei 8 3/12 Jahren, das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen (Müller et al., 2003).

Die Symptome entstehen größtenteils durch den Masseneffekt des Tumors, ungefähr 75 Prozent der Patienten klagen über Kopfschmerzen und Sehstörungen (Asa, 1998). Sie produzieren eigentlich keine Hormone, insbesondere nie Hypophysenhormone, obwohl in der Zystenflüssigkeit schon humanes Choriogonadotropin (hCG) ohne entsprechende Serumerhöhung des Hormons nachgewiesen wurde (Harris et al., 1988; Honegger et al., 1995).

Durch Kompression oder Destruktion adenohipophysären oder hypothalamischen Gewebes kann es jedoch zu einem Hypopituitarismus kommen (Horvath, Kovacs, 1995). Eine Kompression des Hypophysenstiels oder Schädigung der dopaminergen Neurone im Hypothalamus führen zudem zu einer Hyperprolaktinämie und somit gegebenenfalls zur Differentialdiagnose eines Prolaktinoms (Melmed, 1995). Bis zu 80 Prozent der Kinder haben zum Zeitpunkt der Diagnose eine endokrine Dysfunktion, dabei ist ein GH-Mangel am häufigsten (Lafferty, Chrousos, 1999).

Therapeutische Strategien hängen stark von der Tumorlokalisation, seiner Ausdehnung und gegebenenfalls Infiltration benachbarter Gewebe ab. Vor der Tumorresektion können zunächst liquorableitende Operationen erforderlich werden. Strahlentherapeutische Überlegungen spielen vor allem bei subtotaler Resektion oder Progression des Resttumors eine Rolle (Müller, Sörensen, 2006<sup>a</sup>). Neben ophthalmo-

logischen und endokrinen Ausfällen machen sich bezüglich der Lebensqualität der Patienten neuropsychologische Defizite und die häufig auftretende Hyperphagie mit Adipositas bemerkbar, dessen Ursache noch nicht endgültig geklärt ist. Zur Zeit werden am ehesten Läsionen im Hypothalamusbereich dafür verantwortlich gemacht (Müller, Sörensen, 2006<sup>b</sup>).

Kraniopharyngeome verhalten sich sehr infiltrativ und können oft nur inkomplett reseziert werden. Die Rezidivrate beträgt 10 bis 45 Prozent (Asa, 1998; Kim et al., 2001). Für das Kindesalter zeigen Zwischenauswertungen der Kraniopharyngeom 2000-Studie nach 3 Jahren ein Rezidiv nach kompletter Resektion in 40 Prozent der Fälle und eine Tumorprogression nach subtotaler Resektion in fast 80 Prozent der Fälle (Müller, Sörensen, 2006<sup>b</sup>). Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren konnte von 88 Prozent in den 80er Jahren auf 96 Prozent in den 90er Jahren verbessert werden (Müller et al., 2003). Eine maligne Transformation eines Kraniopharyngeoms ist extrem selten. In der Literatur sind 4 Fälle beschrieben: Dabei kommt es zur malignen Entartung nach mehrfachen Rezidiven und dementsprechend mehrfacher chirurgischer Resektion und Radiotherapie (Asa, 1998; Kristopaitis et al., 2000).

## **2.2 Charakterisierung von Hypophysenadenomen**

Bei Hypophysenadenomen handelt es sich um benigne Neoplasien der adenohypophysären Zellen. Demzufolge sind sie primär intrasellär lokalisiert (Saeger, 2003<sup>a</sup>). Embryologisch stammt die Adenohypophyse aus der Rathke-Tasche, einer endodermalen Invagination der primären Mundhöhle (Asa, 1998).

Wenn die Adenome klein sind, wird die zum Teil schwerwiegende Symptomatik durch die exzessive Hormonproduktion bestimmt. Falls sie zudem hormonell inaktiv sind, werden sie in der Regel nicht klinisch, sondern als sogenannte Inzidentalome radiologisch oder erst post mortem diagnostiziert (Asa, 1998).

Mit zunehmendem Gebrauch von CT und MRT in der Diagnostik steigt die Anzahl zufällig diagnostizierter Hypophysenadenome. Bisher gibt es wenig Daten über ihre klinische Bedeutung und den Spontanverlauf. Dabei kommen sowohl Mikro- als auch Makroadenome vor, die zu unterschiedlichen Anteilen auch symptomatisch sein können oder eine Größenzunahme im Verlauf zeigen (Feldkamp et al., 1999).

Die Prävalenz okkultter Hypophysenadenome in unselektionierten Autopsien beträgt 10 bis 23 Prozent (Stoffel-Wagner et al., 1997; Petersenn et al., 2006). Die wahre Inzidenz von Hypophysenadenomen ist somit nur schwer abzuschätzen. Man geht zur Zeit von circa 20 Prozent in der allgemeinen Bevölkerung aus, wobei die Inzidenz mit dem Alter auf etwa 30 Prozent bei 50- bis 60jährigen Patienten steigt. Ein Geschlechtsunterschied lässt sich nicht feststellen (Asa, 1998).

Hypophysenadenome stellen im Kindesalter 2 Prozent aller intrakraniellen Tumoren (Colao et al., 1998) und machen circa 3,5 bis 6 Prozent der chirurgisch behandelten kindlichen Hypophysentumoren aus.

Das Prolaktinom ist das häufigste Hypophysenadenom im Kindes- und Jugendalter, gefolgt vom ACTH-produzierenden und GH-produzierenden Adenom. Hormoninaktive Adenome sind im Kindesalter selten (etwa 3 bis 6 Prozent) im Gegensatz zu einem Anteil von etwa 2/3 im Erwachsenenalter. Sie sind klinisch oft schwer von Kraniopharyngeomen zu differenzieren.

Etwa 1/4 der Kinder präsentiert sich vor dem 12. Lebensjahr. Präpubertär ist das ACTH-produzierende Adenom am häufigsten (Lafferty, Chrousos, 1999).

Histologisch und ultrastrukturell entsprechen die kindlichen Hypophysenadenome denen der Erwachsenen (Brown, 1996). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass kindliche Hypophysenadenome kleiner sind und sich weniger invasiv und aggressiv verhalten als die Adenome im Erwachsenenalter (Asa, 1998). Etwa 42 Prozent der Hypophysenadenome aller Altersgruppen verhalten sich mikroskopisch invasiv (Saeger, 2003<sup>b</sup>).

Zur Bestimmung der proliferativen Aktivität von Tumorzellen können Proliferationsmarker wie Ki-67 eingesetzt werden. Eine erhöhte Mitoserate und eine verstärkte Proliferation (> 2-5 Prozent mit Ki-67/ MIB-1) sind malignitätsverdächtig (Saeger et al., 2001). Die Inzidenz von Hypophysenkarzinomen beträgt etwa 0,2 Prozent aller Hypophysentumoren. Sie entstehen in der Regel sekundär nach dem ersten oder folgenden Rezidiven invasiv wachsender Hypophysenadenome (Saeger, 2003<sup>b</sup>).

Die Klassifikation von Hypophysentumoren beruht vor allem auf der H. E.-Färbung und wird bei Bedarf durch weitere Färbungen, Elektronenmikroskopie und zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen ergänzt. Die Differentialdiagnose zwischen Adenom und Kraniopharyngeom ist in der Regel rein strukturell möglich. Nach Sicherung der Diagnose des Hypophysenadenoms sind der Hormongehalt und

der Proliferationsindex wichtig (Saeger et al., 2001). Die aktuell verwendete Subklassifikation der WHO richtet sich nach besonderen Strukturcharakteristika und nicht-immunhistologischen Färbeverfahren und erscheint nur bei entsprechender Klinik wirklich notwendig, zum Beispiel bei unvollständiger Tumorentfernung oder Planung einer adjuvanten Therapie. Eine medikamentöse Nachtherapie wäre bei prolaktinbildenden und GH-bildenden Adenomen erfolgversprechend (Saeger, 2003<sup>b</sup>).

Für die Mehrzahl der Hypophysenadenome stellen operative Therapieverfahren die Methode der Wahl, dabei können etwa 90 bis 95 Prozent aller Hypophysentumoren auf transsphenoidalem Wege entfernt werden (Petersenn et al., 2006).

### **2.3 Charakterisierung der GH-IGF-Achse**

Die Regulation des zellulären Metabolismus und seine Auswirkungen auf die Proliferation unterliegt verschiedensten Wachstumsfaktoren. Die durch die Wachstumsfaktoren hervorgerufene Antwort wird durch folgende Mechanismen kontrolliert:

- Die Konzentration und Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors in biologischen Flüssigkeiten
- Das Vorkommen und die Verteilung von Rezeptoren an der Zelloberfläche, die für Peptid-Wachstumsfaktoren in der Regel integrierte Plasmamembranproteine darstellen
- Die Intaktheit des auf den Rezeptor folgenden transmembranösen Signalmechanismus
- Transkriptionale Regulationsmechanismen

Lösliche Bindeproteine mit hoher Affinität sorgen für eine Kontrolle auf extrazellulärer Ebene. Diese können den Efflux von Wachstumsfaktoren aus dem Gefäßraum und den Zugang zu den Rezeptoren an der Zelloberfläche limitieren oder den Wachstumsfaktor direkt zu seinen Anlaufstellen führen. Eine Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren sind an solche Bindeproteine gebunden, zum Beispiel ANP, PDGF, NGF, Prolaktin, Wachstumshormon oder TNF.

*Insulin-like growth factors* (IGF) sind eine Klasse von Wachstumsfaktoren, die nahezu immer in Assoziation mit hochaffinen *insulin-like growth factor binding proteins*

(IGFBP) gefunden werden. IGFBP binden IGF-I und IGF-II, aber nicht Insulin (McCusker, Clemmons, 1992).

1987 hat man als Konsens beschlossen, die vorher als Somatomedine bezeichneten Peptide IGF-I und IGF-II zu nennen, wobei Somatomedin-A und -C mit IGF-I identisch sind. Zuerst identifiziert und beschrieben wurden die IGF 1957 und bisher gibt es keinen Beweis für weitere IGF-Proteine außer IGF-I und -II (Baxter, Martin 1989; Mohan, Baylink 2002). IGF-I und -II wurden 1978 isoliert und sequenziert und erhielten ihren Namen durch die primäre strukturelle Homologie zu Proinsulin (Grimberg, Cohen, 2000).

GH wird von der Hypophyse sezerniert und stimuliert die Produktion von IGF-I durch die Leber und extrahepatischen Gewebe. IGF-I wiederum reguliert Gewebeproliferation und -differenzierung auf endokrinem oder autokrin/ parakrinem Wege. Physiologisch vermittelt IGF-I die Effekte des GH. So hat er einen starken Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung und ist ein potenter Inhibitor der Apoptose. Die Aktionen von IGF-I werden vor allem durch den IGF-I-Rezeptor vermittelt. IGFBP modulieren die Verfügbarkeit von IGF-I und haben zudem unabhängige Effekte auf das Zellwachstum, zum Beispiel zeigt IGFBP-3 eine pro-apoptotische Aktivität sowohl abhängig von p53 als auch unabhängig davon (Fürstenberger, Senn, 2002). Sowohl GH als auch IGF-I zirkulieren als Komplexe mit spezifischen Bindeproteinen. Das GH-Bindeprotein (GH-BP) entspricht dem extrazellulären, Liganden bindenden Teil des GH-Rezeptors und seine Serumkonzentration könnte den Status der Gewebsrezeptoren widerspiegeln (Leung, Ho, 2001).

Die Wachstumshormon- und IGF-I-Achse spielt eine große Rolle in der Regulation von fetalem und kindlichem Wachstum. Bei Krebs-Patienten scheint die GH/ IGF-Achse gestört zu sein (Holly, 1998). Die Assoziation zwischen Krebsrisiko und Serum-IGF-I verstärkt sich, wenn man die Serum-IGFBP-3-Konzentration mit einbezieht.

### **2.3.1 Insulin-like growth factors**

IGF-I ist ein einkettiges Polypeptid, das aus 70 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 7649 kDa besteht. Das dafür kodierende Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (12q22-24.1) (Tricoli et al., 1984; Höppener et al., 1985; Morton et al., 1986). IGF-II zeigt zu 62 Prozent Strukturähnlichkeiten mit IGF-I.

Bestehend aus 67 Aminosäuren hat es ein Molekulargewicht von 7469 kDa. Das für IGF-II kodierende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15) nahe den Genloci von Insulin (Tricoli et al., 1984; de Pagter-Holthuizen et al., 1985; Morton et al., 1986).

IGF-I ist ein wichtiges Mitogen, das von einigen Zelltypen für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verlangt wird.

Bei vielen menschlichen Tumoren konnte die Expression größerer Mengen an IGF-I- oder IGF-II-mRNA oder -Protein nachgewiesen werden, so in fast allen Tumorklassen, in Karzinomen, Sarkomen und auch ihren gutartigen Gegenspielern (Schofield, Engstrom, 1992).

IGF werden im Kreislauf in Assoziation mit spezifischen Bindungsproteinen transportiert und weniger als 1 Prozent des IGF zirkuliert frei im Serum (Baxter, 1994). Über 90 Prozent des zirkulierenden IGF sind im sogenannten *ternary complex* gebunden, 150 kDa schwer, bestehend aus IGF, IGFBP-3 und einer säureinstabilen Unter-einheit, der sogenannten ALS (*acid labile subunit*). Dieser Komplex verlängert die Halbwertszeit des IGF durch eine verringerte Kapillarpermeabilität und eine verringerte Bioverfügbarkeit für Gewebe von circa 10 Minuten auf etwa 12 bis 16 Stunden (Zapf, 1997; Grimberg, Cohen, 2000).

Die Konzentration von IGFBP-3 entspricht ungefähr der Konzentration von IGF-I plus -II. Wenn IGFBP-3 an IGF-I oder -II bindet, kommt es zu einer allosterischen Veränderung, die eine Bindung an die ALS ermöglicht. Die ALS ist immer im Überfluss vorhanden. Der *ternary complex* stellt einen zirkulierenden Reservepool an IGF dar, der nicht direkt dem Gewebe zur Verfügung steht (Daughaday, 1995).

Wie IGF-I sind auch ALS und IGFBP-3 eng durch GH reguliert. GH-Sekretion, IGF-I, ALS und IGFBP-3 sind potentielle biochemische Marker bei GH-assoziierten Störungen, dabei zählt IGF-I als verlässlichster Marker bei Akromegalie (Leung, Ho, 2001).

IGF werden auch im Nervensystem synthetisiert, sie scheinen nicht nur das Wachstum des Gehirns zu regulieren, sondern auch eine wichtige Rolle im Gleichgewicht des erwachsenen Nervensystems zu spielen. Man spricht ihnen eine Rolle bei der Tumorgenese von ZNS-Tumoren zu: Bei glialen Tumoren wurden erhöhte IGF-Aktivitäten im Liquor und in Zystenflüssigkeit nachgewiesen, die nach operativer Tumorentfernung fielen. Eventuell wirkt IGF in diesem Zusammenhang als autokriner Wachstumsfaktor (Sara, 1992).

### 2.3.2 IGF-Rezeptoren

Bisher sind zwei Rezeptoren mit spezifischer Bindung für IGF bekannt. Man spricht vom Typ-I-IGF-Rezeptor und Typ-II-IGF-Rezeptor. Auch der Insulinrezeptor kann IGF mit einer geringeren Affinität binden. Daher werden die unterschiedlichen Rollen von Insulin und IGF mehr durch die Rezeptorverteilung als durch die Rezeptoraktivität bestimmt (Moxham et al., 1992). Der Hauptteil der mitogenen Aktivität der IGF wird durch den IGF-I-R vermittelt, der zu 50 bis 60 Prozent Strukturhomologien zum Insulin-Rezeptor zeigt (Czech, 1989). Der IGF-I-R besteht aus vier Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Dabei binden die beiden extrazellulären  $\alpha$ -Einheiten IGF, während die transmembranösen  $\beta$ -Einheiten Tyrosinkinase-Aktivität besitzen (Jones, Clemmons, 1995). Der IGF-I-R erkennt IGF-I, -II und Insulin, dabei ist die Affinität für IGF-I am größten. Der IGF-II-R ist mit dem sogenannten kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor identisch (Laureys et al., 1988). Er bindet Mannose-6-Phosphat-enthaltende Glykoproteine sowie IGF-I und -II, die daraufhin durch Endozytose in das Zellinnere internalisiert und abgebaut werden. Die Affinität für IGF-I ist etwa 500fach niedriger als für IGF-II. Er bindet kein Insulin (Kiess et al., 1990). Der IGF-II-Rezeptor entfernt IGF-II aus dem Kreislauf und hemmt autokrine und parakrine IGF-II-Aktionen.

Der IGF-I-Rezeptor vermittelt die wachstumsfördernden Funktionen von IGF-I und -II durch folgende Aktionen:

- Stimulation der Mitogenese in verschiedenen Zelltypen
- Schutz der Zellen vor Apoptose
- zelluläre Transformation – auch für die Transformation von Zellen durch andere Ursachen (wie zum Beispiel Virusantigene) notwendig (Grimberg, Cohen, 2000).

### 2.3.3 IGF-Bindeproteine

Die Bindung von Hormonen an Bindeproteine erlaubt eine exakte Kontrolle der Hormonaktionen. Hormone ohne signifikante Proteinbindung steuern lebenswichtige und schnell agierende Regulationsmechanismen, bei denen eine Trägheit gefährlich wäre. Bindeproteine schaffen eine stabile Reserve, die Perioden geringer oder keiner Hormonproduktion überbrücken kann. Bei Hormonen ohne Proteinbindung werden gut durchblutete Gewebe oder Regionen überexponiert. Bindeproteine sorgen hingegen für eine gewisse durchblutungsunabhängige Hormonverteilung, so führt

zum Beispiel die strenge Bindung der IGF zu einer gleichen Exposition aller Körperteile mit IGF, was unter anderem für ein gleichmäßiges Knochenwachstum wichtig ist (Kurbel et al., 2003).

Der Spiegel an freiem IGF wird durch das Verhältnis von IGF-Synthese und IGF-Abbau und dem Bindungsgrad an IGFBP moduliert. Die IGFBP-Familie beinhaltet 6 IGFBP mit hoher Affinität und Spezifität zu IGF und die sogenannten *IGFBP-related proteins* 1-4 (IGFBP-rP), deren Affinität viel geringer ist (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>; Grimberg, Cohen, 2000). Alle Mitglieder der sogenannten *insulin-like growth factor binding protein superfamily* enthalten die charakteristische Cystein-reiche N-terminale Domäne. Bei IGFBP-1-6 besteht eine zusätzliche charakteristische C-terminale Region. Dabei wird die hohe Bindungsaffinität zu IGF durch die Sekundär- und Tertiärstruktur gewährleistet (Rosenfeld et al., 1999).

Jedes der 6 Bindeproteine wurde extrazellulär und mit Ausnahme von IGFBP-5 auch im Kreislauf nachgewiesen (Baxter, 1994).

Bei der Bindung von IGF-I und -II verändert sich die Bindungsfähigkeit von IGF-I und -II zu Zelloberflächen-Rezeptoren signifikant (Clemmons, 1992).

IGFBP regulieren nicht nur die Verfügbarkeit und Aktivität von IGF, sondern scheinen auch IGF-unabhängig Einfluss auf das Zellwachstum und die Apoptoseinduktion zu nehmen. Dabei werden IGFBP von verschiedenen Geweben in spezifischer Menge produziert.

#### **2.3.4 IGFBP-Proteasen**

Proteasen, die in einer Vielzahl biologischer Flüssigkeiten gefunden werden, können IGFBP-1-6 in Fragmente spalten, die eine deutlich reduzierte Affinität zu IGF-I und IGF-II besitzen. Mit Veränderung der Verfügbarkeit von freiem IGF moduliert die IGFBP-Proteolyse direkt den ersten Schritt im IGF-Rezeptor-Signalweg. In den letzten Jahren hat man einige neue IGFBP-Proteasen gefunden (Clay Bunn, Fowlkes, 2003). IGFBP-Proteolyse wurde zunächst im Serum von Schwangeren als proteolytische Aktivität gegen IGFBP-3 beschrieben (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

IGFBP-Proteasen können den Spiegel freien IGF über ihr Angreifen an IGFBP modulieren. Dabei gibt es drei Strukturfamilien: 1. Kallikreine, 2. Kathepsine und 3. Matrixmetalloproteinasen (MMP). Die erste biochemisch identifizierte IGFBP-Protease war



das PSA, gefunden in der Samenflüssigkeit, eine Kallikrein-ähnliche Serinprotease. Zur gleichen Gruppe gehören auch der  $\gamma$ -nerve growth factor ( $\gamma$ -NGF) oder Plasmin. Einige der Proteasen erweisen sich als relativ spezifisch für eines der IGFBP, indem sie dieses mit größerer Wirkung spalten als die anderen (Mohan, Baylink, 2002). Verschiedene Malignome, wie das Prostata-Ca. oder Leukämien, zeigen Assoziationen zur IGFBP-3-Protease-Aktivität im Serum. Sie konnte auch im Liquor von Leukämiepatienten oder Patienten mit ZNS-Tumoren nachgewiesen werden (Rajah et al., 1995).

Zu den Modulatoren der IGFBP-Proteaseaktivität gehört auch IGF-I selbst. So stimuliert IGF-I die Proteolyse von IGFBP-4, indem es durch Bindung an das Bindeprotein die Spaltstelle der Protease präsentiert (Mohan, Baylink, 2002).

## 2.4 Problemstellung

Den Informationen über das Wachstumsverhalten von Tumoren kommt gerade bei Hirntumoren eine große Bedeutung auch für die Therapieentscheidung zu. Sowohl bei Kraniopharyngeomen als auch bei Hypophysenadenomen handelt es sich zwar um grundsätzlich gutartige Raumforderungen, die aber aufgrund ihrer Lokalisation in der Regel schwerwiegende Folgen haben. Das Kraniopharyngeom bleibt auch heutzutage noch einer der am schwierigsten zu behandelnden Tumoren, da eine komplette Resektion meist nicht möglich ist und die Rezidivrate sehr hoch liegt (Oskouian et al., 2006). Die Lebensqualität der Patienten wird dementsprechend neben den lokalen Auswirkungen und den Nebenwirkungen der Therapie auch von der sehr hohen Rezidivrate beeinflusst.

Durch die von der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie durchgeführten Therapieoptimierungsstudien (aktuell HIT 2000 bzw. HIT-ENDO für Kraniopharyngeome) konnte in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Steigerung der Heilungsrate auch bei Hirntumoren erzielt werden. Dementsprechend rückt aktuell immer mehr das Ziel einer möglichst individuellen, dem Rückfall- und Spätfolgenrisiko adaptierten Therapie in den Vordergrund, um vor allem einer Verbesserung der Lebensqualität mehr Bedeutung zu schenken (Creutzig et al., 2003). Mit "Kraniopharyngeom 2000" erfasst zur Zeit zum ersten Mal eine prospektive Beobachtungsstudie Daten zum therapeutischen Vorgehen und post-

operativem Ergebnis bei Kindern und Jugendlichen mit Kraniopharyngeom in Deutschland (Müller, Sörensen, 2001).

Da bei hypophysären Tumoren keine klare Korrelation zwischen Morphologie und klinischer Aggressivität besteht, erscheint die Entwicklung verlässlicher und prognostisch wegweisender Methoden hier zur Abschätzung des Tumorverhaltens besonders wichtig (Fukui et al., 2002; Suhardja et al., 2005).

Die zytologischen Merkmale differieren nicht in Rezidiv- oder Primärtumoren und auch Ploidie-Analysen haben keine Korrelation zum Hormonprofil oder der Rezidivrate erbracht (Asa, 1998). Bei Hypophysenadenomen ist der wichtigste Faktor bezüglich der Prognose eine komplette Resektion des Tumors oder sein Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie. Gerade für Residualtumoren wären Proliferationsmarker für die Wachstumsrate oder die Aggressivität des Tumors für die weitere Betreuung der Patienten wichtig (Saeger, 2005).

Bei beiden Tumoren steht also in ihrer Bedeutung die relativ geringe Tumorfrequenz dem zum Teil schwerwiegenden klinischen Bild gegenüber. Interessant erscheint bei beiden hypophysären Tumoren ihre Lokalisation nahe der GH-Produktion und inwieweit sie auch sonst vom komplexen Geschehen der GH-IGF-IGFBP-Achse beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit ist eine Beschreibung des Verteilungsmusters von IGFBP-1-6 in Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen. Zudem sollen die IGF-Bindeproteine in ihrer histologischen Verteilung und zum Teil auch im Serum im Hinblick auf eine potentielle Bedeutung als Prognosefaktor bezüglich der Rezidivhäufigkeit untersucht werden.

### 3. Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 99 Hypophysenadenome von 72 Patienten, darunter 35 Rezidiv-Tumore, und 14 Kraniopharyngeome von insgesamt auch 14 Patienten, darunter aber 3 Rezidivtumore, immunhistochemisch untersucht. Als Positivkontrolle dienten 10 Seminome bzw. 8 testikuläre intraepitheliale Neoplasien (im folgenden als TIN bezeichnet). Zusätzlich kamen 3 Plasmozytome, 1 Nebenschilddrüsenadenom und 5 Nebennierenrindenadenome zur Darstellung. Dabei wurde pro Fall ein repräsentativer Paraffinblock mit Formalin fixiertem Tumorgewebe zur immunhistochemischen Untersuchung ausgewählt. Alle Patienten mit Hypophysentumoren sind in der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg operiert worden und sämtliche histopathologische Beurteilungen der untersuchten Tumoren sind postoperativ im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erfolgt.

Tab. 3.1 Überblick über die untersuchten Tumoren

Diagnose	Anzahl der untersuchten Tumoren	Patientenzahl	Rezidive
Kraniopharyngeom	14	14	3
Hypophysenadenom	99	72	35
NNR-Adenom	5	5	
Plasmozytom	3	3	
NSD-Adenom	1	1	
Seminom	10	10	
TIN	8	8	

Die immunhistochemische Untersuchung umfasste die IGF-Bindeproteine-1-6 (verwendete Antikörper s. Tab. 3.2) und bei den Hypophysenadenomen, vornehmlich zur weiteren Subklassifizierung, eine Kennzeichnung der Prolaktin-Produktion.

An zwei einzelnen Fällen von Hypophysenadenomen wurden die IGF-Bindeproteine-3 und -5 immunelektronenmikroskopisch untersucht.

Bei den erhobenen serologischen Werten handelt es sich um im Rahmen des Krankheitsbildes durchgeführte Routineuntersuchungen, die aufgrund dessen auch nicht vollständig erhoben werden konnten. Alle Serumuntersuchungen entstammen dem Labor für gynäkologische Endokrinologie und Tumordiagnostik der Universitäts-

linik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und sind, genau wie die sonstigen Patientenangaben, retrospektiv zusammengetragen worden.

### 3.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Anhand von H. E.-Färbungen des Paraffinmaterials wurden repräsentative Tumorareale ausgesucht, die für eine immunhistochemische Färbung verwertbar sind. Für die Rekrutierung der Kraniopharyngeome wurden Patientendaten bis ins Jahr 1971 zurückverfolgt.

Für die Färbung wurden zunächst an ausgewählten Präparaten die optimalen Antikörper-Konzentrationen und Einwirkungsparameter ermittelt. Dabei veränderten wir wiederholt die Antikörper-Verdünnung, die Vorbehandlung mit Trypsin und Mikrowellenbehandlung, die Einwirkungsdauer und wechselten zuletzt auch die verwendeten Primärantikörper. Die letztendlich für jedes IGF-Bindeprotein individuell herausgearbeiteten Parameter sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

#### Färbeprotokoll:

1. **Entparaffinieren** der Schnitte in Xylol und in absteigender Alkoholreihe
2. **Vorbehandlung:**
  - 2.1. **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blockierung:** Hemmung der endogenen Peroxidase durch Einstellen der Schnitte für 30 Minuten in ein Methanolgemisch (200 ml Methanol + 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - 2.2. Spülen der Schnitte mit Aqua dest.
  - 2.3. **Mikrowellenbehandlung** (je nach Färbeprotokoll, s.Tab. 3.3): Einstellen der Schnitte in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) und Erhitzen bei 600 Watt für 3 x 5 Minuten, dabei Auffüllen des Puffers nach jedem Erhitzen
  - 2.4. Schnitte für 20 Minuten abkühlen lassen
  - 2.5. Spülen mit TBS
  - 2.6. **Trypsinandauung** (je nach Färbeprotokoll, s.Tab. 3.3): Einstellen der Schnitte für 15 Minuten in 0,001 %iger Trypsinlösung
  - 2.7. Spülen mit Leitungswasser (Stoppen der Trypsinandauung)
  - 2.8. Spülen mit TBS

- 2.9. **Normalserum:** Blockieren der gewebsspezifischen Antikörper mit Normalserum vom Pferd für 15 Minuten bei Raumtemperatur (Vermindern einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch Bindung an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente des Präparates)
- 2.10. Abklopfen des Normalserums von den Schnitten (nicht abspülen)
3. **Primär-AK:** Inkubation mit dem Primärantikörper (jeweilige Verdünnung mit 2 %iger BSA/PBS-Lösung s. Tab. 3.3) für 1 Stunde bei 37° C im Brutschrank
4. Spülen mit PBS
5. **Sekundär-AK:** Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinyliertes Anti-Rabbit-IgG 1:100 in PBS verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
6. Spülen mit PBS
7. **ABC-Komplex:** Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Elite-ABC® in PBS verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
8. Spülen mit PBS
9. **DAB-Färbung:**
  - 9.1. Färben der Schnitte für 5-7 Minuten
  - 9.2. Spülen mit Leitungswasser
  - 9.3. Einstellen in Aqua dest.
10. **Gegenfärbung:**
  - 10.1. Kurzes Einstellen der Schnitte (circa 5-10 Sekunden) in Hämalan (1:4 mit Aqua dest. verdünnt)
  - 10.2. Bläuen in Leitungswasser
  - 10.3. Spülen mit Aqua dest.
  - 10.4. Einstellen in aufsteigender Alkoholreihe bis zum 100 %igen Alkohol, dort 5 Minuten stehen lassen, danach einmaliges kurzes Eintauchen in Xylol und Eindecken der Schnitte mit Entellan®

Tab. 3.2 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antigen	Antikörper	Hersteller	Herst.-Nummern	Ursprung
IGFBP-1	Anti-IGF Binding Protein-1	Upstate biotechnology, USA	Catalog # 06-106, Lot # 16592	Rabbit polyclonal antiserum
IGFBP-2	Anti-IGF Binding Protein-2	Upstate biotechnology, USA	Catalog # 06-107, Lot # 16943	Rabbit polyclonal antiserum
IGFBP-3	Anti-Human IGFBP-3	GroPep, Australien	Catalog # PAV1, Lot # AJJ PAV1	Rabbit polyclonal antiserum
IGFBP-4	Anti-IGF Binding Protein-4	Upstate biotechnology, USA	Catalog # 06-109, Lot # 16603	Rabbit polyclonal antiserum
IGFBP-5	Anti-Human IGFBP-5	GroPep, Australien	Catalog # PAZ1, Lot # HJJ PAZ1	Rabbit polyclonal antiserum
IGFBP-6	Anti-Human IGFBP-6	GroPep, Australien	Catalog # PAU1, Lot # GJI PAU1	Rabbit polyclonal antiserum
Prolaktin	Anti-Human-Prolactin	Dako, Deutschland		Rabbit, polyclonal

Tab. 3.3 Übersicht Färbeprotokoll der Immunhistochemie

Antigen	Mikrowellenbehandlung	Trypsinanzu- dauung	Einwirkungs- dauer Primär- Antikörper	Verdünnung des Antikörpers (BSA/PBS)
IGFBP-1	3 x 5 Minuten	0,001%	über Nacht	1:1600
IGFBP-2	3 x 5 Minuten	/	30 Minuten	1:1000
IGFBP-3	3 x 5 Minuten	0,001%	30 Minuten	1:1000
IGFBP-4	3 x 5 Minuten	0,001%	über Nacht	1:1000
IGFBP-5	3 x 5 Minuten	/	30 Minuten	1:1200
IGFBP-6	3 x 5 Minuten	0,001%	30 Minuten	1:1200
Prolaktin	/	0,1%	30 Minuten	1:250

### 3.2 Immunreaktive Beurteilung

Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktion erfolgte durch semiquantitative Kennzeichnung der Farbintensität in 4 Klassen: 0 = keine Farbreaktion, 1 = schwach positive Reaktion, 2 = mittelgradig positive Reaktion, 3 = stark positive Reaktion. Dabei wurde das zytoplasmatische und gegebenenfalls auch nukleäre Verteilungsmuster der Anfärbung ebenfalls berücksichtigt und in eine diffuse oder herdförmige Reaktion unterschieden.

Bei den aufgefallenen *dot-like-reactions* wurde analog in 0 = fehlend, 1 = kleine, 2 = wenige große, 3 = viele große *dots* unterschieden.

### 3.3 Durchführung der Immunelektronenmikroskopie

Für die Immunelektronenmikroskopie konnte Frischgewebe von zwei Hypophysenadenomen in Unicryl® eingebettet werden.

Bei der Erprobung der richtigen Antikörperverdünnungen wurde je 1 Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde.

Die Färbung erfolgte an Ultradünnschnitten nach folgendem Inkubationsprotokoll:

1. **Blockieren** freier Aldehydgruppen durch Inkubation mit PBS-Glyzerin (50mM) für 15 Minuten
2. Inkubation für 2 x 10 Minuten mit PBG (PBS/ BSA/ Gelatine)
3. **Primärantikörper:** Inkubation mit dem spezifischen Immuneserum (verdünnt in PBG) über Nacht in einer feuchten Kammer; Verdünnung 1:250 für IGFBP-3 und 1:500 für IGFBP-5
4. 6maliges Waschen mit je 100 µl PBG für je 5 Minuten
5. **Sekundärantikörper:** Inkubation abgedeckt mit 50 µl biotinyliertem Anti-Rabbit-IgG
6. 5maliges Waschen mit je 100 µl PBG für je 5 Minuten
7. **Streptavidin-Gold:** Inkubation abgedeckt mit Streptavidin-Gold (circa 1:10 verdünnt) für 1 Stunde
8. 6maliges Waschen mit je 100 µl PBG für je 5 Minuten
9. 3maliges Waschen mit je 100 µl PBS für je 5 Minuten
10. 3maliges Waschen mit je 200 µl Aqua bidest.
11. **Doppelkontrastierung:**
  - 11.1 Kontrastieren der Blenden für 7 Minuten im Blockschälchen mit einer Mischung aus gleichen Teilen 100 %igen Alkohols, 5 %igen Uranylacetats und Aqua bidest.
  - 11.2 Abspritzen der Blenden mit Aqua bidest.
  - 11.3 Kontrastieren der Blenden für 7 Minuten im Blockschälchen mit 5 ml Bleizitrat
  - 11.4 Kurzes Abspülen der Schnitte im Blockschälchen mit 0,02 M NaOH
  - 11.5 Abspritzen der Blenden mit Aqua bidest.

### 3.4 Serumuntersuchungen

Die Prolaktinwert-Bestimmung erfolgte mit dem Gerät Elecsys 2000<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim), die des Wachstumshormons mit Immulite<sup>®</sup> (DPC Biermann) und von IGF-1 und IGFBP-3 im Serum anhand der Radioimmunoassays Seria IGF-1<sup>®</sup> bzw. Seria IGFBP-3<sup>®</sup> (Biochem Immunosystems).

### 3.5 Statistische Analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte vornehmlich mittels der deskriptiven wie auch der explorativen Datenanalyse des Statistikprogramms "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS<sup>®</sup>) für Windows.

In der statistischen Auswertung wurden Plasmozytome, Nebenschilddrüsenadenome und Nebennierenrindenadenome als Varia zusammengefasst.

Die Zusammenhänge zwischen den fast ausschließlich kategorialen Merkmalen wurden durch Vierfeldertafeln und anhand des Chi-Quadrat-Tests bzw. McNemar-Test bei den Rezidiv-Tumoren (abhängige Gruppen) dargestellt und analysiert. Dafür wurde die oben beschriebene ordinale Skalierung der Farbintensität in eine binäre Differenzierung zwischen schwacher und starker Anfärbung kategorisiert. Entsprechend wurde zum statistischen Vergleich die Unterscheidung der *dot-like-reaction* auf kleine und große *dots* vereinfacht.

Jeder statistischen Analyse lag dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  zugrunde.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnis der Positivkontrolle

Als Positivkontrolle dienten insgesamt 10 Seminome und 8 TIN im Vergleich zur Arbeit von Drescher et al. (1997). Dabei zeigten sich die beschriebenen Anfärbungsmuster mit charakteristischem Bild der Leydigzellen, Spermatozyten, des Endothels, des Gefäßmuskels und der Plasmazellen. Auch die *dot-like reaction* war besonders für IGFBP-3 nachzuweisen. Bezüglich IGFBP-1-5 sind die durchgeführten Positivkontrollen somit mit diesen Vorgaben vereinbar, die Färbung für IGFBP-6 ergab eine deutlich positive Reaktion im Bereich der Zellkerne, die so nicht in der Vorarbeit beschrieben ist und somit sehr kritisch betrachtet werden muss. Zwei mit Bouin fixierte Präparate standen uns zur Verfügung, die im direkten Vergleich noch eine deutlich bessere Übereinstimmung der Anfärbung erzielten.



Abb. 4.1.1 Seminom, IGFBP-2, 200x,  
L = Leydig-Zellen, S = Spermatozyten

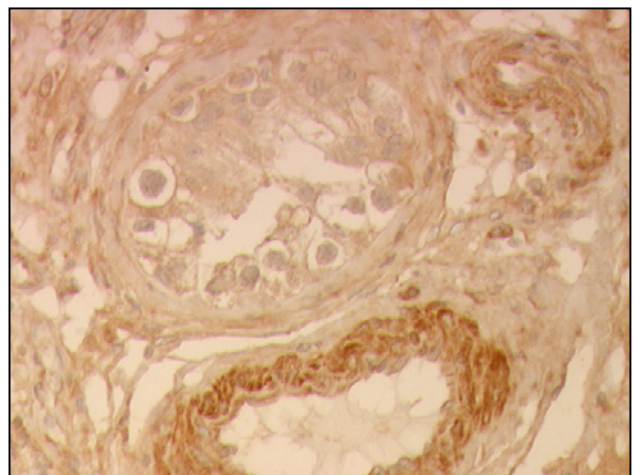


Abb. 4.1.2 Seminom, IGFBP-5, 200x, Gefäß

Abb. 4.1 Charakteristische Färbung der Positivkontrolle

### 4.2 Charakteristika der Studienpopulation

Das Alter der Hypophysenadenom-Patienten bei der Operation der Erstumoren variierte von 14 bis 76 Jahren und zeigte eine angedeutet schiefe Häufigkeitsverteilung mit einem Gipfel um das 5. Lebensjahrzehnt.

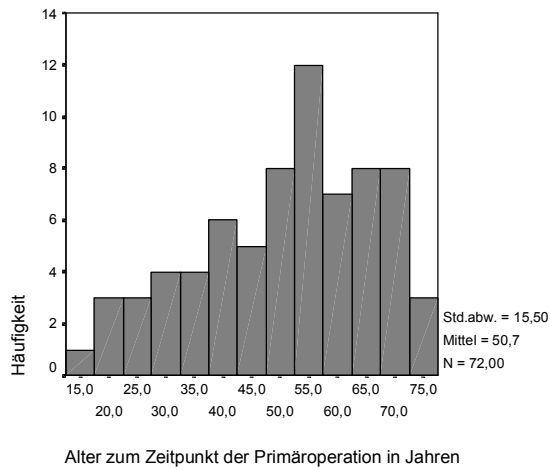


Abb. 4.2.1 Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation bei den untersuchten Hypophysenadenom-Patienten

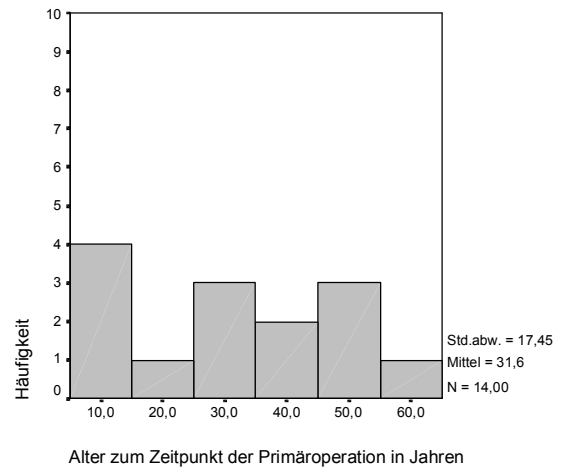


Abb. 4.2.2 Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation bei den untersuchten Kraniopharyngeom-Patienten

Abb. 4.2 Altersverteilung der Hypophysentumoren

Für die Kraniopharyngeome ergab sich eine eher gleichmäßige Altersverteilung mit einer Spannweite von 6 bis 60 Jahren. Im direkten Vergleich ergibt sich ein zeitlich früheres Auftreten von Kraniopharyngeomen bezogen auf die Hypophysenadenome dieser Population ( $p = 0,001$ ).

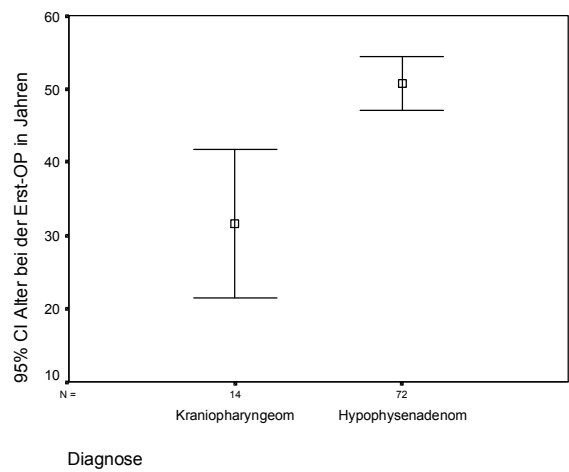
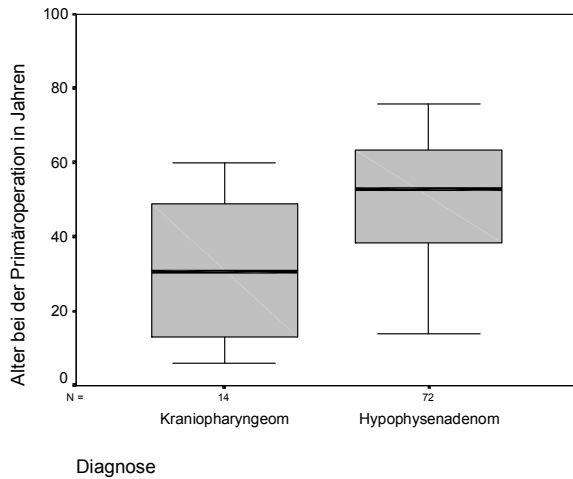


Abb. 4.3 Altersverteilung bei Primäroperation der untersuchten Hypophysentumoren ( $p = 0,001$ )

Bei den untersuchten Hypophysenadenom-Rezidiven variierte das Alter bei Operation zwischen 23 und 72 Jahren. In der vorliegenden Population steigt die Häufigkeit wie bei den Primärtumoren mit dem Alter an (s. Abb. 4.4).

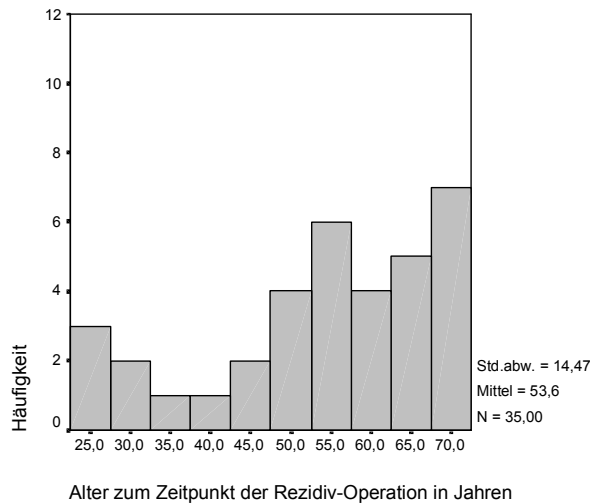


Abb. 4.4 Altersverteilung bei den untersuchten Hypophysenadenom-Rezidiven

Die drei in die Untersuchung mit einbezogenen Kraniopharyngeom-Rezidive traten zwischen 15 und 39 Jahren auf.

Bei den Hypophysenadenomen wurden in 58 Prozent männliche und in 42 Prozent weibliche Patienten untersucht, bei den Kraniopharyngeomen entsprechend 64 Prozent männliche zu 36 Prozent weiblichen Patienten. Damit ergibt sich zwar in unserer Population für beide Tumoren eine leichte Tendenz zum männlichen Geschlecht, die jedoch nicht statistisch signifikant ist ( $p = 0,77$  im Exakt-Test nach Fisher).

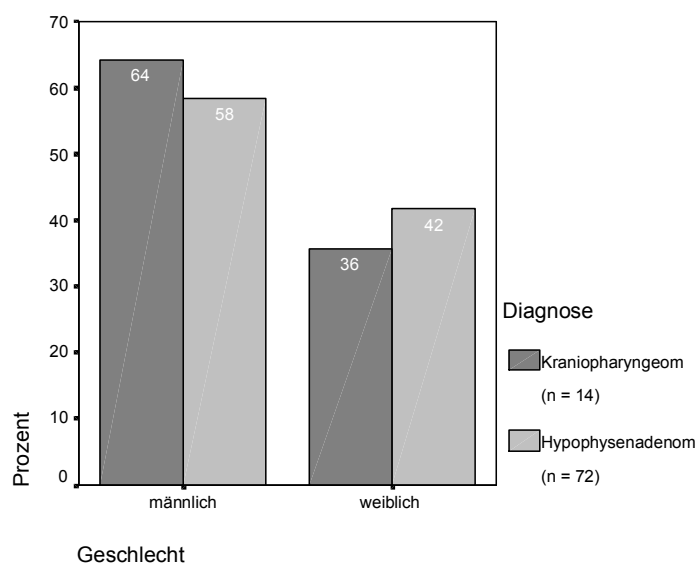


Abb. 4.5 Geschlechtsverhältnis in der vorliegenden Population von Hypophysentumoren

Als Maß für das proliferative Verhalten von Hypophysenadenomen wird zum Teil der immunhistologische Marker Ki-67 (Antikörper MIB-1) verwendet (Pizarro et al., 2004). Bei 10 der Primärtumoren und 4 der Hypophysenadenomrezidive war dieser Nachweis erfolgt und ergab die übliche Spannbreite des Proliferationsindizes von  $< 0,1$  bis maximal 5 Prozent (maximal Grad II) bei den untersuchten Tumoren.

Bei den Kraniopharyngeomen lag in 46 Prozent ein adamantinöser Typ und in 9 Prozent ein papillärer histologischer Typ vor. Die restlichen Tumoren waren aufgrund des Materials zwar eindeutig als Kraniopharyngeom, aber nicht in ihrer Untergruppe zu diagnostizieren.

### **4.3 Klinische Symptomatik der Hypophysentumoren**

Die untersuchten Hypophysentumoren fielen zumeist durch Symptome einer intrakraniellen Raumforderung auf, gefolgt von den Auswirkungen hormonaler Exzesse. Im Einzelnen zeigten 55 Prozent der Hypophysenadenome (Primärtumoren) die Symptomatik einer Raumforderung, 36 Prozent einen hormonalen Exzess, 5 Prozent eine Hypophyseninsuffizienz und nur 2 Prozent waren zum Operationszeitpunkt asymptomatisch. Dabei kamen durchaus auch Mischbilder der Symptomatik vor. Bei 23 Prozent war die vorherrschende Symptomatik retrospektiv nicht eindeutig zu eruieren. Hinter dem zusammenfassenden Begriff der Raumforderung verbargen sich vielfach als Mischbilder bei 67 Prozent Sehstörungen, bei 27 Prozent Kopfschmerzen, bei 12 Prozent ein Hydrozephalus, bei 12 Prozent eine Invasion der umgebenden Gewebe und bei 3 Prozent eine Wesensänderung. Bei den 11 untersuchten Primärtumoren der Kraniopharyngeome war die Raumforderung in allen Fällen die dominierende Symptomatik, einmal begleitet von einer Hypophyseninsuffizienz (hypophysärer Kleinwuchs). Darunter lagen Sehstörungen und ein Hydrozephalus zu gleichen Anteilen vor, in einem Fall begleitet von einer Klivusinfiltration.

Die für beide Tumorarten untersuchten Rezidive äußerten sich durch ein ähnliches Beschwerdebild, die Symptommhäufigkeit ist in der Tabelle 4.1 gegenübergestellt.

Symptomatik	Adenom (n=64)		Kranio (n=11)		Ade-Rez (n=35)		Kranio-Rez (n=3)	
Raumforderung (gesamt)	33	(52%)	11	(100%)	15	(43%)	3	(100%)
Sehstörung	22	(67%)	6	(55%)	14	(93%)	1	(33%)
Kopfschmerzen	9	(27%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
Hydrozephalus	4	(12%)	6	(55%)	0	(0%)	2	(67%)
Infiltration	4	(12%)	1	(9%)	0	(0%)	0	(0%)
Wesensänderung	1	(3%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(33%)
Krampfanfall	0	(0%)	0	(0%)	1	(7%)	0	(0%)
nicht differenziert	1	(3%)	2	(18%)	0	(0%)	0	(0%)
Hormonexzess	23	(36%)	0	(0%)	2	(6%)	0	(0%)
Hypophyseninsuffizienz	3	(5%)	1	(9%)	7	(20%)	2	(67%)
asymptomatisch	1	(2%)	0	(0%)	2	(6%)	0	(0%)
nicht bekannt	15	(23%)	0	(0%)	12	(34%)	0	(0%)

Adenom = Hypophysenadenom, Ade-Rez = Hypophysenadenom-Rezidiv, Kranio = Kraniopharyngeom, Kranio-Rez = Kraniopharyngeom-Rezidiv, n = Anzahl der untersuchten Tumoren

Tab. 4.1 Klinische Symptomatik im Vergleich zwischen Hypophysenadenomen, Adenom-Rezidiven, Kraniopharyngeomen und Kraniopharyngeom-Rezidiven (Mehrfachsymptomatik möglich)

Das Outcome für die entsprechenden Tumoren lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Outcome	Adenom (n=64)		Kranio (n=11)		Ade-Rez (n=35)		Kranio-Rez (n=3)	
Rezidiv-Tumor	18	(28%)	1	(9%)	15	(43%)	0	(0%)
Hormonsubstitution (zumindest kurzzeitig)	29	(45%)	0	(0%)	14	(93%)	0	(0%)
Revisions-OP	6	(9%)	4	(36%)	0	(0%)	1	(33%)
medikamentöse Nachbehandlung	1	(2%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
Tod	1	(2%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(33%)
nicht bekannt	24	(38%)	6	(55%)	0	(0%)	1	(33%)

Adenom = Hypophysenadenom, Ade-Rez = Hypophysenadenom-Rezidiv, Kranio = Kraniopharyngeom, Kranio-Rez = Kraniopharyngeom-Rezidiv, n = Anzahl der untersuchten Tumoren

Tab. 4.2 Klinisches Outcome im Vergleich zwischen Hypophysenadenomen, Adenom-Rezidiven, Kraniopharyngeomen und Kraniopharyngeom-Rezidiven (Mehrfachangabe möglich)

Von den untersuchten Hypophysenadenomen kam es in 28 Prozent der Fälle (18 von 64 Primär-Tumoren) zu einem Rezidiv; bei den untersuchten Kraniopharyngeomen ist in 1 Fall von 11 Primär-Tumoren (9 Prozent) ein Rezidiv bekannt.

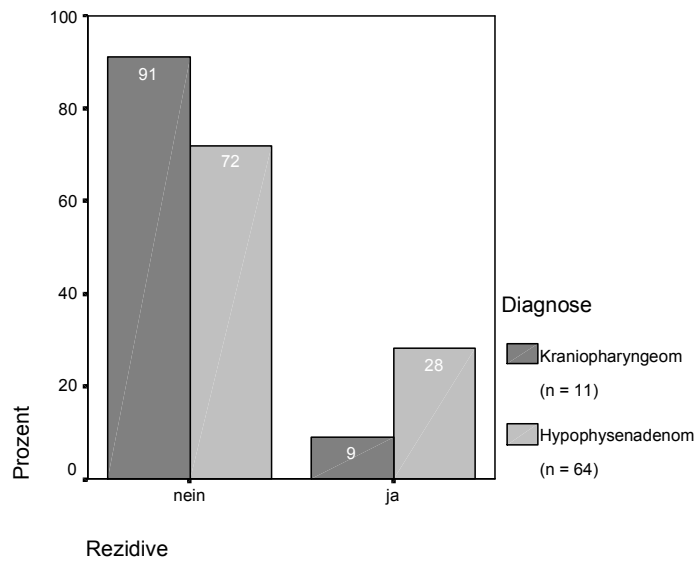


Abb. 4.6 Rezidive der untersuchten Hypophysentumoren (Primärtumoren)

Es wurden Tumoren mit bis zu 6 Rezidiven untersucht (s. Tab. 4.3).

Anzahl der Rezidive	Häufigkeit	Prozent
0	46	63
1	17	24
2	4	6
3	2	3
5	2	3
6	1	1

Tab. 4.3 Anzahl der Rezidive der untersuchten Hypophysenadenome (n = 72 Patienten)

Von den untersuchten Rezidiv-Tumoren der Hypophysenadenome kam es in 43 Prozent der Fälle in der Folge zum Auftreten eines weiteren Rezidivs. Die zweithäufigste Komplikation lag in einer zumindest kurzzeitigen Substitution von Hypophysenhormonen, gefolgt von Revisions-Operationen bei zum Beispiel aufgetretener Liquor-Leckage, Blutungen oder auch notwendiger Wahl eines anderen Zugangsweges. Es ist zu berücksichtigen, dass die genannten klinischen Daten aufgrund der retrospektiven Erhebung keine Vollständigkeit und kein endgültiges Follow-up wiedergeben, sondern nur orientierend beschreiben können.

#### 4.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an den Hypophysentumoren

Die meisten der untersuchten Hypophysen-Tumoren zeigen eine Immunreaktivität für die IGFBP-1-6 in einem diffusen zytoplasmatischen Muster. Auffällig ist bei den Hypophysenadenomen eine deutliche Akzentuierung der Zellmembran bei IGFBP-5 und eine nahezu bei allen IGFBP gefundene paranukleär gelegene fleckförmige (*dot-like*) Reaktion. Am deutlichsten und am größten sind diese *dots* bei IGFBP-3.

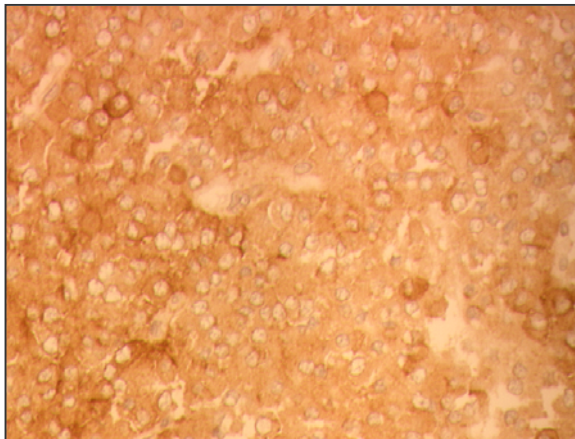


Abb. 4.7 Hypophysenadenom, IGFBP-5, 200x

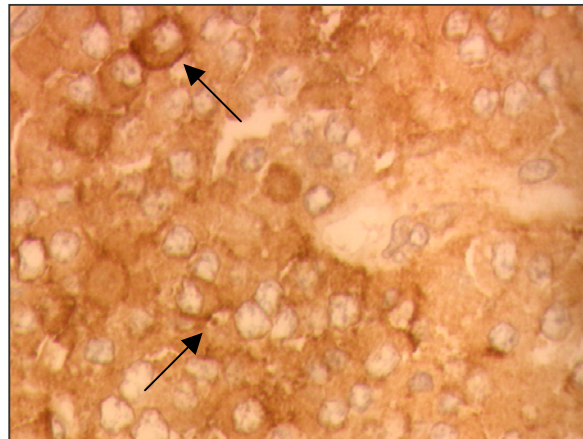


Abb. 4.8 Hypophysenadenom, IGFBP-5, 400x

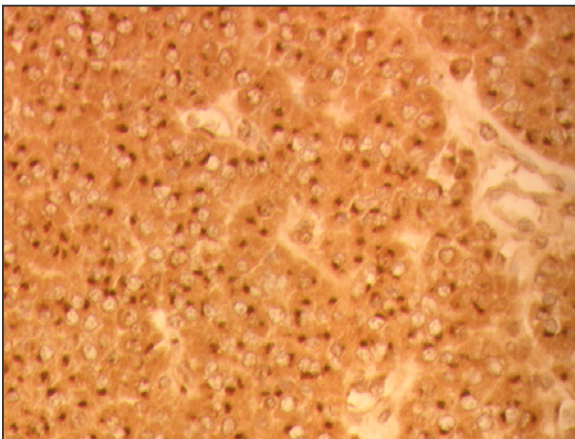


Abb. 4.9 Hypophysenadenom, IGFBP-3, 200x



Abb. 4.10 Hypophysenadenom, IGFBP-3, 400x

##### 4.4.1 Zytoplasmatische und nukleäre Reaktion

Betrachtet man die Immunreaktivität im Zytoplasma ergibt sich für die IGFBP im einzelnen: IGFBP-1, -3, -4 und -6 lassen sich bei allen untersuchten Hypophysen-

tumoren nachweisen. Für IGFBP-2 fällt auf, dass bei den Adenomen sowohl eine geringe Anzahl (3 Prozent) nicht reagiert, hingegen 16 Prozent sogar eine stark positive Reaktion zeigen. Bei den Kraniopharyngeomen färben sich IGFBP-2 in 55 Prozent und -5 in 9 Prozent der Fälle nicht an.

Rein deskriptiv ergibt sich zunächst kein deutlicher Unterschied zwischen den Hypophysenadenomen und Kraniopharyngeomen und ihren entsprechenden Rezidivtumoren. Bei den Hypophysenadenom-Rezidiven färben sich die Tumoren jedoch für jedes der IGFBP-5 an, bei den 3 Kraniopharyngeom-Rezidiven zeigen sich negative Reaktionen bei IGFBP-5.

Es konnten auch nukleäre Anfärbungen beobachtet werden. Für die Kraniopharyngeome ergaben sich:

- stark positive nukleäre (diffus und herdförmig) Reaktionen bei IGFBP-1 und -3 für mehrere Fälle
- in wenigen Fällen nukleäre, aber nur herdförmig lokalisierte Anfärbung für IGFBP-2, -4, -5 und -6
- diffus nukleär überwiegend keine Reaktion für IGFBP-2, -4, -5, und -6 (jeweils  $\geq$  73 Prozent).

Bei den Hypophysenadenomen:

- stark positive (diffuse) nukleäre Reaktion für IGFBP-1 (55 Prozent), -2 (3 Prozent), -3 (5 Prozent), -4 (17 Prozent), -5 (10 Prozent) und -6 (47 Prozent); herdförmig zum Teil noch stärkere Anfärbung
- keine Anfärbung diffus nukleär für IGFBP-2 in 75 Prozent und IGFBP-5 in 72 Prozent.

Bei den jeweiligen Rezidivtumoren verhielten sich die Anfärbungen nukleär ähnlich wie bei den Primärtumoren.

In der folgenden Tabelle ist das grundsätzliche immunhistochemische Verteilungsmuster dargestellt, die statistische Auswertung war nur mittels Zusammenfassung der Kategorien möglich und folgt unter Punkt 4.7.



Tumor	Signal	IGFBP-1		IGFBP-2		IGFBP-3		IGFBP-4		IGFBP-5		IGFBP-6	
Adenom (n=64)	negativ	0	(0%)	2	(3%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
	schwach	24	(38%)	13	(20%)	10	(16%)	10	(16%)	9	(14%)	19	(30%)
	mittel	36	(56%)	39	(61%)	51	(80%)	53	(83%)	47	(73%)	45	(70%)
	stark	4	(6%)	10	(16%)	3	(4%)	1	(1%)	8	(13%)	0	(0%)
Ade-Rez (n=35)	negativ	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
	schwach	17	(49%)	14	(40%)	8	(23%)	2	(6%)	6	(17%)	10	(29%)
	mittel	18	(51%)	17	(49%)	25	(71%)	32	(91%)	26	(74%)	25	(71%)
	stark	0	(0%)	4	(11%)	2	(6%)	1	(3%)	3	(9%)	0	(0%)
Kranio (n=11)	negativ	0	(0%)	6	(55%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(9%)	0	(0%)
	schwach	3	(27%)	4	(36%)	1	(9%)	0	(0%)	8	(73%)	8	(73%)
	mittel	8	(73%)	1	(9%)	8	(73%)	10	(91%)	2	(18%)	3	(27%)
	stark	0	(0%)	0	(0%)	2	(18%)	1	(9%)	0	(0%)	0	(0%)
Kranio-Rez (n=3)	negativ	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	2	(67%)	0	(0%)
	schwach	3	(100%)	3	(100%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(33%)	2	(67%)
	mittel	0	(0%)	0	(0%)	3	(100%)	3	(100%)	0	(0%)	1	(33%)
	stark	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)

Adenom = Hypophysenadenom, Ade-Rez = Hypophysenadenom-Rezidiv, Kranio = Kraniopharyngeom, Kranio-Rez = Kraniopharyngeom-Rezidiv, n = Anzahl der untersuchten Tumoren

Tab. 4.4 Zytoplasmatisches Verteilungsmuster der Immunreaktivität im Vergleich zwischen Hypophysenadenomen, Adenom-Rezidiven, Kraniopharyngeomen und Kraniopharyngeom-Rezidiven

#### 4.4.2 Paranukleäre Anfärbung

Wie oben beschrieben zeigen die Hypophysenadenome eine deutliche Reaktion mit paranukleärer Anfärbung vor allem bei IGFBP-3. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Dabei sind bei den Hypophysenadenomen und auch ihren Rezidivtumoren diese *dots* für alle IGFBPs darzustellen. Auffällig ist ein deutliches Überwiegen großer *dots* für IGFBP-3 (95 Prozent der Primärtumoren, 100 Prozent der Rezidive), bei allen anderen IGFBPs stellen sie sich deutlich kleiner dar. Kein Nachweis einer *dot-like reaction* ergibt sich bei den Hypophysenadenomen für IGFBP-1 in 44 Prozent der Fälle und für IGFBP-2 in 17 Prozent der Fälle; bei IGFBP-4 und -5 nur in sehr kleiner Prozentzahl.

Die Kraniopharyngeome zeigen bei IGFBP-1 und -2 keinerlei *dot-like reaction*, für IGFBP-3 auch große *dots* (55 Prozent), sonst bei Anfärbung überwiegend kleinere *dots*.

Ein Unterschied zwischen Primär- und Rezidivtumor fällt für beide Hypophysentumoren deskriptiv nicht auf.

Die statistische Auswertung, die unter anderem einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Tumoren für IGFBP-3 zeigt, folgt unter Punkt 4.7.

Tumor	Dots	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Adenom (n=64)	negativ	28 (44%)	11 (17%)	0 (0%)	2 (3%)	1 (2%)	0 (0%)
	kleine	35 (54%)	53 (83%)	3 (5%)	62 (97%)	63 (98%)	58 (91%)
	große	1 (2%)	0 (0%)	61 (95%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (9%)
Ade-Rez (n=35)	negativ	20 (57%)	10 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	kleine	15 (43%)	25 (71%)	0 (0%)	35 (100%)	35 (100%)	33 (94%)
	große	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)
Kranio (n=11)	negativ	11 (100%)	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (73%)	2 (18%)
	kleine	0 (0%)	0 (0%)	5 (45%)	11 (100%)	3 (27%)	8 (73%)
	große	0 (0%)	0 (0%)	6 (55%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)
Kranio-Rez (n=3)	negativ	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
	kleine	0 (0%)	0 (0%)	2 (67%)	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
	große	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Adenom = Hypophysenadenom, Ade-Rez = Hypophysenadenom-Rezidiv, Kranio = Kraniopharyngeom, Kranio-Rez = Kraniopharyngeom-Rezidiv, n = Anzahl der untersuchten Tumoren

Tab. 4.5 Verteilungsmuster der *dot-like reaction* bei Hypophysenadenomen, Adenom-Rezidiven, Kraniopharyngeomen und Kraniopharyngeom-Rezidiven

Unter dem Verdacht, dass die paranukleären *dots* dem Golgi-Apparat entsprechen könnten, führten wir weitere Untersuchungen an Tumoren mit ausgeprägtem Golgi-Apparat wie Plasmozytomen, Nebenschilddrüsenadenomen und Nebennierenrindenadenomen durch. Dabei bestätigte sich eine paranukleäre Anfärbung für alle IGFFBPs, die ebenfalls bei IGFBP-3 am stärksten ausgeprägt ist. Für IGFBP-2 zeigten 89 Prozent der Vergleichstumoren keine *dot-like reaction*.

Tumor	dots	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Varia (n=9)	negativ	4 (44%)	8 (89%)	0 (0%)	2 (22%)	2 (22%)	2 (22%)
	kleine	4 (44%)	1 (11%)	2 (22%)	4 (44%)	2 (22%)	2 (22%)
	große	1 (11%)	0 (0%)	7 (78%)	3 (33%)	5 (56%)	5 (56%)

Tab. 4.6 *dot-like reaction* bei den Vergleichstumoren (als Varia zusammengefasst)

Auch bei den Anteilen an normaler Hypophyse in den untersuchten Präparaten zeigte sich ein spezifisches zytoplasmatisches Anfärbungsmuster mit *dot-like reactions* für IGFBP-3 und einer Zellmembranakzentuierung für IGFBP-5.

#### 4.5 Ergebnis der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung

Für die Elektronenmikroskopie wird eine Fixation in Glutaraldehyd benötigt, die Verwendung von paraffin-fixiertem Gewebe ist hier von fragwürdigem Wert (Asa, 1998), was die Anzahl der für die Elektronenmikroskopie zur Verfügung stehenden Tumoren deutlich eingeschränkt hat.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung, unter der Intention einer Spezifizierung der perinukleären Anfärbung durchgeführt, ergab trotz vielfacher methodischer Variation nur eine unspezifische Anfärbung. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Antikörper ursprünglich weder für den immunhistochemischen noch für den elektronenmikroskopisch-immunologischen Nachweis erprobt waren. Die mitgeführte Negativkontrolle ist definitiv negativ. Eine räumliche Spezifizierung in den Präparaten ist aber nicht gelungen (s. Abb. 4.11-4.12).

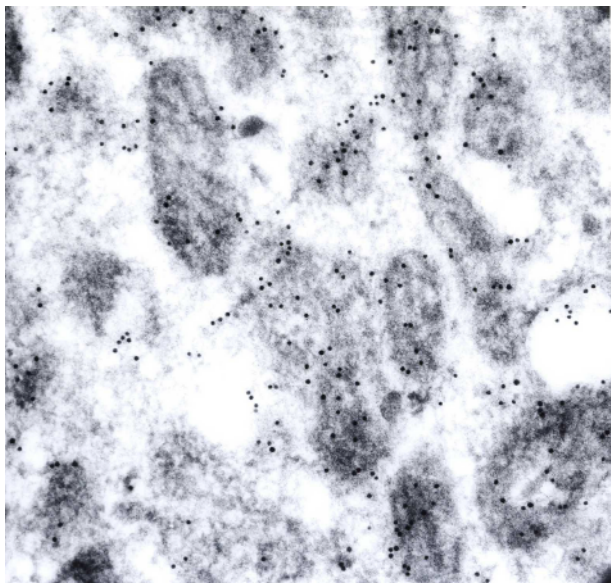


Abb. 4.11 Hypophysenadenom, IGFBP-3, Konzentration 1:250, M 50000

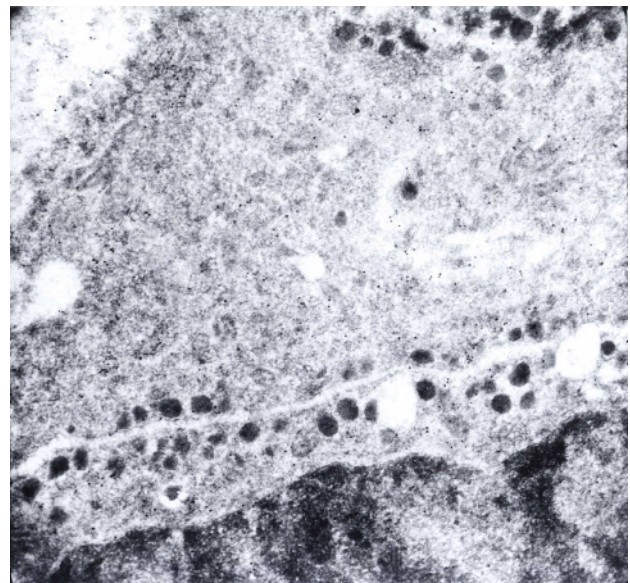


Abb. 4.12 Hypophysenadenom, IGFBP-5, Konzentration 1:500, M 20000

#### 4.6 Subklassifikation und Hormonaktivität

Die Hypophysenadenome zeigten sich histologisch in den folgenden Subklassifikationen: chromophobe Adenome bei 78 Prozent und eosinophile Adenome bei 22 Prozent der untersuchten Primärtumoren.

Dabei lag in 28 Prozent der Fälle ein kleinzelliger Adenomtyp, in 49 Prozent ein klein- bis mittelgroßzelliges, in 14 Prozent ein mittelgroßzelliges und in 9 Prozent ein groß- zelliges Zellbild vor. Bezüglich der Hormonaktivität wurden die Hypophysenadenome auf eine Prolaktinexpression immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigten von den 64 untersuchten Primärtumoren nur 24 eine positive Reaktion (38 Prozent).

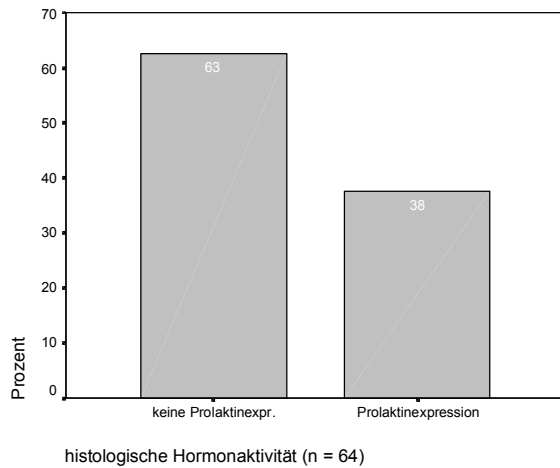


Abb. 4.13 Histologische Hormonaktivität der Hypophysenadenome (Primärtumoren)

Wenn man hingegen die immunhistochemischen Befunde mit klinischen Daten kombiniert, ergibt sich das folgende Bild für die Hormonaktivität: 34 Prozent (22/64) hormoninaktive Tumoren, 27 Prozent (17/64) Prolaktinome, 17 Prozent (11/64) gemischt GH- und Prolaktin-produzierende Adenome, 1 Fall (2 Prozent) eines ACTH- bzw. gemischt ACTH- und Prolaktin-produzierenden Tumors und bei 20 Prozent (13/64)

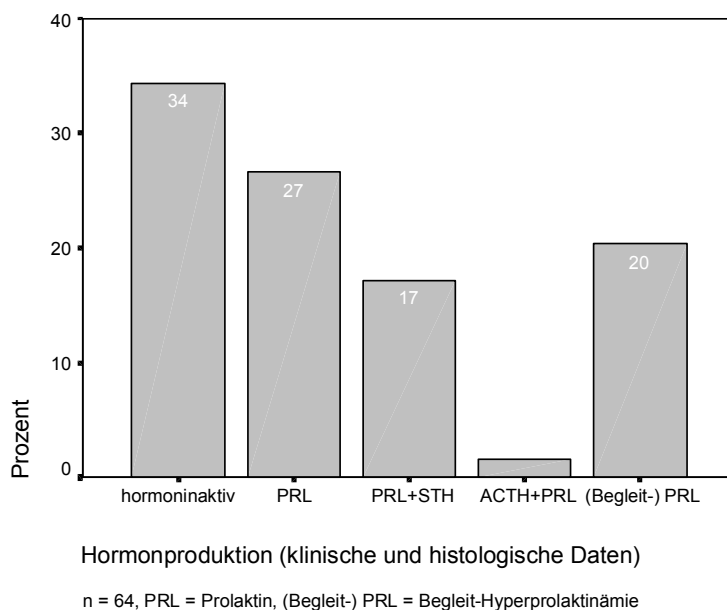


Abb. 4.14 Hormonproduktion der Hypophysenadenome (Zusammenfassung klinischer und histologischer Daten, n = 64, Primärtumoren)

eine laborchemische Hyperprolaktinämie ohne immunhistochemisches Korrelat, was auch für eine Begleithyperprolaktinämie sprechen könnte (durch Raumforderung Kompression des Hypophysenstiels). Auf die histologische Subklassifikation der Hypophysenadenome bezogen zeigte sich kein Zusammenhang zum immunhistochemischen Prolaktinnachweis ( $p = 0,64$  im Exakt-Test nach Fisher).

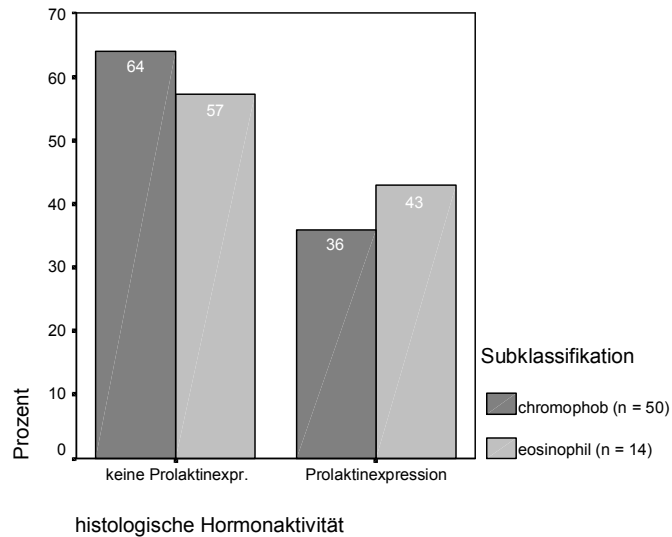


Abb. 4.15 Histologische Hormonaktivität in Bezug zur Subklassifikation ( $p = 0,64$ )

Bezogen auf die histologische Prolaktinexpression traten die Prolaktinome in der Studienpopulation signifikant in einem früheren Lebensalter auf (Zeitpunkt der Erstoperation,  $p < 0,001$ ; Mittelwert der Prolaktinome: 40,9 Jahre, der hormoninaktiven Tumore: 57,5 Jahre).

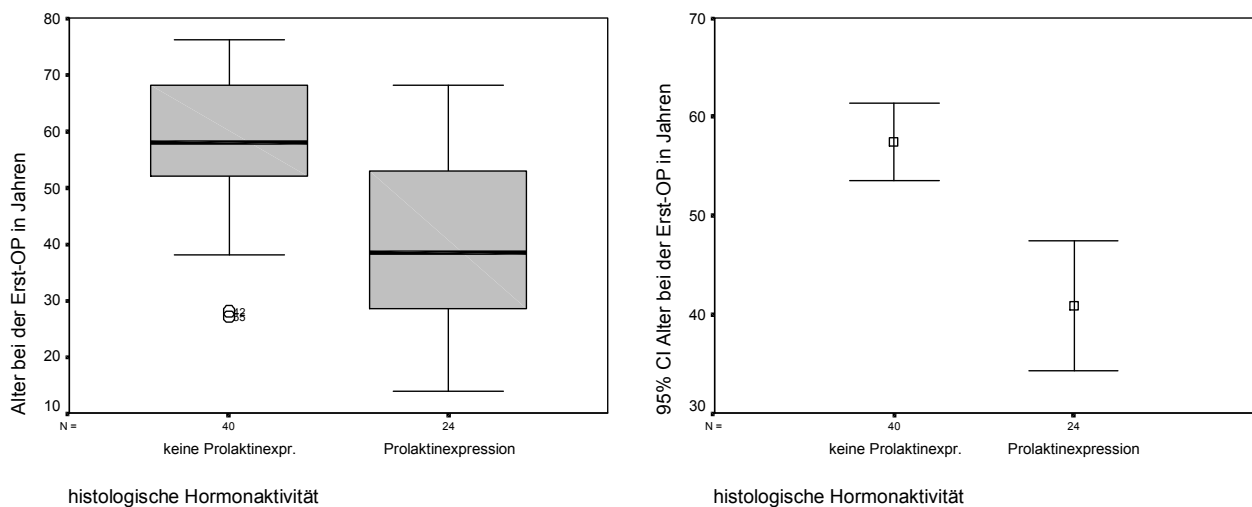


Abb. 4.16 Darstellung des Alters zum Zeitpunkt der Erstoperation in Abhängigkeit von der histologischen Prolaktinexpression ( $p < 0,001$ )

Auch bei Hinzuziehen der klinischen Daten (andere oder gemischte Hormonproduktion bzw. Interpretation als Begleithyperprolaktinämie) bleibt dieser Altersunterschied auf signifikantem Niveau ( $p = 0,002$ ) erhalten.

Eine medikamentöse Vorbehandlung mit einem Dopaminagonisten oder Somatostatinanalogon erfolgte präoperativ bei den Hypophysenadenom-Primärtumoren in 14 Fällen (14/64) und bei den Hypophysenadenom-Rezidivtumoren in 7 Fällen (7/35).

Die Hormonexpression für Prolaktin zeigt zunächst keine deutlichen Unterschiede bei den untersuchten IGFBP. Sowohl Prolaktin-exprimierende als auch bezüglich Prolaktin inaktive Hypophysenadenome zeigten eine durchschnittlich schwache bis eher mittelstarke Anfärbung für alle untersuchten IGFBP (s. Tab. 4.7).

Hormonaktivität	Signal	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
inaktiv (n=40)	negativ	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	schwach	17 (43%)	5 (13%)	7 (17%)	5 (13%)	4 (10%)	14 (35%)
	mittel	23 (58%)	26 (65%)	31 (78%)	35 (87%)	32 (80%)	26 (65%)
	stark	0 (0%)	7 (17%)	2 (5%)	0 (0%)	4 (10%)	0 (0%)
Prolaktin (n= 24)	negativ	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	schwach	7 (29%)	8 (33%)	3 (13%)	5 (21%)	5 (21%)	5 (21%)
	mittel	13 (54%)	13 (54%)	20 (83%)	18 (75%)	15 (62%)	19 (79%)
	stark	4 (17%)	3 (13%)	1 (4%)	1 (4%)	4 (17%)	0 (0%)

inaktiv = histologisch keine Prolaktinexpression; Prolaktin = immunhistochemische Prolaktinexpression

Tab. 4.7 Zytoplasmatisches Verteilungsmuster der Immunreaktivität im Vergleich zwischen Hypophysenadenomen ohne und mit histologisch nachgewiesener Prolaktinexpression

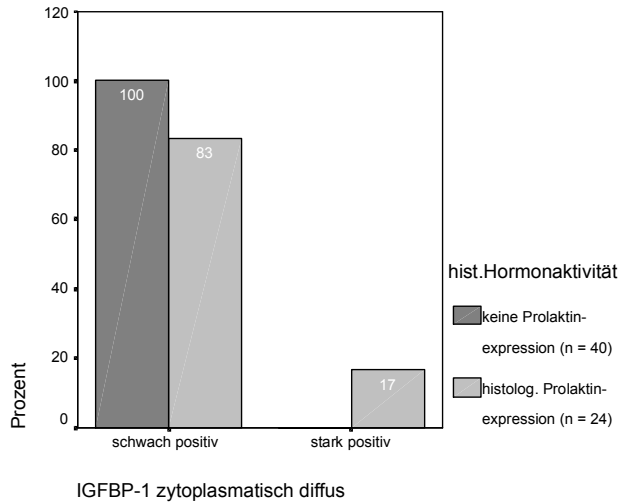
Die schon oben beschriebene charakteristische *dot-like reaction* erbrachte generell keine ausgeprägte Differenz bezüglich der beiden Untergruppen. Dabei waren große *dots* in nahezu allen Tumoren für IGFBP-3 nachzuweisen (100 Prozent für hormoninaktive und 88 Prozent für Prolaktin-exprimierende Hypophysenadenome). In wenigen Fällen auch für IGFBP-1 und -6.

Hormonaktivität	dots	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
inaktiv (n=40)	negativ	18 (45%)	5 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	kleine	21 (52%)	35 (87%)	0 (0%)	40 (100%)	40 (100%)	35 (87%)
	große	1 (3%)	0 (0%)	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (13%)
Prolaktin (n= 24)	negativ	10 (42%)	6 (25%)	0 (0%)	2 (8%)	1 (4%)	0 (0%)
	kleine	14 (58%)	18 (75%)	3 (12%)	22 (92%)	23 (96%)	23 (96%)
	große	0 (0%)	0 (0%)	21 (88%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)

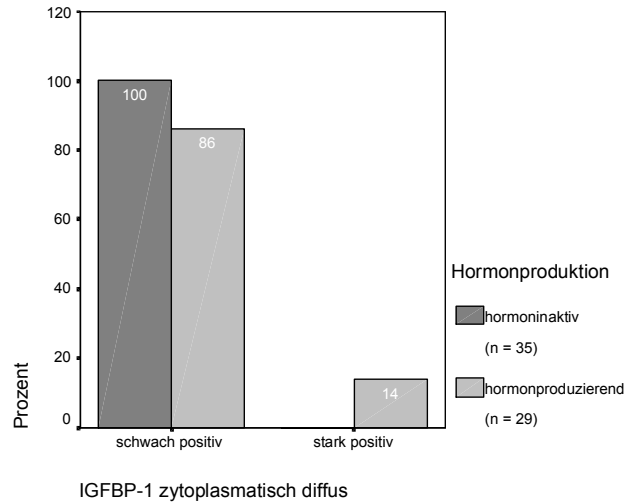
inaktiv = histologisch keine Prolaktinexpression; Prolaktin = immunhistochemische Prolaktinexpression

Tab. 4.8 Verteilungsmuster der *dot-like reaction* bei Hypophysenadenomen mit und ohne histologisch nachgewiesener Prolaktinexpression

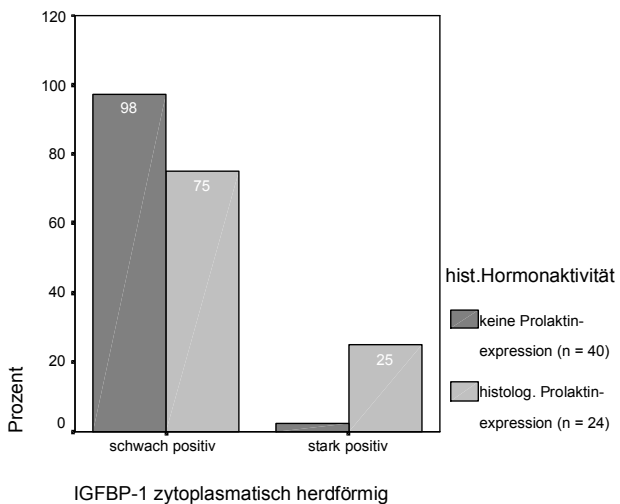
Bei statistischer Gegenüberstellung ergab sich aber eine Signifikanz in der unterschiedlichen Anfärbungsstärke bei hormoninaktiven und hormonproduzierenden Hypophysenadenomen für IGFBP-1 zytoplasmatisch diffus und herdförmig und die *dot-like reaction* bei IGFBP-3 (s. Abbildungen).



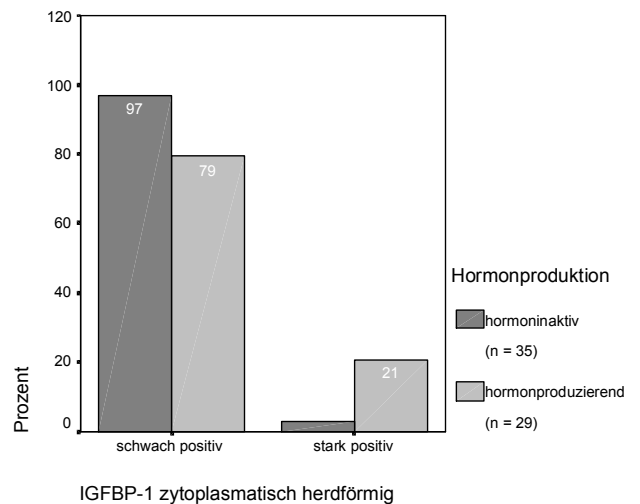
**Abb. 4.17** IGFBP-1 zytoplasmatisch diffus bei Prolaktin-inaktiven und Prolaktin-produzierenden Hypophysenadenomen (rein histologische Befunde)  
p = 0,017 Fishers Exakt-Test



**Abb. 4.18** IGFBP-1 zytoplasmatisch diffus bei hormoninaktiven und hormonproduzierenden Hypophysenadenomen (klinische und immunhistochemische Befunde zusammengefasst)  
p = 0,037 Fishers Exakt-Test



**Abb. 4.19** IGFBP-1 zytoplasmatisch herdförmig bei Prolaktin-inaktiven und Prolaktin-produzierenden Hypophysenadenomen (rein histologische Befunde)  
p = 0,009 Fishers Exakt-Test



**Abb. 4.20** IGFBP-1 zytoplasmatisch herdförmig bei hormoninaktiven und hormonproduzierenden Hypophysenadenomen (klinische und immunhistochemische Befunde zusammengefasst)  
p = 0,040 Fishers Exakt-Test

Dieser Unterschied verringert sich gering, wenn man die rein immunhistochemischen Daten mit den klinischen Befunden ergänzt. Dabei wurde nicht zwischen der Art des sezernierten Hormons unterschieden, aber eine laborchemische Prolaktinexpression ohne immunhistochemischen Nachweis als hormoninaktiv beurteilt. Für IGFBP-3 ließ sich dann für die *dots* zwar kein signifikanter Zusammenhang mit der Hormonproduktion darstellen, mit einem  $p$  von 0,051 (Chi-Quadrat nach Pearson) bzw. 0,088 (Exakt-Test nach Fisher) aber doch eine deutliche Tendenz, die größere *dots* bei den hormonproduzierenden Hypophysenadenomen beschreibt.

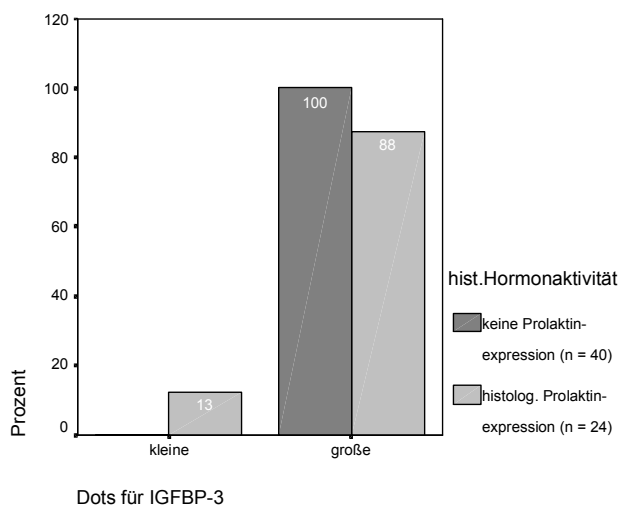


Abb. 4.21 *Dots* für IGFBP-3 bei Prolaktin-inaktiven und Prolaktinproduzierenden Hypophysenadenomen (rein histologische Befunde)  
 $p = 0,049$  Fishers Exakt-Test

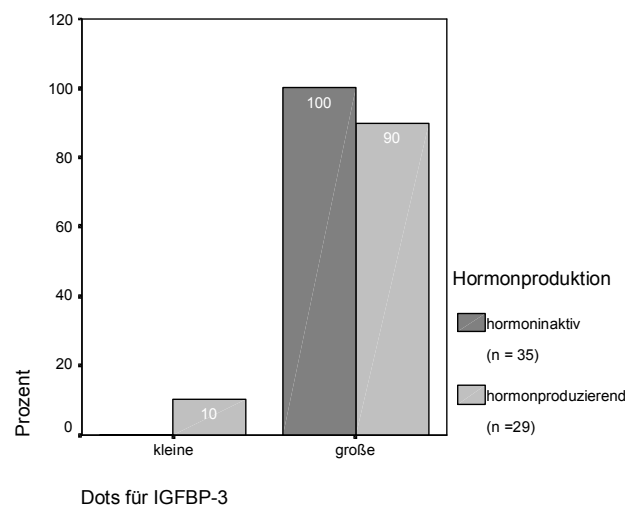


Abb. 4.22 *Dots* für IGFBP-3 bei hormoninaktiven und hormonproduzierenden Hypophysenadenomen (klinische und immunhistochemische Befunde zusammengefasst),  $p = 0,051$  Chi-Quadrat nach Pearson,  $p = 0,088$  Fishers Exakt-Test

## 4.7 Vergleich Kraniopharyngeome - Hypophysenadenome

Mittels Darstellung in Kreuztabellen/ Vierfeldertafeln und folgendem Chi-Quadrat-Test bzw. Berechnung des relativen Risikos wurde die Anfärbung von Hypophysenadenomen mit der von Kraniopharyngeomen (Primärtumoren) verglichen. Dabei ergab sich für die diffuse zytoplasmatische Anfärbung kein signifikanter Unterschied für IGFBP-1-6. Herdförmig zytoplasmatisch erbrachte die Reaktion einen statistisch signifikanten Unterschied für IGFBP-2 ( $p = 0,005$  im Exakt-Test nach Fisher), wobei



sich nur bei den Hypophysenadenomen eine stark positive Reaktion in 44 Prozent der Fälle zeigte und für IGFBP-5 ( $p < 0,001$  im Exakt-Test nach Fisher), wobei auch hier nur die Hypophysenadenome herdförmig stark positive Reaktionen in mehr als der Hälfte der Fälle (56 Prozent) zeigten.

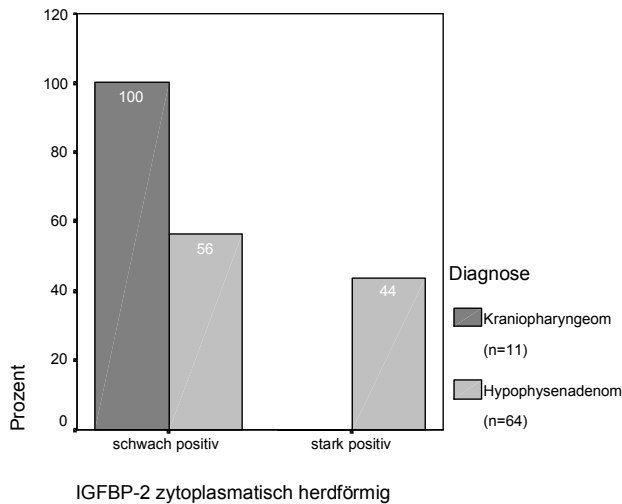


Abb. 4.23 IGFBP-2 zytoplasmatisch herdförmig bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen ( $p = 0,005$ )

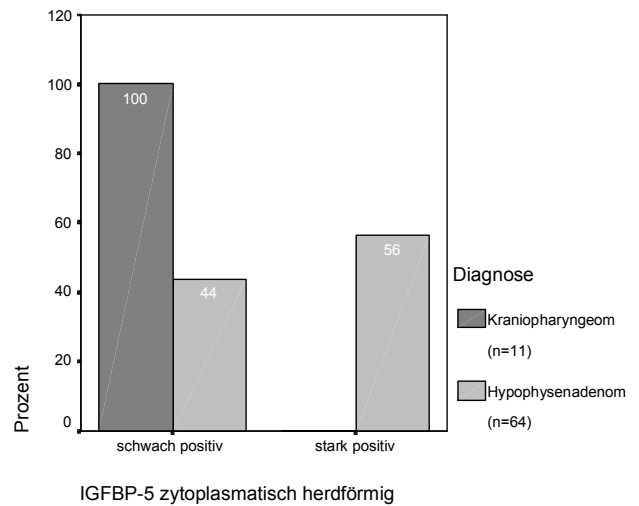


Abb. 4.24 IGFBP-5 zytoplasmatisch herdförmig bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen ( $p < 0,001$ )

Teilweise ließ sich auch eine Anfärbung des Nukleus nachweisen, wobei diese überwiegend schwach positiv war. Herdförmig zeigte sich gelegentlich auch eine stärkere Anfärbung, wobei sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorarten nur für IGFBP-6 nachweisen ließ:  $p = 0,045$  (Exakt-Test nach Fisher); RR 4,64 für die stark positive Anfärbung Hypophysenadenome gegen Kraniopharyngeome (95 %iges KI: 0,70-30,74).

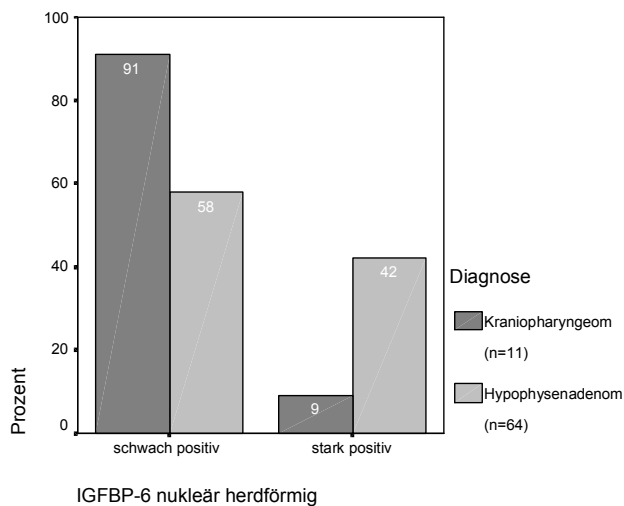


Abb. 4.25 IGFBP-6 Kernfärbung herdförmig bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen ( $p = 0,045$ )

In der diffusen Kernanfärbung ergab sich eine Signifikanz in der unterschiedlichen Anfärbungsstärke bezüglich IGFBP-1 und -6, wobei IGFBP-6 gerade auf diese Kernanfärbung bezogen sowohl diffus als auch herdförmig aufgrund der Positivkontrolle kritisch beurteilt werden muss.

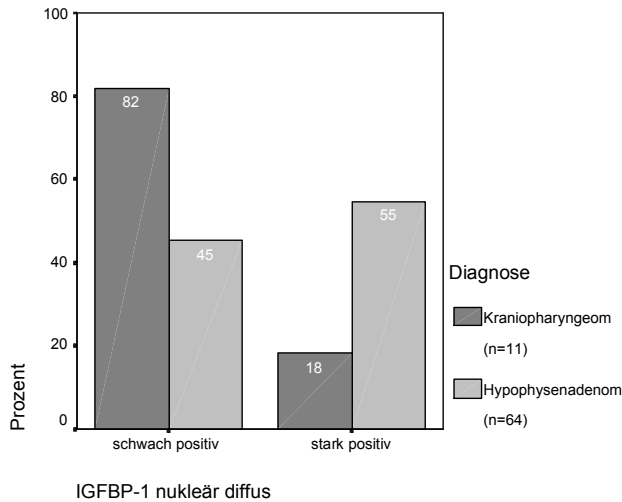


Abb. 4.26 IGFBP-1 Kernfärbung diffus bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen  
 $p = 0,047$  Fishers Exakt-Test  
 RR 3,01 (95 %iges KI: 0,84-10,75)

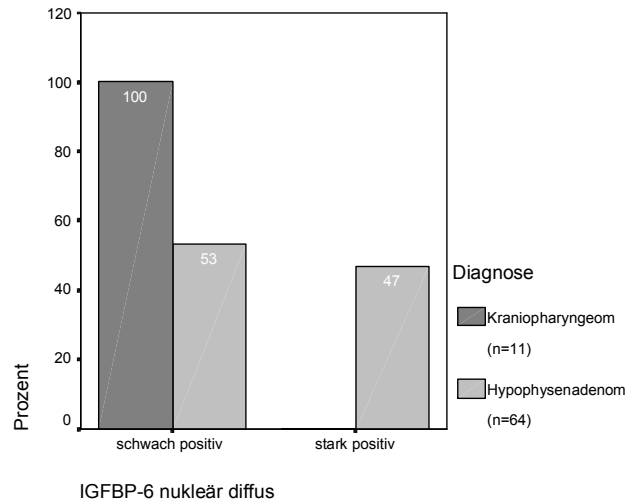


Abb. 4.27 IGFBP-6 Kernfärbung diffus bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen  
 $p = 0,002$  Fishers Exakt-Test

Bezogen auf die *dot-like reaction* ergibt sich folgendes Bild: Für IGFBP-1, -4 und -5 zeigen sich in beiden Tumorarten nur kleine *dots*, bei IGFBP-1 bis auf eine Ausnahme bei den Hypophysenadenomen ebenfalls nur kleine *dots*, bei IGFBP-6 überwiegend kleine *dots* ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Diagnosen. Statistisch signifikant ist im Gegensatz dazu das Ergebnis für IGFBP-3 mit eindeutig mehr großen *dots* für die Hypophysenadenome ( $p = 0,001$ ).

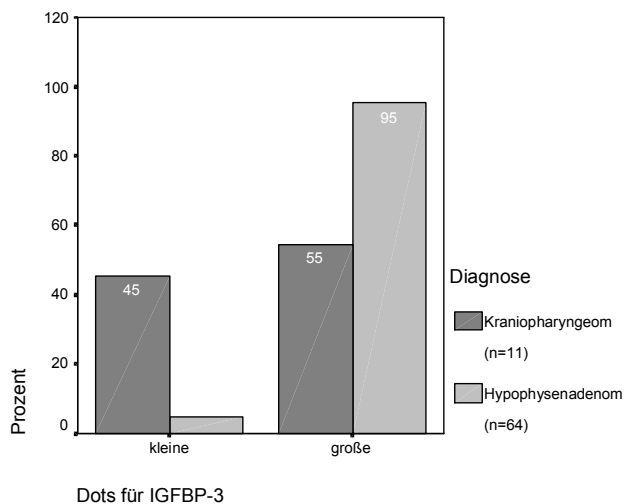


Abb. 4.28 *Dots* für IGFBP-3 bei Kraniopharyngeomen und Hypophysenadenomen  
 $p = 0,001$  Fishers Exakt-Test  
 RR 1,75 (95 %iges KI: 1,02-3,01)

#### 4.8 Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumoren

Bei den Hypophysenadenomen konnten für 14 Primärtumoren die jeweils ersten Rezidive ausgemacht werden: Es konnte keinerlei signifikanter Unterschied in der Stärke der Anfärbung gezeigt werden. Allerdings stellte sich für die diffuse nukleäre Anfärbung bei IGFBP-1 eine Tendenz mit einem  $p = 0,125$  im McNemar-Test dar, wobei bei den Rezidivtumoren eine stärkere positive Kernfärbung beobachtet wurde (s. Tab. 4.9).

Ein zweites Rezidiv konnte in 6 Fällen untersucht werden. Dabei sind aufgrund der geringen Fallzahl keine statistischen Signifikanzen zu erwarten und auch nicht zu berechnen. Beim Versuch eines rechnerischen Vergleichs (McNemar-Test) zwischen dem zweiten Rezidiv und dem Primärtumor bzw. dem zweiten und ersten Rezidivtumor ergeben sich Hinweise auf geringe Tendenzen:

- Diffus nukleär färben sich für IGFBP-6 die zweiten Rezidive stärker als die ersten Rezidive ( $p = 0,250$ ) und die Primärtumoren ( $p = 0,5$ )
- Herdförmig zytoplasmatisch färben sich für IGFBP-4 die zweiten Rezidive stärker als die Primärtumoren ( $p = 0,5$ )
- Herdförmig nukleär färben sich für IGFBP-4 die zweiten Rezidive stärker als die ersten Rezidive ( $p = 0,625$ ) und die Primärtumoren ( $p = 0,5$ )
- Herdförmig nukleär färben sich für IGFBP-6 die zweiten Rezidive schwächer als die Primärtumoren ( $p = 0,5$ ).

##### Diffuse Kernanfärbung für IGFBP-1 (zusammengefaßt): Kreuztabelle Primär- und 1. Rezidiv-Tumor

			IGFBP-1 nukleär diffus (Rezidiv 1)		Gesamt
			schwach positiv	stark positiv	
IGFBP-1 nukleär diffus (Primärtumor)	schwach positiv	Anzahl	2	6	8
		% der Gesamtzahl	14,3%	42,9%	57,1%
	stark positiv	Anzahl	1	5	6
		% der Gesamtzahl	7,1%	35,7%	42,9%
Gesamt	Anzahl		3	11	14
	% der Gesamtzahl		21,4%	78,6%	100,0%

Tab. 4.9 Vergleich Primär- und Rezidivtumor (Hypophysenadenom) für IGFBP-1 ( $p = 0,125$ , McNemar-Test)

Von den untersuchten Hypophysenadenomen führten 28 Prozent (18 von 64 Tumoren) zu einem Rezidiv. Wenn man diese Gruppe mit den nicht-rezidivierenden Tumoren vergleicht, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell zeigen die zu einem Rezidiv neigenden Tumoren eine insgesamt schwächere lokale Reaktion in der herdförmigen zytoplasmatischen Anfärbung für IGFBP-1 ( $p = 0,079$  Chi-Quadrat nach Pearson;  $p = 0,177$  Exakt-Test nach Fisher), der herdförmigen zytoplasmatischen Anfärbung für IGFBP-2 ( $p = 0,107$  Chi-Quadrat nach Pearson,  $p = 0,161$  Exakt-Test nach Fisher) und auch IGFBP-5 ( $p = 0,080$  Chi-Quadrat nach Pearson,  $0,098$  Exakt-Test nach Fisher). Eine gleiche Tendenz ließ sich für IGFBP-5 diffus nukleär berechnen ( $p = 0,107$  Chi-Quadrat nach Pearson,  $p = 0,173$  Exakt-Test nach Fisher).

#### **4.9 Ergebnisse von Hormonuntersuchungen im Serum**

Serum-IGF-I wurde präoperativ bei 40 der Hypophysenadenome (Primärtumoren) bestimmt, dabei variierten die Werte von 32,0 bis 1428,0 ng/ml. Für IGFBP-3 konnten retrospektiv 19 Fälle mit einer Schwankungsbreite von 1,3 bis 6,0  $\mu\text{g/ml}$  erhoben werden. Dementsprechend lässt sich für 19 Fälle eine IGF-I/IGFBP-3-Ratio berechnen, die von 0,02 bis 0,24 reicht. GH im Serum wurde bei 41 Patienten mit Werten von 0,05 bis 906,0 ng/ml, Prolaktin im Serum bei 46 Patienten mit Werten von 10,0 bis 123.600,0 mIU/l bestimmt.

Bei den jeweils 1. Rezidiven dieser Tumoren wurde Prolaktin in 10 der Fälle mit Werten zwischen 139,0 und 5730,0 mIU/l bestimmt, GH im Serum bei 7 Patienten mit Werten zwischen 0,05 und 1,27 ng/ml, IGF-I im Serum bei 7 Patienten mit Werten zwischen 77,1 bis 187,7 ng/ml. IGFBP-3 war nur bei einem dieser Rezidiv-Patienten bestimmt worden.

Bezüglich der Rezidivneigung der untersuchten Primärtumoren der Hypophysenadenome ergibt sich im T-Test (bzw. im Einzelfall nichtparametrischen Test) kein signifikanter Unterschied für IGF-I, IGFBP-3, IGF-I/IGFBP-3-Ratio, GH und Prolaktin präoperativ im Serum. Ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ließ sich zwischen den genannten Hormon-Serumwerten und dem Geschlecht der Patienten, einer medikamentösen Vorbehandlung des Tumors, der Tumorgroße bzw. den

Symptomen einer Raumforderung ausmachen. Eine Tendenz zeigt sich hier zwischen der Tumorgöße und dem Serum-IGF-I ( $p = 0,093$ ), mit einem tendentiell niedrigeren IGF-I bei Makroadenomen (s. Abb. 4.28).

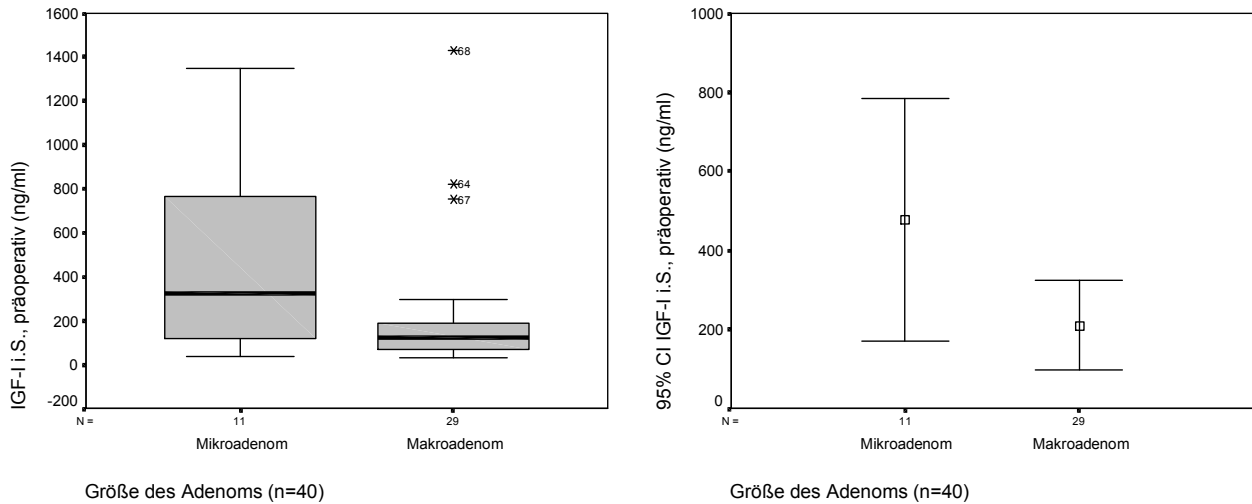


Abb. 4.29 Darstellung des präoperativen Serum-IGF-I bei Hypophysenadenomen in Abhängigkeit von der Adenomgröße ( $p = 0,093$ )

Zu beobachten war ein signifikanter Unterschied für IGFBP-3 im Serum ( $p < 0,001$ ), IGF-I im Serum ( $p = 0,005$ ) und der IGF-I/ IGFBP-3-Ratio ( $p = 0,002$ ) im T-Test bezogen auf die histologische Prolaktinexpression. Dieser Unterschied bleibt erhalten, wenn man bezüglich der Hormonaktivität die histologischen mit den klinischen Daten kombiniert: Es zeigt sich ein höheres Serum-IGF-I ( $p = 0,003$  im T-Test) und ein höheres Serum-IGFBP-3 ( $p < 0,001$  im T-Test) für hormonproduzierende Hypophysenadenome.

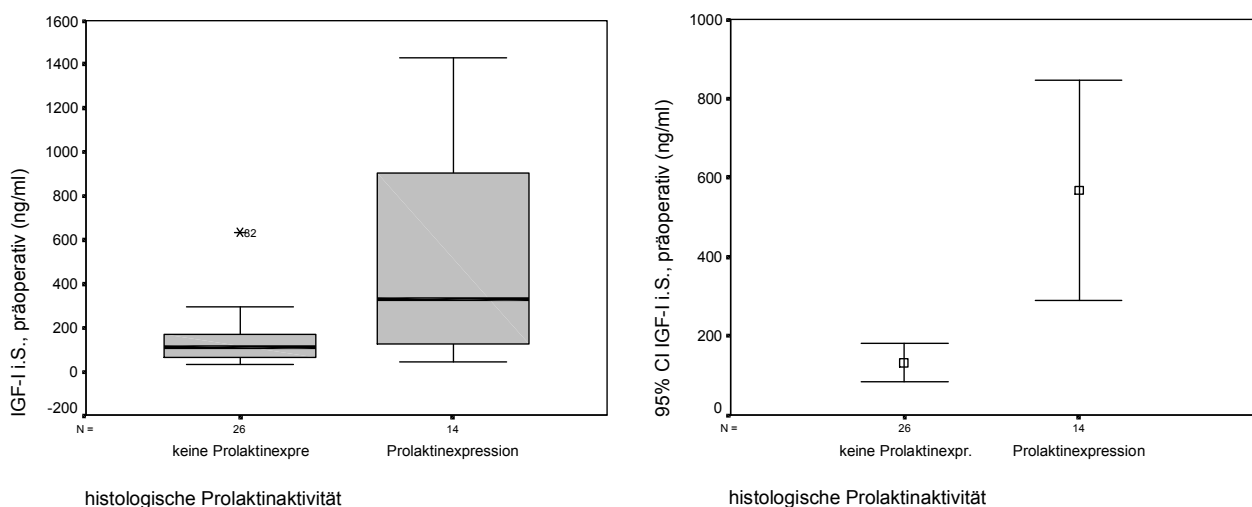


Abb. 4.30 Darstellung der präoperativen Serum-IGF-I-Werte in Abhängigkeit von der histologischen Prolaktinexpression ( $p = 0,005$ )

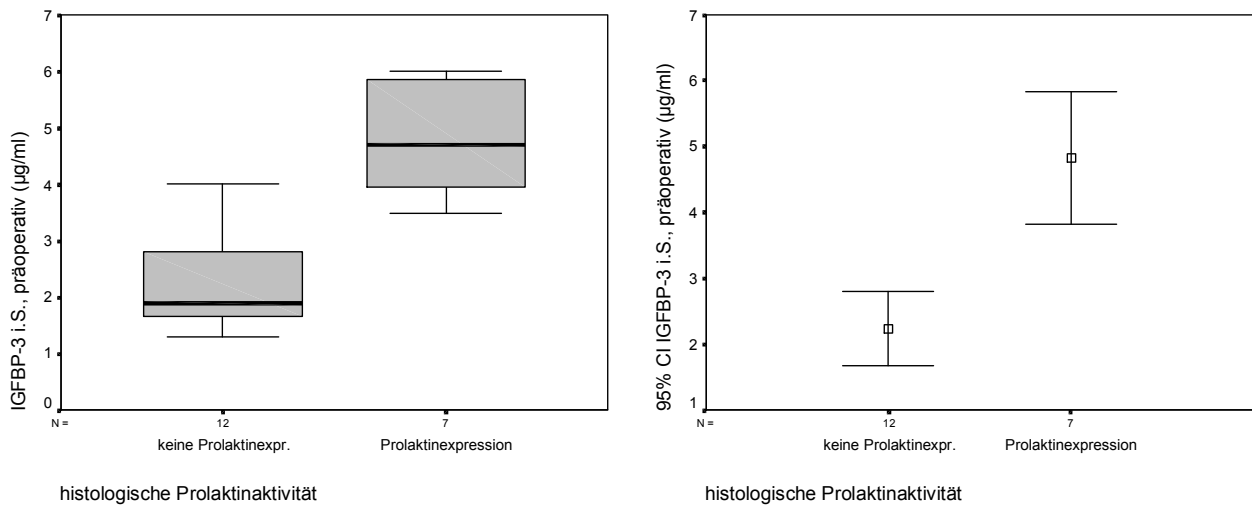


Abb. 4.31 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der histologischen Prolaktinexpression ( $p < 0,001$ )

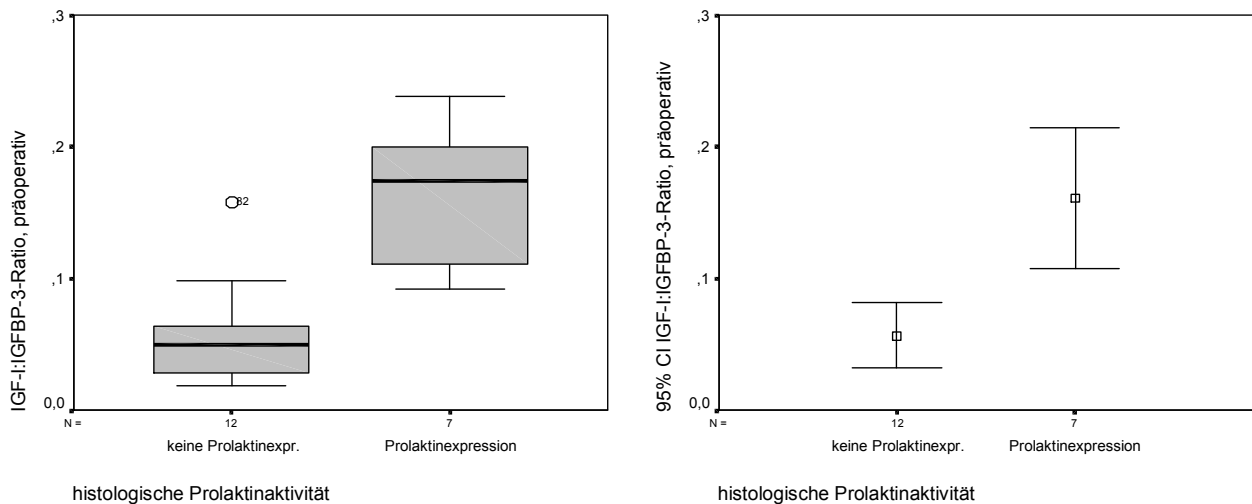


Abb. 4.32 Darstellung der präoperativen IGF-I/IGFBP-3-Ratio in Abhängigkeit von der histologischen Prolaktinexpression ( $p < 0,001$ )

Dementsprechend berechnet sich auch eine höhere IGF-I/IGFBP-3-Ratio ( $p < 0,001$ ).

Die Serumwerte für Prolaktin, GH, IGF-I und IGFBP-3 zeigten (soweit bei geringer Fallzahl berechenbar) keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Primär- und ersten Rezidivtumor der Hypophysenadenome.

In der Darstellung mittels Boxplot bzw. T-Test ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Serum-Werten für GH und Prolaktin und den einzelnen immunhistochemischen Färbungsgraden (schwach gegen stark positive Reaktion) für IGFBP-1-6.

Interessanterweise zeigen sich für das präoperative Serum-IGFBP-3 trotz der relativ geringen Fallzahlen signifikante Zusammenhänge für die histologische Expression von IGFBP-3 (herdförmig nukleär) und -5 (sowohl zytoplasmatisch diffus und herdförmig als auch herdförmig nukleär). Im Einzelnen (s. auch Abb. 4.33-4.35):

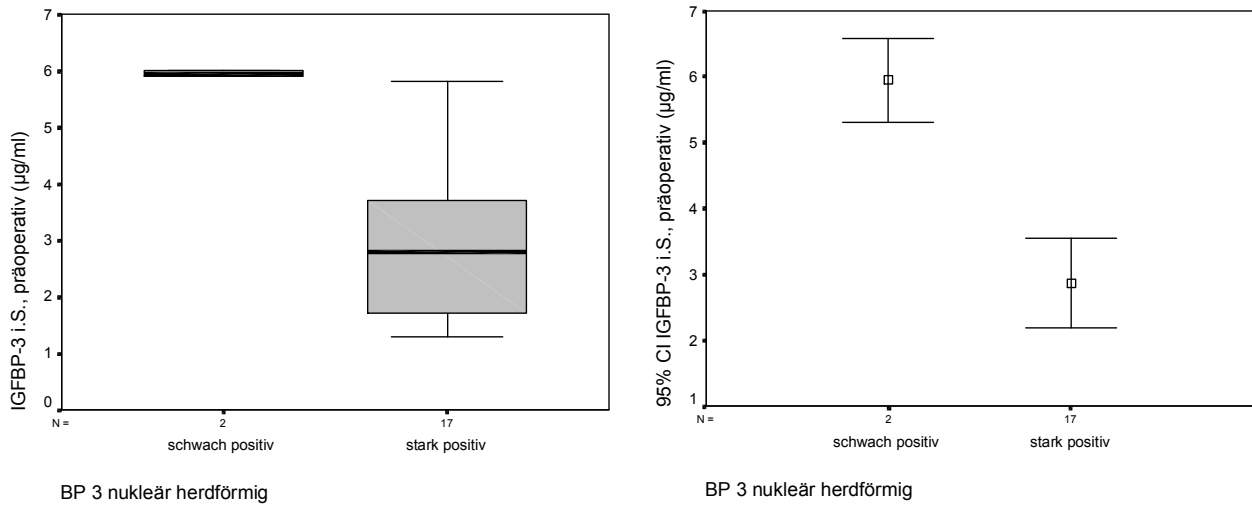


Abb. 4.33 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der herdförmig nukleären IGFBP-3-Expression,  $p < 0,001$

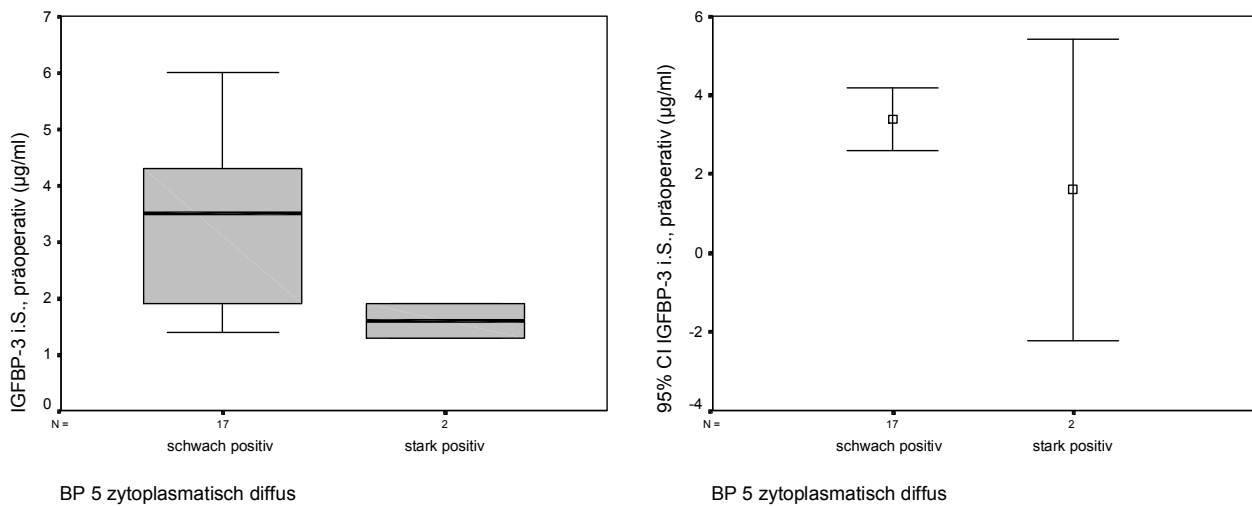


Abb. 4.34 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der diffus zytoplasmatischen IGFBP-5-Expression,  $p = 0,011$

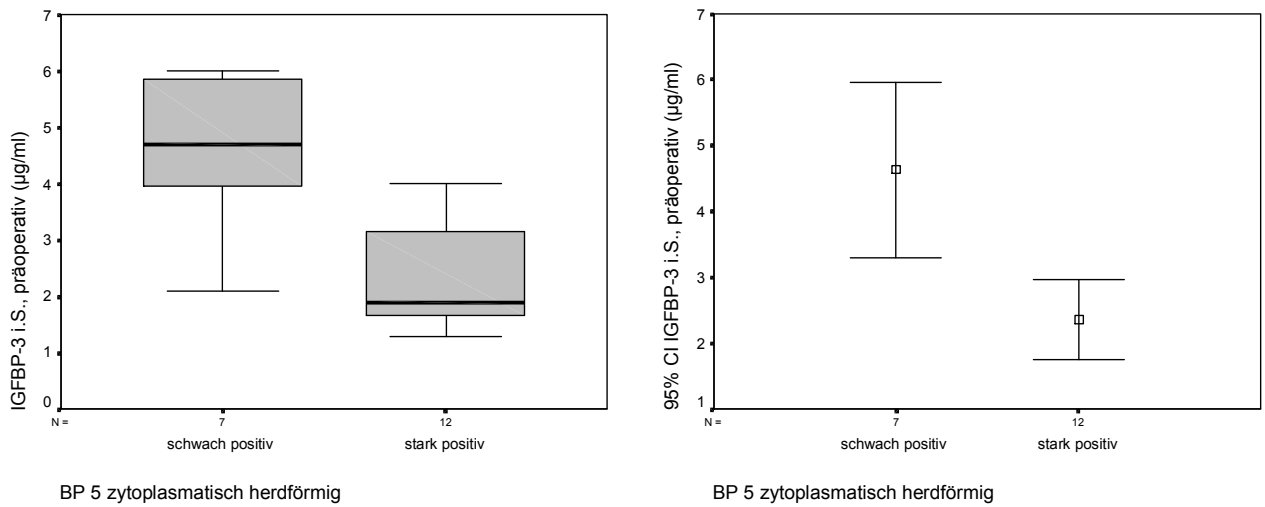


Abb. 4.35 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der herdförmig zytoplasmatischen IGFBP-5-Expression,  $p = 0,005$

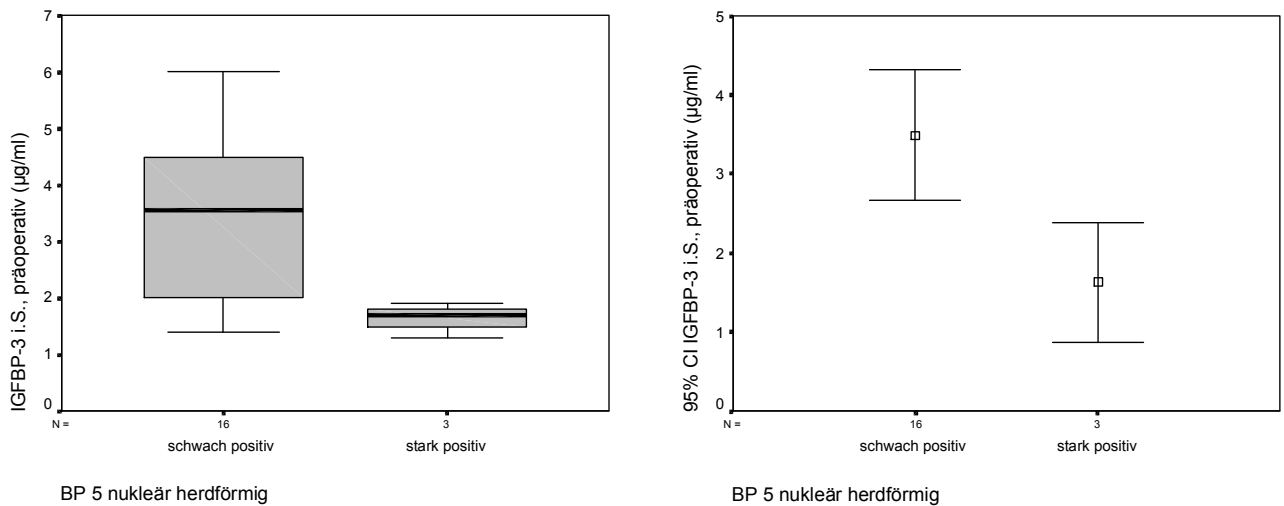


Abb. 4.36 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der herdförmig nukleären IGFBP-5-Expression,  $p < 0,001$

Für IGFBP-1 ließ sich für die zytoplasmatisch herdförmige Anfärbung zwar kein signifikanter Zusammenhang mit dem Serum-IGFBP-3 darstellen, mit einem  $p$  von 0,089 aber doch eine leichte Tendenz, die bei einer stark positiven immunhistochemischen Reaktion auch mit einem höheren Serum-IGFBP-3 einhergeht (Abb. 4.37).



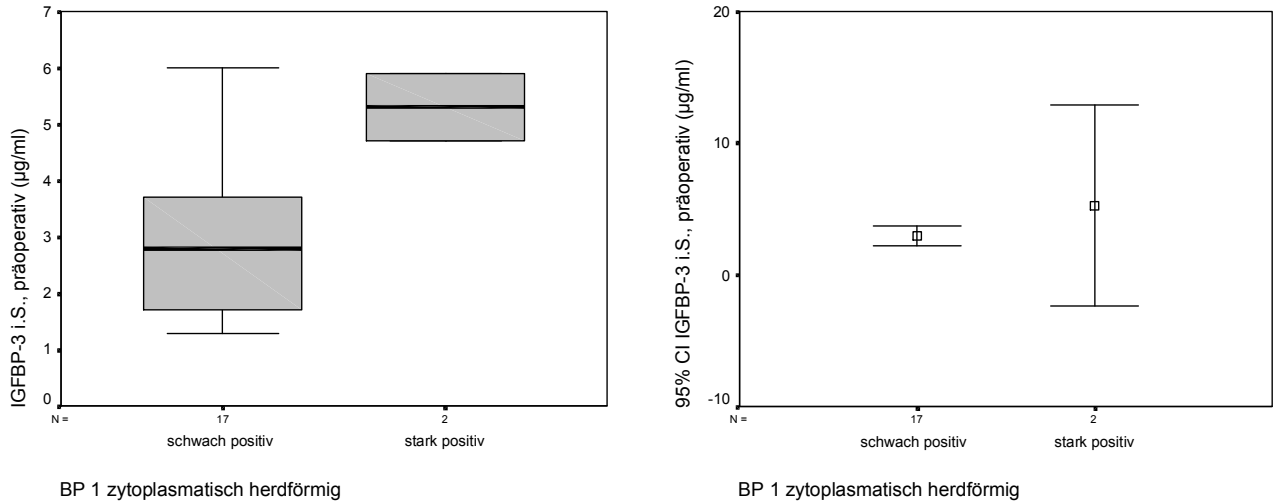


Abb. 4.37 Darstellung der präoperativen IGFBP-3-Werte in Abhängigkeit von der herdförmig zytoplasmatischen IGFBP-1-Expression,  $p = 0,089$

Das präoperative Serum-IGF-I steht in einem signifikanten Zusammenhang mit der zytoplasmatischen Anfärbung (diffus) von IGFBP-5 ( $p = 0,002$ ) sowie mit der herdförmig nukleären Anfärbung des gleichen Bindeproteins ( $p = 0,005$ ). Dabei geht eine stärkere Anfärbung in beiden Fällen mit einem höheren Serum-IGF-I einher. Für die zytoplasmatische Reaktion von IGFBP-5 (diffus und herdförmig) ist auch das Verhältnis zur IGF-I/IGFBP-3-Ratio signifikant (Abb. 4.38-4.41):

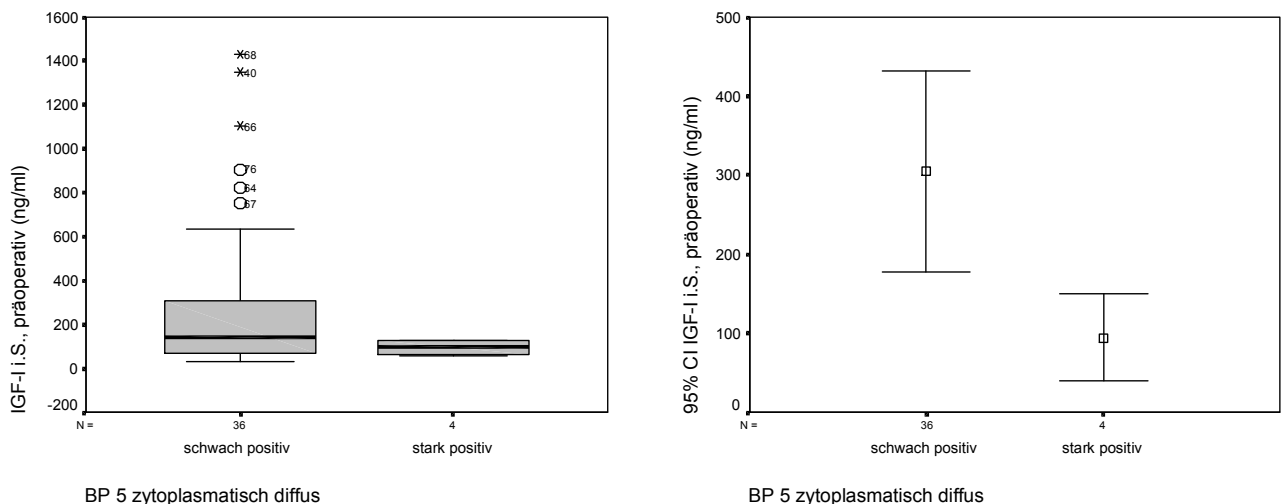
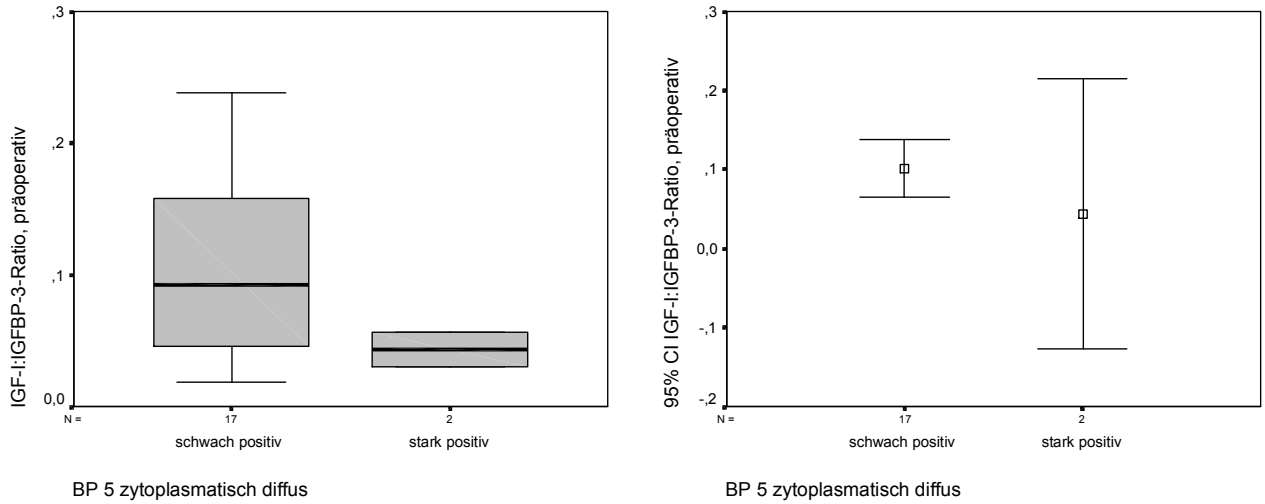
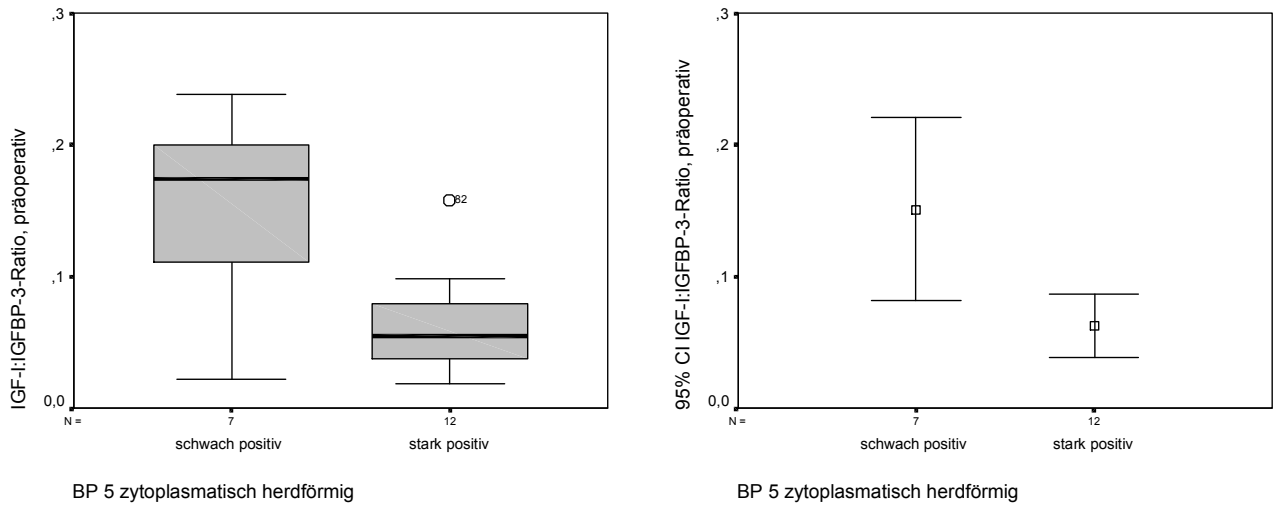


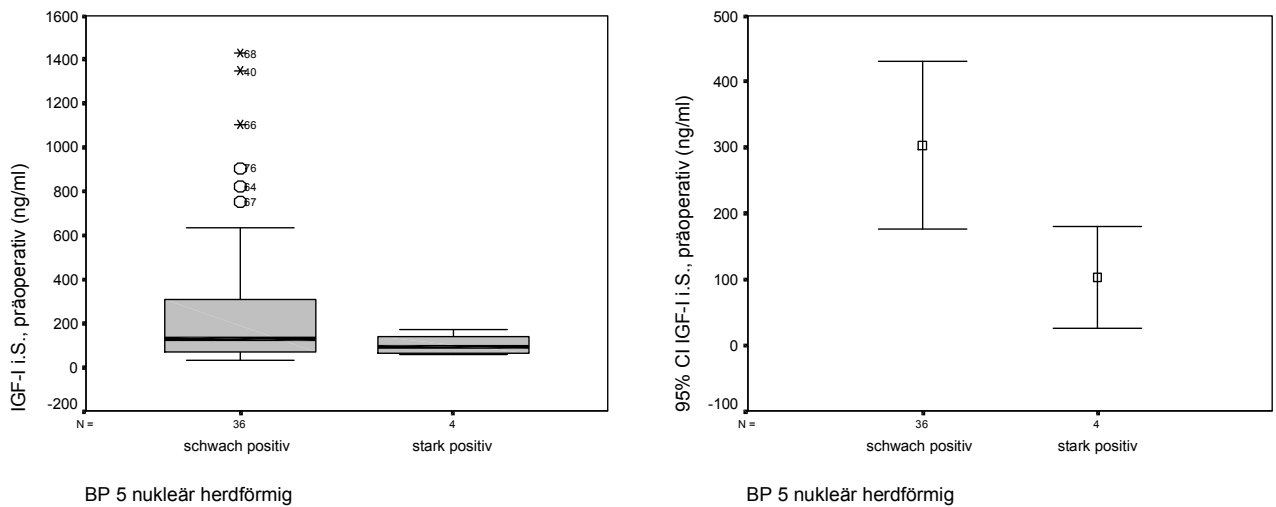
Abb. 4.38 Darstellung der präoperativen IGF-I-Werte in Abhängigkeit von der diffusen zytoplasmatischen IGFBP-5-Expression,  $p = 0,002$



BP 5 zytoplasmatisch diffus  
 Abb. 4.39 Darstellung der präoperativen IGF-I/ IGFBP-3-Ratio in Abhängigkeit von der diffusen zytoplasmatischen IGFBP-5-Expression,  $p = 0,038$



BP 5 zytoplasmatisch herdförmig  
 Abb. 4.40 Darstellung der präoperativen IGF-I/ IGFBP-3-Ratio in Abhängigkeit von der herdförmigen zytoplasmatischen IGFBP-5-Expression,  $p = 0,02$



BP 5 nukleär herdförmig  
 Abb. 4.41 Darstellung der präoperativen Serum-IGF-I-Werte in Abhängigkeit von der herdförmigen nukleären IGFBP-5-Expression,  $p = 0,005$

#### 4.10 Binär logistische Regression

Verschiedene Regressionsanalysen bezüglich Stärke der immunhistochemischen Färbung, Einfluss der Serumhormonwerte und Hormonaktivität der Hypophysenadenome erbrachten keine signifikanten Zusammenhänge. Bezüglich der Rezidivneigung der Adenome ließ sich lediglich eine Tendenz ( $p = 0,187$ ) für den Einfluss der Tumorgroße mit einem 3fach erhöhten Risiko einer Rezidivneigung bei einem Makroadenom nachweisen:

		Regressions koeffizientB	Standardf ehler	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Schritt 1 <sup>a</sup>	Hormon- aktivität	-,461	,723	,407	1	,524	,631
	Alter bei OP	-,009	,022	,184	1	,668	,991
	Geschlecht	-,373	,624	,356	1	,551	,689
	<b>Tumorgroße</b>	1,117	,847	1,739	1	<b>,187</b>	<b>3,056</b>
	Konstante	-2,185	1,990	1,205	1	,272	,112

a. In Schritt 1 eingegebene Variablen: HORMAKT, ALTER1, SEX, GRÖßE.

Tab. 4.10 Binär logistische Regression bezüglich der Rezidivneigung der Primärtumoren

#### 4.11 Charakteristische immunhistochemische Abbildungen

In der Folge sind charakteristische Abbildungen der beschriebenen immunhistochemischen Färbungen dargestellt (lichtmikroskopisch). Dabei sind die entsprechenden Tumorentitäten, die Färbung bzw. das dargestellte Antigen und die verwendete Vergrößerung (50fach bis 400fach) bei jeder Abbildung separat gekennzeichnet.

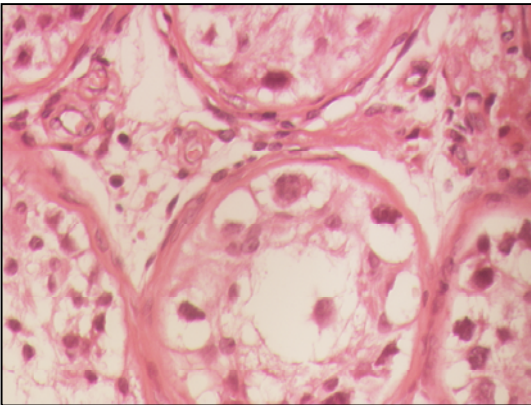


Abb. 4.42: TIN, H. E., 200x

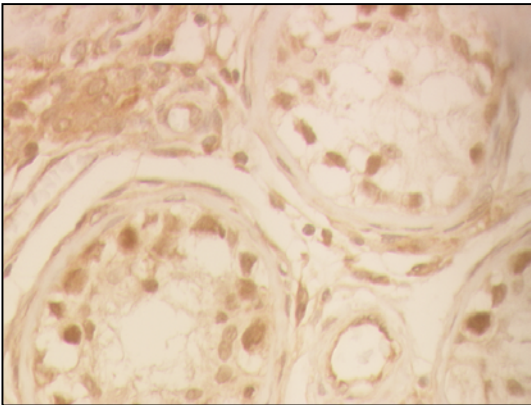


Abb. 4.43: TIN, IGFBP-1, 200x

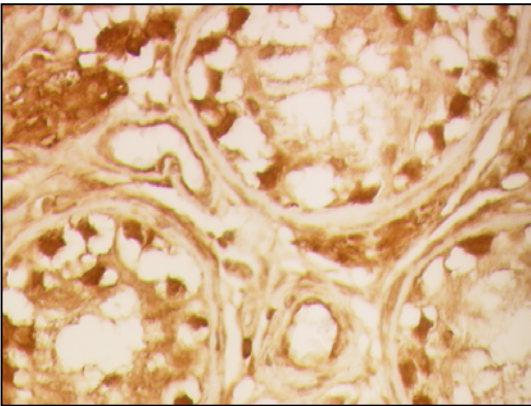


Abb. 4.44: TIN, IGFBP-2, 200x



Abb. 4.45: TIN, IGFBP-3, 200x

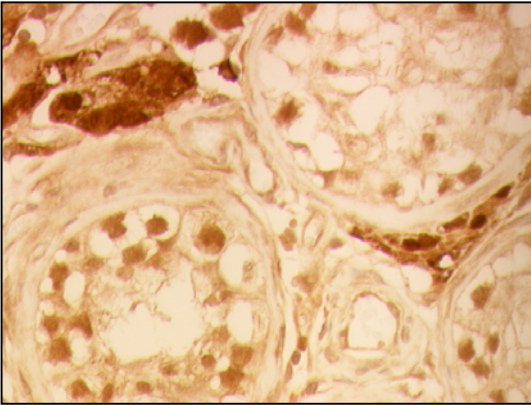


Abb. 4.46: TIN, IGFBP-4, 200x

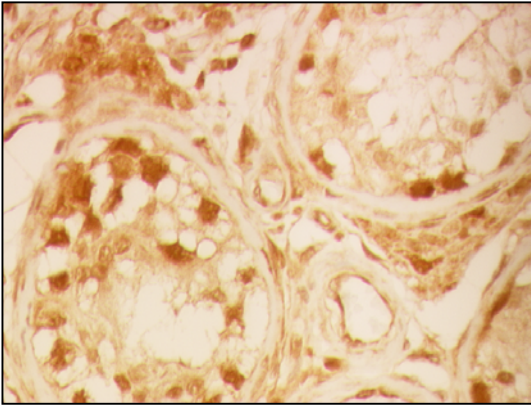


Abb. 4.47: TIN, IGFBP-5, 200x

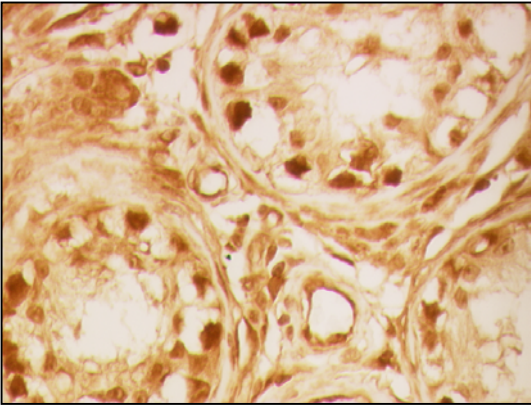


Abb. 4.48: TIN, IGFBP-6, 200x

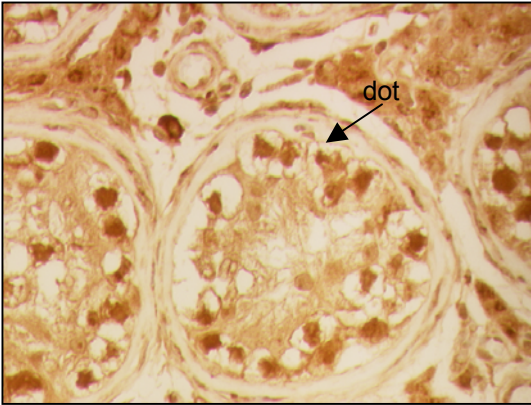


Abb. 4.49: TIN, IGFBP-3, 200x

Abbildungen 4.42 - 4.49: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 in TIN (testikuläre intraepitheliale Neoplasien) (Positivkontrolle)

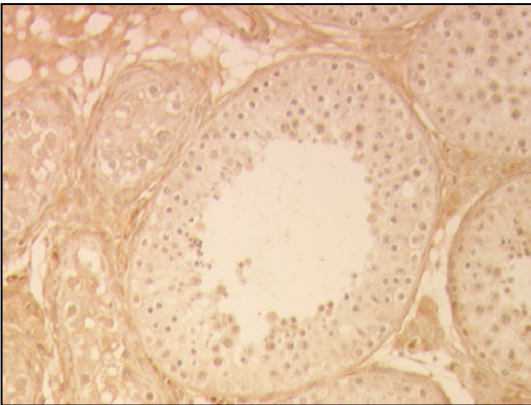


Abb. 4.50: Seminom, IGFBP-1, 100x

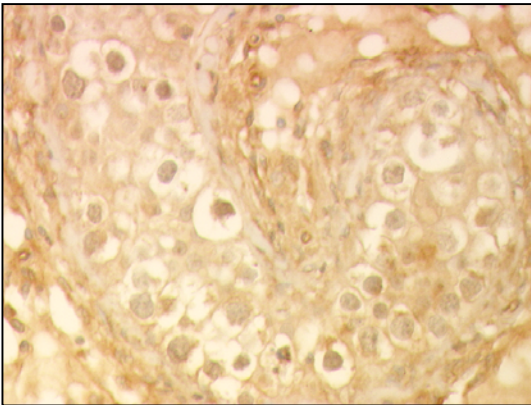


Abb. 4.51: Seminom, IGFBP-1, 200x

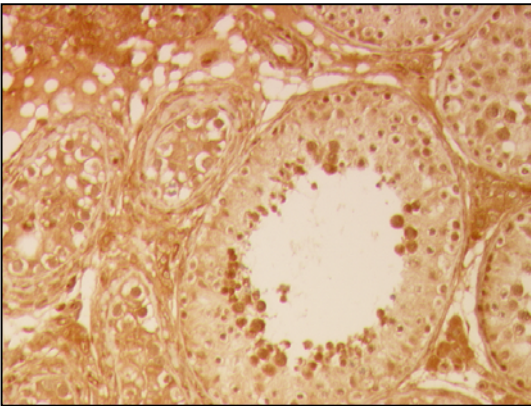


Abb. 4.52: Seminom, IGFBP-2, 100x

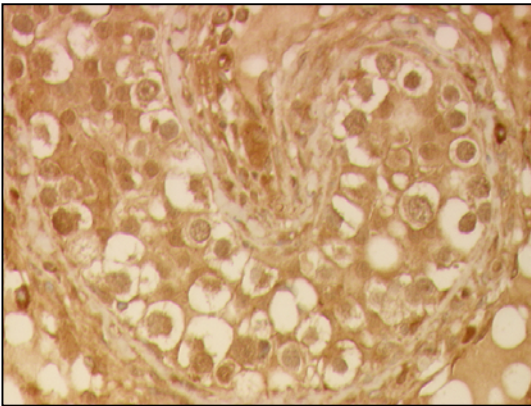


Abb. 4.53: Seminom, IGFBP-2, 200x

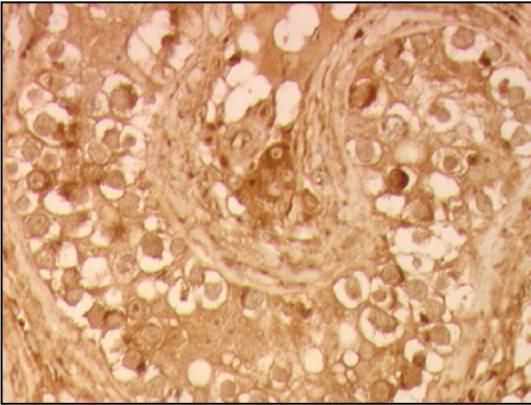


Abb. 4.54: Seminom, IGFBP-3, 200x

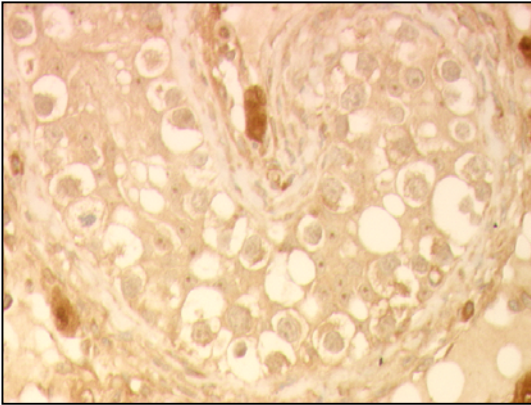


Abb. 4.55: Seminom, IGFBP-4, 200x

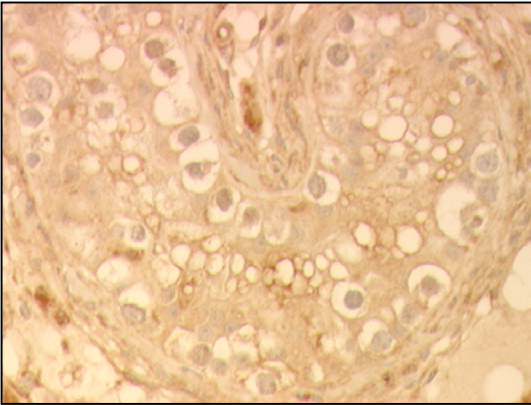


Abb. 4.56: Seminom, IGFBP-5, 200x

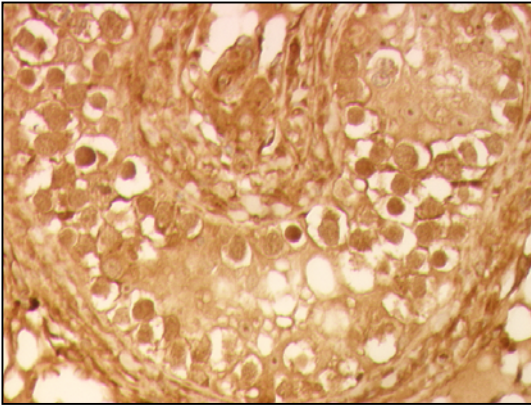


Abb. 4.57: Seminom, IGFBP-6, 200x

Abbildungen 4.50 - 4.57: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 in Seminomen (Positivkontrolle)

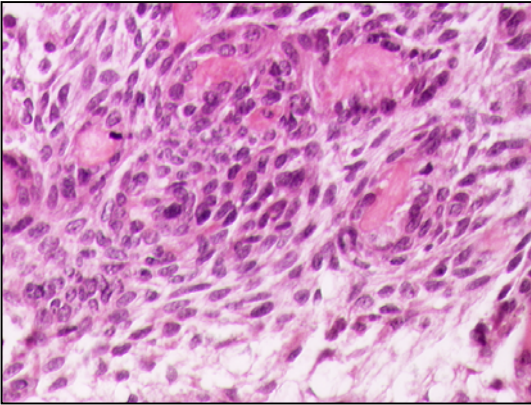


Abb. 4.58: Kraniopharyngeom, H.E., 200x

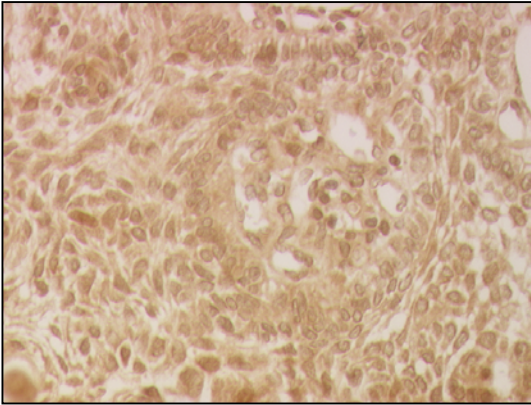


Abb. 4.59: Kraniopharyngeom, IGFBP-1,200x

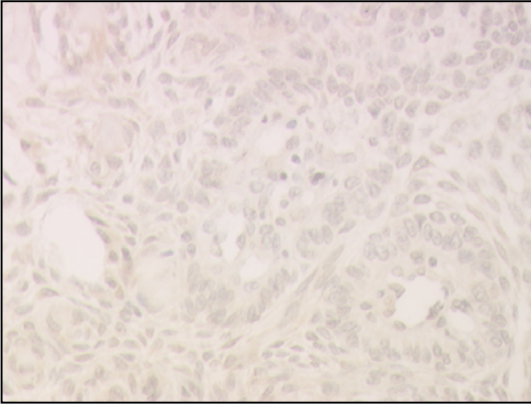


Abb. 4.60: Kraniopharyngeom, IGFBP-2,200x

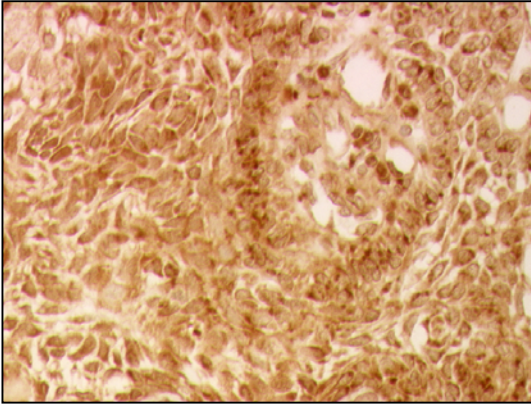


Abb. 4.61: Kraniopharyngeom, IGFBP-3,200x

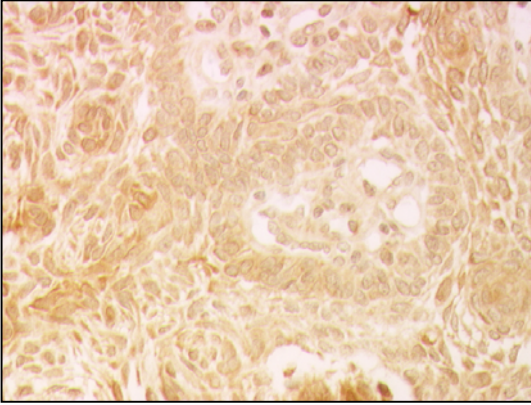


Abb. 4.62: Kraniopharyngeom, IGFBP-4,200x

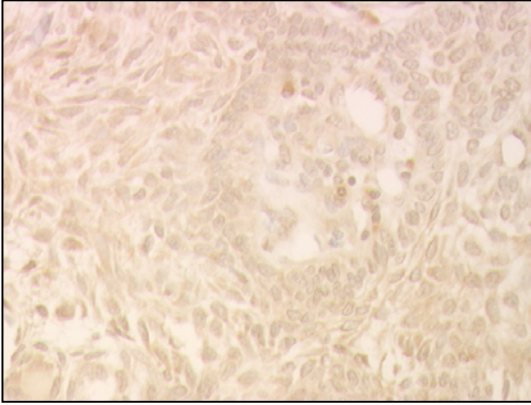


Abb. 4.63: Kraniopharyngeom, IGFBP-5,200x

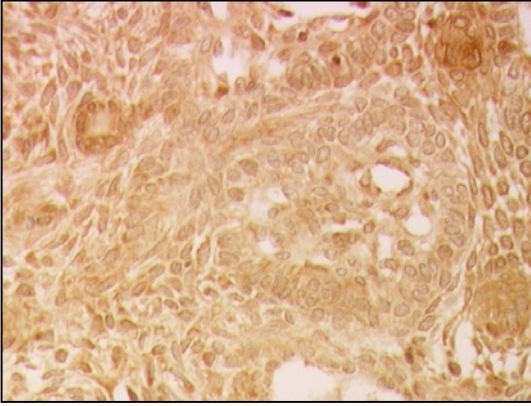


Abb. 4.64: Kraniopharyngeom, IGFBP-6,200x

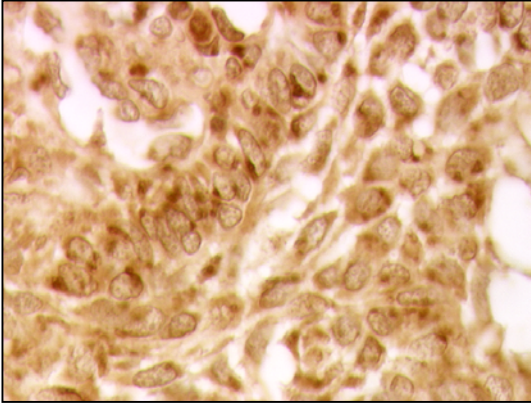


Abb. 4.65: Kraniopharyngeom, IGFBP-3,400x

Abbildungen .4.58 - 4.65: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 in Kraniopharyngeomen (exemplarisch mit dot-like reaction)

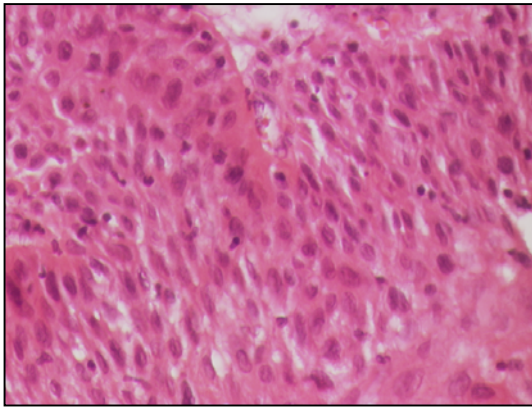


Abb. 4.66: Kraniopharyngeom, H.E., 200x

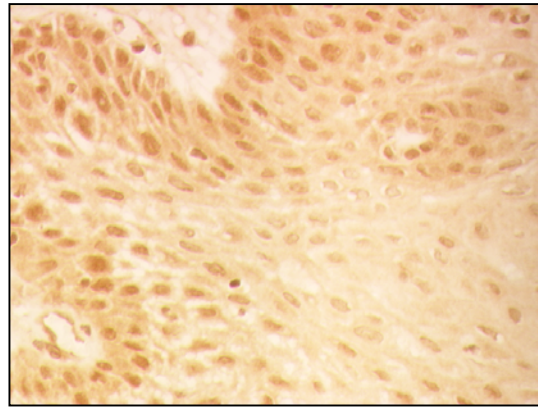


Abb. 4.67: Kraniopharyngeom, IGFBP-1,200x

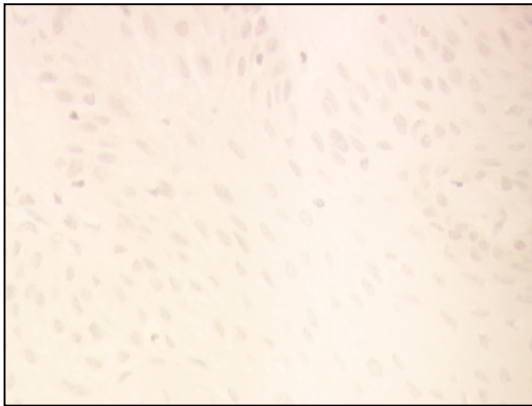


Abb. 4.68: Kraniopharyngeom, IGFBP-2,200x

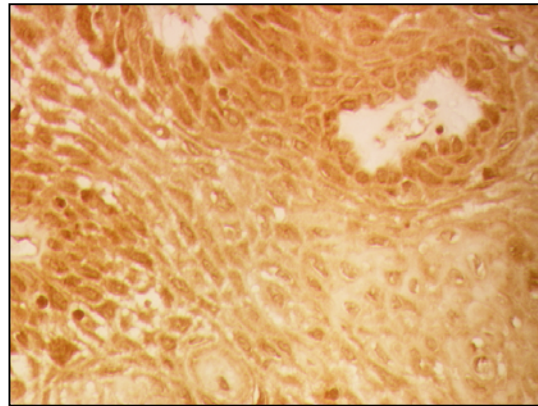


Abb. 4.69: Kraniopharyngeom, IGFBP-3,200x

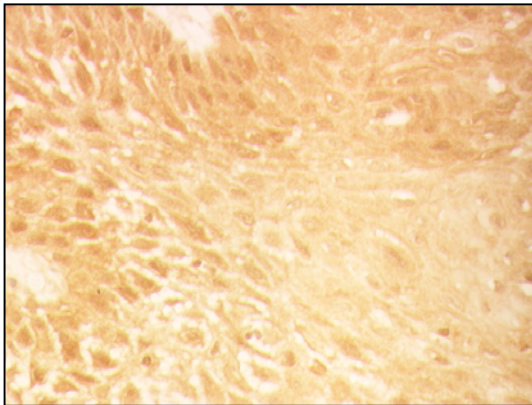


Abb. 4.70: Kraniopharyngeom, IGFBP-4,200x

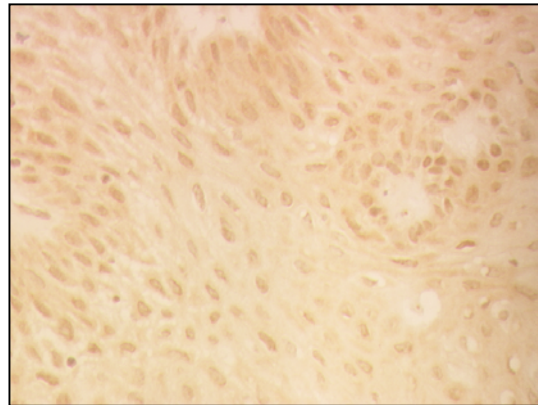


Abb. 4.71: Kraniopharyngeom, IGFBP-5,200x

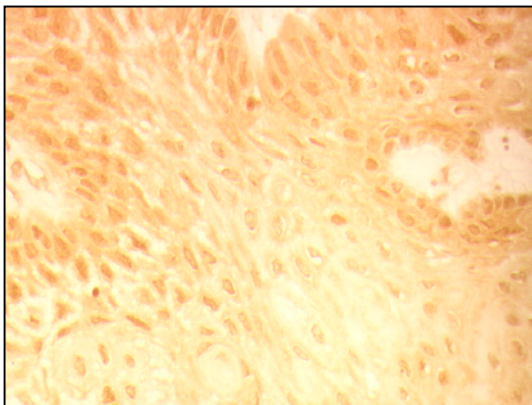


Abb. 4.72: Kraniopharyngeom, IGFBP-6,200x

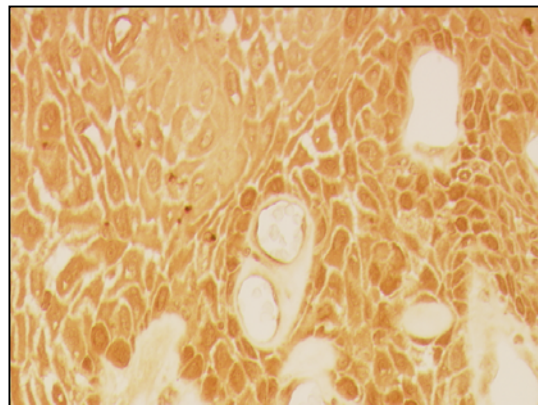


Abb. 4.73: Kraniopharyngeom, IGFBP-3,200x

Abbildungen 4.66 - 4.73: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 in Kraniopharyngeomen

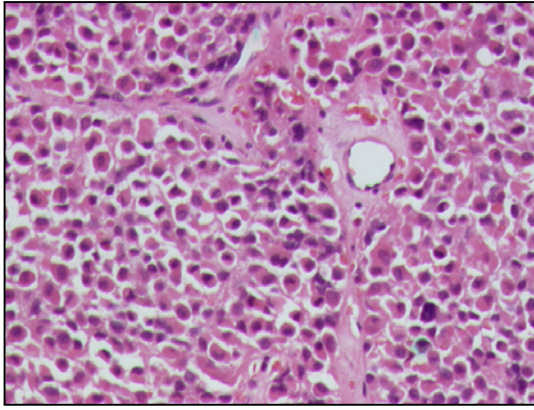


Abb. 4.74: Hyp. ad., H.E., 100x

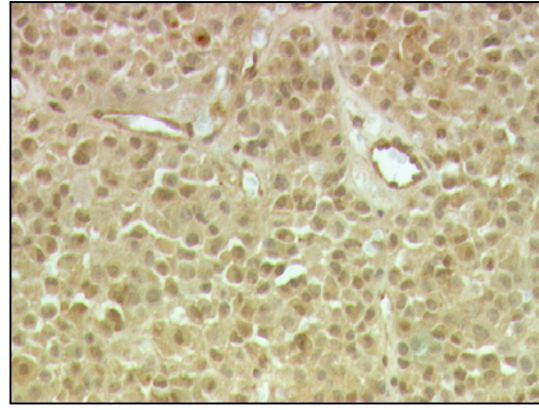


Abb. 4.75: Hyp. ad., IGFBP-1, 100x

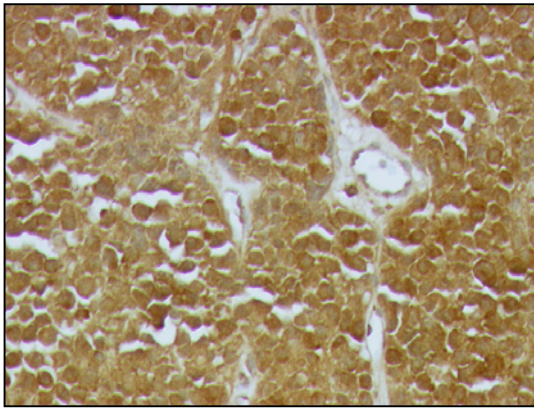


Abb. 4.76: Hyp. ad., IGFBP-2, 100x

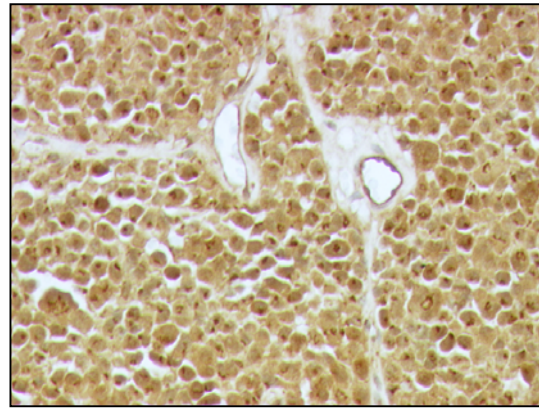


Abb. 4.77: Hyp. ad., IGFBP-3, 100x

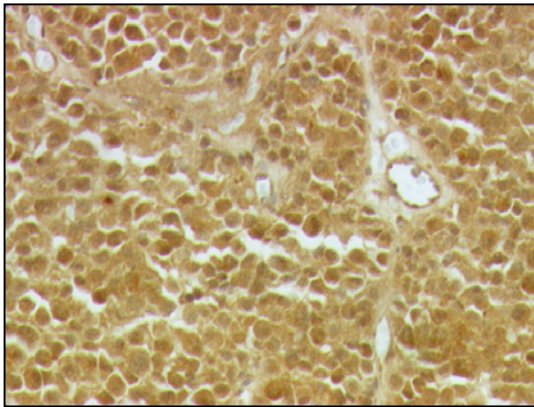


Abb. 4.78: Hyp. ad., IGFBP-4, 100x

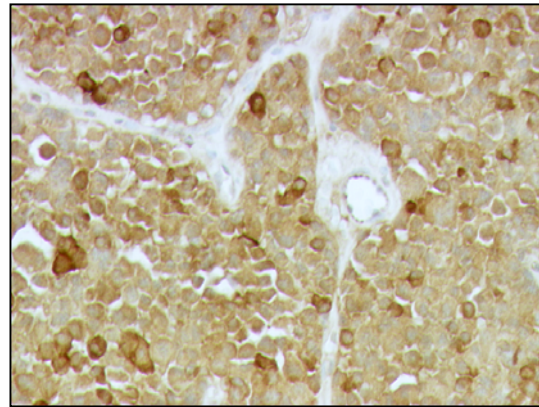


Abb. 4.79: Hyp. ad, IGFBP-5, 100x

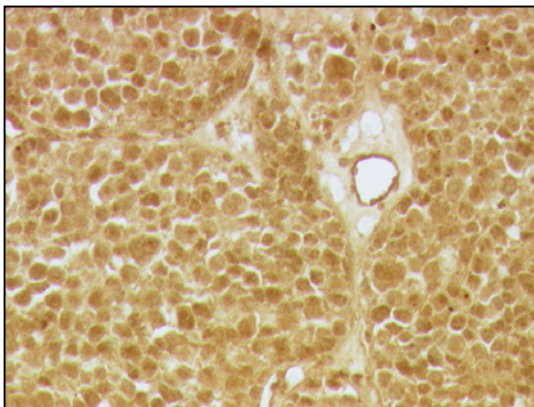


Abb. 4.80: Hyp. ad., IGFBP-6, 100x

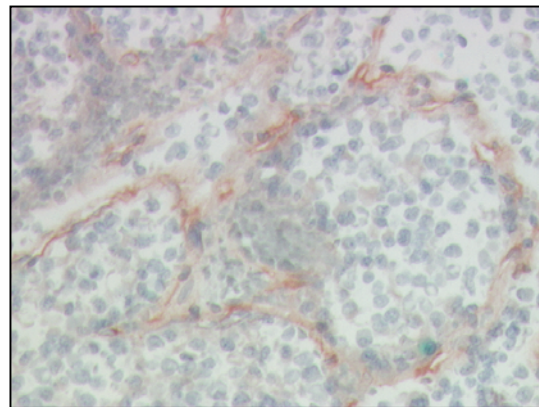


Abb. 4.81: Hyp. ad., Prolaktin, 100x

Abb. 4.74 - 4.81: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 und Prolaktin in einem Hypophysenadenom (eosinophil, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression)



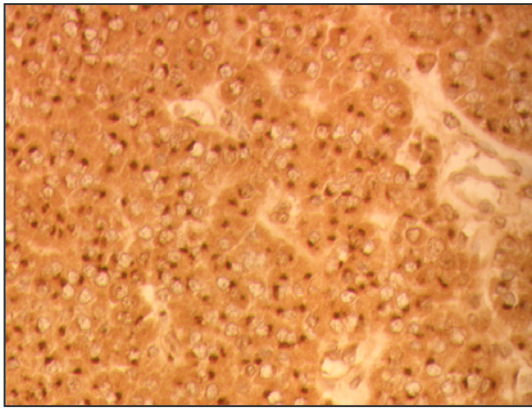


Abb. 4.82: Hyp.ad. (chromophob, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-3 200x

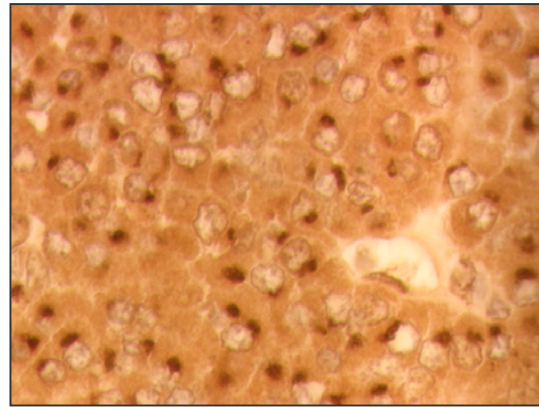


Abb. 4.83: Hyp.ad. (chromophob, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-3 400x

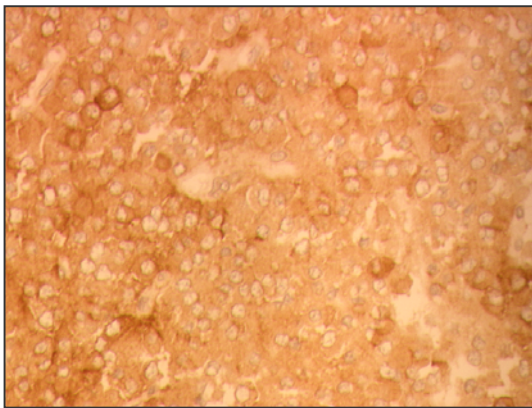


Abb. 4.84: Hyp.ad. (chromophob, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-5 200x

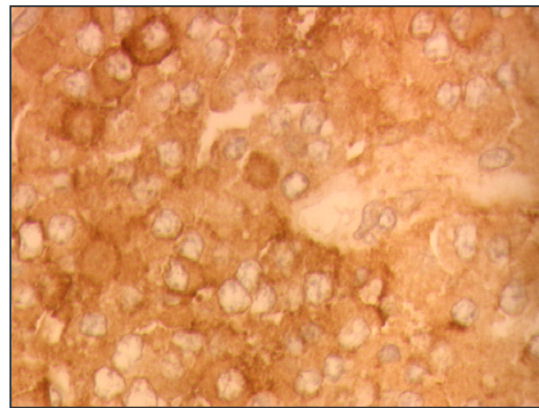


Abb. 4.85: Hyp.ad. (chromophob, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-5 400x

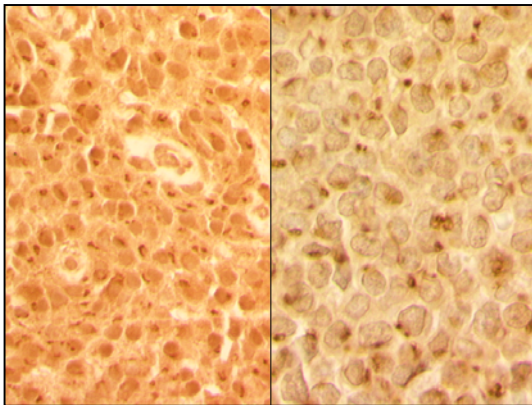


Abb. 4.86: Hyp.ad., IGFBP-3, 200x, 400x

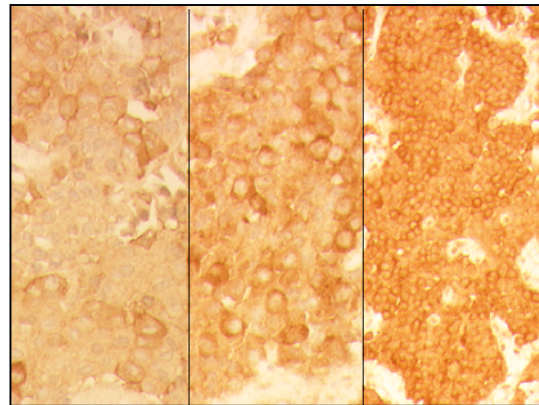


Abb. 4.87: Hyp.ad., IGFBP-5, 200x, 200x, 100x

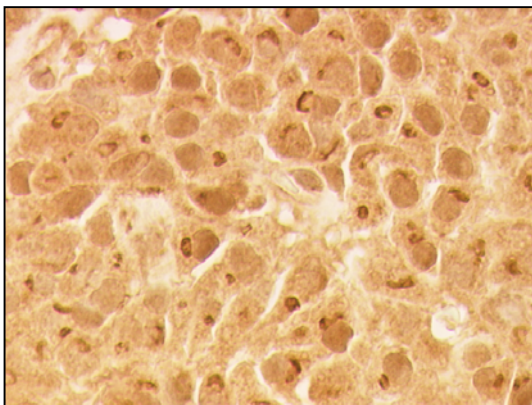


Abb. 4.88: Hyp.ad. (eosinophil, mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-3 400x

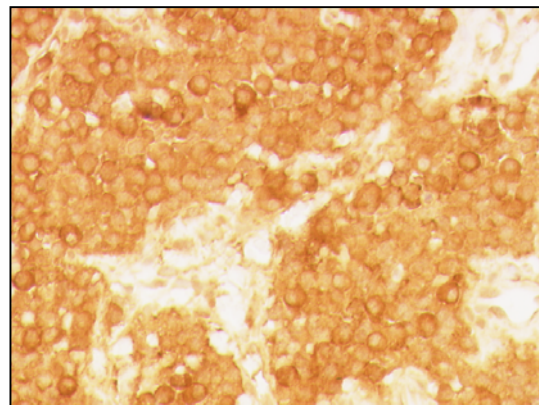


Abb. 4.89: Hyp.ad. (eosinophil, klein- mittelgroßzellig, keine histolog. Prolaktinexpression) IGFBP-5 200x

Abb. 4.82 - 4.89: Anfärbung von IGFBP-3 und -5 in Hypophysenadenomen

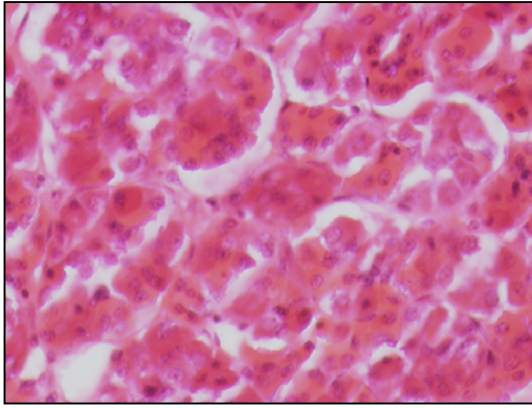


Abb. 4.90: Adenohypophyse, H.E., 200x

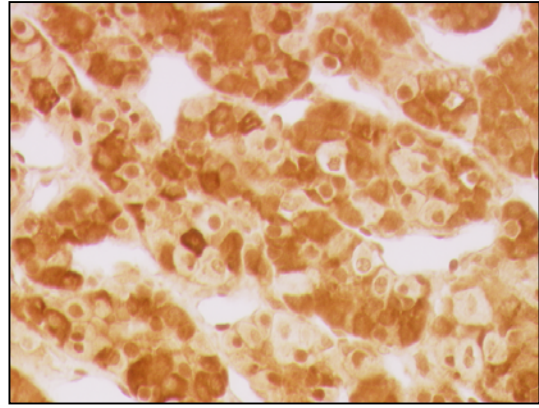


Abb. 4.91: Adenohypophyse, IGFBP-1, 200x

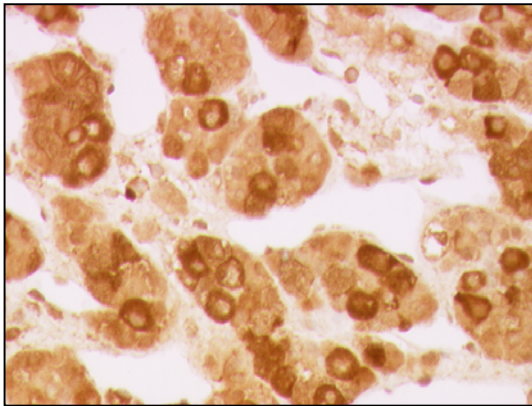


Abb. 4.92: Adenohypophyse, IGFBP-2, 200x

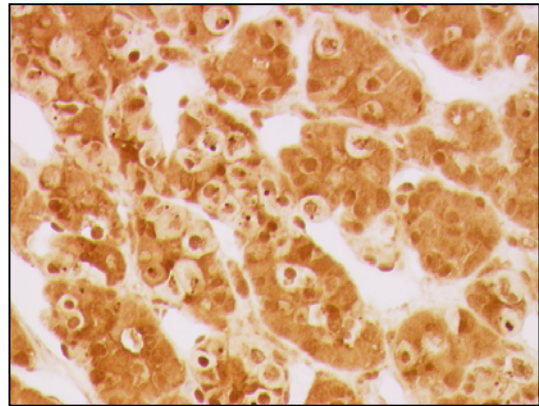


Abb. 4.93: Adenohypophyse, IGFBP-3, 200x

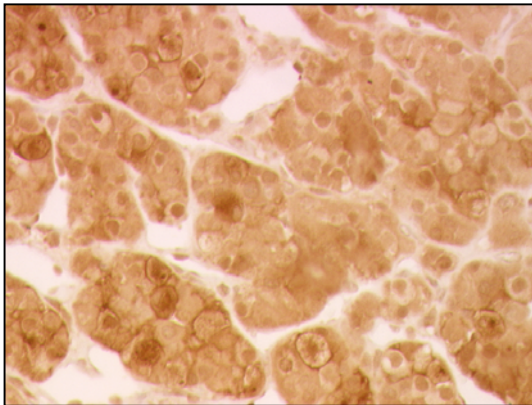


Abb. 4.94: Adenohypophyse, IGFBP-4, 200x

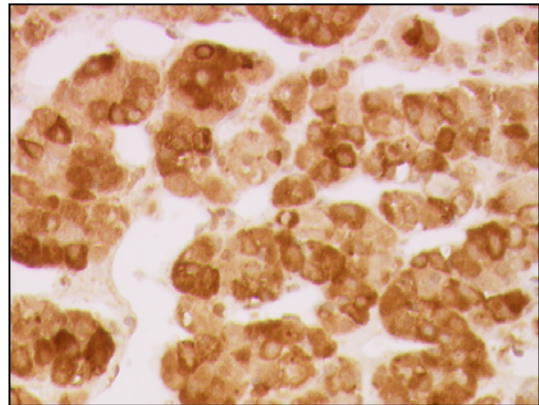


Abb. 4.95: Adenohypophyse, IGFBP-5, 200x

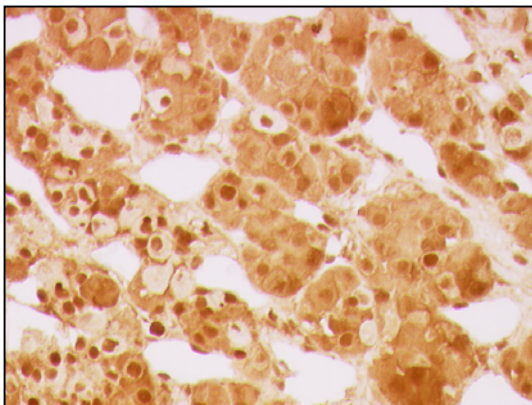


Abb. 4.96: Adenohypophyse, IGFBP-6, 200x

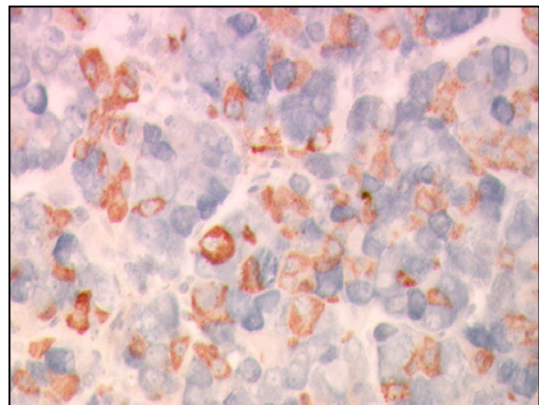


Abb. 4.97: Adenohypophyse, Prolaktin, 200x

Abbildungen 4.90 - 4.97: Anfärbung von IGFBP-1 bis -6 und Prolaktin in normaler Adenohypophyse

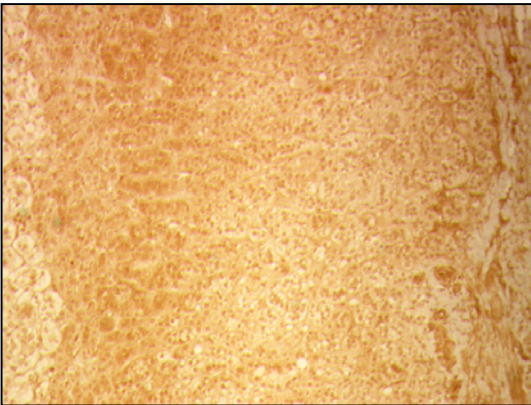


Abb. 4.98: Nebennierenrinde, IGFBP-1, 50x

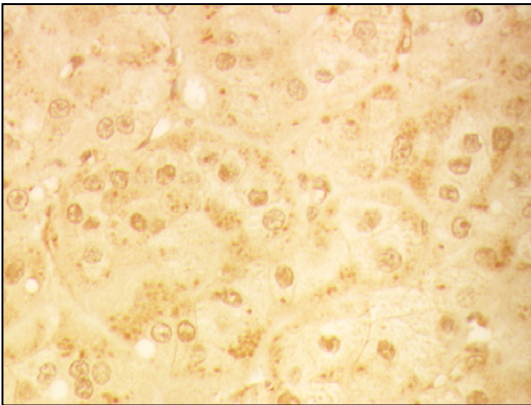


Abb. 4.99: NNR-Adenom, IGFBP-1, 200x

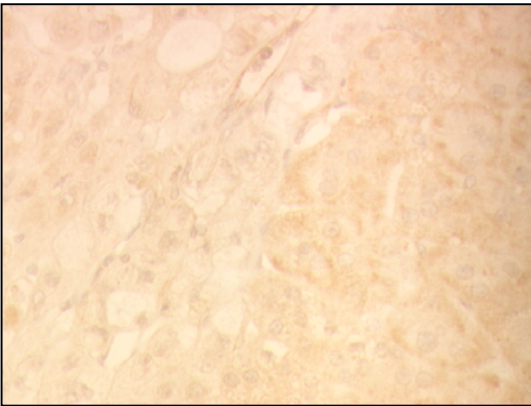


Abb. 4.100: NNR-Adenom, IGFBP-2, 200x

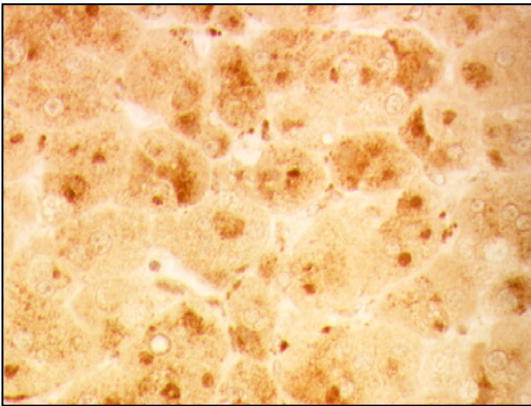


Abb. 4.101: NNR-Adenom, IGFBP-3, 200x

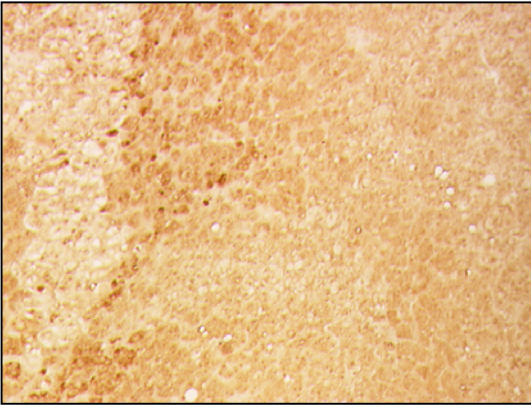


Abb. 4.102: Nebennierenrinde, IGFBP-3, 50x

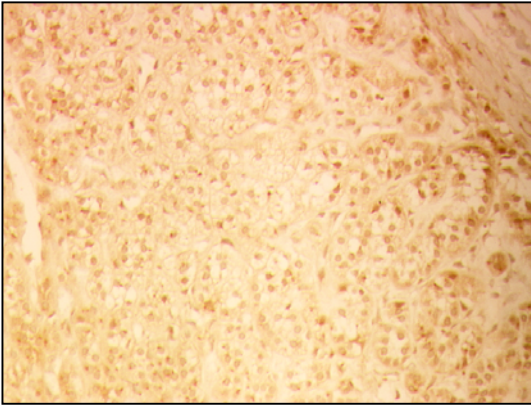


Abb. 4.103: NNR, IGFBP-3, 100x

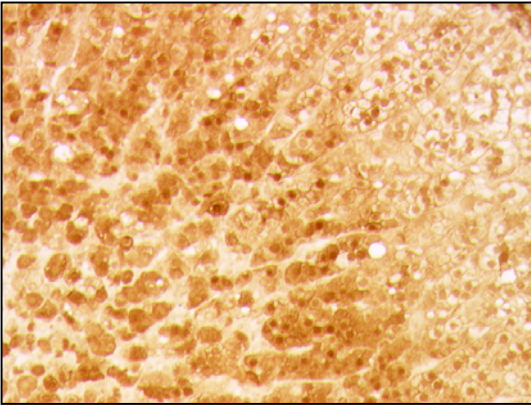


Abb. 4.104: NNR, IGFBP-4, 100x

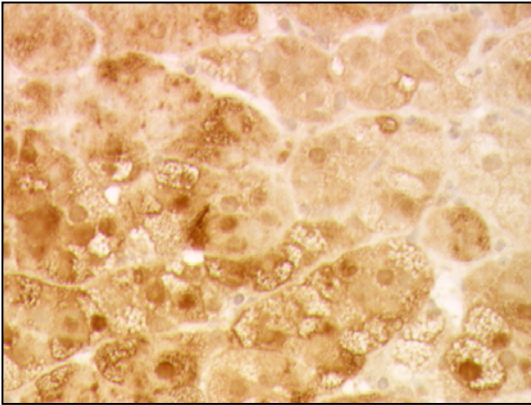


Abb. 4.105: NNR-Adenom, IGFBP-4, 200x

Abbildungen .4.98 - 4.105: Anfärbung einiger IGFBP in Nebennierenrindenadenomen und normaler NNR

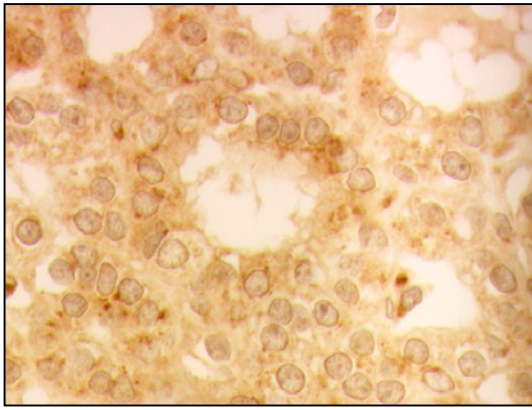


Abb. 4.106: NSD-Adenom, IGFBP-3, 400x

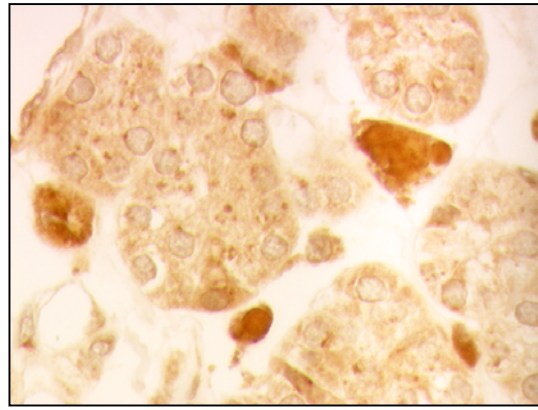


Abb. 4.107: NSD-Adenom, IGFBP-3, 400x

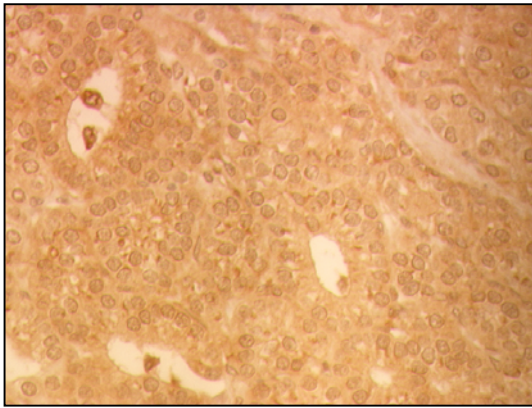


Abb. 4.108: NSD-Adenom, IGFBP-4, 200x

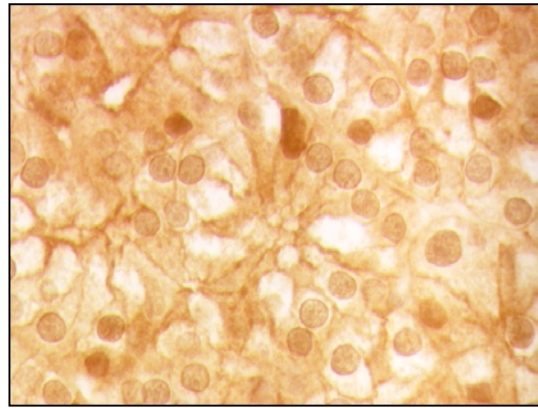


Abb. 4.109: NSD-Adenom, IGFBP-4, 400x

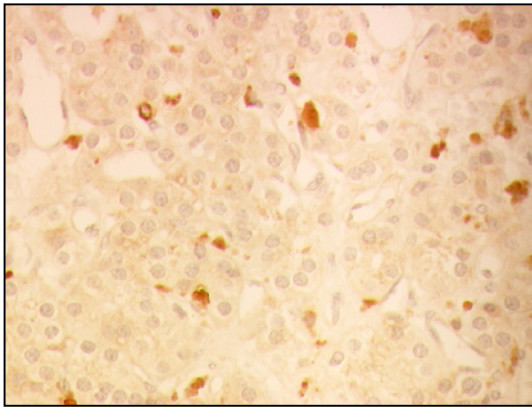


Abb. 4.110: NSD-Adenom, IGFBP-5, 200x

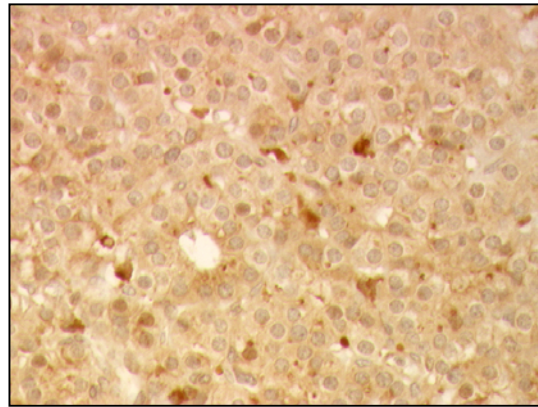


Abb. 4.111: NSD-Adenom, IGFBP-6, 200x

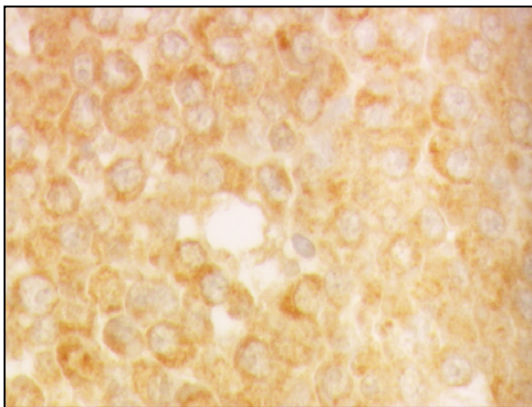


Abb. 4.112: Plasmozytom, IGFBP-3, 400x

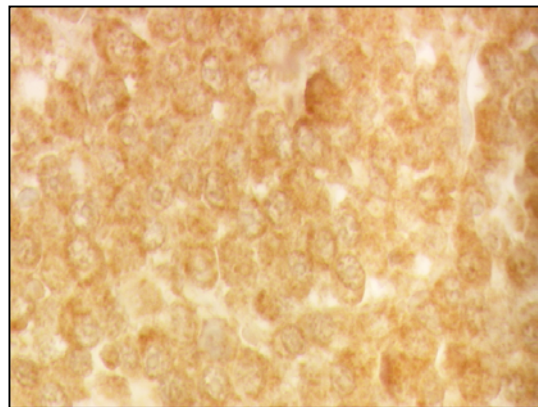


Abb. 4.113: Plasmozytom, IGFBP-5, 400x

Abbildungen 4.106 - 4.113: Anfärbung einiger IGFBP (exemplarisch) in Nebenschilddrüsenadenomen und Plasmozytomen

## **5. Diskussion**

### **5.1 Studienpopulation**

Im wesentlichen entspricht die untersuchte Population in ihren Eigenschaften den in der Literatur beschriebenen Charakteristika für Hypophysentumoren und scheint deshalb - soweit das bei einer retrospektiven Fallzusammenstellung möglich ist - repräsentativ zu sein.

Bei den Hypophysenadenomen war vor allem bei transssphenoidaler Operation mit Gewebsalterationen zu rechnen, bei den Kraniopharyngeomen hingegen wurde der zum Teil nur sehr geringe Anteil an vitalem und damit anfärbbarem Gewebe in vielen Fällen zum Ausschlusskriterium. Trotz eindeutiger Klassifikation als Kraniopharyngeom durch zystischen Aufbau und zum Beispiel Nachweis von Cholesterinkristallen konnten viele Fälle nicht eingeschlossen werden, so dass trotz Rückverfolgen der Daten bis ins Jahr 1971 von ursprünglich 37 Patienten nur 14 auswertbare Fälle rekrutiert werden konnten. Die geringe Fallzahl bei den Kraniopharyngeomen muss bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden.

Im direkten Vergleich zeigt sich eine deutliche Tendenz zum zeitlich früheren Auftreten von Kraniopharyngeomen bezogen auf die Hypophysenadenome dieser Population, was sich mit den Altersverteilungen in der Literatur deckt (Asa, 1998; Melmed, 1995). Für die Kraniopharyngeome ergab sich eine eher gleichmäßige Altersverteilung mit einer Spannbreite von 6 bis 60 Jahren. Das in der Literatur beschriebene gehäufte Auftreten von Kraniopharyngeomen in Kindheit und Adoleszenz ließ sich wahrscheinlich durch die geringere Fallzahl in dieser Studie nicht bestätigen, andererseits wird aber auch beschrieben, dass Kraniopharyngeome in jedem Lebensalter auftreten können (Melmed, 1995).

Bei den Hypophysenadenomen und Kraniopharyngeomen ergibt sich in unserer Population eine leichte Tendenz zum männlichen Geschlecht. Auch in der Literatur wird für Kraniopharyngeome je nach Quelle zum Teil eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts (Asa, 1998) beschrieben oder aber abgelehnt (Lafferty, Chrousos, 1999; Van Effenterre, Boch, 2002; Müller et al., 2003). Bei den Hypophysenadenomen ist im allgemeinen kein Geschlechtsunterschied bekannt. Im Jugendlichenalter scheinen Mädchen etwas häufiger betroffen zu sein (Asa, 1998).

## 5.2 Histologische und klinische Aspekte der Hypophysentumoren

### 5.2.1 Kraniopharyngeome

Bei den Kraniopharyngeomen lag histologisch in 46 Prozent ein adamantinöser Typ und in 9 Prozent ein papillärer Typ vor, die restlichen Tumoren waren aufgrund der histologischen Beurteilung nicht eindeutig zuzuordnen. Diese zwei Subtypen von Kraniopharyngeomen weisen fließende Übergänge auf: Im Kindesalter überwiegt der adamantinöse, im Erwachsenenalter der papilläre histologische Typ (Saeger et al., 2001; Müller et al., 2003). Tena-Suck et al. (2006) beschreiben in ihrer Studienpopulation ein Verhältnis von 89 Prozent adamantinösen zu 11 Prozent papillären Kraniopharyngeomen.

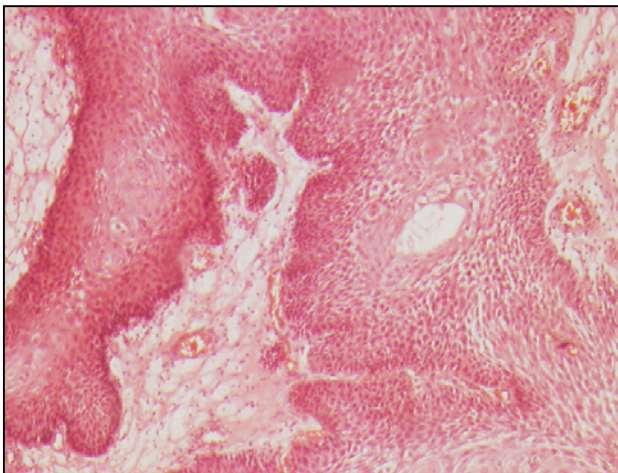


Abb.5.1 Adamantinöses Kraniopharyngeom, H.E., 50x

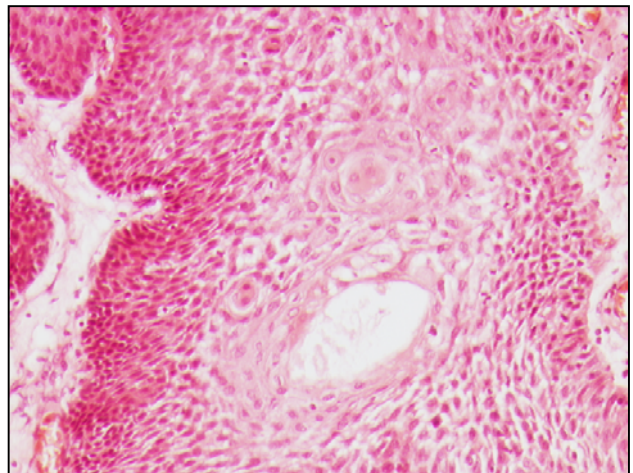


Abb.5.2 Adamantinöses Kraniopharyngeom, H.E., 100x

Das adamantinöse Kraniopharyngeom ist größtenteils zystisch aufgebaut. Der Zysteninhalt ist ölartig und mit Cholesterinkristallen behaftet, zudem sind in der Wand oft Verkalkungen nachweisbar. Histologisch zeigen sich girlandenartige, solide oder trabekuläre Komplexe geschichteten Plattenepithels mit palisadenartiger Basalschicht (Saeger, 2003<sup>b</sup>), die in einem lockeren fibrösen Stroma mit intervenierenden Zysten eingebettet sind (Asa, 1998). Das apikale Epithel zeigt oft irreguläre Keratosen. Regressive Veränderungen sind besonders in zystischen Kraniopharyngeomen deutlich ausgeprägt; dann ist das eigentliche Tumorgewebe kaum zu erkennen. In diesem Fall können immunhistologische Keratinnachweise die Diagnose stützen. Immunhistochemisch exprimiert das papilläre Kraniopharyngeom niedrigmolekulare Keratine, das adamantinöse Kraniopharyngeom vornehmlich hochmolekulare Keratine (Saeger, 2003<sup>b</sup>).

Das papilläre Kraniopharyngeom wächst ausschließlich suprasellär und ist weitgehend frei von regressiven Veränderungen. Typisch sind papilläre Komplexe stachelzelliger Plattenepithels ohne Palisaden oder Verhornungen. Kraniopharyngeome können mikroskopisch irreguläre Grenzen aufweisen (Asa, 1998). In der Studie von Van Effenterre und Boch (2002) lag in 67 Prozent der Fälle ein invasiv wachsender Tumor vor.

Bei den 11 untersuchten Primärtumoren der Kraniopharyngeome war die Raumforderung in allen Fällen die dominierende Symptomatik, einmal begleitet von einer Hypophyseninsuffizienz (hypophysärer Kleinwuchs). Entsprechend werden in Arbeiten von Pedreira et al. (2006), Müller et al. (2003) oder Kim et al. (2001) als vorherrschende Beschwerden unspezifische Symptome einer intrakraniellen Drucksteigerung genannt, darunter Kopfschmerzen, Sehstörungen (62-84 Prozent) und endokrine Ausfälle (52-87 Prozent), vor allem GH (75 Prozent), Gonadotropine (40 Prozent), ACTH (25 Prozent), TSH (25 Prozent). Bis zu 80 Prozent der Kinder haben zum Zeitpunkt der Diagnose eine endokrine Dysfunktion (Lafferty, Chrousos, 1999). Auffällig sind häufig zu beobachtende lange Anamnesezeiten, die nach Van Effenterre und Boch (2002) im Mittel bei 27 Monaten liegen; die endokrinologischen Probleme werden von den Patienten lange toleriert.

Das Outcome ist für die untersuchten Kraniopharyngeome aufgrund der Fallzahlen schwer zu verallgemeinern und wird bei den vorliegenden Fällen vor allem durch Revisions-Operationen bzw. Rezidivtumoren bestimmt. Aus den vorliegenden Krankengeschichten war keine Angabe zur prä- oder postoperativen Hormonachse des Patienten zu erheben. In der Regel bestehen unabhängig vom Grad der Resektion postoperativ in 85-95 Prozent multiple hypothalamisch-hypophysäre Ausfälle bis hin zum Panhypopituitarismus. Oft kommt es zu einem postoperativ nicht-reversiblen Diabetes insipidus oder Wachstumshormonmangel (Müller et al., 2003).

### **5.2.2 Hypophysenadenome**

Auf die histologische Subklassifikation der Hypophysenadenome bezogen, zeigte sich, wie aus der Literatur zu erwarten, bei unseren Fällen kein Zusammenhang zum Prolaktinnachweis (Asa, 1998). Die histologische Unterteilung in chromophob, azido-

phil und basophil korreliert nicht mit der sekretorischen Aktivität (Horvath, Kovacs, 1995). Die aktuell verwendete Subklassifikation nach WHO richtet sich nach besonderen Strukturcharakteristika und nichtimmunhistologischen Färbeverfahren: GH-Zell- (gering oder dicht granuliert), Prolaktinzell- (meistens gering, selten dicht granuliert), ACTH-Zell- (gering oder dicht granuliert), Crooke-Zell-, TSH-Zell- und FSH-/ LH-Zell-Adenome sowie bihormonale GH-/ Prolaktin-Zell-Adenome, mammosomatotrope, azidophile Stammzelladenome, endokrin inaktive Nullzelladenome und onkozytäre Adenome und plurihormonale Adenome (Petersenn et al., 2006; Saeger, 2003<sup>b</sup>, Asa, 1998). Das Wachstumsmuster der Hypophysenadenome ist meistens diffus oder sinusoidal, seltener papillär, trabekulär oder mit Pseudorosetten. Der Kapillargehalt ist geringer als in der normalen Hypophyse (Saeger, 2003<sup>b</sup>).

Bezogen auf die histologische Prolaktinexpression traten die Prolaktinome in unserer Studienpopulation signifikant in einem früheren Lebensalter auf. Entsprechend wird beschrieben, dass die meisten Prolaktinome im Jugendalter auftreten. Prolaktinome sind die häufigsten hypophysären Tumoren und treten bevorzugt bei Frauen zwischen 20 und 50 Jahren auf (Geschlechtsverhältnis 10:1). In der pädiatrisch-adoleszenten Patientengruppe haben Prolaktinome eine Prävalenz von 100 auf 1 Million (Ciccarelli, Daly, Beckers, 2005). Sie stellen circa 25 Prozent der operierten Hypophysenadenome und an die 50 Prozent der Hypophysenadenome in Autopsien. Die niedrigere Prävalenz in chirurgischem Material könnte durch die erfolgreiche Behandlung mit Dopamin-Agonisten bedingt sein, die heute oft der chirurgischen Therapie vorangestellt wird (Asa, 1998). Die Serum-Konzentration von Prolaktin korreliert mit der Tumorgröße.

Bei den untersuchten Hypophysenadenomen zeigten 55 Prozent (der Primärtumoren) die Symptomatik einer Raumforderung, 36 Prozent einen hormonalen Exzess, 5 Prozent eine Hypophyseninsuffizienz und nur 2 Prozent waren zum Operationszeitpunkt asymptomatisch. Dabei kamen durchaus auch Mischbilder der Symptomatik vor.

Dies entspricht den hauptsächlichen Symptomen in der Literatur: Es überwiegen Raumforderung und hormonaler Exzess (Kim et al., 2001). Hingegen beschreiben Stoffel-Wagner et al. in einer Arbeit von 1997 endokrinologische Probleme als die häufigsten Erstsymptome. Danach folgen Gesichtsfeldausfälle, Symptome der Akromegalie und Kopfschmerzen. Bei hormonaktiven Tumoren mit Hypersekretion eines



einzelnen Hormons waren die entsprechenden hormonabhängigen Symptome auch die häufigsten Erstsymptome, bei endokrin inaktiven Tumoren tritt häufig eine Begleithyperprolaktinämie auf (39 Prozent der Frauen, 12,8 Prozent der Männer). Etwa 25 Prozent der Hypophysenadenome zeigen klinisch oder laborchemisch keine erhöhte Hormonproduktion. Die meisten Patienten haben Makroadenome mit signifikanter suprasellärer Ausdehnung und präsentieren sich mit Verdrängungssymptomen oder einer Hypophyseninsuffizienz (Asa, 1998).

Auch bei den Hypophysenadenomen ist interessanterweise der Zeitraum zwischen Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung eher lang (Frauen - Median 3 Jahre; Männer - 2,3 Jahre).

Die in unserem Kollektiv bestehende postoperative Hormoninsuffizienz (45 Prozent) ist eine typische Komplikation. In einem weltweiten Review von Ross und Wilson (1988) mit 214 Patienten mit transsphenoidaler Operation bei einem GH-produzierenden Hypophysenadenom war in etwa 50 Prozent eine Heilung zu verzeichnen, als signifikante Komplikationen traten eine perioperative Hypophysenunterfunktion bei 5 Prozent oder eine Liquor-Leckage bei 2 bis 3 Prozent der Patienten auf.

### **5.3 Bedeutung von IGF in der Karzinogenese**

IGF verstärkt sowohl mitogene als auch antiapoptotische Effekte auf verschiedene Krebszellen. Es wirkt synergistisch mit anderen mitogenen Wachstumsfaktoren und Steroiden und antagonisiert antiproliferative Moleküle. In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass erhöhte Spiegel von IGF-1 und niedrigere Spiegel von IGFBP-3 mit einem erhöhten Risiko für einige Karzinome (Brust-, Prostata-, kolorektales und Bronchial-Karzinom) assoziiert sind (Fürstenberger, Senn, 2002; Grimberg, Cohen, 2000; Hankinson et al., 1998). Interessant erscheint, dass sowohl Brust als auch Prostata Steroid-abhängige Gewebe sind. IGF-I scheint hier zusätzlich lokale Wachstumsfaktoren zu potenzieren (Holly, 1998). Fraglich bleibt nach wie vor der zeitliche Zusammenhang zwischen einem erhöhten IGF-I und dem erhöhten Krebsrisiko (Giovannucci, 1999).

Neue Studien zeigen, dass es in den meisten Karzinomen zu einer Dysregulation des IGF-I-Rezeptor-Stoffwechselwegs kommt, welche eng mit verstärkter Tumorphores-

sion und Metastasierung assoziiert zu sein scheint. Dabei zeigt sich eine Kreuzverbindung auf verschiedenen Ebenen zwischen verschiedenen Komponenten des IGF-I- mit dem TGF- $\beta$ -Signalweg (Danielpour, Song, 2006).

IGF-I kann Apoptose verhindern, IGFBP-3 hingegen scheint auch IGF-I-unabhängig eine Apoptose fördern zu können. Die Balance in diesem System könnte so etwas wie eine Überlebensschwelle bilden, zum Beispiel verschiebt Tamoxifen im IGF-System das Verhältnis zwischen IGF-I und IGFBP-3 (Holly, 1998). Zudem verringert Tamoxifen als etablierte Therapieoption die Konzentration an zirkulierendem IGF-I (Hankinson et al., 1998). Man nimmt an, dass eine Vielzahl der in der Krebstherapie verwendeten Anti-Östrogene über das IGF-System wirken (Strange et al., 2002).

Eventuell muss man also das Verhältnis von IGF-I zu IGFBP-3 als den eigentlich wirksamen Faktor berücksichtigen, vielleicht ist auch die Rolle von IGF-II in diesem Zusammenhang zu wenig untersucht. IGF-II wird in vielen Tumorarten exprimiert und wurde zum Beispiel für Brustkrebs-Zelllinien als mitogen erkannt. Dabei basiert die Stimulation des Tumorwachstums auf der Aktivierung des IGF-I-Rezeptors, da der IGF-II-Rezeptor keine mitogene Wirkung entfaltet (Yokoyama et al., 1998; Ali et al., 2003). Vielleicht hebt der Effekt von IGF-II in einigen Situationen die schützende Wirkung des IGFBP-3 auf.

#### **5.4 Hypophysentumoren und die IGF-Achse**

IGF werden in den meisten Geweben mit unterschiedlicher Ausprägung abhängig vom Zelltyp und dem Lebensalter produziert, so auch in der Hypophyse.

Zirkulierendes IGF-I wirkt als negativer Regulator der hypophysären GH-Produktion. GH-Spiegel scheinen mit der hypophysären Tumogröße und einer suprasellären Ausdehnung zu korrelieren (Asa, 1998). Die Akromegalie wird durch eine chronische GH-Hypersekretion gekennzeichnet. Da die GH-Sekretion pulsatil erfolgt, wird als Serummarker meist IGF-I verwendet, dessen Serumspiegel relativ konstant ist. Bei Akromegalie-Patienten waren die Werte für IGF-I (Zapf, 1997), ALS (*acid labile subunit*) und IGFBP-3 im Serum signifikant erhöht und für IGFBP-1 signifikant erniedrigt, IGFBP-2 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Bis auf GH selbst korrelierte keiner der Parameter signifikant mit der Größe des Adenoms. Dabei war jedoch

weiterhin IGF-I der sensitivste Marker (Arosio et al., 2001). Eine Normalisierung der IGF-I-Spiegel ist mit Symptombefreiheit und einer normalen Lebenserwartung assoziiert (Brabant, 2003).

Der hypophysäre IGF-II-Rezeptor scheint keine Rolle bei der Regulation des GH-Gens zu spielen, ist aber an der Verteilung von IGF-II und IGF-II-vermittelten Funktionen beteiligt. Im Vorderlappen der menschlichen Hypophyse konnten durch Radioimmunoassay große Mengen an IGF-II nachgewiesen werden (Yokoyama et al., 1998). Vorliegende Studien zur Familie der IGF beschäftigen sich vornehmlich mit der Verteilung von IGF-II und dem IGF-II-R, die bei der Ratte und auch in Kulturen menschlicher Adenomzellen nachgewiesen werden konnten. IGF-II hemmt in vitro die GH-Freisetzung (Ocrant et al., 1989; Yokoyama et al., 1998). Eine Fallbeschreibung eines rasch wachsenden ACTH-Zell-Adenom-Rezidivs zeigte eine signifikante Erhöhung der IGF-II-mRNA (Hashimoto et al., 2000). IGF-II-mRNA ist mit variabler Intensität und Häufigkeit in den meisten morphologisch klassifizierten Typen des Hypophysenadenoms vorhanden und ihre vermehrte Expression korreliert signifikant mit der über MIB-1 hergeleiteten Wachstumsrate. Somit scheint IGF-II bei der Adenomzellmultiplikation mitzuwirken (Yokoyama et al., 1998).

In der bovinen Adenohypophyse sind vornehmlich IGFBP-5, -2 und -3 nachweisbar, dabei fluktuiert die Aktivität der IGFBP mit Änderungen im Östrogenzyklus. Damit scheinen die IGFBP potentielle Regulatoren der gonadotropen Funktion zu sein (Roberts et al., 2001).

Bei Akromegalie-Patienten besteht oft ein hohes IGFBP-3, eventuell hat dieses IGFBP-3 protektive Effekte, da sich bei Akromegalie eine geringere Inzidenz von Mamma- und Prostata-Ca. ergibt. Besonders zu beachten wäre in diesem Zusammenhang auch eine Wachstumshormontherapie. Die bisherigen Erfahrungen bei Kindern suggerieren zwar kein erhöhtes Risiko, allerdings sind Prostata- und Mamma-Karzinome auch keine typischen Erkrankungen des Kindesalters (Holly, 1998).

Untersuchungen bezüglich IGFBP bei Kraniopharyngeomen wurden bisher nur in einer Arbeit von Zumkeller et al. beschrieben. Dabei wurden Zystenflüssigkeiten untersucht. Die Konzentrationen von IGF-II in der Zystenflüssigkeit von Kraniopharyngeomen war bis zu 20fach höher als die jeweiligen IGF-I-Konzentrationen.

Vorläufige immunhistochemische Daten bezüglich untersuchter Zystenflüssigkeiten ergaben eine schwache Reaktion für IGFBP-2 und -5, eine starke Anfärbung für IGFBP-3 und keine Reaktion für IGFBP-1. Das IGFBP-Muster im Western Blot unterscheidet sich in den Zystenflüssigkeiten von Erwachsenen und Kindern. Die Reduktion von IGF-II in der Zystenflüssigkeit von Kraniopharyngeomen nach intrakavitärer Bestrahlung könnte ein gutes Ansprechen auf die Behandlung signalisieren und somit Aussicht auf den Behandlungserfolg bieten (Zumkeller et al., 1996).

## 5.5 IGFBP als IGF-Modulatoren und eigenständige Mitogene

Die einzelnen IGFBP spielen verschiedene Rollen in der extrazellulären Regulation von IGF-I. Sie unterscheiden sich in ihrer Gewebsverteilung, ihrer IGF-Bindungsaffinität und ihrer Regulation bzw. ihrem Abbau.

Wachstumsfördernde und insulinähnliche Aktionen von IGF werden durch IGFBP, besonders IGFBP-3 (im Serum) inhibiert. Paradoxer Weise zeigt die Serum-IGFBP-3-Konzentration in den meisten Situationen eine positive Korrelation mit der Wachstumsaktivität, zum Beispiel im Nabelschnurserum bezüglich Geburtsgewicht, oder während der Wachstumsphase in Kindheit und Pubertät. Auch eine Wachstumsanregung durch GH-Therapie wird von einer IGFBP-3-Erhöhung begleitet (Baxter, 1994).

Die zur Zeit diskutierten Funktionen der IGFBP stellen sich wie folgt dar:

- Limitieren der Bioverfügbarkeit von freiem IGF an IGF-Rezeptoren
- Verhindern IGF-induzierter Hypoglykämien
- Regulation des Transports von IGF zwischen intra- und extravaskulärem Raum
- Verlängerung der Halbwertszeit von IGF im Kreislauf
- Langsame Freisetzung von IGF aus dem Pool und damit Verstärkung bzw. Verlängerung der Dauer der IGF-Aktionen (gegebenenfalls auch Schutz vor Rezeptor-Downregulation)
- Einfluss auf zelluläre Proliferation und Zelltod durch eigene IGFBP-Rezeptoren (Grimberg, Cohen, 2000; Ferry et al., 1999<sup>a</sup>)

Wie schon erwähnt scheinen mehrere Mitglieder der IGFBP-Familie auch IGF-unabhängige Effekte auf die Zellfunktion zu haben. Besonders IGFBP-3 steht seit

einigen Jahren im allgemeinen Interesse als potentiell wachstumshemmendes Protein, sowohl durch seine IGF-I-Modulation, als auch durch einen IGF-I unabhängigen Mechanismus. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass von basalen Keratinozyten synthetisiertes IGFBP-3 in vitro die zelleigene IGF-Antwort abschwächt (Wraight et al., 1998).

In diesem Zusammenhang spricht vieles für spezifische zellmembrangebundene IGFBP-Rezeptoren (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>). IGFBP-3-Fragmente, die an der Zellmembran gebunden sind, haben eine viel geringere Affinität zu IGF-I als intaktes lösliches IGFBP-3. Ein erster Beweis für solche Oberflächenrezeptoren wurde bei Brustkrebszellen gefunden, dabei war die mittlere Region des IGFBP-3-Moleküls verantwortlich für die Bindung an Oberflächenproteine. Genauso hat man spezifische IGFBP-3-Assoziationsproteine bei Prostata-Ca.-Zelllinien gefunden. Hier konnte eine direkte Steigerung der Apoptoserate durch IGFBP-3 gezeigt werden (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>). Zudem interagieren IGFBP-3 und -5 mit viralen Onkoproteinen, was weitere wichtige Rollen in Bezug auf Zellproliferation, Apoptose und maligne Transformation beinhalten kann (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

IGFBP-3-Mutanten ohne Bindungsfähigkeit für IGF-I oder -II stimulieren in humanen Prostata-Ca.-Zellen in gleichem Ausmaß wie normales IGFBP-3 Zelltod und Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung. Das spricht für hauptsächlich IGF-unabhängige Mechanismen bei IGFBP-3-induzierter Apoptose in diesen Zellen (Hong et al., 2002).

Auch IGFBP-5 wirkt durch IGF-unabhängige Mechanismen. Dabei könnte Fibronectin ein potentieller Interaktionspartner sein. In Fibronectin-Null-Mauszellen potenzierte IGFBP-5 die durch IGF-I induzierte Zellmigration. Die Bindung von IGFBP-5 an Fibronectin hat keinen Effekt auf die Bindungsfähigkeit des IGF-I an IGFBP-5, aber es erhöht die Proteolyse von IGFBP-5. Somit scheint Fibronectin durch Bindung an IGFBP-5 dessen liganden-abhängige Aktionen zu hemmen, indem es die Proteolyse von IGFBP-5 fördert (Xu et al., 2003).

Die schon angesprochene negative Korrelation zwischen Serum-IGFBP-3 und dem Risiko für Prostata-, Kolon- und Bronchial-Ca. deutet eine protektive Funktion gegen die Effekte von systemischem IGF-I an. Diese letztlich gefundenen Assoziationen beweisen jedoch keine Kausalität (Grimberg, Cohen, 2000). Höhere IGFBP-3-Serum-

spiegel waren in verschiedenen klinischen Studien bezüglich Prostata-Ca., kolorektalem Ca., Bronchial-Ca., Blasen-Ca. und auch kindlicher Leukämie mit einem geringeren Risiko verknüpft (Ali et al., 2003). Kontroverse Befunde gibt es für das Mamma-Ca., dabei scheinen hohe IGFBP-3-Spiegel vor allem bei prämenopausalen Frauen mit einem höheren Risiko verbunden zu sein. Ebenso gibt es in einigen Studien ein mit hohem IGFBP-3 verbundenes höheres Risiko bei Bronchial-Ca. und Kolon-Ca. (Ali et al., 2003).

Verschiedene Malignome, wie das Prostata-Ca. oder Leukämien, zeigen Assoziationen zur IGFBP-3-Protease-Aktivität im Serum. Sie konnte auch im Liquor von Leukämiepatienten oder Patienten mit ZNS-Tumoren nachgewiesen werden. Es ist bislang unklar, ob die erhöhten Proteasen bei neoplastischen Prozessen durch vermehrte Produktion des Tumors entstehen oder durch Verlust eines Proteaseinhibitors (Rajah et al., 1995).

Die Proteasen sind wichtige autokrine bzw. parakrine Wachstumsregulatoren und sind vielleicht eine *short-loop* in der Kontrolle der IGF-Aktivität. Da in unterschiedlichen Untersuchungen die Proteasen sowohl von IGF inhibiert, als auch stimuliert werden, und auch von IGFBP inhibiert werden, scheint das relative Verhältnis von IGF zu IGFBP die Proteasenaktivität zu beeinflussen (Grimberg, Cohen, 2000; Ferry et al., 1999<sup>a</sup>). So zeigen Prostata-Zellen im Beisein von PSA eine Umkehr des inhibitorischen Effekts von IGFBP-3 auf IGF-stimuliertes Zellwachstum (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

Die Matrix-Metalloproteinase-7 (MMP-7), die von Krebszellen sezerniert wird, wurde klassischerweise mit der Zerstörung der Basalmembran im Rahmen von Tumorzellinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht. Epidemiologische Studien haben eine Korrelation zwischen IGF-I, IGFBP-3 und dem Risiko von Kolon-, Mamma-, Prostata- und Bronchial-Ca., alles Tumoren, die MMP-7 produzieren, erbracht (Miyamoto et al., 2004).

### **5.5.1 IGFBP-1**

Das Gen für IGFBP-1 ist auf Chromosom 7p14-12 lokalisiert (Ehrenborg et al., 1992; Allander et al., 1993). IGFBP-1 hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und beinhaltet strukturell eine RGD-Sequenz (Shimasaki, Ling, 1991), die von Integrin-Rezeptoren

in der Zellmembran erkannt wird. IGFBP-1 liegt in mehreren Phosphorylierungsstufen vor, die die Affinität zu IGF beeinflussen (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

IGFBP-1 wird vor allem in der Leber, der Dezidua und den Nieren produziert, ist nur in geringem Maße im Serum, aber von den IGFBP am stärksten im Fruchtwasser vertreten. Serumspiegel von IGFBP-1 fallen nach der Geburt bis hin zum Erwachsenenalter stark ab (Baxter, 1994). Seine Serumkonzentration schwankt abhängig vom metabolischen Status. Ähnlich Insulin-gegenregulatorischer Hormone wird IGFBP-1 nach oraler Glukoseaufnahme supprimiert und durch eine insulin-induzierte Hypoglykämie erhöht (Baxter, 1994) und schützt so vor den hypoglykämischen Effekten der IGF beim Fasten (Daughaday, 1995). Insulin und Kortikosteroide kontrollieren die Serumspiegel über die hepatische Synthese. Einige Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 können ebenfalls die Produktion anregen (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

In einer Fall-Kontroll-Studie ergeben sich Hinweise auf einen möglichen protektiven Effekt von zirkulierendem IGFBP-1 und IGFBP-2 bezüglich des Risikos in jüngerem Alter an einem Ovarial-Ca. zu erkranken (Lukanova et al., 2003).

### **5.5.2 IGFBP-2**

Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q33-34) lokalisiert (Ehrenborg et al., 1991; Allander et al., 1993); das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 31 kDa. Wie IGFBP-1 hat es ebenfalls eine RGD-Sequenz (Shimasaki, Ling, 1991), eine Bindung an Integrin-Rezeptoren konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. IGFBP-2 könnte über Glykosaminoglykane und wahrscheinlich Proteoglykane mit der Zelloberfläche in Kontakt treten. IGFBP-2 wird weder phosphoryliert noch glykosyliert.

IGFBP-2 ist das IGFBP mit der zweithöchsten Serumkonzentration (Daughaday, 1995), diese ist altersabhängig mit Gipfeln in der Kindheit und in höherem Lebensalter. Seine höchste Konzentration in biologischen Flüssigkeiten zeigt das IGFBP-2 im Sperma. Da es von vielen Nervengewebe produziert wird, ist es das am meisten verbreitete IGFBP im Liquor (Daughaday, 1995) und bei bestimmten ZNS-Tumoren erhöht. Ein GH-Mangel erhöht die Serumspiegel. Die Regulation von IGFBP-2 unterliegt in geringerem Maße dem metabolischen Status als bei IGFBP-1 (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

Beim Prostata-Ca. werden höhere Serumwerte für IGFBP-2 gefunden, die mit PSA im Serum und der Tumoraggressivität korrelieren (Grimberg, Cohen, 2000; Moore et al., 2003). In Krebszellen der Prostata wirkt es stimulatorisch. In normalen Prostata-Epithelien hat IGFBP-2 hingegen einen leicht supprimierenden Effekt auf das Zellwachstum und zudem eine IGF-antagonistische Wirkung. Somit scheint IGFBP-2 eine Rolle in der Progression, aber nicht in der Initialisierung des Prostata-Ca. zu spielen. Denkbar wäre ein sogenannter *switch* auf molekularer Ebene, der IGFBP-2 zu einem pro-karzinogenen Molekül verändert (Moore et al., 2003). IGFBP-2 zeigt auch immunhistochemisch eine signifikante Mehrexpression bei intraepithelialen Neoplasien und Karzinomen der Prostata ohne Korrelation zu ihrem Grading (Richardsen et al., 2003).

### **5.5.3 IGFBP-3**

Das Gen ist auf Chromosom 7p14-12, neben dem IGFBP-1-Gen, lokalisiert (Allander et al., 1993). Das IGFBP-3 hat 3 Glykosylierungsstellen und zirkuliert im Kreislauf in verschiedenen Glykosylierungsstufen mit einem Gewicht zwischen 40 und 44 kDa. Unglykosyliert wiegt es 29 kDa (Shimasaki, Ling, 1991; Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

IGFBP-3 zeigt eine hoch signifikante Korrelation zum Geburtsgewicht. Seine Serumkonzentration zeigt einen kontinuierlichen altersabhängigen Anstieg, mit einem Peak in der Pubertät und einem langsamen Abfall im weiteren Erwachsenenleben. IGFBP-3 ist im Serum (postnatal) mit mehr als 10fach höheren Spiegeln als andere IGFBP vertreten und zeigt dabei keine schnellen Änderungen (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>; Baxter, 1994).

IGFBP-3 wird auch von vielen nichtheptatischen Geweben produziert. In vitro konnte eine Regulation des IGFBP-3 durch Interleukin-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Retinoinsäure, PTH, *osteogenic-protein-1*, Östradiol, Prostaglandin E2, Glukokortikoide und p53 gezeigt werden, die primäre Regulation unterliegt aber dem GH.

IGFBP-3 hat sowohl antiproliferative als auch proapoptische Effekte auf das Wachstum von Brustkrebszellen in vitro. Die Mechanismen dieser Effekte sind noch unklar. IGFBP-3 bindet an die Zelloberfläche, wobei bisher noch kein möglicher IGFBP-3-Rezeptor charakterisiert wurde. Zudem kann es in den Zellkern translokieren (Butt et al., 2002). Die Bindung von IGFBP-3 an die Zellmembran von Brust-



krebszellen wird von einer Phosphorylierung begleitet, beide Prozesse werden von IGF-I inhibiert. Durch die Phosphorylierung hingegen wird die Bindungsfähigkeit von IGFBP-3 für IGF-I verstärkt, was zu einer erhöhten Assoziation von IGF-I an die Zellmembran führt (Mishra, Murphy, 2003).

#### **5.5.4 IGFBP-4**

Das Gen ist auf Chromosom 17q12-21.1 lokalisiert (Bajalica et al., 1992; Allander et al., 1993). Das Molekulargewicht beträgt 24 kDa oder glykosyliert (Shimasaki, Ling, 1991) 28 kDa. IGFBP-4 wurde in allen biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen. Lokal wird IGFBP-4 von verschiedenen Zelltypen gebildet, zum Beispiel Fibroblasten, Neuroblastomzellen, Prostata-Zellen oder Knochenzellen. IGFBP-4 kann in einem bisher noch unbekanntem Mechanismus an Zellmembranen binden, das meiste IGFBP-4 liegt aber extrazellulär gelöst vor (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>). IGFBP-4 ist bei Hypopituitarismus und im Serum von Patienten mit IGF-II sezernierenden Tumoren erhöht (Daughaday, 1995).

Bei der Untersuchung von Zellproliferation, Koloniebildung und Zellmigration bei kolorektalen Karzinomzellen kann IGFBP-4 IGF-abhängig alle getesteten Wachstumsparameter hemmen, wobei die Effekte teilweise durch IGF-II aufgehoben werden. IGF-unabhängig kann IGFBP-4 die Koloniebildung hemmen (Diehl et al, 2004).

#### **5.5.5 IGFBP-5**

Das Protein wiegt 29 kDa und kommt in verschiedenen glykosylierten Stufen bis 32 kDa vor. Das Gen ist in enger Korrelation zum IGFBP-2-Gen auf Chromosom 2q33-34 lokalisiert (Allander et al., 1994). Wie bei IGFBP-3 fallen die IGFBP-5-Spiegel mit dem Alter, beginnend nach der Pubertät. Fetale Gewebe haben hohe IGFBP-5-Spiegel während schnellen Wachstums, die Gewebespiegel bei Erwachsenen hingegen variieren. In Bindegeweben und Liquor liegen wesentliche Konzentrationen an IGFBP-5 vor, zudem ist es das vorwiegende IGFBP in der Niere.

Auch IGFBP-5 kann einen Dreier-Komplex mit IGF und ALS bilden. Im Gegensatz zu den anderen IGFBP bindet IGFBP-5 aufgrund hoher Affinität zu Hydroxylapatit stark an Knochenzellen. Wie IGFBP-3 bindet es an Endothelzellen und wird in hohen Konzentrationen in der extrazellulären Matrix gefunden. In vitro verstärkt IGFBP-5 die Wirkungen von IGF-I, diese Verstärkung scheint eine Bindung des IGFBP-5 an die

Zellmembran oder die extrazelluläre Matrix vorauszusetzen, was eine Bindung des IGF-I an seinen Rezeptor vereinfacht. Der Serumspiegel von IGFBP-5 ist GH-abhängig (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

Auch IGFBP-5 scheint IGF-unabhängig als Wachstumsfaktor zu wirken, zum Beispiel in der Regulation von Knochenaufbau. Der Mechanismus ist noch unklar: möglicherweise über eigene Zelloberflächenrezeptoren oder transkriptionale Genaktivierung durch in den Zellkern transportiertes IGFBP-5 (via NLS) (Mohan, Baylink, 2002).

### **5.5.6 IGFBP-6**

Das Gen liegt auf Chromosom 12q13 (Ehrenborg et al., 1999). Es ist ein o-glykosyliertes Protein (Shimasaki, Ling, 1991) mit einem Molekulargewicht von 34 kDa. Vornehmlich findet man es im Liquor und im Serum. Nur IGFBP-6 bindet IGF-II mit 100fach höherer Affinität als IGF-I, ein Unterschied, der eventuell auf anderen N-terminalen Disulfidbrücken beruht (Grimberg, Cohen, 2000).

Es wird in Ovarialzellen, Prostata-Zellen, Fibroblasten, Osteoblasten und anderen Zellen exprimiert (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

### **5.5.7 IGFBP-related proteins**

In der IGFBP-Familie gibt es auch noch sogenannte IGFBP-related proteins, die IGF mit geringer Affinität binden. IGFBP und IGFBP-rP haben das gleiche Zystein-reiche N-terminale Ende, was für verschiedene biologische Aktionen, unter anderem ihre Bindung an IGF notwendig ist (Rosenfeld et al., 1999).

IGFBP-rP1 (oder auch IGFBP-7) reguliert die zelluläre Proliferation, Adhäsion, Angiogenese und stimuliert die Prostazyklin-Synthese. Es kann in den meisten Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, zudem zeigt es eine deutliche Expression im mikrovaskulären Endothel, das mit der Tumorgenese assoziiert ist (Lopez-Bermejo et al., 2003). IGFBP-rP1 ist ein Protein von 31 kDa, das zuerst in Leptomeningen nachgewiesen wurde. Es entspricht dem sogenannten *mac 25*, *Prostacyclin-stimulating factor (PSF)*, *tumor adhesion factor (TAF)* und *T1A12* (Rosenfeld et al., 1999). IGFBP-rP1-mRNA ist in vielen Tumorzelllinien downreguliert und scheint eine wachstumshemmende Aktivität zu haben (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>).

IGFBP-rP2 (oder IGFBP-8), entsprechend dem *connective tissue growth factor* (CTGF) scheint ein wichtiger endokriner Faktor zu sein und eine Rolle auf TGF- $\beta$  zu spielen (Rosenfeld et al., 1999). Es scheint auch noch sogenannte IGFBP-rP 3-6 zu geben, wobei das IGFBP-rP-3 auch als IGFBP-9 (oder *nephroblastoma overexpressed gene* (*novH*)) und das IGFBP-rP 5 auch als IGFBP-10 bezeichnet wird. Das IGFBP-rP-4 entspricht dem *cyr61* (Ferry et al., 1999<sup>b</sup>, Rosenfeld et al., 1999).

## **5.6 Vergleich beider Tumoren der Sellaregion**

### **5.6.1 Immunhistochemischer Nachweis der IGFBP**

#### **5.6.1.1 Zytoplasmatische Anfärbung**

Bei allen untersuchten Hypophysentumoren ließ sich zytoplasmatisch IGFBP-1, -3, -4 und -6 nachweisen, IGFBP-2 und -5 waren zum Teil bei Kraniopharyngeomen, wenige Fälle für IGFBP-2 bei Hypophysenadenomen nicht nachweisbar. Dabei ergab sich eine deutliche positive Reaktion für alle anderen IGFBP. Diese Anfärbung gestaltete sich in einem distinkten Muster, das auf eine charakteristische Anfärbung schließen lässt. Die durchgeführte Positivkontrolle an testikulären intraepithelialen Neoplasien bzw. Seminomen entsprach bezüglich der zytoplasmatischen Anfärbung in vollem Maße der Vergleichsarbeit von Drescher et al. (1997).

Bei der immunhistochemischen Anfärbung der IGF-Bindeproteine im Zytoplasma fällt vor allem die Membranakkzentuierung für IGFBP-5 auf. Eine entsprechende Anfärbung findet sich in der Literatur zum Beispiel für den IGF-II-R, so in einer Arbeit von Ocran et al., wo die IGF-II-Rezeptor-Immunreaktivität vor allem an der Plasmamembran der Zellen lokalisiert war, hingegen zeigte sich keine bis nur geringe zytoplasmatische Reaktivität (Ocran et al., 1989). Möglicherweise könnte also bei IGFBP-5 eine Assoziation mit dem IGF-II-R von besonderer Bedeutung sein.

Im Vergleich zwischen Hypophysenadenomen und Kraniopharyngeomen ergab sich für die diffuse zytoplasmatische Anfärbung kein signifikanter Unterschied für IGFBP-1-6. Herdförmig zeigte sich nur bei den Hypophysenadenomen eine stark positive Reaktion für IGFBP-2 und -5.

Die hormonaktiven Hypophysenadenome zeigen eine stärkere Expression von IGFBP-1 zytoplasmatisch diffus und herdförmig als nicht hormonproduzierende Hypophysenadenome. Außerdem ergibt sich eine stärkere Expression von IGFBP-2 und -5 zytoplasmatisch herdförmig bei Hypophysenadenomen gegenüber Kraniopharyngeomen. Wenn die IGFBP bei Hormonproduktion tendenziell stärker nachweisbar sind, wäre auch die schwächere Anfärbung für die Kraniopharyngeome zu erklären. Im Vergleich zwischen Rezidiv- und Primärtumoren ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Grundsätzlich besteht bei einem immunhistochemischen Nachweis die Problematik, dass man die entsprechenden Proteine, aber nicht die mRNA-Expression nachweist, und damit der Ort des Proteinnachweises nicht dem Synthesort entsprechen muss. In einer Arbeit von Van Kleffens et al. (1999) scheint jedoch die Proteinlokalisierung der IGFBP weitgehend ihrer mRNA-Expression zu entsprechen. Die dennoch gefundenen Unterschiede könnten auch an Nachweisgrenzen liegen oder für eine Sekretion des Proteins ohne Bindung an das Zielorgan sprechen (Auswaschen der IGFBP während der Färbung). Letztlich bleibt für die vorliegende Arbeit ohne zusätzlichen Nachweis der spezifischen mRNA unklar, ob die nachgewiesenen IGFBP auch von den Hypophysentumoren in dieser Form gebildet wurden.

Im Vergleich zweier Serien bezüglich der Hormonexpression von Hypophysenadenomen zeigt sich bei monoklonalen Antikörpern gegenüber polyklonalen Antikörpern ein deutlicherer *cutoff* in der Immunhistochemie pituitärer Hormone (Saeger et al., 2003). Für die IGFBP waren zum Zeitpunkt der Studiendurchführung keine monoklonalen Antikörper gebräuchlich. Obwohl sich Saeger und Kollegen auf die Routinefärbung hypophysärer Hormone beziehen, könnte auch für die Peptide der IGF-Familie ein monoklonaler Antikörper günstiger für ihren Nachweis sein.

#### **5.6.1.2 Paranukleäre Reaktion**

Interessant erscheint die deutliche *dot-like reaction* insbesondere für IGFBP-3. Aber auch die überwiegend kleineren paranukleären *dots* für die übrigen IGFBP sind zu diskutieren.

Keine *dots* konnten wir für IGFBP-1 und -2 und zum Teil für IGFBP-5 und -6 bei Kraniopharyngeomen nachweisen. Ebenso bei einigen Fällen der Hypophysenadenome: keine *dots* für IGFBP-1 und -2, in Ausnahmefällen auch nicht für IGFBP-4 und -5.

Statistisch signifikant ist im Gegensatz dazu das Ergebnis für IGFBP-3 mit eindeutig mehr großen *dots* für die Hypophysenadenome ( $p = 0,001$ ).

Die globuläre Struktur, direkt neben dem Zellkern gelegen, erinnert an sogenannte *fibrous bodies*, Keratin-positive paranukleäre Körper, die bei dicht und gering granulierten GH-Zelladenomen beschrieben sind. Ähnliche Keratinstrukturen gibt es auch bei Kraniopharyngeomen und NNR-Adenomen (Saeger et al., 2001). Somatotrope Zellen zeigen interessanterweise gelegentlich eine GH-Positivität in Form einer globulären Struktur, die den Golgi-Apparat repräsentiert. Dies könnten aktiv sezernierende Zellen sein. Elektronenmikroskopisch variiert diese Prominenz des rER und der Golgi-Region mit der sekretorischen Aktivität der Zelle. Ultrastrukturell immunzytologisch bestätigt sich die Präsenz von GH in den sekretorischen Granula und innerhalb der Golgi-Region. Auch laktotrope Zellen können eine starke Immunreaktivität für Prolaktin im juxt nukleärem Golgi-Komplex zeigen. Das gut entwickelte rER kann gelegentlich konzentrische Strukturen formen, die als "Nebenkern"-Formation bekannt sind (Asa, 1998). Beim dicht granulierten GH-Zell-Adenom ergibt sich bei immunhistologischer Färbung gegen Keratine mit niedrigem Molekulargewicht eine charakteristische halbringförmige, perinukleäre Reaktion; die GH-Immunreaktivität hingegen ist stark und gleichförmig. Bei gering granulierten GH-Zell-Adenomen gelten sogenannte *fibrous bodies* als Hauptcharakteristikum, dabei handelt es sich um keratinpositive paranukleäre Körper. Elektronenmikroskopisch zeigen sich die *fibrous bodies* als dicht gelagerte kugelige Filamentanreicherungen, zum Teil mit Einschluss von Sekretgranula oder Zellorganellen. Interessant ist auch eine beim gering granulierten Prolaktinzelladenom typische kugelige paranukleäre Immunreaktivität für Prolaktin, die auf den Golgi-Apparat konzentriert ist (sogenanntes Golgi-Muster der Immunreaktivität). Auch beim azidophilen Stammzelladenom, das sich nur elektronenmikroskopisch sicher nachweisen lässt, zeigen sich sogenannte *fibrous bodies* (Saeger, 2003<sup>b</sup>, Asa, 1998).

Die Anfärbung der IGFBP paranukleär könnte dafür sprechen, dass auch diese Bindeproteine in den entsprechenden Zellen zumindest sezerniert, wenn nicht synthetisiert werden. Unter dem Verdacht, dass die angefärbte Struktur der Golgi-Region entsprechen würde, haben wir Untersuchungen an verschiedenen Tumoren mit ebenfalls ausgeprägtem Golgi-Apparat durchgeführt (NNR-Adenome, Plasmozy-

tome, Nebenschilddrüsenadenome). Hier ließ sich die paranukleäre Lokalisation bestätigen.

Eine immunelektronenmikroskopische Zuordnung ist uns trotz mehrfacher methodischer Variation leider nicht gelungen. Dabei ist zu beachten, dass die verwendeten Antikörper nicht für diese Anwendung ausgerichtet waren, es sich also trotzdem um einen methodischen Fehler handeln kann. Eine Bestätigung für die Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates können wir aktuell jedoch nicht liefern.

Auch bei Kraniopharyngeomen lassen sich Zytokeratine nachweisen. Kurosaki et al. beschreiben einen immunhistochemischen Nachweis in 92 Prozent der Fälle (Kurosaki et al., 2001). Entsprechend wäre eine paranukleäre Reaktion ähnlich der Hypophysenadenome möglich.

Ein ähnliches spezifisches Ablagerungsmuster wurde ansonsten bisher noch von Röcken et al. bezüglich der Ablagerung von Amyloid in Hypophysenadenomen beschrieben. Dabei zeigt sich eine Immunreaktivität für die *anti-amyloid X-light chain* ohne Nachweis einer lokalen Synthese oder Sekretion von Immunglobulinen (Röcken et al., 1995).

In Brustkrebs-Zellen zeigte sich für IGFBP-3 ein starkes nukleäres Signal und eine generalisierte Anfärbung des Zytoplasmas, was eine freie Verteilung im Zytoplasma und keine Bindung an vesikuläre Strukturen suggeriert (Schedlich et al., 1998). Auch Wraight et al. zeigten für Keratinozyten einen eher diffusen zytoplasmatischen Nachweis von IGFBP-3 (Wraight et al., 1998). Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass IGFBP-3 vor Aufnahme in den Zellkern durch das Golgi-System freigesetzt wird (Schedlich et al., 1998).

Die Möglichkeit einer Kreuzreaktion bleibt zu bedenken, sie könnte eventuell die besprochenen Zytokeratine betreffen. Zumindest erscheint eine Kreuzreaktion mit GH unwahrscheinlich, da sich die globulären Strukturen auch in den keinesfalls GH-produzierenden Kraniopharyngeomen nachweisen lassen.

### **5.6.1.3 Nukleäre Anfärbung der IGF-Bindeproteine**

Wie im Ergebnisteil beschrieben ließen sich für die einzelnen Bindeproteine nicht nur eine zytoplasmatische Färbung, sondern auch nukleäre Anfärbungen nachweisen.

Dabei ist die bei IGFBP-6 beschriebene Expression aufgrund der diskussionswürdigen Positivkontrolle für IGFBP-6 kritisch zu betrachten.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede bei der Positivkontrolle liegt in der unterschiedlichen Fixierung der Materialien mit Bouin bzw. Formalin: Die uns vorliegenden Präparate sind mit Formalin fixiert, was in der Regel die beste Routinefixierung für immunhistochemische Studien darstellt. Bei einer Bouin-Fixierung können die zytologischen Details eventuell besser sein, für die meisten Antigene hat sich für die Immunhistochemie jedoch Formalin bewährt, gerade auch im Hypophysenbereich (Asa, 1998). Die deutliche Kernanfärbung der Positivkontrolle bezüglich IGFBP-6, die so nicht in der Vorarbeit beschrieben ist, macht die vorliegenden nukleären Nachweise der IGFBP, insbesondere für IGFBP-6, fraglich.

Für alle IGFBP ergeben sich bei beiden Hypophysentumoren in unterschiedlicher Ausprägung auch nukleäre Reaktionen. Dabei überwiegen für Kraniopharyngeome IGFBP-1 und -3, für Hypophysenadenome IGFBP-1, -3 und -4.

In der Literatur sind bisher nukleäre Lokalisationen vornehmlich für IGFBP-3 und -5 beschrieben worden. Bei Untersuchungen an embryonalem Mausgewebe wurde immunhistochemisch auch für IGFBP-2 ein nukleäres Signal gefunden, wobei sich daraus allein keine nukleäre Lokalisation beweisen lässt (Van Kleffens et al., 1999).

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Radulescu war gezeigt worden, dass IGFBP-3 strukturelle Informationen enthält, die eine Translokation in den Zellkern ermöglichen. In immunhistochemischen Färbungen zeigte sich sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation von IGFBP-3. Das nukleäre IGFBP-3 hat die Fähigkeit, IGF zu binden, behalten (Jaques et al., 1997). In Brustkrebs-Zellen zeigte sich für IGFBP-3 ein starkes nukleäres Signal und eine generalisierte Anfärbung des Zytoplasmas. Die nukleäre Lokalisation fand sich vor allem in sich aktiv teilenden Regionen, was auf eine Beziehung zum Zellzyklus hinweisen könnte (Schedlich et al., 1998). In sich teilenden Keratinozyten konnte IGFBP-3 ebenfalls nukleär nachgewiesen werden (Wraight et al., 1998). Auch IGFBP-5 hat die Potenz, in den Zellkern transportiert zu werden und direkt mit der DNA zu interagieren. IGFBP-1, -2, -4, und -6 hingegen besitzen die entsprechende Gensequenz nicht (Schedlich et al., 1998). Der nukleäre Transport von IGFBP-3 und -5 scheint zumindest zum Teil dem gleichen Transportmechanismus zu unterliegen. Der klassische

Endozytose-Weg wird weder von IGFBP-3 noch von IGF-I zur Internalisierung in den Nukleus benutzt. Innerhalb der Familie der IGFBP sind IGFBP-3 und -5, sowohl was die Struktur als auch die Funktion betrifft, eng verwandt. Die carboxy-terminale Domäne des IGFBP-3 enthält eine Sequenz, die eine strenge Homologie zu schon vorher bestimmten *nuclear localization signals* (NLS) aufweist; außerdem zeigt sich eine Homologie zu DNA-bindenden Domänen verschiedener Transkriptionsfaktoren (Schedlich et al., 1998). Auch für IGFBP-5 konnte diese NLS nachgewiesen werden (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>). Zusätzlich können IGFBP-3 und -5 Importin binden, das den nukleären Transport vereinfacht (Grimberg, Cohen, 2000). Nukleäres IGFBP-3 könnte dabei eine direkte Kontrolle auf die Genexpression ausüben (Ferry et al., 1999<sup>a</sup>).

Bezüglich der nachgewiesenen Translokation in den Zellkern (also einem nukleärem Proteinimport) stellt die reversible Phosphorylierung einen wichtigen Mechanismus dar. Eine Phosphorylierung des IGFBP-3 mittels einer DNA-Proteinkinase erhöhte sowohl den nukleären Import des IGFBP-3 als auch die Bindung des IGFBP-3 an Kernkomponenten. Die Bindungsfähigkeit für IGF-I war hingegen deutlich abgeschwächt. Beim Kotransport von IGF-I mit IGFBP-3 in den Zellkern scheint die Phosphorylierung ein Mittel zur Freisetzung des IGF-I zu sein (Schedlich et al., 2003).

Durch Western Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass das in nukleären Extrakten nachgewiesene IGFBP-3 in der Größe dem sezernierten IGFBP-3 entspricht (Jaques et al., 1997). Das die nukleäre Isoform von IGFBP-3 die gleiche Größe wie die von Zellen sezernierte glykosylierte Form hat, spricht dafür, dass IGFBP-3 vor Aufnahme in den Zellkern durch das Golgi-System freigesetzt wird (Schedlich et al., 1998). Der IGFBP-3-Promoter beinhaltet ein aktives Antwort-Element für das Tumorsuppressorgen p53. Bei der Frage nach der biologischen Funktion nukleären IGFBP-3s bleibt interessant, ob IGFBP-3 dort IGF-abhängig oder -unabhängig wirkt. Das nukleäre IGFBP-3 könnte entweder einem nukleären Transport-Stoffwechsel entstammen, oder es wird bei Zellteilung aus dem Zytoplasma aufgenommen und in den Nukleus transportiert (Wraight et al., 1998).

Das Vorhandensein von IGF-I hat nur geringe Auswirkungen auf die nukleäre Aufnahme (Schedlich et al., 1998). Der Transport von IGF-I zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten könnte vom Differenzierungsstadium der Zelle abhängen. Für IGF-I konnte bisher kein *nuclear localization signal* (NLS) gefunden werden. In ruhen-



den Zellen werden sowohl IGF-I als auch IGFBP-3 internalisiert und lokalisieren sich im endosomalen Kompartiment. Bei aktiven Zellen hingegen akkumulieren IGF-I und IGFBP-3 nach einem Transit durchs Zytoplasma im Nukleus. Möglicherweise funktioniert IGFBP-3 mit seiner NLS als Transporter für IGF-I in den Zellkern und damit der Initiation der mitogenen Aktivität. Vielleicht agiert IGF-I zusätzlich zur Beeinflussung der Gentranskription auch in Interaktion mit anderen Kern-Proteinen (Li et al., 1997; Jaques et al., 1997), wie zum Beispiel dem *retinoblastoma protein* und p53. So induziert p53 die Transkription des IGFBP-3 Gens, um eine Zellwachstumshemmung zu erreichen. Der Retinoid-X-Rezeptor konnte als IGFBP-3-Bindeprotein identifiziert werden; eine Behandlung mit Retinoinsäure bringt den IGFBP-3-/RXR-Komplex in den Nukleus (Grimberg, Cohen, 2000).

Nukleäres IGFBP-3 könnte somit den Anteil an in Zellteilung begriffenen Zellen und damit indirekt das aktuelle Wachstumsgeschehen reflektieren. Viele Hormone und Wachstumsfaktoren können zelluläre Antworten auf zwei Arten hervorrufen: Indirekt durch Aktivierung klassischer Signal-Transduktions-Kaskaden oder direkt durch nukleäres Angreifen. Diese Dualität der Funktion scheint auch für IGFBP vorzuliegen. Diese Bindeproteine könnten eine andere Klasse von Liganden regulierten Transkriptionsfaktoren darstellen. Die Funktion intrazellulären IGFBP-3 ist immer noch unklar, es scheint jedoch bei der Regulation der Apoptose eine Rolle zu spielen (Schedlich et al., 1998).

### **5.6.2 Proliferationsmarker Ki-67 bei Hypophysentumoren**

Proliferationsmarker sollen bei Hypophysenadenomen helfen, aggressiv oder schnell wachsende Tumoren von solchen mit niedriger Wachstumsrate zu unterscheiden. Zelluläre Atypien sagen nichts über die Prognose aus, hier erscheint nur die Zahl der Mitosen wichtig. Das nukleäre Antigen Ki-67 zeigt sich in diesem Zusammenhang bisher als der verlässlichste Marker (Saeger, 2004). Es ist in allen Stadien des Zellzyklus, aber nicht in ruhenden Zellen nachweisbar (Prevedello et al., 2005; Pizarro et al., 2004). Bei den Hypophysenadenomen dieser Studie, bei denen ein Proliferationsindex mittels Ki-67-Antigen bestimmt worden war, entsprach dieser der in der Literatur beschriebenen Spannbreite bis maximal Grad II bei den untersuchten Tumoren. Es ließ sich kein Zusammenhang zur Prognose herleiten.

Nach Saeger enthalten die meisten Hypophysenadenome weniger als 1 Prozent Ki-67-positive Kerne (Grad I), die übrigen zwischen 1 und 5 Prozent (Grad II) oder selten mehr als 5 Prozent (Grad III). Bei letzteren wird zum Teil auch p53 nukleär exprimiert, das ansonsten nur selten nachzuweisen ist. In einem sehr schnell wachsendem Hypophysenadenom mit rascher Rezidivfolge konnte ein sehr hoher Ki-67-Index von 22 Prozent nachgewiesen werden (Prevedello et al., 2005).

Invasiv verhalten sich etwa 40 bis 60 Prozent der Hypophysenadenome, die einen höheren Ki-67-Index und zu etwa 15 Prozent auch p53-positive Zellkerne zeigen. Zudem haben sie eine höhere postoperative Rezidivrate (Saeger et al., 2001; Schreiber et al., 1999). Die mittlere Wachstumsrate (Ki-67) von hormonaktiven Hypophysenadenomen war dabei signifikant höher als für hormoninaktive Tumoren (Thapar et al., 1996). Dabei zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den hormonellen Subtypen (Knosp et al., 1989) oder signifikante Alters- oder Geschlechtsunterschiede (Pizarro et al., 2004). Ebenso ergibt sich aus dem Proliferationsindex kein signifikanter Unterschied zwischen Primärtumor und Rezidiv, bei einem hohen Ki-67-Anteil > 3 Prozent lagen meist Makroadenome mit suprasellärer Ausdehnung oder invasivem Verhalten vor (Pizarro et al., 2004; Knosp et al., 1989).

IGFBP-3 und der Proliferationsmarker Ki-67 zeigen ein unterschiedliches Färbungsmuster: Ursächlich könnte ein Auftreten in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus oder eine unterschiedliche intranukleäre Verteilung sein (Wraight et al., 1998).

Andere Proliferationsmarker wie das PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) werden auch in Hypophysenadenomen stark exprimiert ohne Korrelation zur Rezidivrate. bcl2 ist nur gering positiv in wenigen Zellen und zeigt keine Korrelation zu den klinischen Daten (Schreiber et al., 1999). Bei unterschiedlichen Tumoren des ZNS gibt es hingegen eine signifikante Korrelation zwischen ansteigendem Grading und PCNA- bzw. Ki-67-Werten, sowie bezüglich des klinischen Outcomes bzw. der Rezidivneigung (Kayaselcuk et al., 2002).

Auch in neoplastischen Zellen von Kraniopharyngeomen lässt sich das Kernantigen Ki-67 nachweisen. Eine MIB-1-Aktivität fand sich vor allem im peripheren palisadenförmigem Epithel. Entsprechend des langsamen Wachstums und der *low-grade*

Invasivität lag in den meisten Tumoren eine niedrige MIB-1-Immunreaktivität vor (Raghavan et al., 2000).

Zudem konnte man eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von MIB-1 positiven Zellen und der Mikrogefäßdichte in immunhistochemischen Studien nachweisen. Die Rolle der Angiogenese beim Wachstumsverhalten von Kraniopharyngeomen steht zur Zeit in der Diskussion (Vidal et al., 2005). Ein Bezug zwischen Mitoseindex und Rezidivrate (sowohl Ki-67 als auch PCNA) ließ sich in einer Arbeit von Agozzino et al. (2006) nicht herstellen, hingegen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Rezidivrate und VEGF-Expression bei Kraniopharyngeomen. VEGF ist ein bekannter Promoter der Angiogenese und damit in vielen Fällen in seiner Ausprägung eng mit der Gefäßversorgung und auch der Aggressivität eines Tumors verknüpft. Eine Blockade des IGF-I-R inhibiert in Kolon-Ca.-Zellen die IGF-I induzierte VEGF-Expression und Angiogenese sowie die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum (Reinmuth et al., 2002).

### **5.6.3 Rezidivneigung**

Von den untersuchten Hypophysentumoren zeigten die Adenome eine Rezidivrate von 28 Prozent, bei den Kraniopharyngeomen von 9 Prozent. Entsprechend werden für Kraniopharyngeome in der Literatur Rezidivraten von 10 bis 59 Prozent angegeben (Asa, 1998; Kim et al., 2001; Van Effenterre, Boch, 2002; Tena-Suck et al., 2006). Für Hypophysenadenome gibt es in der Literatur keine einheitlichen Angaben, da das Outcome in der Regel abhängig vom postoperativen hormonellen Status des Patienten definiert wird, nicht immer ein erneutes Tumorwachstum berücksichtigt wird und die Zeit des Follow-up deutlich schwankt. Zudem beschäftigen sich die meisten Studien mit nur einer Subklassifikation des Hypophysenadenoms und lassen deshalb keine Abschätzung der Rezidivrate für alle Hypophysenadenome zu. Die berichteten Rezidivraten reichen von 0,4 bis 19 Prozent bei GH-sezernierenden Hypophysenadenomen (Ross, Wilson, 1988; Freda et al., 1998; Biermasz et al., 2000; Nomikos et al., 2005).

Bei den Hypophysenadenomen bzw. ihren Rezidiven konnte keinerlei signifikanter Unterschied in der Stärke der Anfärbung gezeigt werden. Allerdings stellte sich für

die diffuse nukleäre Anfärbung bei IGFBP-1 eine Tendenz mit einem  $p = 0,125$  im McNemar-Test dar, wobei bei den Rezidivtumoren eine stärkere nukleäre Anfärbung beobachtet wurde.

Die untersuchten Primärtumoren mit nachgewiesener Rezidivneigung zeigten tendenziell eine schwächere Anfärbung für IGFBP-1, -2 und -5 herdförmig zytoplasmatisch und IGFBP-5 diffus nukleär, was für eine fehlende inhibitorische Wirkung dieser IGFBP auf IGF-I hindeuten könnte.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ließ sich weder für Hypophysenadenome noch für Kraniopharyngeome eine signifikante Korrelation bezüglich der Vorhersage eines Rezidivs aufzeigen.

Bisher fehlt ein verlässlicher Marker für das Risiko eines Rezidivs bei Hypophysenadenomen. Immunhistochemische Untersuchungen von bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und MIB-1 (Ki-67) zeigen, dass ein hoher bFGF-*nuclear index* ein 9fach erhöhtes Risiko für eine höhere Rezidivrate beinhaltet. In einer multivariaten Analyse stellte sich dabei allein der *nuclear index* als aussagekräftig heraus (Fukui et al., 2002). Machado et al. (2005) konnten mittels DNA-Durchflusszytometrie den Ploidiestatus und damit die Proliferationsrate bei Hypophysenadenomen abschätzen. Damit ließen sich die Patienten herausfinden, die ein engmaschigeres Follow-up bekommen sollten. Eine direkte Vorhersage bezüglich Prognose oder Rezidivrate war jedoch nicht möglich.

IGF-I und GH-Serumwerte scheinen einen Einfluss auf die Rezidivrate bei GH-produzierenden Adenomen zu haben. Die Messung des Serum-IGF-I wird dabei als Index der Aktivität der Akromegalie benutzt. Höhere postoperative IGF-I-Spiegel können somit ein signifikanter Marker für eine rezidivierende Erkrankung sein (Krieger et al., 2003). Dabei können die Serumwerte die Größe des Residualtumors widerspiegeln oder aber auf einen Einfluss der Wachstumshormonachse auf die Rezidivrate hindeuten. Van Lindert et al. schlagen in diesem Zusammenhang eine Normalisierung von IGF-I und GH im oGTT als genaueres Maß der Heilung vor (Van Lindert et al., 1997).

Bezüglich der Rezidivneigung der Adenome ließ sich in unserer Untersuchung lediglich eine Tendenz für den Einfluss der Tumorgröße mit einem 3fach erhöhten Risiko eines Rezidivs bei einem Makroadenom nachweisen.

Auch bei Kraniopharyngeomen konnten bisher weder klinische noch histopathologische Charakteristika zur Vorhersage eines Rezidivs identifiziert werden (Tena-Suck et al., 2006). Zellproliferationsindex und Gefäßdichte waren größer bei adamantinösen Kraniopharyngeomen als bei papillären, aber es ergab sich keine signifikante Korrelation zur Rezidivrate. Hingegen waren Immunreaktivität für p53 und eine inkomplette Resektion signifikant mit dem erneuten Tumorwachstum assoziiert.

Bezüglich des Proliferationsindizes gibt es unterschiedliche Aussagen: In einer Untersuchung von Kim et al. (2001) ergibt sich aus dem Ki-67-Index kein prognostischer Wert bezüglich eines Rezidivs. Nach Izumoto et al. (2005) ist der Ki-67-Index bei Kraniopharyngeomen mit Rezidivwachstum im Verlauf signifikant höher. Rezidivtumoren zeigen eine Tendenz zu höheren Ki-67-Indizes als ihre Primärtumoren (Duo et al., 2003). Pan et al. beschreiben in einer immunhistochemischen Untersuchung für PCNA einen höheren Färbeindex für adamantinöse gegenüber papillären Kraniopharyngeomen und vor allem eine Tendenz für ein höheres PCNA in Rezidivtumoren (Pan et al., 2002).

Ebenfalls eine signifikante Korrelation lässt sich für den immunhistochemischen Nachweis von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren bei Kraniopharyngeomen zeigen: Ein postoperatives Rezidivwachstum trat häufiger bei Tumoren ohne Nachweis der Geschlechtshormonrezeptoren auf, was für ein höheres Gewebsdifferenzierungspotential der Kraniopharyngeome mit Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren sprechen könnte (Izumoto et al., 2005).

Da es sich beim Kraniopharyngeom um einen langsam wachsenden Tumor handelt, braucht man ein relativ langes Follow-up. Die meisten Rezidive treten allerdings in den ersten 3 Jahren nach der Operation auf. Die Rezidivrate hängt wesentlich von der Radikalität des Ersteingriffes und von weiteren Therapiemodalitäten ab (Feldkamp, Scherbaum, 1997). Bei radikaler Chirurgie beträgt die Rezidivrate in der Literatur durchschnittlich 15 Prozent (Totalresektion) bis 75 Prozent (Teilresektion) (Van Effenterre, Boch, 2002). Unter einer Wachstumshormontherapie ergab sich keine höhere Rezidivrate (Feldkamp, Scherbaum, 1997). Die Substitution rekombi-

nanten GH erscheint effektiv und sicher (mehrere Studien) bei Kraniopharyngeompatienten mit GH-Mangel. Trotz GH-Mangel zeigen einige Patienten ohne Substitution eine normale bis erhöhte Wachstumsrate, häufig von einer deutlichen Gewichtszunahme begleitet (Müller et al., 2003). Andere Autoren beschreiben ein schnelles Tumorrezidiv unter GH-Therapie bei residualem Kraniopharyngeom (Niu et al., 2002).

### **5.7 Beziehung der IGFBP-Expression zu Hormonserumwerten, der Subklassifikation, der Rezidivrate und der histologischen Hormonaktivität**

Bei statistischer Gegenüberstellung ergab sich eine Signifikanz in der unterschiedlichen Anfärbungsstärke bei hormoninaktiven und hormonproduzierenden Hypophysenadenomen für IGFBP-1 zytoplasmatisch diffus und herdförmig und die *dot-like reaction* bei IGFBP-3. Zudem ergibt sich eine deutliche Tendenz, die größere *dots* bei den hormonproduzierenden Hypophysenadenomen beschreibt. Dies könnte die Annahme stützen, dass die paranukleären dots der Golgi-Region entsprechen. In diesem Falle könnten die IGF-Proteine im Zusammenhang mit der dortigen Hormonproduktion stehen.

Bei hormonproduzierenden Hypophysenadenomen lag das Serum-IGF-I und Serum-IGFBP-3 höher als bei hormoninaktiven Hypophysenadenomen. Entsprechend berechnet sich auch eine höhere IGF-I-/ IGFBP-3-Ratio. Da die hormonproduzierenden Hypophysenadenome auch die GH-produzierenden Adenome oder zum Beispiel die gemischtzelligen Prolaktin-/ GH-Zell-Adenome subsummieren, zeigt sich in den Hormonserumwerten die tumoreigene Aktivierung der GH-IGF-Achse.

Bezüglich der Rezidivneigung der untersuchten Primärtumoren der Hypophysenadenome ergibt sich kein signifikanter Unterschied für IGF-I, IGFBP-3, IGF-I-/ IGFBP-3-Ratio, GH und Prolaktin präoperativ im Serum.

In der Darstellung mittels Boxplot bzw. T-Test ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Serum-Werten für GH und Prolaktin und den einzelnen immunhistochemischen Nachweisen für IGFBP-1-6.

Interessanterweise zeigen sich für das präoperative Serum-IGFBP-3 signifikante Zusammenhänge für die histologische Expression von IGFBP-3 (nukleär) und -5 (sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär) und eine Tendenz für die zytoplasmatische Reaktion von IGFBP-1. Serum-IGFBP-3 ist zudem signifikant höher bei schwach positiver Anfärbung für IGFBP-3 nukleär und IGFBP-5 zytoplasmatisch. Für IGFBP-1 zytoplasmatisch liegt ein höheres IGFBP-3 bei stark positiver Färbung vor.

Ähnliche Verhältnisse liegen für das präoperative Serum-IGF-I vor mit einem signifikanten Zusammenhang bezüglich der zytoplasmatischen und nukleären Anfärbung von IGFBP-5. Dabei geht eine stärkere Anfärbung in beiden Fällen mit einem höheren Serum-IGF-I einher und einer höheren IGF-I-/IGFBP-3-Ratio. Diese Zusammenhänge bleiben in ihrer konkreten Bedeutung zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Man muss bedenken, dass sowohl das zirkulierende IGF-I als auch das Serum-IGFBP-3 GH-abhängig sind. Damit ist bei einer GH-induzierten IGF-I-Aktivierung auch eine Aktivierung zumindest dieses IGF-Bindeproteins zu erwarten. Hier zeigt sich jedoch ein Einfluss der Serumwerte auf die zelluläre Ausprägung der IGFBP. Gerade die nukleäre Anfärbung von IGFBP-3 und -5, die in der Literatur in der Regel als IGF-unabhängig gewertet wird, lässt Auswirkungen auf die Transkription und damit die zelluläre Umsatzrate vermuten (s. Punkt 5.6.1.3).

Verschiedene Regressionsanalysen bezüglich Stärke der immunhistochemischen Färbung, Einfluss der Serumhormonwerte und Hormonaktivität der Hypophysenadenome erbrachten keine signifikanten Zusammenhänge. Bezüglich der Rezidivneigung der Adenome ließ sich - wie schon erwähnt - lediglich eine Tendenz für den Einfluss der Tumorgöße auf die Rezidivneigung bei einem Makroadenom nachweisen. Interessanterweise zeigt sich auch eine Tendenz zwischen der Tumorgöße und dem Serum-IGF-I mit einem tendenziell niedrigeren IGF-I bei Makroadenomen. Aus der Verlaufskontrolle der IGF-Achse zum Beispiel bei Akromegalie-Patienten hätte man eher ein erhöhtes Serum-IGF-I bei Makroadenomen erwartet. Vielleicht repräsentiert das erhöhte Rezidivrisiko bei Makroadenomen die höhere Rate an Tumorresten durch notwendige Teilresektion.

De Marinis et al. beschreiben eine Korrelation zwischen präoperativem Serum-Prolaktin, immunhistochemischem Bild und klinischem Verlauf bei GH-sezernierenden Hypophysenadenomen: Bei den Patienten mit auch nach Operation andauernder Krankheitsaktivität zeigten sich höhere präoperative Prolaktinspiegel und 80 Prozent

der Tumore zeigten immunhistochemisch sowohl einen GH- als auch einen Prolaktin-Nachweis. Eine präoperative Hyperprolaktinämie bei Akromegalie-Patienten kann somit auf ein erhöhtes Risiko der Krankheits-Persistenz nach OP hinweisen. Wahrscheinlich haben diese Patienten aggressivere gemischte GH-PRL-sezernierende Adenome (De Marinis et al., 2002).

Weitere Serumuntersuchungen beschäftigen sich in der Literatur eher mit anderen Tumorarten. Zur Zeit wird Serum-IGFBP2 bei den akuten Leukämien des Kindesalters untersucht. Sowohl bei der ALL als auch der AML zeigt sich IGFBP-2 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Rezidivrisiko (Vorwerk et al., 2005; Dawczynski et al., 2006).

In einer großen Fall-Kontroll-Studie aus England zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Serum-IGF-I, -II oder -IGFBP-3 und dem Krebsrisiko. Morris et al. (2006) folgern daraus, dass diese serologischen Parameter als Screening-Faktoren keine Relevanz haben, obwohl sie für einige Tumorarten ätiologisch in klarer Relation zu stehen scheinen.

## **5.8 Aktuelles zur Pathogenese von Hypophysentumoren**

Wachstumsfaktoren sind wichtig für die Pathogenese endokriner Tumoren. Zunächst bedeutet eine erhöhte Mitoserate mit folgender endokriner Hyperplasie auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit sekundärer Ereignisse in Richtung Neoplasie. Zudem sind endokrine Zellen Quellen für Wachstumsfaktoren (Low, 1993). Hypophysenadenome haben ihren Ursprung aus der unkontrollierten Proliferation einer einzelnen transformierten Zelle. Die einzigen aktivierenden Mutationen, die bisher identifiziert wurden sind gsp-Mutationen, die in eine Aktivierung des cAMP-Signalweges münden. Hypophysäre somatotrope Zellen werden positiv durch die Adenylcyclaseaktivität und die Konzentration von cAMP reguliert (Low, 1993). Bei Patienten mit McCune-Albright-Syndrom besteht eine deutlich erhöhte Inzidenz von GH-produzierenden Hypophysenadenomen, dabei liegt die Ursache in einer aktivierenden Mutation der  $\alpha$ -Untereinheit des Gs-Proteins (Saeger, 2003<sup>a</sup>).

Die Pathogenese in somatotropen Hypophysenadenomen scheint nicht auf einer reduzierten Feedback-Inhibierung von GH durch somatische Mutationen der für den



GH-Rezeptor kodierenden Region zu beruhen. Vielmehr kommt es zu einer reduzierten Expression von GH-R und IGF-R (mRNA und Protein), die zumindest teilweise erklären könnte, weshalb trotz hoher Spiegel zirkulierenden IGF-I und GH kontinuierlich GH vom Tumor sezerniert wird (Kola et al., 2003).

Ein langbestehender Morbus Addison kann zunächst über eine noduläre Hyperplasie der kortikotropen Zellen bis zu einem kortikotropen Adenom führen (Asa, 1998; Saeger, 2003<sup>a</sup>). TSH-produzierende Adenome entstehen oft nach einem langdauernden primären Hypothyreoidismus, der über eine Hypersekretion von TSH eine sekundäre Hyperplasie der pituitären thyreotropen Zellen bis hin zur Entwicklung eines Adenoms induziert (Asa, 1998).

Eine Gruppe der Wachstumsfaktoren ist durch die Bindung an transmembranöse Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität charakterisiert, dazu gehören NGF, EGF, PDGF, *fibroblast growth factor* (FGF), *hepatocyte growth factor* (HGF) und auch Insulin und IGF-I. Bei Prolaktinomen hat man eine aktive Expression des hst-Gens gefunden (FGF-Familie). FGF wirkt zudem mitogen auf laktotrope Zellen, diese Wachstumsfaktorfamilie könnte also eine Rolle in der Tumorfornation spielen (Low, 1993). Das *human pituitary tumor-transforming gene* (hPTTG) ist an der frühen Tumorgenese, als Transkriptionsaktivator und an der Tumorprogression durch Regulation des bFGF beteiligt. bFGF ist ein potenter Aktivator von Angiogenese und Mitogenese. Noch unklar ist eine mögliche Rolle von Cyclin E1 und *allelic loss* von noch unbekanntem Onkosuppressorgenen (Faglia, Spada, 2001). Vorliegende Befunde sprechen für einen veränderten VEGF- respektive VEGF-Rezeptor-Signalweg während der hypophysären Tumorgenese. PTTG-Stimulation von FGF- und VEGF-Expression könnte bei Vorhandensein hochregulierter Wachstumsfaktor-Rezeptoren zur Angiogenese und Progression hypophysärer Tumoren beitragen (McCabe et al., 2002).

Bezüglich der Pathogenese von Kraniopharyngeomen wird in mehreren Fallbeschreibungen aufgrund der histologischen Befunde eine Transformation von Basalzellen der Rathketaschenschleimhaut in ein papilläres Kraniopharyngeom (über eine squamöse Metaplasie) vermutet (Sato et al., 2006). Weiteres zur Pathogenese bleibt noch unklar.

## 5.9 GH-IGF-Achse und therapeutische Aussichten

Bezüglich der therapeutischen Strategien bei Hypophysentumoren gibt es zur Zeit noch wenig Untersuchungen. Ergebnisse bei anderen Tumorarten zeigen jedoch einen ermutigenden Einfluss auf Tumorwachstum oder Rezidiv durch Beeinflussung der GH-IGF-Achse. In Zukunft werden molekulargenetische Untersuchungen ergänzende Aussagen liefern können (Suhardja et al., 2005).

Präklinische Studien zeigen, dass sich in verschiedenen Krebsmodellen mit verschiedenen Interventionen, die IGF-I-R-Signalwege antagonisieren oder die IGFBP-3-Funktion verstärken, das Tumorzellwachstum inhibieren lässt (Jerome et al., 2003; Moschos, Mantzoros, 2002).

Beim renalen Klarzell-Ca. zeigt sich eine inverse Assoziation zwischen IGF-I-R-Expression und dem Überleben. Damit könnte der IGF-I-R eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention auf molekularer Ebene bieten (Parker et al., 2003). So inhibiert eine Blockade des IGF-I-R in Kolon-Ca.-Zellen die IGF-I-induzierte VEGF-Expression und Angiogenese sowie die Zellproliferation und damit das Tumorzellwachstum (Reinmuth et al., 2002). Lungen-Ca.-Zellen exprimieren IGF-I-R und IGF-II, welche die Zellproliferation durch autokrine Mechanismen zu stimulieren scheinen. Versuche mit *antisense oligodeoxynucleotides* (Blockade der mRNA) führten zu einer Wachstumshemmung. Ein *antisense*-Vorgehen könnte somit eine effektive Strategie der Krebs-Gentherapie darstellen (Pavelic et al., 2002).

Der IGF-II-R besitzt die Charakteristika eines Tumorsuppressorgens. Ein *loss of heterozygosity* für den IGF-II-R wird für verschiedene Krebsarten, wie Brust-Krebs, hepatozelluläres Karzinom oder Bronchial-Ca. beschrieben. Ein *allelic loss* für den IGF-II-R bei Kopf-Hals-Karzinomen ist mit einem schlechteren Outcome assoziiert (Jamieson et al., 2003). In funktionellen Studien wird durch das Einbringen exogenen Wildtyp-IGF-II-R in menschliche Kolon-Ca.-Zellen eine signifikante Verminderung der Wachstumsrate und eine Apoptoseverstärkung erzielt. Ein Verlust der IGF-II-R-Expression führt zu einem gesteigerten Karzinomwachstum durch Erhöhen des Signalweges über den IGF-I-R und den Insulinrezeptor.

Auch auf Ebene der IGFBP führen neuere Untersuchungen langsam in die Richtung therapeutischer Möglichkeiten. IGFBP-3 vermittelt durch TGF- $\beta$  induzierte Apoptose.

TNF- $\alpha$  und p53 wiederum induzieren IGFBP-3. Eine Behandlung von Prostata-Ca.-Zellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer IGFBP-3-Expression und Apoptose, die bei Ko-Behandlung mit IGFBP-3-neutralisierenden Antikörpern oder IGFBP-3-spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden verhindert wurde (Rajah et al., 2002; Ye et al., 2003). Exogenes IGFBP-3 kann in Zellkulturen des Ewings-Sarkoms dessen Wachstum inhibieren und somit möglicherweise auch ein therapeutisches Potential in Zukunft haben (Benini et al., 2006)

Interessant erscheint auch die Regulation über die IGFBP-Proteasen. In menschlichen Hypophysenadenomen fanden sich überraschend hohe Spiegel an MMP-Aktivität und niedrige Werte für den *tissue inhibitor of metalloproteinases*. Studien mit einem synthetischen MMP-Inhibitor zeigen, dass die von den hypophysären Zellen sezernierten MMP Wachstumsfaktoren freisetzen können, die an die extrazelluläre Matrix gebunden sind, und ihrerseits die hypophysäre Zellproliferation und Hormonsekretion regulieren. Eventuell wäre in diesem Bereich auch ein therapeutischer Ansatz möglich (Paez Pereda et al., 2000).

Die menschliche Hypophysenadenomzelllinie HP75 synthetisiert IL-6-mRNA und exprimiert und sezerniert IL-6 (Borg et al., 2003). In Hypophysenadenomzellkulturen wird die GH-Sekretion durch IL-6 angeregt, dabei war die stimulatorische Potenz des IL-6 entsprechend oder größer als die von GHRH (Thiele et al., 2003). Zellwachstum konnte durch Zugabe IL-6-blockierender Antikörper inhibiert werden. In Hypophysenadenomzellen scheint ein Defekt in der Kontrolle der IL-6-Sekretion vorzuliegen (Borg et al., 2003). Dexamethason inhibiert die IL-6-Sekretion deutlich. Intratumorales IL-6 könnte zu exzessiver GH-Produktion bei somatotropen Adenomen führen (Thiele et al., 2003) und damit ebenfalls einen therapeutischen Ansatz bieten.

Ulfarsson et al. (2005) untersuchten Kraniopharyngeom-Zelllinien bezüglich ihrer IGF-I-Rezeptor-Expression und ihrer IGF-I-Abhängigkeit. Diese haben eine unterschiedlich starke Ausprägung des IGF-I-R in verschiedenen Zelllinien gezeigt. Bei starker Rezeptor-Expression konnte die Behandlung mit einem IGF-I-R-Inhibitor eine Reduktion in der Phosphorylierungskaskade und damit einen Wachstums-Arrest hervorrufen, was ebenfalls einen therapeutischen Aspekt beinhalten könnte.

In den Blickpunkt geraten ist auch die Erhöhung des IGF-I-Spiegels durch eine hochkalorische Ernährung. In Tierexperimenten mindert IGF-I den inhibitorischen Effekt

einer Energierestriktion auf das Tumorwachstum (Yu, Rohan, 2000). Individuen mit einer größeren Fettmasse scheinen einen erhöhten Spiegel an freiem IGF-I zu haben, der vielleicht teilweise das beschriebene Krebsrisiko bei Adipositas vermittelt (Sandhu et al., 2004). Diätetische Faktoren, die inhibierend auf das Krebswachstum wirken, gehen mit einer Erhöhung von IGFBP-3-Serumspiegeln einher, die diese Effekte vermitteln könnten (Ali et al., 2003). Es gibt mehr und mehr Hinweise darauf, dass ein Prostata-Ca. mit erhöhten Serum-IGF-I-Spiegeln assoziiert ist. Eine Lebensführung mit regelmäßigem Sport und einer fettarmen Diät induziert Veränderungen in den Serumspiegeln der IGF-Achse: Es kommt zu einem reduzierten Serum-IGF-I und einem erhöhten IGFBP-1-Spiegel, ebenso fällt das Serum-Insulin, es scheint jedoch keine Veränderungen für IGFBP-3 zu geben. Bei Zugabe dieses Fasten-Serums zu In-vitro-Zelllinien (LNCaP) kam es zu einem verringerten Wachstum und einer verstärkten Apoptose bzw. Nekrose (Ngo et al., 2002).

## **5.10 Schlussfolgerung**

Es konnte eine spezifische immunhistochemische Anfärbung für alle 6 IGFBP in beiden Hypophysentumoren nachgewiesen werden. Interessant erscheinen dabei vor allem die perinukleäre Reaktion insbesondere für IGFBP-3, die sich am ehesten im Bereich des Golgi-Apparates lokalisiert, und die Betonung der Plasmamembran für IGFBP-5.

Anhand der durchgeführten immunhistochemischen Nachweise lässt sich jedoch kein Marker für die Rezidivwahrscheinlichkeit oder Invasivität der untersuchten Tumoren ableiten. Die berechneten Zusammenhänge zwischen Serum-IGF-I, Serum-IGFBP-3 bzw. ihrem Verhältnis zueinander (IGF-I/IGFBP-3), Hormonproduktion durch den Tumor oder der Tumorgröße lassen auf eine distinkte Rolle der IGF-Achse bezüglich Tumorformation und Tumorprogression schließen, die in ihrer Kausalität noch näher untersucht werden muss.

## **6. Zusammenfassung und abschließende Bewertung**

Die untersuchten Hypophysentumoren stellen trotz ihrer histologischen Benignität hohe Ansprüche an Therapie und weitere Betreuung des Patienten. Für die Lebensqualität sind die lokalen Tumorfolgen und das hohe Rezidivrisiko von großer Bedeutung. Die Pathogenese beider Tumoren der Sellaregion, vor allem aber des Kranio-pharyngeoms, bleibt nach wie vor in vielen Teilen ungeklärt. In diesem Zusammenhang weist die vorliegende Arbeit auf eine wichtige Bedeutung der IGFBP für das biologische Verhalten von Hypophysenadenomen und Kranio-pharyngeomen hin und bietet somit weitere Forschungsansätze.

In der vorliegenden Studie wurde der immunhistochemische Nachweis von IGFBP-1 bis -6 für das vorliegende histologische Material in der Methode optimiert und in der Folge bei 99 Hypophysenadenomen und 14 Kranio-pharyngeomen die immunhistochemische Expression der IGF-Bindeproteine untersucht. Zusätzlich wurden präoperative Serumhormonwerte, die klinische Symptomatik der Patienten und die Rezidivfolge erhoben. Eine ergänzende histologische Klassifikation der Hypophysenadenome erfolgte immunhistochemisch bezüglich ihrer Prolaktinexpression. Hervorzuheben ist die charakteristische Anfärbung für IGFBP-3 mit der globulären paranukleären Reaktion und für IGFBP-5 mit der deutlichen Membranakzentuierung. Aber auch der nukleäre Nachweis einiger IGFBP, der für IGFBP-3 und -5 schon relativ gut untersucht ist, erscheint im Sinne eines mitogenen Potentials für die Tumorpheriferation von großer Bedeutung.

Einen signifikanten prognostischen Zusammenhang ließ sich mit keinem der untersuchten Parameter herstellen.

Gerade in Bezug auf die stetig zunehmenden Erkenntnisse in der Signalkaskade der IGF-Achse scheinen sich vielseitige therapeutische Ansätze zu entwickeln. Für die Auswirkungen von IGF und seinen Bindeproteinen zeichnen sich auf zellulärer Ebene bei verschiedenen Tumorarten zumindest ähnliche Reaktionen ab. Inwieweit diese auch auf die untersuchten Hypophysentumoren zutreffen, muss näher untersucht werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Agozzino L**, Ferraraccio F, Accardo M, Esposito S, Agozzino M, Cuccurullo L: Morphological and ultrastructural findings of prognostic impact in craniopharyngiomas. *Ultrastruct Pathol* 30 (2006) 143-150
2. **Ali O**, Cohen P, Lee KW: Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule. *Horm Metab Res* 35 (2003) 726-733
3. **Allander SV**, Bajalica S, Larsson C, Luthman H, Powell DR, Stern I, Weber G, Zazzi H, Ehrenborg E: Structure and chromosomal localization of human insulin-like growth factor-binding protein genes. *Growth Regul* 3 (1993) 3-5
4. **Allander SV**, Larsson C, Ehrenborg E, Suwanichkul A, Weber G, Morris SL, Bajalica S, Kiefer MC, Luthman H, Powell DR: Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5. *J Biol Chem* 269 (1994) 10891-10898
5. **Arosio M**, Garrone S, Bruzzi P, Faglia G, Minuto F, Barreca A: Diagnostic value of the acid-labile subunit in acromegaly: Evaluation in comparison with insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein-1, -2, and -3. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 1091-1098
6. **Asa SL**: "Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Pituitary Gland". Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1998, 8-29, 37-147, 167-172
7. **Asthagiri A**, Lopes MB: Neuropathological considerations of pituitary adenomas. *Front Horm Res* 34 (2006) 206-235
8. **Bajalica S**, Allander SV, Ehrenborg E, Brondum-Nielsen K, Luthman H, Larsson C: Localization of the human insulin-like growth-factor-binding protein 4 gene to chromosomal region 17q12-21.1. *Hum Genet* 89 (1992) 234-236
9. **Baxter RC**, Martin JL: Binding proteins for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res* 1 (1989) 49-68
10. **Baxter RC**: Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 42 (1994) 140-144
11. **Benini S**, Zuntini M, Manara MC, Cohen P, Nicoletti G, Nanni P, Oh Y, Picci P, Scotlandi K: Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 119 (2006) 1039-1046

12. **Biermasz** NR, van Dulken H, Roelfsema F: Ten-year follow-up results of transsphenoidal microsurgery in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 4596-4602
13. **Borg** SA, Kerry KE, Baxter L, Royds JA, Jones TH: Expression of interleukin-6 and its effects on growth of HP75 human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 4938-4944
14. **Brabant** G: Insulin-like growth factor-I: Marker for diagnosis of acromegaly and monitoring the efficacy of treatment. *Eur J Endocrinol* 148 Suppl 2 (2003) 15-20
15. **Brown** CL: Endocrine Pathology: Pituitary. In: "Paediatric Pathology", Berry CL (Ed), Springer Verlag London, Berlin, Heidelberg, 1996, third edition, 704-709
16. **Butt** AJ, Fraley KA, Firth SM, Baxter RC: IGF-binding protein-3-induced growth inhibition and apoptosis do not require cell surface binding and nuclear translocation in human breast cancer cells. *Endocrinology* 143 (2002) 2693-2699
17. **Ciccarelli** A, Daly AF, Beckers A: The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary* 8 (2005) 3-6
18. **Clay Bunn** R, Fowlkes JL: Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* 14 (2003) 176-181
19. **Clemmons** DR: IGF binding proteins: regulation of cellular actions. *Growth regulation* 2 (1992) 80-87
20. **Colao** A, Loche S, Cappa M, Di Sarno A, Landi ML, Sarnacchiaro F, Faccioli G, Lombardi G: Prolactinomas in children and adolescents. Clinical presentation and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (1998) 2777-2780
21. **Creutzig** U, Henze G, Bielack S, Herold R, Kaatsch P, Klusmann J, Graf N, Reinhardt D, Schrappe M, Zimmermann M, Jürgens H: Krebserkrankungen bei Kindern. *Dtsch Arztebl* 100 (2003) A 842-853
22. **Czech** MP: Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59 (1989) 235-238
23. **Danielpour** D, Song K: Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 17 (2006) 59-74
24. **Daughaday** WH: Growth hormone and insulin-like growth factors. In: "Endocrinology", DeGroot LJ (Ed), W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1995, third edition, 313-314

25. **Dawczynski** K, Kauf E, Schlenvoigt D, Gruhn B, Fuchs D, Zintl F: Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 is associated with a high relapse risk after hematopoietic stem cell transplantation in childhood AML. *Bone Marrow Transplant* 37 (2006) 589-594
26. **De Marinis** L, Zuppi P, Valle D, Mancini A, Bianchi A, Lauriola L, Pasquini P, Anile C, Maira G, Giustina A: A retrospective hormonal and immunohistochemical evaluation of 47 acromegalic patients: prognostic value of preoperative plasma prolactin. *Horm Metab Res* 34 (2002) 137-143
27. **De Pagter-Holthuisen** P, Höppener JW, Jansen M, Geurts van Kessel AH, van Ommen GJ, Sussenbach JS: Chromosomal localization and preliminary characterization of the human gene encoding insulin-like growth factor II. *Hum Genet* 69 (1985) 170-173
28. **Diehl** D, Hoeflich A, Wolf E, Lahm H: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res* 64 (2004) 1600-1603
29. **Drescher** B, Lauke H, Hartmann M, Davidoff MS, Zumkeller W: Immunohistochemical pattern of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF II, and IGF binding proteins 1 to 6 in carcinoma in situ of the testis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 50 (1997) 298-303
30. **Duo** D, Gasverde S, Benech F, Zenga F, Giordana MT: MIB-1 immunoreactivity in craniopharyngiomas: A clinico-pathological analysis. *Clin Neuropathol* 22 (2003) 229-234
31. **Ehrenborg** E, Vilhelmsdotter S, Bajalica S, Larsson C, Stern I, Koch J, Brondum-Nielsen K, Luthman H: Structure and localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 176 (1991) 1250-1255
32. **Ehrenborg** E, Larsson C, Stern I, Janson M, Powell DR, Luthman H: Contiguous localization of the genes encoding human insulin-like growth factor binding proteins 1 (IGFBP1) and 3 (IGFBP3) on chromosome 7. *Genomics* 12 (1992) 497-502
33. **Ehrenborg** E, Zazzi H, Lagercrantz S, Granqvist M, Hillerbrand U, Allander SV, Larsson C, Luthman H: Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mammalian Genome* 10 (1999) 376-380



34. **Faglia G**, Spada A: Genesis of pituitary adenomas: state of the art. *J Neurooncol* 54 (2001) 95-110
35. **Feldkamp J**, Scherbaum WA: Wachstumshormon-Substitution nach Exstirpation eines Kraniopharyngeoms. *Dtsch Med Wochenschr* 122 (1997) 1298-1299
36. **Feldkamp J**, Santen R, Harms E, Aulich A, Modder U, Scherbaum WA: Incidentally discovered pituitary lesions: High frequency of macroadenomas and hormone-secreting adenomas - results of a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51 (1999) 109-113
37. **Ferry Jr. RJ**, Katz LEL, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA: Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res* 31 (1999<sup>a</sup>) 192-202
38. **Ferry Jr. RJ**, Cerri RW, Cohen P: Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. *Horm Res* 51 (1999<sup>b</sup>) 53-67
39. **Freda PU**, Wardlaw SL, Post KD: Long-term endocrinological follow-up evaluation in 115 patients who underwent transsphenoidal surgery for acromegaly. *J Neurosurg* 89 (1998) 353-358
40. **Fukui S**, Otani N, Nawashiro H, Yano A, Miyazawa T, Ohnuki A, Tsuzuki N, Katoh H, Ishihara S, Suzuki T, Shima K: Nuclear accumulation of basic fibroblast growth factor as a predictor for the recurrence of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 57 (2002) 221-229
41. **Fürstenberger G**, Senn HJ: Insulin-like growth factor and cancer. *Lancet Oncol* 3 (2002) 298-302
42. **Giovannucci E**: Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res* 51 Suppl 3 (1999) 34-41
43. **Grimberg A**, Cohen P: Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183 (2000) 1-9
44. **Hankinson SE**, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351 (1998) 1393-1396
45. **Harris PE**, Perry L, Chard T, Chaudry L, Cooke BA, Touzel R, Coates P, Lowe DG, Afshar F, Wass JA et al.: Immunoreactive human chorionic gonadotrophin from the cyst fluid and CSF of patients with craniopharyngioma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 29 (1988) 503-508

46. **Hashimoto** K, Nagano I, Asaba K, Inoue M, Nishioka T, Takao T, Nakajo T, Mori T, Kurisaka M, Otsuka F: Significant gene expression of insulin-like growth factor II and proliferating cell nuclear antigen in a rapidly growing recurrent pituitary acth-secreting adenoma. *Horm Res* 54 (2000) 198-202
47. **Holly** J: Insulin-like growth factor-I and new opportunities for cancer prevention. *Lancet* 351 (1998) 1373-1374
48. **Honegger** J, Mann K, Thierauf P, Zrinzo A, Fahlbusch R: Human chorionic gonadotrophin immunoactivity in cystic intracranial tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42 (1995) 235-241
49. **Hong** J, Zhang G, Dong F, Rechler MM: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 10489-10497
50. **Höppener** JW, de Pagter-Holthuizen P, Geurts van Kessel AH, Jansen M, Kittur SD, Antonarakis SE, Lips CJ, Sussenbach JS: The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum Gen* 69 (1985) 157-160
51. **Horvath** E, Kovacs K: Anatomy and histology of the normal and abnormal pituitary gland. In: "Endocrinology", DeGroot, LJ (Ed), W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1995, third edition, 165-175
52. **Izumoto** S, Suzuki T, Kinoshita M, Hashiba T, Kagawa N, Wada K, Fujimoto Y, Hashimoto N, Saitoh Y, Maruno M, Yoshimine T: Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in craniopharyngiomas: correlation with clinical and histologic features. *Surg Neurol* 63 (2005) 520-525
53. **Jamieson** TA, Brizel AM, Killian JK, Oka Y, Jang HS, Fu X, Clough RW, Vollmer RT, Anscher MS, Jirtle RL: M6P/ IGF2R loss of heterozygosity in head and neck cancer associated with poor patient prognosis. *BMC Cancer* (2003) 3:4
54. **Jaques** G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K: Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 138 (1997) 1767-1770
55. **Jerome** L, Shiry L, Leyland-Jones B: Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocr Relat Cancer* 10 (2003) 561-578

56. **Jones** JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16 (1995) 3-34
57. **Kayaselcuk** F, Zorludemir S, Gümürdülü D, Zeren H, Erman T: PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: Correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol* 57 (2002) 115-121
58. **Kiess** W, Thomas CL, Sklar MM, Nissley SP: Beta-galactosidase decreases the binding affinity of the insulin-like-growth-factor-II/ mannose-6-phosphate receptor for insulin-like-growth-factor II. *Eur J Biochem* 190 (1990) 71-77
59. **Kim** SK, Wang KC, Shin SH, Choe G, Chi JG, Cho BK: Radical exzision of pediatric craniopharyngioma: recurrence pattern and prognostic factors. *Childs Nerv Syst* 17 (2001) 531-536
60. **Knosp** E, Kitz K, Perneczky A: Proliferation activity in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery* 25 (1989) 927-930
61. **Kola** B, Korbonits M, Diaz-Cano S, Kaltsas G, Morris DG, Jordan S, Metherell L, Powell M, Czirjak S, Arnaldi G, Bustin S, Boscaro M, Mantero F, Grossman AB: Reduced expression of the growth hormone and type 1 insulin-like growth factor receptors in human somatotroph tumours and an analysis of possible mutations of the growth hormone receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59 (2003) 328-338
62. **Krieger** MD, Couldwell WT, Weiss MH: Assessment of long-term remission of acromegaly following surgery. *J Neurosurg* 98 (2003) 719-724
63. **Kristopaitis** T, Thomas C, Petruzzelli GJ, Lee JM: Malignant craniopharyngioma. *Arch Pathol Lab Med* 124 (2000) 1356-1360
64. **Kurbel** S, Zucic D, Kurbel B, Gulam D, Gmajnic R, Krajina Z: Inertia of endocrine systems due to hormone binding to circulatory proteins. *Med Hypotheses* 60 (2003) 430-438
65. **Kurosaki** M, Saeger W, Lüdecke DK: Immunohistochemical localisation of cytokeratins in craniopharyngioma. *Acta Neurochir (Wien)* 143 (2001)147-151
66. **Lafferty** AR, Chrousos GP: Pituitary tumors in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999) 4317-4323
67. **Laureys** G, Barton DE, Ullrich A, Francke U: Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics* 3 (1988) 224-229

68. **Leung** KC, Ho KK: Measurement of growth hormone, insulin-like growth factor I and their binding proteins: the clinical aspects. *Clin Chim Acta* 313 (2001) 119-123
69. **Li** W, Fawcett J, Widmer HR, Fielder PJ, Rabkin R, Keller GA: Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138 (1997) 1763-1766
70. **Lopez-Bermejo** A, Koshravi J, Corless CL, Krishna RG, Diamandi A, Bodani U, Kofoed EM, Graham DL, Hwa V, Rosenfeld RG: Generation of anti-insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1/MAC 25) monoclonal antibodies and immunoassay: quantification of IGFBP-rP1 in human serum and distribution in human fluids and tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 3401-3408
71. **Low** MJ: Growth factors in the pathogenesis of endocrine tumors. In: "Endocrine tumors", Mazzaferri EL, Samaan NA (Eds), Blackwell Scientific Publications, Boston, 1993, 15-24
72. **Lukanova** A, Lundin E, Micheli A, Akhmedkhanov A, Rinaldi S, Muti P, Lenner P, Biessy C, Krogh V, Riboli E, Hallmans G, Berrino F, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P, Kaaks R: Risk of ovarian cancer in relation to prediagnostic levels of C-peptide, insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 (USA, Sweden, Italy). *Cancer Causes Control* 14 (2003) 285-292
73. **Machado** AL, Nomikos P, Kiesewetter F, Fahlbusch R, Buchfelder M: DNA-flow cytometry of 207 pituitary adenomas: ploidy, proliferation, and prognosis. *J Endocrinol Invest* 28 (2005) 795-801
74. **McCabe** CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJL: Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Fik-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 4238-4244
75. **McCusker** RH, Clemmons DR: The insulin-like growth factor binding proteins: structure and biological functions. In: "The insulin-like growth factors – structure and biological functions", Schofield, P. N. (Ed), Oxford medical publications, Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1992, 110-150
76. **Melmed** S: Tumor mass effects of lesions in the hypothalamus and pituitary. In: "Endocrinology", DeGroot, LJ (Ed), W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1995, third edition, 462-463

77. **Mishra S**, Murphy LJ: Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 by breast cancer cell membranes enhances IGF-I binding. *Endocrinology* 144 (2003) 4042-4050
78. **Miyamoto S**, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A: Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res* 64 (2004) 665-671
79. **Mohan S**, Baylink DJ: IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol* 175 (2002) 19-31
80. **Moore MG**, Wetterau LA, Francis MJ, Peehl DM, Cohen P: Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 105 (2003) 14-19
81. **Morris JK**, George LM, Wu T, Wald NJ: Insulin-like growth factors and cancer: no role in screening. Evidence from the BUPA study and meta-analysis of prospective epidemiological studies. *Br J Cancer* 95 (2006) 112-117
82. **Morton CC**, Byers, MG, Nakai H, Bell GI, Shows TB: Human genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor are located on 12q22-q24.1, 11p15, and 4q25-q27, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 41 (1986) 245-249
83. **Moschos SJ**, Mantzoros CS: The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63 (2002) 317-332
84. **Moxham CP**, Jacobs S: Insulin/ IGF-I receptor hybrids: a mechanism for increasing receptor diversity. *J Cell Biochem* 48 (1992) 136-140
85. **Müller HL**, Sörensen N: "KRANIOPHARYNGEOM 2000 - Multizentrische, prospektive Beobachtungsstudie von Kindern und Jugendlichen mit Kraniopharyngeom". Verlag Isensee, Oldenburg, 2001
86. **Müller HL**, Kaatsch P, Warmuth-Metz M, Flentje M, Sörensen N: Kraniopharyngeom im Kindes- und Jugendalter. Diagnostische und therapeutische Strategien. *Monatsschr Kinderheilkd* 151 (2003) 1056-1063
87. **Müller HL**, Sörensen N (2006<sup>a</sup>) Kraniopharyngeom im Kinder- und Jugendalter - Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien (<http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/025-026.htm>) Stand: März 2006

88. **Müller** HL, Sörensen N: Kraniopharyngeom im Kindes- und Jugendalter. Perspektiven in Diagnostik, Therapie und Nachsorge durch interdisziplinäre und multizentrische Kooperation. Dtsch Arztebl 103 (2006<sup>b</sup>) A 2634-2640
89. **Ngo** TH, Barnard RJ, Tymchuk CN, Cohen P, Aronson WJ: Effect of diet and exercise on serum insulin, IGF-I and IGFBP-1 levels and growth of LNCaP cells in vitro (United States). Cancer Causes Control 13 (2002) 929-935
90. **Niu** DM, Guo WY, Pan HC, Wong TT: Rapid enlargement of a residual craniopharyngioma during short-term growth hormone replacement. Childs Nerv Syst 18 (2002) 164-165
91. **Nomikos** P, Buchfelder M, Fahlbusch R: The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure'. Eur J Endocrinol 152 (2005) 379-387
92. **Ocrant** I, Valentino KL, Hoffman AR, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG: Structural characterization and immunohistochemical localization of receptors for insulin-like growth factor II in the rat pituitary gland. Neuroendocrinology 49 (1989) 248-254
93. **Oskouian** RJ, Samii A, Laws ER: The craniopharyngioma. Front Horm Res 34 (2006) 105-126
94. **Paez Pereda** M, Ledda MF, Goldberg V, Chervin A, Carrizo G, Molina H, Müller A, Renner U, Podhajcer O, Arzt E, Stalla GK: High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. J Clin Endocrinol Metab 85 (2000) 263-269
95. **Pan** J, Qi ST, Deng YJ, Ding YQ, Peng L, Li XQ: Expression of proliferating cell nuclear antigen in craniopharyngioma and tumor recurrence. Di Yi Jun Da Xue Xue Bao 22 (2002) 363-365
96. **Parker** A, Cheville JC, Lohse C, Cerhan JR, Blute ML: Expression of insulin-like growth factor I receptor and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. J Urol 170 (2003) 420-424
97. **Pavelic** J, Pavelic L, Karadza J, Krizanac S, Unesic J, Spaventi S, Pavelic K: Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma. Mol Med 8 (2002) 149-157
98. **Pedreira** CC, Stargatt R, Maroulis H, Rosenfeld J, Maixner W, Warne GL, Zacharin MR: Health related quality of life and psychological outcome in

- patients treated for craniopharyngioma in childhood. *J Pediatr Endocrinol* 19 (2006) 15-24
99. **Petersenn S**, Lüdecke D, Fahlbusch R, Renner U, Buchfelder M, Wowra B, Saeger W: Therapie von Hypophysentumoren. *Dtsch Arztebl* 103 (2006) A 474-481
100. **Pizarro CB**, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP: Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Braz J Med Biol Res* 37 (2004) 235-243
101. **Prevedello DM**, Jagannathan J, Jane JA Jr, Lopes MB, Laws ER Jr: Relevance of high Ki-67 in pituitary adenomas. Case report and review of the literature. *Neurosurg Focus* 19 (2005) E11
102. **Raghavan R**, Dickey WT Jr, Margraf LR, White CL 3<sup>rd</sup>, Coimbra C, Hynan LS, Rushing EJ: Proliferative activity in craniopharyngiomas: Clinicopathological correlations in adults and children. *Surg Neurol* 54 (2000) 241-217
103. **Rajah R**, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 6, 2-4 (1995) 273-284
104. **Rajah R**, Lee KW, Cohen P: Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis: role of bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth Differ* 13 (2002) 163-171
105. **Rashidi M**, Da Silva VR, Minagar A, Rutka JT: Nonmalignant pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3 (2003) 200-205
106. **Reinmuth N**, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmad SA, Stoeltzing O, Bucana CD, Radinsky R, Ellis LM: Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 3259-3269
107. **Richardson E**, Ukkonen T, Bjornsen T, Mortensen E, Egevad L, Busch C: Overexpression of IGFBP2 is a marker for malignant transformation in prostate epithelium. *Virchows Arch* 442 (2003) 329-335
108. **Roberts AJ**, Funston RN, Moss GE: Insulin-like growth factor binding proteins in the bovine anterior pituitary. *Endocrine* 14 (2001) 399-406
109. **Röcken C**, Uhlig H, Saeger W, Linke RP, Fehr S: Amyloid deposits in pituitaries and pituitary adenomas: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Endocr Pathol* 6 (1995) 135-143

110. **Rosenfeld** RG, Hwa V, Wilson L, Lopez-Bermejo A, Buckway C, Burren C, Choi WK, Devi G, Ingermann A, Graham D, Minniti G, Spagnoli A, Oh Y: The insulin-like growth factor binding protein superfamily: new perspectives. *Pediatrics* 104 (1999) 1018-1020
111. **Ross** DA, Wilson CB: Results of transsphenoidal microsurgery for growth hormone-secreting pituitary adenoma in a series of 214 patients. *J Neurosurg* 68 (1988) 854-867
112. **Russell** WE, Van Wyk JJ: Peptide growth factors. In: "Endocrinology", DeGroot, LJ (Ed), W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1995, third edition, 2590-2600
113. **Saeger** W, Schröder S, Klöppel G: Pathologie wichtiger Erkrankungen endokriner Organe (Schilddrüse ausgenommen). *Pathologe* 22 (2001) 296-309
114. **Saeger** W: Raumfordernde Prozesse der Sellaregion unter besonderer Berücksichtigung tumorähnlicher Läsionen. *Pathologe* 24 (2003<sup>a</sup>) 247-254
115. **Saeger** W: Hypophysentumoren. *Pathologe* 24 (2003<sup>b</sup>) 255-264
116. **Saeger** W, Wilczak W, Lüdecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R: Hormone markers in pituitary adenomas: changes within last decade resulting from improved method. *Endocr Pathol* 14 (2003) 49-54
117. **Saeger** W: Proliferation markers and cell cycle inhibitors in pituitary adenomas. *Front Horm Res* 32 (2004) 110-126
118. **Saeger** W: Pituitary tumors: prognostic indicators. *Endocrine* 28 (2005) 57-66
119. **Sandhu** MS, Gibson JM, Heald AH, Dunger DB, Wareham NJ: Association between insulin-like growth factor-I: insulin-like growth factor-binding protein-1 ratio and metabolic and anthropometric factors in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 (2004) 166-170
120. **Sara**, VR: The role of the insulin-like growth factors in the nervous system. In: "The insulin-like growth factors – structure and biological functions", Schofield, P. N. (Ed), Oxford medical publications, Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1992, 258-279
121. **Sato** K, Oka H, Utsuki S, Kondo K, Kurata A, Fujii K: Ciliated craniopharyngioma may arise from Rathke cleft cyst. *Clin Neuropathol* 25 (2006) 25-28



122. **Schedlich** LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC: Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273 (1998) 18347-18352
123. **Schedlich** LJ, Nilsen T, John AP, Jans DA, Baxter RC: Phosphorylation of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid-dependent protein kinase reduces ligand binding and enhances nuclear accumulation. *Endocrinology* 144 (2003) 1984-1993
124. **Schofield**, PN, Engstrom W: Insulin-like growth factors in human cancer. In: "The insulin-like growth factors – structure and biological functions", Schofield, P. N. (Ed), Oxford medical publications, Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1992, 240-257
125. **Schreiber** S, Saeger W, Lüdecke DK: Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. *Pituitary* 1 (1999) 213-220
126. **Shimasaki** S, Ling N: Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3 (1991) 243-266
127. **Stoffel-Wagner** B, Stöger P, Klingmüller D: Erstsymptome und Anamnesezeiten bei 517 Patienten mit Hypophysenadenomen. *Dtsch Med Wochenschr* 122 (1997) 213-219
128. **Strange** KS, Wilkinson D, Emerman JT: Mitogenic properties of insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and epidermal growth factor on human breast epithelial cells in primary culture. *Breast Cancer Res Treat* 75 (2002) 203-212
129. **Suhardja** A, Kovacs K, Greenberg O, Scheithauer BW, Lloyd RV: Prognostic indicators in pituitary tumors. *Endocr Pathol* 16 (2005)1-9
130. **Tena-Suck** ML, Salinas-Lara C, Arce-Arellano RI, Rembao-Bojorquez D, Morales-Espinosa D, Sotelo J, Arrieta O: Clinico-pathological and immunohistochemical characteristics associated to recurrence/ regrowth of craniopharyngiomas. *Clin Neurol Neurosurg* 108 (2006) 661-669
131. **Thapar** K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefanescu L, Horvath E, Pernicorne PJ, Murray D, Laws ER Jr: Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery* 38 (1996) 99-106

132. **Thiele** JO, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Stummer W, Losa M, Lange M, Tichomirowa M, Arzt E, Stalla GK, Renner U: Functional in vitro studies on the role and regulation of interleukin-6 in human somatotroph pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 149 (2003) 455-461
133. **Tricoli** JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB: Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* 310 (1984) 784-786
134. **Ulfarsson** E, Karstrom A, Yin S, Girnita A, Vasilcanu D, Thoren M, Kratz G, Hillman J, Axelson M, Larsson O, Girnita L: Expression and growth dependency of the insulin-like growth factor I receptor in craniopharyngioma cells: a novel therapeutic approach. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 4674-4680
135. **Van Effenterre** R, Boch AL: Craniopharyngioma in adults and children: a study of 122 surgical cases. *J Neurosurg* 97 (2002) 3-11
136. **Van Kleffens** M, Groffen CAH, Dits NFJ, Lindenbergh-Kortleve DJ, Schuller AGP, Bradshaw SL, Pintar JE, Zwarthoff EC, Drop SLS, van Neck JW: Generation of antisera to mouse insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-1 to -6: Comparison of IGFBP protein and messenger ribonucleic acid localization in the mouse embryo. *Endocrinology* 140 (1999) 5944-5952
137. **Van Lindert** E, Hey O, Boecher-Schwarz H, Perneczky A: Treatment results of acromegaly as analyzed by different criteria. *Acta Neurochir (Wien)* 139 (1997) 905-912
138. **Vidal** S, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV: Angiogenesis and the growth potential of craniopharyngiomas. *Endocr Pathol* 16 (2005) 219-228
139. **Vorwerk** P, Mohnike K, Wex H, Rohl FW, Zimmermann M, Blum WF, Mittler U: Insulin-like growth factor binding protein-2 at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia and the prediction of relapse risk. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2005) 3022-3027
140. **Wraight** CJ, Liepe IJ, White PJ, Hibbs AR, Werther GA: Intranuclear localization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) during cell division in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 239-242
141. **Xu** Q, Yan B, Li S, Duan C: Fibronectin binds insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) -5 and abolishes its ligand-dependent action on cell migration. *J Biol Chem* 279 (2003) 4269-4277

142. **Ye P**, Price W, Kassiotis G, Kollias G, D'Ercole, AJ: Tumor necrosis factor-alpha regulation of insulin-like growth factor-I, type 1 IGF receptor and IGF binding protein expression in cerebellum of transgenic mice. *J Neurosci Res* 71 (2003) 721-731
143. **Yokoyama S**, Thapar K, Kovacs K, Stefaneanu L: Localization of insulin-like growth factor-II mRNA in human pituitary adenomas. *Virchows Arch* 432 (1998) 241-246
144. **Yu H**, Rohan T: Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 1472-1489
145. **Zapf J**: Total and free IGF serum levels. *Eur J Endocrinol* 136 (1997) 146-147
146. **Zumkeller W**, Sääf M, Rähn T: Insulin-like growth factors and IGF binding proteins in cyst fluid from patients with craniopharyngioma prior to intracavitary irradiation with <sup>90</sup>Yttrium and thereafter. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 49 (1996) M51-M56

## 8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit hat auf ihrem Weg vom Dachboden bzw. Keller der Pathologie bis zur Fertigstellung viele Stationen durchlebt. Entsprechend gibt es viele Personen, die mich auf verschiedene Weise unterstützt und begleitet haben und ich möchte mich bei allen recht herzlich für die Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. S. Burdach für die gute Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die freundliche Überlassung des Themas,

Herrn Prof. Dr. med. habil. H.-J. Holzhausen, Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg, für die wertvollen Anregungen und das Durchhaltevermögen bei der sich schwierig gestaltenden Methodenfindung und für seine Hilfe bei der Mikroskopie und bei der Diskussion des Themas,

Herrn PD Dr. med. N. Rainov, Universitätsklinik und Poliklinik für Neurochirurgie der MLU Halle-Wittenberg, für die freundliche Überlassung der klinischen Daten,

Herrn Dr. med. U. Krause, Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg, für seine stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung, seine engagierte Betreuung und zahlreichen Ratschläge,

Frau G. Bauer für ihre Unterstützung bei der immunhistochemischen Anfärbung der histologischen Schnitte,

meiner Kollegin und Freundin Frau Dr. med. A. Kehl für die kritische Durchsicht der Arbeit,

Frau Dr. med. D. Memis und Herrn Dr. med. S. Brunnberg für ihre hilfreichen Tipps, meinem Bruder Herrn I. Abels u. a. für seine stets rasche und kompetente Problemlösung von EDV-Krisen

und nicht zuletzt besonders meinen Eltern Herrn K.-H. Abels und Frau C. Abels für ihre liebevolle Geduld und stetige Motivation.