

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Roden

**Komplikationen einer adrenalen Steroidbiosynthesestörung auf
die Funktion bzw. Morphologie der Gonaden sowie
Expressionsmuster von Melanocortinrezeptoren auf
steroidogenem Gewebe**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Theresa Kempkes

(2013)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Willenberg

Korreferent: Prof. Dr. Baldus

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Lachenmayer A, Lichtenauer UD, Cox T, Schott M, Malendowicz LK, Goretzki PE, Cupisti K, Scherbaum WA, Bornstein SR, Willenberg HS. Nestin as a marker in the classification of adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2009 May;41(5):397-401. Epub 2009 Mar 17.

Poster im Rahmen der 14. Jahrestagung der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie, 23. und 24. Januar 2009 in Düsseldorf
Characterization of Leydig-Zell-Hyperplasia and adrenocortical cells using anti-melanocortin receptor antibodies
Theresa Cox, Rainer Engers, Tuğrul Tiryaki, Matthias Schott, Werner A. Scherbaum, Holger S. Willenberg

Zusammenfassung

Es gibt eine hohe Prävalenz für Testikuläre adrenale Resttumore (TART) bei männlichen Patienten, die an einem Adrenogenitalen Syndrom (AGS) erkrankt sind. Bislang wurden überwiegend bildgebende Verfahren benutzt, diese Tumore zu charakterisieren.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den TARTs um aberrantes Nebennierengewebe handelt und die Tumore in vielen Fällen sensibel auf eine Therapie mit Glukokortikoiden reagieren, stellen wir die Hypothese auf, dass die Zellen der TARTs den Melanocortin-2-Rezeptor exprimieren, so wie es von gewöhnlichem Nebennierenrindengewebe bekannt ist.

Mittels dieser Hypothese war es nun das Ziel der Arbeit, TARTs immunhistochemisch von Leydigzellhyperplasien (LZH) zu differenzieren, was in der Klinik für die betroffenen Patienten von erheblicher Relevanz ist.

Zu diesem Zwecke wurde die Expression der Melanocortin-Rezeptoren 1 bis 5 sowie des Cortisol-Rezeptors auf Nebennieren, TARTs sowie LZH mittels der *Labelled StreptAvidin-Biotin-Peroxidase*-Methode untersucht.

Es zeigten sich positive Färbungen für die Melanocortin-2-Rezeptor-Antikörper auf den Nebennieren sowie den TARTs, aber negative Resultate auf den LZH. Interessanterweise fand sich der Melanocortin-4-Rezeptor Antikörper lediglich auf den Nebennieren und erbrachte negative Resultate im Bereich der TARTs und LZH. Die Färbungen mittels Cortisol Antikörper waren unglücklicherweise ubiquitär unspezifisch und zur weiteren Differenzierung nicht zu gebrauchen.

Daraus schließen wir, dass zukünftig mittels immunhistochemischer Methoden die Differenzierung zwischen LZH und TART gelingen kann und sich die Männer gegebenenfalls infertilisierenden operativen Maßnahmen entziehen können.

Die Ergebnisse der Melanocortin-4-Rezeptor Expression sind interessant und sollten sich weiteren Studien unterziehen.

Weiterführend wird im Rahmen der Arbeit auch eine typische Komplikation des AGS für weibliche Patientinnen beschrieben. Deren Fertilitätsrate ist gemeinhin als niedrig bekannt, und wir beschreiben den Fall einer Patientin mit einem Compound heterozygoten 21-Hydroxylase Mangel sowie einem zudem bestehenden Morbus Basedow, die nach erfolgreicher medikamentöser endokrinologischer Intervention auf natürlichem Wege schwanger werden konnte.

Abkürzungsverzeichnis

α-MSH	Alpha-Melanocyten-stimulierendes Hormon	hNN	Humane Normale Nebennieren
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	HSL	Hormon sensitive Lipase
AGS	Adrenogenitales Syndrom	LH	Luteinisierendes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat	LZH	Leydigzellhyperplasie
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
β-MSH	Beta-Melanocyten-stimulierendes Hormon	MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
BMI	Body-Mass-Index $\frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße}^2(\text{m})}$	MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor
bzw.	Beziehungsweise	MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
CAH	Congenital adrenal hyperplasia	MC5R	Melanocortin-5-Rezeptor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
CRH	Corticotropin releasing Hormone	PBS	Phosphate Buffered Saline
DHEA	Dihydroepiandrostenion	PCO	Polycystische Ovarien
DNA	Desoxyribonukleinsäure	POMC	Proopiomelanocortin
EtOH	Ethanol	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
FSH	Follikel stimulierendes Hormon	RNA	Ribonukleinsäure
γ-MSH	Gamma-Melanocyten-stimulierendes Hormon	TART	Testikulärer adrenaler Resttumor
HLA	Human Leucocyte Antigen	Tg-Ak	Thyreoglobulin Antikörper
		TPO-Ak	Thyreoperoxidase Antikörper
		TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
		z.B.	zum Beispiel

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	
1 EINLEITUNG	1
1.1 Entwicklung der Nebenniere	1
1.2 Das Adrenogenitale Syndrom	2
1.2.1 Enzymdefekte	6
1.2.2 Komplikation beim Mann, Der Testikuläre adrenale Resttumor	12
1.2.3 Komplikation bei der Frau, reduzierte Fertilität	13
1.3 Melanocortin-Rezeptoren und ihre Bindungsproteine	15
1.3.1 Allgemeines	15
1.3.2 Der Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R)	16
1.3.3 Der Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R)	16
1.3.4 Der Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R)	17
1.3.5 Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)	17
1.3.6 Der Melanocortin-5-Rezeptor (MC5R)	17
2. ZIELE DER ARBEIT	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Histologisches Gewebe	19
3.2 Angewendete Antikörper	20
3.3 Histologie und Immunhistochemie	20
3.3.1 Beschreibung des Färbevorgangs	21
3.3.2 Verdünnung der Antikörper	23
3.3.3 Negativkontrollen	23
4. ERGEBNISSE	24
5. DISKUSSION	29
6. LITERATURVERZEICHNIS	42
7. DANKSAGUNG	
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	

1. Einleitung

1.1 Entwicklung der Nebenniere

Die Nebenniere ist ein zur Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen unverzichtbares endokrinologisches Organ. Die Nebennieren sind paarig angelegt und finden sich beidseits am kranialen Pol der Nieren. Die *Arteriae suprarenales superior, media* und *inferior* sichern die arterielle Durchblutung des Organs.

Die Nebennieren gliedern sich in Mark und Rinde. Zunächst entwickelt sich in der Embryonalperiode die Rinde. Sie geht aus einer Verdickung des *Zölomepithels* in Nachbarschaft der Gonadenanlagen hervor. Die Nebennierenrinde ist in drei Schichten gegliedert: außen findet sich die Kapsel, nach innen hin folgen die *Zona glomerulosa*, die *Zona fasciculata* sowie die *Zona reticularis*.

In der *Zona glomerulosa* werden hauptsächlich Mineralokortikoide gebildet, mit dem Aldosteron als Hauptvertreter, welche den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers maßgeblich regulieren. Im Bereich der *Zona fasciculata* findet die Bildung der Glukokortikoide statt, in der inneren *Zona reticularis* die Bildung von Geschlechtshormonen bzw. deren Vorläufer.

Die Funktionen der Nebenniere sind vielfältig, so dass es angepasst an die Beanspruchung auch zu einer Veränderung der Schichtendicken kommt. So zum Beispiel ist die fetale Nebennierenrinde am Breitesten. Postnatal kommt es zu einer Rindeninvolution, die *Zona fasciculata* ist bis zur Pubertät anschließend am Breitesten (1).

Das Mark bildet den zentralen Teil der Nebenniere. Es entwickelt sich aus dem *Neuroektoderm*. Die chromaffinen Zellen bilden Adrenalin und Noradrenalin und sind ein Teil des sympathischen Nervensystems (1)

Nebennieren und Gonaden entwickeln sich in enger Nachbarschaft zueinander. Kommt es zu einer unvollständigen Teilung dieser Gewebe, welche etwa in der achten Schwangerschaftswoche vollzogen wird, so kann es dazu kommen, dass im Rahmen der männlichen genitalen Entwicklung

Nebennierenrindengewebe mit den Leydigzellen kaudalwärts wandert (2). Dieser Umstand ist für diese Arbeit von zentraler Bedeutung.

Die Funktion der Nebennierenrinde wird über zwei Regelkreise gesteuert. Zum einen über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse. Hier stimuliert das hypothalamisch synthetisierte *Corticotropin-releasing hormone* (CRH) die Bildung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) im Hypophysenvorderlappen. Das ACTH stimuliert die Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde, wobei die Glukokortikoide über eine negative Feedbackschleife die CRH- bzw. ACTH-Sekretion supprimieren (3). Die Rezeptoren, an denen das ACTH bindet sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Vor allem die Synthese von Mineralokortikoiden ist für die Einbettung der Nebenniere in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von großer Bedeutung. Renin prozessiert als renal sezernierte Peptidase aus dem hepatisch synthetisierten Angiotensinogen das Angiotensin I. Anschließend werden durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* zwei weitere Aminosäuren abgespalten, so dass das Angiotensin II entsteht. Dieses Hormon stimuliert nach Bindung an seinen Typ 1 Rezeptor (AT1R) in der *Zona glomerulosa* die Synthese von Corticosteron und Aldosteron. Auch hier existiert ein negativer Feedback-Mechanismus: über die Natriumretention und die in der Folge entstehende Hypervolämie wird eine weitere Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere blockiert (3).

Die Synthese der Androgene in der *Zona reticularis* erfolgt ebenfalls in Abhängigkeit von ACTH. Allerdings besteht hier kein negativer Feedbackmechanismus wie bei den anderen beiden Pfaden beschrieben. In Bezug auf die Androgene erfolgt die weiterführende Modulation über die Gonadotropine (4).

1.2 Das Adrenogenitale Syndrom

Beim Adrenogenitalen Syndrom (AGS) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Störung der Biosynthese von Cortisol in der Nebennierenrinde, die ihren Ursprung in verschiedenen Enzym- und Coenzymdefekten hat.

Mit über 90% ist die häufigste Ursache für ein AGS ein 21-Hydroxylase-Defekt. Dieser Enzymdefekt wurde 1963 von Bongiovanni *et al.* ausführlich beschrieben

(5). Der zweithäufigste angeborene Enzymdefekt der Nebennierenrinde ist mit etwa 5 % der 11 β -Hydroxylase-Defekt. Die biochemische Beschreibung erfolgte im Jahr 1956 (6). Seltenerer Störungen wie der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel bilden die Ausnahme. Biochemisch charakterisiert wurde er im Jahre 1962 (7). Die verminderte 17 α -Hydroxylierung infolge des 17 α -Hydroxylase Mangels wurde 1966 beschrieben und ist sehr selten (8).

Die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase bedient verschiedene Enzyme der Steroidbiosynthese mit Elektronen von NADPH. Ein Mangel der Oxidoreduktase führt zu heterogenen Krankheitsbildern. Eine ausführliche Beschreibung dessen wurde 2006 veröffentlicht (9).

Den verschiedenen Formen des AGS ist gemeinsam, dass durch eine Einschränkung der Enzymaktivität in der Nebennierenrinde oder bei der Bereitstellung von Cortisol zu wenig Glukokortikoid entsteht. Der Mangel an glukokortikoiden Steroidhormonen resultiert in einer Enthemmung der ACTH-Sekretion, welche ihrerseits zur Stimulation der Hormonsynthese in der Nebennierenrinde und somit zur Akkumulation (bzw. beim 17 α -Hydroxylasedefekt zur ausbleibenden Bildung) der gonadal wirksamen Steroidvorstufen vor dem Block sowie zum Ausweichen der Steroidogenese in andere Synthesepfade führt. Die Dauerstimulation durch ACTH hat außerdem eine Hyperplasie der Nebennierenrinde zur Folge, die englische Bezeichnung für diese Krankheit ist deshalb *Congenital adrenal hyperplasia* (CAH) (10).

In Abhängigkeit von Art und Ausmaß der Enzymstörung, unterscheidet man AGS-Formen mit oder ohne Salzverlust, Formen mit Hyperandrogenämie oder Hypogonadismus bzw. Formen mit oder ohne Mineralokortikoidexzess-Hypertonie. Zur Entwicklung klinisch relevanter Virilisierungserscheinungen können der 21-Hydroxylase-, der 11 β -Hydroxylase- und der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Defekt führen (11), zur Mineralokortikoidexzess-Hypertonie der 11 β -Hydroxylase- und der 17 α -Hydroxylase-Defekt. Die lebensgefährlichen Salzverlust-Krisen werden durch bestimmte Formen des 21-Hydroxylase- und des 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Defektes verursacht.

In der Folge des Enzymmangels z.B. beim 21-Hydroxylasedefekt treten vermehrt Vorstufen auf, die über andere Stoffwechselwege weiter metabolisiert werden können, und so führen überproduzierte Androgene zur Virilisierung der weiblichen Genitalorgane und zu einem übermäßig frühen sowie schnellen

Längenwachstum mit allerdings vorzeitigem Schluss der Epiphysenfugen, so dass daraus im Erwachsenenalter bei unbehandelten Patienten ein vermindertes Längenwachstum resultiert.

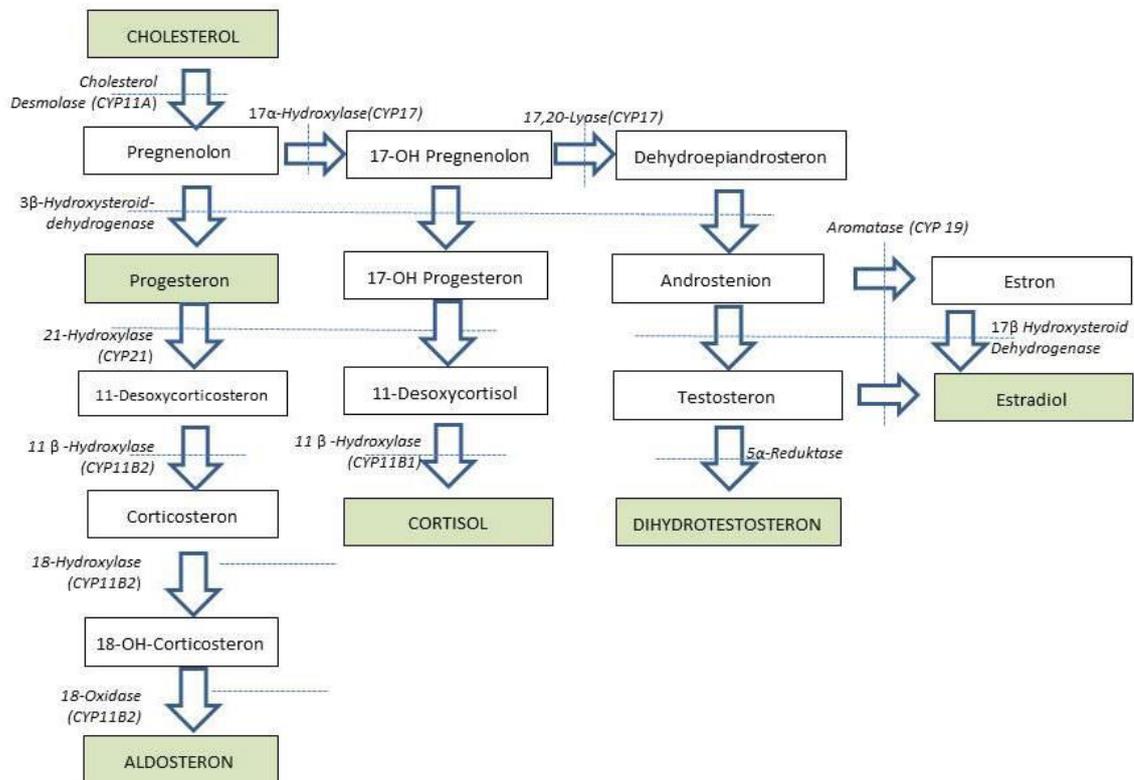


Abb. 1: Steroidbiosynthese

Biochemie/Physiologie

In der Nebennierenrinde ist Cholesterin die Ausgangssubstanz für alle Kortikosteroide. Die obenstehende Abbildung 1 zeigt schematisch die Schritte der Hormonbiosynthese.

Die Cholesterin-Desmolase katalysiert den Schritt vom C₂₇-Körper Cholesterin zum Pregnenolon, einem C₂₁-Steroid.

In der *Zona glomerulosa*, in der die Mineralokortikoide produziert werden, wandelt die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase das Pregnenolon zu Progesteron um. Die CYP21- und P450-Oxidoreduktase-abhängige 21-Hydroxylierung macht aus Progesteron 11-Desoxycorticosteron. Durch das Enzym 11 β -Hydroxylase (Aldosteronsynthase, CYP11B2) entsteht dann zunächst Corticosteron, weiter durch 18-Hydroxylierung 18-Hydroxycorticosteron und durch Oxidierung schließlich Aldosteron.

Die Produktion von Cortisol erfolgt durch die CYP17- und P450-Oxidoreduktase-abhängige 17α -Hydroxylierung aus Pregnenolon zu 17-Hydroxypregnenolon und dann über die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu 17-Hydroxyprogesteron und schließlich 11-Desoxycortisol bzw. 21-Desoxycortisol zu Cortisol. Dieser Syntheseweg wird hauptsächlich in der *Zona fasciculata* bestritten.

In der *Zona reticularis* findet ebenfalls eine 17α -Hydroxylierung statt. In dieser Zone wird allerdings auch unter Vermittlung der 17α -Hydroxylase zusammen mit dem Cytochrom b5 eine 17,20-Lyase-Aktivität entfaltet, die aus 17-Hydroxypregnenolon dann das Dihydroepiandrosteron (DHEA) entstehen lässt. Dieses Steroid kann als Substrat der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase dienen und weiter zu Androstenion metabolisiert und dann beispielsweise in den Gonaden weiter mit der 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase zu Testosteron reduziert oder peripher zu Estron aromatisiert werden.

Pathophysiologie

Die Folgen aus den entsprechenden Enzymdefekten beim AGS sind verminderte Spiegel der lebensnotwendigen Hormone Cortisol und Aldosteron, aber gleichzeitig ein vermehrtes Vorkommen der entsprechenden Vorstufen. Vor allem resultiert aus dieser Überproduktion der Vorstufen z.B. beim 21-Hydroxylase Mangel eine vermehrte Synthese von Androgenen. Das führt bei den betroffenen weiblichen Patienten zu Virilisierungserscheinungen, die einer weiteren Therapie bedürfen. Das Resultat aus dem chronisch erhöhten ACTH Spiegel als einem Wachstumsfaktor für die Nebennierenrinde ist eine Hyperplasie selbiger. Jaresch *et al.* wiesen bei AGS-Patienten eine durchschnittliche Fläche der Nebenniere von mehr als 500 mm² nach, während die Fläche bei gesunden Patienten weniger als 300 mm² beträgt (10). Fällt also bei einem Patienten während einer Bildgebung zufällig eine Raumforderung in der Nebenniere auf, so sollten sich stets Untersuchungen im Hinblick auf das AGS anschließen, da Nebennierentumore bei homozygoten AGS-Patienten bei einer Größe von mehr als 5 mm mit einer Wahrscheinlichkeit von 82 % auftreten, während dies bei der Normalbevölkerung nur zu 0,6% der Fall ist (12).

Die Diagnose eines AGS mittels Bildgebung oder serologischer Parameter wurde in vielen Studien kontrovers diskutiert. Beuschlein *et al.* zeigten in ihren

molekularbiologische Untersuchungen mittels Nebennierentumoren, dass Mutationen innerhalb des CYP 21 Gens, dem Locus der 21-Hydroxylase, nicht grundsätzlich onkogen sind und die Ausbildung von Nebennierentumoren zur Folge haben. Die von ihnen untersuchte Population zeigte keine einheitlichen Mutationen (13).

1.2.1 Enzymdefekte

Der 21-Hydroxylase-Defekt

In 95% der Fälle findet sich bei Patienten mit einem AGS ein 21-Hydroxylase Defekt. Die Konversion von Progesteron zu 11-Desoxycorticosteron und von 17-Hydroxyprogesteron zu 11-Desoxycortisol bzw. 21-Desoxycortisol zu Cortisol ist nicht mehr oder nur noch eingeschränkt möglich. Charakteristischer Weise resultieren bei allen Patienten mit dieser Form des AGS erhöhte basale Blutspiegel von 17-Hydroxyprogesteron und 21-Desoxycortisol. Nicht übersehen werden darf die Tatsache, dass sich erhöhte Werte an 17-Hydroxyprogesteron auch bei Patienten mit 11 β -Hydroxylase-Defekt finden, es in diesem Fall aber von essentieller Bedeutung ist, diese Konstellation nicht zu übersehen, da erhöhte Blutdruckwerte bei diesem Enzymmangel einer dringenden Behandlung bedürfen. Beim ACTH-Stimulationstest bleibt bei den homozygot erkrankten Patienten meist ein adäquater Anstieg von Cortisol aus. Erhöht sind bei der klassischen Form des Weiteren auch 17-Hydroxyprogesteron und Androstenion im Plasma. Der klinische Alltag zeigt, dass es häufig zu überschießendem Anstieg der Hormone bzw. sogar paradoxen Reaktionen kommt, gerade auch bei den heterozygot erkrankten Patienten.

Man unterscheidet zwei klassische Formen, die *Simple-virilizing* Form und die *salt-wasting* Form von einer nicht-klassischen oder *late-onset* Form.

Simple-virilizing Form des 21-Hydroxylase Mangels

Bei dieser Form des 21 Hydroxylase-Mangels kommt es zu einer überschießenden Bildung von Androgenen, die eine Virilisierung der weiblichen äußeren Genitalorgane mit sich bringen. Je nach Schweregrad der Ausprägung reichen die Veränderungen von einer einfachen Vergrößerung der Labien bis hin zur Ausbildung eines Penis mit Umformung der Labien zu einem leeren

Scrotum. Anhand eines Schemas nach Prader aus dem Jahr 1954 lassen sich normale und abnormale Entwicklung der äußeren Genitale unterscheiden und in fünf verschiedene Grade einteilen (14). Die inneren Genitale entwickeln sich artgerecht und bleiben unbeeinflusst, da sie androgenunabhängig wachsen. Bei männlichen Betroffenen äußern sich die Symptome lediglich mitunter in einem vergrößerten Penis und hyperpigmentiertem äußeren Genitale. Die Ursache hierfür ist, dass bei der Bildung von ACTH aus dem Vorläuferpeptid Proopiomelanocortin (POMC) gleichermaßen auch Alpha-Melanocytenstimulierendes Hormon (α -MSH) freigesetzt wird, welches über den Melanocortin-Rezeptor 1 die Pigmentierung der Haut beeinflusst.

Die Mineralokortikoidbiosynthese ist aufgrund einer gewissen Restaktivität des Enzyms nicht beeinträchtigt.

Diese unkomplizierte Form tritt in etwa 25% der Fälle mit 21-Hydroxylasemangel auf.

Salt-wasting Form des 21-Hydroxylase Mangels

Dreimal so häufig findet sich die Form mit Salzverlustsyndrom. Hier kommt es aufgrund der mangelnden Aldosteronsynthese sowie der überschießenden Bildung des Vorläufersteroids Progesteron, welches eine gestagene und antimineralokortikoide Wirkung aufweist, zu fehlender Natriumrückresorption in der Niere und in Folge dessen zu einem hypovolämen Zustand. Neben vermindertem Appetit, Erbrechen und lethargischen Zuständen bei den Neugeborenen droht eine Nebenniereninsuffizienz. Die Patienten präsentieren sich binnen der ersten vier Lebenswochen, aber selten vor dem 7. Lebenstag, mit Hyponatriämie, Hyperkaliämie und Hyperreninämie. Problematisch ist besonders die Konstellation, wenn ein männliches Neugeborenes betroffen ist, welches ja nicht immer durch veränderte äußere Genitale auffällt. Die Salzverlustkrise ist in diesen Fällen die Erstmanifestation des AGS (15). Daher hat sich im Rahmen des Neugeborenen Screenings die Testung auf ein AGS etabliert, hier wird das 17- α -Hydroxyprogesteron im Serum bestimmt.

Postnatal führen die erhöhten Androgenspiegel zu einem schnellen Längenwachstum im Kindesalter, allerdings mit verfrühtem Epiphysenfugenschluss, so dass daraus letztlich eine verminderte Endgröße

resultiert (16). Zudem kommt es bei Frauen infolge des Androgenüberschusses zu Akne, Hirsutismus und ovarieller Fehlfunktion. Bei Jungen äußert sich der Überschuss in einem schnellen Peniswachstum ohne dass der Hoden mit wächst. Im Hinblick auf die Reproduktion der betroffenen Patienten kommt es bei Frauen zu einer späten *Menarche* (17) und zu einem klinischen Bild, das dem der *polycystischen Ovarien* (PCO) ähnelt, mit multiplen ovariellen Zysten, anovulatorischen Zyklen, unregelmäßigen Blutungen und den oben genannten Symptomen einer Hyperandrogenämie (18).

Die Ursache für den 21-Hydroxylase Defekt liegt in einem veränderten Gen, welches für das Enzym codiert. So findet sich das Gen *CYP21A2* im *Human leucocyte antigen (HLA) major histocompatibility complex* auf Chromosom 6. Mehr als 90% der AGS-Fälle resultieren aus einer intergenetischen Rekombination zwischen dem Gen *CYP21* und dem benachbarten *CYP21 P* Pseudogen.

Nicht-klassische/ late-onset Form

Bei dieser Form handelt es sich um eine allelische Variante des 21-Hydroxylase-Gens. Es ist allerdings bekannt, dass diese auch als *late-onset-AGS* bezeichneten Formen auch bei den beiden anderen genannten Enzymdefekten auftreten können. Hierbei kommt es zu einer weniger starken Hyperandrogenämie, die bei Frauen zu den bereits oben genannten Symptomen der späten Menarche, sekundärer Amenorrhoe, Hirsutismus und PCO-ähnlichen Symptomen führen kann. Eine typische Anamnese einer betroffenen Frau enthält die Angabe, dass sie gehäuft unter orthostatischer Dysregulation leidet.

Bei Männern kann diese Form zu einer Oligospermie führen.

Die betroffenen Patienten fallen unter Umständen erst im ACTH-Test durch einen überschießenden Anstieg von Vorläufersteroiden auf.

Der 11 β -Hydroxylase Defekt

Dieser Defekt findet sich in 5% aller AGS-Fälle mit einer geschätzten Inzidenz von 1:250.000 (19). Durch den Defekt der 11 β -Hydroxylase sind die Biosynthesewege vom 11-Desoxycorticosteron zum Corticosteron und 17-

Hydroxyprogesteron zum 21-Desoxycortisol bzw. vom 11-Desoxycortisol zum Cortisol betroffen.

Auch die Androgene finden sich bei dieser Ausprägungsform vermehrt, hier vor allen Dingen das Androstenion.

In der menschlichen Nebennierenrinde existieren zwei Isoenzyme der 11- β -Hydroxylase, die durch zwei verschiedene Gene codiert werden und sich auf dem langen Arm von Chromosom 8 finden (20) (21). Das Gen *CYP11B1* codiert für die 11- β -Hydroxylase (Typ 1,P450c11) und ist in der *Zona fasciculata* stark exprimiert, während das Gen *CYP11B2* für die Aldosteron-Synthase (Typ 2,P450c11Aldo) fast ausschließlich in der *Zona glomerulosa* exprimiert wird (22). ACTH reguliert die Expression des Typ 1 Enzyms, und somit die Cortisol synthese (23). Die Aldosteron-Synthase ist hauptsächlich abhängig von den Kaliumkonzentrationen und den Blutspiegeln von Angiotensin-II und ist somit in das RAAS eingebunden (24).

Die klinische Ausprägung der Symptome richtet sich auch hier wieder nach der Schwere des Defektes. In der klassischen Form des Enzymdefektes finden sich die gleichen Virilisierungserscheinungen wie bei dem Defekt der 21-Hydroxylase. Zudem kommt in 2/3 der Fälle ein erhöhter Blutdruck vor (19). Dieser wird durch erhöhte Plasmaspiegel des mineralokortikoid wirksamen Aldosteronvorläufers 11-Desoxycorticosteron und seine Metabolite verursacht.

In der nicht klassischen Ausprägung des Defektes findet keine Virilisierung statt, der Blutdruck ist nicht notwendigerweise auffällig erhöht, so dass die Krankheit erst in der Pubertät durch Androgenexzesse auffällig werden kann.

Diagnostizieren lässt sich diese Variante zum einen über erhöhte Blutspiegel an 11-Desoxycorticosteron bzw. 11-Desoxycortisol oder deren hepatischen bzw. renalen Metabolite, wie z.B. Tetrahydro-11-Desoxycortisol (19) (25). Aldosteron ist bei schweren Formen erniedrigt, allerdings nicht aufgrund des Enzymmangels, denn die 11 β -Hydroxylase Typ 2 kann 11-Desoxycortisol metabolisieren, sondern aufgrund des erhöhten 11-Desoxycorticosterons mit konsekutiver Mineralokortikoidhypertonie und supprimiertem Renin.

Der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Defekt

Dieses Enzym findet sich im Gegensatz zu den beiden Erstgenannten nicht nur in der Nebennierenrinde, sondern zusätzlich auch in den Gonaden. Es

katalysiert die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron in der *Zona glomerulosa*, von 17-Hydroxypregnenolon in 17-Hydroxyprogesteron in der *Zona fasciculata* und von Dehydroepiandrostenion in Androstenion in der *Zona reticularis* und in den Gonaden. Es resultieren demzufolge niedrige Spiegel von Cortisol und von Testosteron. Im Gegensatz zu den anderen Enzymdefekten kommt es hier also nicht zu einem Androgenüberschuss, sondern es resultiert ein Mangel, welcher eine inkomplette bis fehlende Maskulinisierung männlicher Feten zur Folge hat. Weibliche Feten hingegen können mit einer Virilisierung geboren werden, da die periphere Umwandlung der vielen Vorstufen zu potenten Androgenen bei ihnen die Entwicklung der Geschlechtsorgane beeinflusst. Bei den männlichen Feten bleibt ähnliches wegen des gonadalen Defektes aus. Allerdings gibt es bei diesem Enzymdefekt eine große Breite an Variationen der klinischen Manifestation.

Therapieziele

Pränatale Therapie

Wenn begründeter Verdacht auf das Vorliegen eines AGS besteht, so ist bereits pränatal ab der 16. Schwangerschaftswoche über eine Amniozentese die Diagnosestellung möglich. Bereits bevor diese Eingriffe überhaupt durchgeführt werden können, sollte bei den entsprechenden Müttern eine Therapie mit Dexamethason eingeleitet werden, am besten so früh wie möglich nach Feststellung der Schwangerschaft. Allerdings sollte man mit der Einnahme der Medikamente in den fünf Tagen vor der Amniozentese aussetzen, um die Ergebnisse dessen nicht zu verfälschen. Dexamethason hat eine lange Halbwertszeit und ist plazentagängig. So wird der Fetus ausreichend mit Glukokortikoiden versorgt und ACTH-Exzesse mit den entsprechenden Folgeerscheinungen verhindert.

Postnatale Therapie

Das Ziel der Behandlung der Patienten ist eine adäquate Substitution von Glukokortikoiden, um über die beschriebene Feedback-Schleife die ACTH Produktion zu unterdrücken und somit einerseits den Wachstumsreiz für das Gewebe auszuschalten und andererseits die Überproduktion von Androgenen

zu stoppen. Um dies zu erreichen, sind meist supraphysiologische Dosen der Medikamente nötig.

Behandelt wird mit Hydrocortison, welches bei geringer Halbwertszeit eine hohe Bioverfügbarkeit aufweist. Es wird verteilt auf 2-3 Tagesdosen, in der jeweiligen Dosierung angepasst an den menschlichen Sekretionsrhythmus. Die kurze Halbwertszeit des Medikaments verhindert in den meisten Fällen die Ausbildung cushingoider Nebenwirkungen, wie beispielsweise einer Gewichtszunahme, Hypertonie, *Striae distensae* und Osteoporose.

Nach Abschluss des Längenwachstums kann eine Umstellung auf synthetische Kortikosteroide mit einer längeren Halbwertszeit erwogen werden.

Wichtig ist es, in Stresssituationen die Anpassung der medikamentösen Dosis zu bedenken, da die körpereigene Regulation nicht möglich ist. Solche Situationen sind zum Beispiel Fieber im Rahmen einer Infektion oder eine Anästhesie des Patienten. Betroffene Patienten sollten immer einen Pass mit eingetragener Medikation mit sich führen. Weiterführend soll an dieser Stelle auf die Homepage der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie verwiesen werden (www.endokrinologie.net)

Des Weiteren ist ein gut eingestellter Blutdruck das Ziel.

Je nach Krankheitsbild ist auch eine Substitution von Elektrolyten bzw. Mineralokortikoiden nötig. Hier können Fludrocortison und Natriumchlorid zusätzlich zu Glukokortikosteroiden verabreicht werden. Möglicherweise ist Fludrocortison auch hilfreich bei der Behandlung der *Simple-Virilizing* Form, da es die adrenocorticale Suppression unterstützen kann und so gegebenenfalls geringere medikamentöse Mengen von Cortison notwendig wären. Es führt zu verminderten Plasmaspiegeln von Renin und ACTH.

Die Behandlung der nicht-klassischen Formen ist nur nötig, falls der Patient klinisch symptomatisch wird bzw. um bei Männern die Fertilität zu verbessern (26).

Operative Korrekturen bei virilisierten äußeren Genitalen können in Erwägung gezogen werden. Bei Festlegung des Zeitpunktes sollte die psychische Entwicklung des Kindes nicht außer Acht gelassen werden.

Wichtig ist das permanente Monitoring der Patienten. Die entsprechenden Hormonspiegel im Serum sollten bestimmt werden. Außerdem soll bei Kindern in regelmäßigen Abständen eine Bildgebung der Hand erfolgen, um das

Knochenalter festzustellen. Nach den Ergebnissen sollte dann ggf. eine Therapieoptimierung erfolgen.

1.2.2 Komplikation beim Mann,

Der Testikuläre adrenale Resttumor

Testikuläre adrenale Resttumore (TART) wurden erstmal im Jahre 1940 von Wilkins *et al.* bei Patienten, die unter einem AGS litten, beschrieben (27). Sie bestehen aus aberrantem Nebennierenrindengewebe, welches während der Embryogenese mit den Gonaden kaudalwärts wandert. Diese Möglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass sich Nebennieren und Gonaden in enger Nachbarschaft zueinander entwickeln und es zu einer unvollständigen Teilung dieser Gewebe kommt, dies geschieht etwa in der achten Schwangerschaftswoche (2).

TARTs sind grundsätzlich benigner Natur, so dass eine operative Entfernung nicht unbedingt nötig ist. Vielmehr wird versucht, durch Substitution der durch die entsprechenden Enzymdefekte fehlenden Hormone die hohen ACTH Plasmaspiegel und damit den Wachstumsreiz zu begrenzen und ein weiteres Tumorwachstum zu verhindern bzw. gar eine Massereduktion zu erreichen. Chirurgische Intervention ist dennoch häufig notwendig, da es durch die räumliche Ausdehnung des TART-Gewebes zur Verdrängung des normalen Hodengewebes, bzw. zum Abdrücken der *Tubuli seminiferi* und einer hieraus resultierenden Fertilitätsstörung kommen kann. Leider hat die Operation nicht immer den gewünschten Effekt, da es durch ein lang andauerndes Vorhandensein des Tumorgewebes im Hoden bereits zu irreparablen Schäden gekommen sein kann.

Unfruchtbarkeit kann aber des Weiteren auch aus der Tatsache heraus resultieren, dass die von den Nebennierenrinden und vom Tumor produzierten Androgene mit den Rückkopplungsmechanismen der Gonaden interferieren und die normale LH-/FSH-Sekretion stören. Wegen der chronischen Suppression der Gonadotropin-Ausschüttung durch die vom Tumor sezernierten adrenalen Androgene kommt es zu einem hypogonadotropen Hypogonadismus (28).

Verfügbare Daten geben Anlass zu der Annahme, dass TARTs die häufigste Ursache für Infertilität bei Patienten mit AGS sind (29). Dennoch gibt es in der

Literatur sehr unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit der Unfruchtbarkeit bei diesen Patienten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine frühe Diagnosestellung des AGS vorteilhaft ist und der Patient bezüglich seiner Therapie engmaschig überwacht werden sollte. Nur durch eine ausreichende Kontrolle können TARTs rechtzeitig bemerkt werden. Durch entsprechende Therapieoptionen kann möglicherweise die Infertilitätsrate gesenkt werden.

1.2.3 Komplikation bei der Frau, verminderte Fertilität -Ein Fallbericht -

Fertilitätsraten bei Frauen, die an einem AGS leiden, werden allgemein als niedrig beschrieben. Im Folgenden stellen wir den Fall einer AGS-Patientin mit einem 21-Hydroxylase-Mangel vor, die zusätzlich an einem Morbus Basedow leidet und dank optimaler Therapie im Alter von 41 Jahren auf natürlichem Wege schwanger werden konnte.

Die Patientin wurde im Jahre 1965 geboren. Im Alter von 15 Jahren erfolgte die linksseitige Nebennierenexzision aufgrund eines Adenoms. Die Diagnose eines Adrenogenitalen Syndroms konnte gestellt werden. Es handelt sich hier um einen 21-Hydroxylase Mangel in der *simple virilizing* Form. Molekulare Untersuchungen zeigten drei heterozygote Mutationen auf dem 21-Hydroxylase Gen CYP21B auf Chromosom 6 zwischen den Exons 1 und 10: Zunächst eine heterozygote Mutation im Bereich des Intron 2, Nucleotid 656 mit der Folge eines vollständigen Aktivitätsverlustes.

Dann eine heterozygote Mutation im Bereich des Exon 7, Codon 339 mit der Konsequenz einer um etwa 30-60%igen Restaktivität des Enzyms.

Zuletzt eine heterozygote Mutation im Bereich des Exon 10, Codon 453, ebenfalls mit der Folge von wenig Restaktivität. Bei drei Mutationen, verteilt auf zwei Allele, ergibt sich eine *Compoundheterozygotie* mit Restaktivität.

Im Jahre 1998 wurde bei der Patientin ein *Morbus Basedow* aufgrund der sich manifestierenden klinischen Erscheinung sowie der serologischen Antikörperkonstellation (Thyreoperoxidase-Antikörper) diagnostiziert. Die Patientin wurde mit thyreostatischer Therapie behandelt (Thiamazol). Nach ein

paar Monaten in einer euthyreoten Stoffwechsellage wurde die Therapie terminiert und bis zum heutigen Tage kam es zu keiner Reaktivierung der *thyreoidalen* Autonomie. Im Verlauf der Jahre traten *hypothyreote* Stoffwechsellagen auf, so dass eine orale Substitution mit Levothyroxin begonnen wurde. Unter regelmäßiger Kontrolle der serologischen Hormonkonstellation zeigte sich eine stabile Stoffwechsellage.

Seit dem Jahr 2000 bestand seitens der Patientin ein Kinderwunsch. Die natürliche Familienplanung erbrachte keinen Erfolg. Drei *intrauterine Inseminationen*, durchgeführt zwischen 2000 und 2005, blieben ohne positives Ergebnis.

In den Jahren 2002 sowie 2005 kam es zu einer Schwangerschaft auf natürlichem Wege, allerdings endeten selbige unglücklicherweise im ersten bzw. dritten *Trimenon* mit *Aborten*.

Letztendlich führten die medikamentösen Interventionen seitens der endokrinologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf zu einer erfolgreichen Schwangerschaft im Alter von 41 Jahren. Die Behandlung erfolgte mit 20 mg Hydrocortison (verteilt auf drei Tagesdosen mit 10 mg, 5 mg und 5 mg) sowie wechselnden abendlichen Dosen von 0,25 mg und 0,125 mg Dexamethason.

Die folgende Tabelle 1 zeigt verschiedene Laborparameter aus den Jahren 2001 (vor adäquater Therapie) sowie 2006, kurz bevor die gewünschte Schwangerschaft eintrat.

	2006	2001	Referenzwert
17 α -hydroxyprogesterone (ng/ml)	10,4	35,0	< 1,0
21-desoxycortisol (ng/ml)	34,8		<15
Aldosterone (pg/ml)	161,0	216,0	10-160
Androstenion (ng/ml)	1,8	4,7	<2,0
Dehydroepiandrosteron (ng/ml)	2,2	2,2	<10
Dehydroepiandrosteronsulfat (μ g/dl)	15,0	46,0	100-400

Testosterone (ng/ml)	0,20	0,48	<0,5
Adrenocorticotropes Hormon (pg/ml)	13,2	29,0	8-50
Renin (pg/ml)	11,0	38,0	3-20
Thyroidea stimulierendes Hormon basal (μ U/ml)	3,31	1,8	0,3-3,5
freies Trijodthyronin (ng/dl)		1,01	0,8-2,0
freies Tyroxin (pg/ml)		2,3	0,5-3,5

Tabelle 1: Laborparameter der Patientin

Der Partner der Patientin willigte in eine genetische Untersuchung ein. Hier zeigten sich beim Ehepartner keine Mutationen im Hinblick auf das AGS, so dass für das Ungeborene keine Gefahr einer Erkrankung bestand. Während der Schwangerschaft war also keine zusätzliche Dexamethasonsubstitution notwendig.

Die Patientin wurde weiter mit Hydrocortison und Prednisolon therapiert.

Aufgrund des Alters bestand eine Risikoschwangerschaft. Erfreulicherweise zeigten weiterführende Untersuchungen keine Hinweise auf eine höhergradige Behinderung wie zum Beispiel ein Down-Syndrom.

Im April 2007 konnte die Patientin mittels *Sectio cesareae* eine gesunde Tochter zur Welt bringen.

1.3 Melanocortin-Rezeptoren und ihre Bindungsproteine

1.3.1 Allgemeines

Die Melanocortine ACTH, α -MSH, Beta-Melanocyten-stimulierendes Hormon (β -MSH) und Gamma-Melanocyten-stimulierendes Hormon (γ -MSH) entstehen allesamt durch posttranslationale Modifikation aus dem Vorläuferhormon POMC (30) (31).

Die untenstehende Abbildung 2 soll dies schematisch zeigen.

An den entsprechenden Rezeptoren üben die Peptide eine Vielzahl verschiedener Funktionen aus, die die Funktion exokriner Drüsen beeinflussen, antimikrobielle Effekte ausüben, autonome Funktionen des Körpers kontrollieren, die Nahrungsaufnahme beeinträchtigen und auch Fieber sowie Entzündungsreaktionen werden moduliert. Bei den Rezeptoren, an die die

Melanocortine binden, handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen (32). Alle aktivieren als extrazelluläre Botenstoffe über den Rezeptor und ein gekoppeltes G-Protein die intrazelluläre Katalysation von Adenosintrisphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Pyrophosphat.

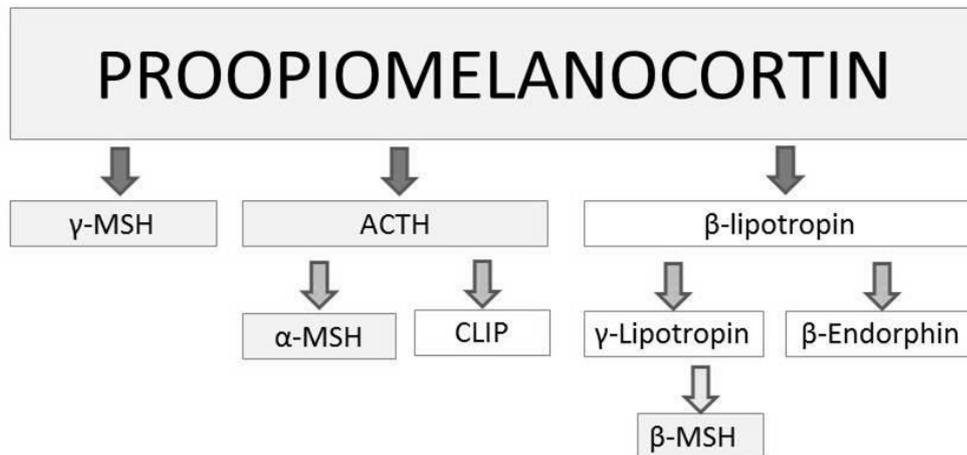


Abb. 2: Proopiomelanocortin und die posttranslationale Modifikation

1.3.2 Der Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R)

Die relative Affinität des MC1R gegenüber seinen Liganden ist folgende:
 $\alpha\text{-MSH} \geq \text{ACTH} \gg \gamma\text{-MSH}$ (33).

Der Rezeptor befindet sich hauptsächlich in den *Melanocyten* der Haut und vermittelt die Effekte von $\alpha\text{-MSH}$ auf die Pigmentation sowohl der Haut als auch der Haare (34). Des Weiteren finden sich MC1-Rezeptoren auf *Keratinocyten*, Endothelzellen, Gliazellen und auf immunologischen Zellen, wo sie indirekt über eine verminderte Synthese von *NF- κ B* antipyretische bzw. antiinflammatorische Effekte besitzen (35) .

1.3.3 Der Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R)

Der MC2R ist hauptsächlich in der Nebennierenrinde exprimiert, dort vor allem in der *Zona glomerulosa* und in der *Zona fasciculata*, weniger in der *Zona reticularis* und als einziger der Melanocortin-Rezeptoren hochspezifisch für ein Melanocortin, für ACTH.

Das hypophysär sezernierte ACTH beeinflusst über diesen Rezeptor die Bildung und Freisetzung der Steroidhormone (36). Auch im Nebennierenmark

wurden einzelne verstreute Rezeptoren gefunden, bislang ohne nachgewiesene Funktion (37).

Es gibt keinerlei Affinität zu α -, β - oder γ -MSH. Des Weiteren ist der Rezeptor in menschlichem und *murinem* Fettgewebe exprimiert. Bei den Mäusen wirkt ACTH lipolytisch, bei den menschlichen Adipozyten konnte kein äquivalenter Effekt nachgewiesen werden, so dass diese Funktion des Rezeptors dort bislang ungeklärt ist (38).

1.3.4 Der Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R)

Hier ist die Affinität der Melanocortine wie folgt: γ -MSH = ACTH \geq α -MSH. Gleichzeitig ist es der einzige Rezeptor, zu dem γ -MSH eine nennenswerte Affinität besitzt (39). Der Rezeptor findet sich hauptsächlich im Hypothalamus, aber auch in peripheren Geweben wie Darm, *Plazenta* und Niere (40).

1.3.5 Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)

Die Affinität der Melanocortine zu diesem Rezeptor ist: α -MSH = ACTH \gg γ -MSH, damit ähnelt er sehr dem MC1R. Der Rezeptor ist im Gehirn und im Rückenmark exprimiert, breiter verteilt als der MC2R. Es liegen Daten vor, dass dieser Rezeptor eine Rolle in unserem Ernährungsverhalten spielt (41). Er moduliert des Weiteren autonome und neuroendokrine Funktionen.

1.3.6 Der Melanocortin-5-Rezeptor (MC5R)

Die relative Affinität der Melanocortine setzt sich hier folgender Maßen zusammen: α -MSH \geq ACTH $>$ γ -MSH. Der MC5R ist in vielen peripheren Geweben zu finden, so beispielsweise in der Nebenniere, im Hoden und in exokrinen Drüsen (42) (43). Besonders auffällig ist die Rezeptorexpression in den Talgdrüsen, so dass sich hier für die Zukunft Möglichkeiten ergeben können, bei dermatologischen Krankheitsbildern medikamentös zu intervenieren.

Der Nachweis auf B- und T-Lymphozyten lässt eine Funktion in der Regulation des Immunsystems vermuten.

2. Ziele der Arbeit

Eine histologische Differenzierung zwischen TARTs und Leydigzellhyperplasien (LZH) gilt bei Ähnlichkeit dieser Gewebe als sehr diffizil und hielt in der Vergangenheit viele Fallstricke bereit.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, Marker zu identifizieren, die eine histologische Unterscheidung ermöglichen.

Die *Hypothese* der Experimente war, dass TART-Zellen adrenalen Ursprungs sind und somit ein ähnliches bis gleiches Expressionsprofil an Melanocortinrezeptoren aufweisen.

Daraus ergibt sich die *Fragestellung*, ob es die Färbungen mittels verschiedener Melanocortin-Rezeptor-Antikörper möglich machen, die beiden Gewebe voneinander zu differenzieren. Parallel dazu sollten zum Vergleich der Expressionsmuster des ursprünglichen und aberranten adrenalen Gewebe auch normale Nebennieren immunhistochemischer Färbungen unterzogen werden.

3. Material und Methoden

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hatte keine ethischen oder rechtlichen Bedenken.
Aktenzeichen: 3962.

Die Untersuchungen wurden unter Wahrung der Persönlichkeitsrechte und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.1 Histologisches Gewebe

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene histologische Gewebe verwendet:

- Es wurde Gewebe von normalen humanen Nebennieren (hNN) (n=19) untersucht, welches in Zusammenarbeit mit der Universität Erlangen im Rahmen einer früheren Studie asserviert und anonymisiert analysiert wurde (44).
- Des Weiteren wurden zwei anonymisierte Präparate von LZH in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um zufällige Befunde, die im Rahmen einer histopathologischen Begutachtung zur Untersuchung auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung erhoben wurden.
- Außerdem wurde das rare Gewebe von zwei Patienten untersucht, die als Komplikation ihres AGS einen Testikulären Adrenalen Resttumor (TART) entwickelt hatten und der zur Abklärung eines urologischen Tumors chirurgisch entfernt wurde. Dieses Gewebe wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Tyriaki, Ankara, Republik Türkei, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Einer der beiden genannten Patienten wurde 17-jährig vorstellig mit einer seit einem Monat andauernden beidseitigen testikulären Schwellung. Ein Adrenogenitales Syndrom mit einem 11 β -Hydroxylase-Mangel war bei diesem Patienten bereits in jüngster Kindheit diagnostiziert worden, da er klinisch

apparent wurde. Es erfolgte multiple Bildgebung. Therapeutisch wurde die Glukokortikoid Therapie modifiziert. Die Hodengröße verringerte sich zwar, aber aufgrund eintretender Nebenwirkungen konnten die medikamentösen Dosen nicht weiter gesteigert werden, so dass eine chirurgische Intervention angestrebt wurde (45).

Der zweite Patient wurde siebenjährig klinisch auffällig mit schnellem Körperwachstum, Akne sowie massiver Behaarung. Die körperliche Untersuchung zeigte bei großem Penis eine linksseitige Hodenschwellung. Serologisch konnte ein AGS aufgrund eines 21 α -Hydroxylase-Mangels festgestellt werden. Nach viermonatiger oraler Medikation trat der gewünschte Erfolg nicht ein, so dass man sich auch in diesem Fall zu einer chirurgischen Intervention entschied (45).

3.2. Angewendete Antikörper

Antikörper	Clon			Firma
MC1R (H-60)	sc-28990	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz
MC2R (H-70)	sc-13107	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz
MC3R (H-88)	sc-8990	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz
MC4R (H-60)	sc-28992	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz
MC5R (C-18)	sc-7644	Ziege	polyclonal	Santa Cruz
Cortisol	9301	Maus	monoclonal	Acris
Chromogranin A	DAK A 3	Maus	monoclonal	DAKO

Tabelle 2: Angewendete Antikörper

3.3 Histologie und Immunhistochemie

Alle beschriebenen Präparate wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 8 μ m angefertigt, die auf beschichtete Objektträger überführt und über Nacht bei 60°C festgebacken wurden.

3.3.1 Beschreibung des Färbevorgangs

Danach folgte zunächst die Entparaffinierung der Schnitte. Hierzu wurden die Schnitte für zwei mal zehn Minuten in Xylol gewaschen, danach in einer absteigenden Reihe sich minimierender Ethanolkonzentrationen zweimal eine Minute in 100% Ethanol (EtOH), danach je eine Minute in 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH und abschließend in destilliertem Wasser (*Aqua dest.*) rehydriert.

Anschließend wurden die Objektträger in eine Plastikkuvette, gefüllt mit Natrium-Citrat-Puffer (Target Retrieval Solution, 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt), gestellt und für 20 Minuten in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 95°C gesetzt. Dieser Schritt führt zwar einerseits zur leichten Erhöhung der Hintergrundfärbung, andererseits aber wird durch die erfolgreiche Antigendemaskierung eine gleichzeitige Zunahme der spezifischen Färbung bei vielen Antikörpern erreicht.

Nun folgte das Abkühlen der Schnitte, wahlweise 20 Minuten bei Raumtemperatur oder für 10 Minuten, wenn die Küvette von *Crush*-Eis umgeben wird.

Der Natrium-Citrat-Puffer wurde anschließend abgeschüttet und dann zwei mal zwei Minuten mit *Aqua dest.* herausgewaschen.

Nach diesem Schritt wurden die Schnitte zwei mal zwei Minuten in Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung / PBS-Puffer) gewaschen. Diese sich immer wiederholenden Schritte mit der Waschpufferlösung tragen erheblich zur Minimierung der Hintergrundfärbung bei.

Um endogenes Avidin und Biotin abzublocken, welches manchmal zu Fehldeutungen aufgrund falsch-positiver Färbungen führt, wurden die Objektträger nun in einer Feuchtkammer liegend jeweils 10 Minuten erst mit *Avidin-Solution* und dann mit *Biotin-Solution* bedeckt.

Danach folgte wieder ein fünfminütiges Bad im PBS-Puffer, um anschließend für 10 Minuten mit einem Peroxidase-Block jegliche Aktivität der endogenen Peroxidase zu unterdrücken.

Im Anschluss daran folgte die Inkubation mit 5% Schweineserum für 30 Minuten, jeweils 100 μ l pro Schnitt zum Blocken des IgG. Man blockt immer mit dem Serum jeder Tierspezies, aus der der Sekundärantikörper isoliert wurde. Das Serum wurde abgeschüttelt und der Primärantikörper entsprechend des Färbeprotokolls aufgetragen. Die Objektträger werden damit nun wahlweise bei 4°C im Kühlschrank über Nacht oder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Inkubation über Nacht gewählt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Primärantikörper von den Schnitten entfernt und die Objektträger wurden für drei mal drei Minuten in PBS Puffer gewaschen.

Danach folgte die Auftragung des Sekundärantikörpers, der sich als biotinylierter Brücken-Antikörper an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers heftet. Dieser wurde nach 30 Minuten entfernt, und es folgte ein weiterer Waschvorgang für drei mal drei Minuten im PBS Puffer.

Nun wurde jeder Schnitt für 30 Minuten mit 100 μ l LSAB[®]2 Streptavidin HRP (Meerrettichperoxidase) bedeckt. Dieses Substrat eignet sich zur Markierung des biotinylierten Link-Antikörpers.

Es folgte erneut ein Waschgang für drei mal drei Minuten im PBS Puffer.

Anschließend wurden die Schnitte für maximal 10 Minuten mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) + Substrate inkubiert, einem Chromogen, welches sich um das Streptavidin herumlegt.

Um eine Überfärbung der Schnitte zu vermeiden, sollte während dieser Zeit fortlaufend mikroskopiert werden.

Anschließend wurden die Schnitte für zwei Minuten in PBS-Puffer und anschließend für eine Minute in *Aqua dest.* getaucht.

Abschließend erfolgte die Kernfärbung in Hämatoxylin für etwa 2 Minuten. Dieser blaue Farbstoff ist basisch und hat daher eine Affinität zu den negativ geladenen Säuren Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) und färbt daher Zellkerne blau an.

Nachdem der restliche Objektträger mit *Aqua dest.* vom Farbstoff befreit und getrocknet worden ist, können die Schnitte mittels Faramount, einem

gebrauchsfertigen Eindeckmedium, und den entsprechenden Deckgläsern fixiert werden.

3.3.2 Verdünnung der Antikörper

Entsprechend den Datenblättern der in 2. angegebenen Antikörper wurden zunächst die verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Gefärbt wurde jeweils an humanen normalen Nebennieren in den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400.

Verdünnt wurde jeweils mit PBS-Puffer.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Färbungen wurde entschieden, mit welchen Konzentrationen weiter gefärbt wird.

3.3.3 Negativkontrollen

Für jeden Antikörper und alle Gewebe wurde in verschiedenen Färbeprozessen zur Kontrolle einmal die Inkubation mit dem Primärantikörper und einmal die Inkubation mit dem Sekundärantikörper durch PBS-Puffer ersetzt.

4. Ergebnisse

Als optimale Verdünnungsstufen für die verschiedenen Antikörper zeigten sich die folgenden Resultate.

Antikörper	Verdünnung
MC1R (H-60)	1 : 100
MC2R (H-70)	1 : 50
MC3R (H-88)	1 : 50
MC4R (H-60)	1 : 50
MC5R (C-18)	1 : 50
Cortisol	1 : 100
Chromogranin A	1 : 200

Tabelle 3: Optimale Antikörperverdünnungen

Die immunhistochemischen Färbungen ergaben die folgenden Ergebnisse:

Die Färbungen mit dem MC1R Antikörper erbrachten schwach positive Ergebnisse im Bereich der hNN. Weder die LZH noch die TARTs zeigten positive Zellverbände.

Die Färbungen mit dem ACTH Rezeptor Antikörper ergaben klar positive Färbungen auf den hNN sowie den TARTs, allerdings negative Ergebnisse auf den LZH.

Die Färbungen mit dem MC3R Antikörper zeigten keine Reaktionen im Bereich der Zellverbände der LZH und TARTs, aber schwach positive Färbungen im Bereich der hNN.

Für den MC4R Antikörper zeigten sich klar positive Färbungen auf den hNN sowie negative Ergebnisse im Bereich der TARTs und LZH.

Der MC5R war im Bereich der hNN deutlich nachweisbar, auf den beiden anderen Geweben zeigten sich schwach positive Färbungen.

Die Färbungen mit den Cortisol Antikörper erwiesen sich bei unspezifischen Hintergrundfärbungen als unbrauchbar in allen verwendeten Geweben.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen tabellarisch dargestellt:

- symbolisiert eine negative Färbung, der Zellverband zeigt keine Reaktion
- + symbolisiert eine schwach positive Färbung bzw. die Färbung einzelner Zellen (< 10%)
- ++ symbolisiert eine klar positive Färbung bzw. die Färbung der überwiegenden Mehrzahl von Zellen

Gewebe	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R	Cortisol
Humane normale Nebennieren	+	++	+	++	++	unbrauchbar
Leydigzell-Hyperplasie	—	—	—	—	+	unbrauchbar
Testikulärer adrenaler Resttumor	—	++	—	—	+	unbrauchbar

Tabelle 4: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen



Abb. 3
 Testikulärer adrenaler Resttumor
 Positive Färbung
 MC2R (H70) Antikörper
 Verdünnung: 1:50

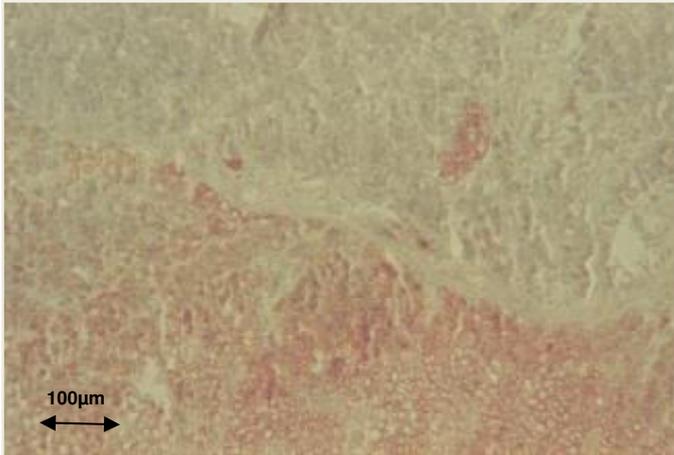


Abb. 4
Humane normale Nebenniere
Positive Färbung
MC2R (H70) Antikörper
Verdünnung: 1:50

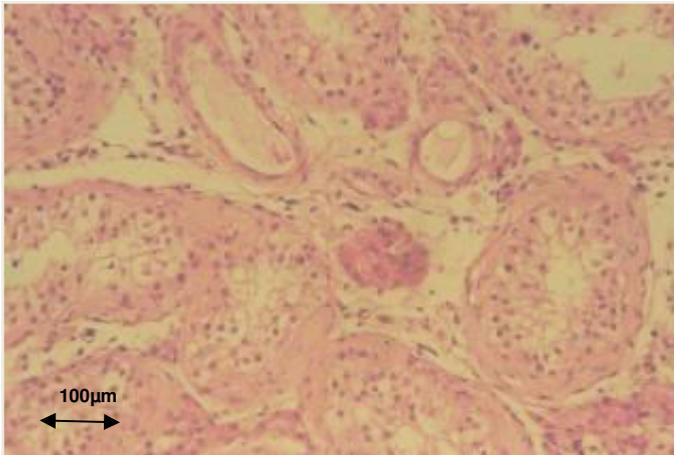


Abb. 5
Leydigzellhyperplasie
Hämatoxylin-Eosin Färbung

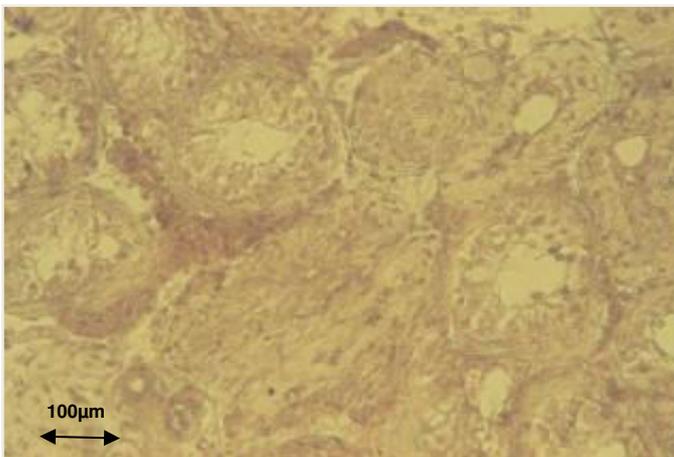


Abb. 6
Leydigzellhyperplasie
Negative Färbung
MC2R (H70) Antikörper
Verdünnung 1:50

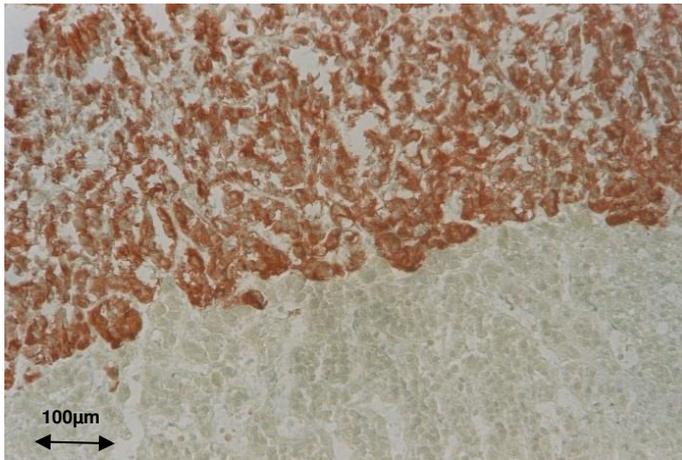


Abb. 7
Humane normale Nebenniere
Positive Reaktion auf
Chromogranin A Antikörper
im Mark
Negativkontrolle für die
Nebennierenrinde
Verdünnung 1:200

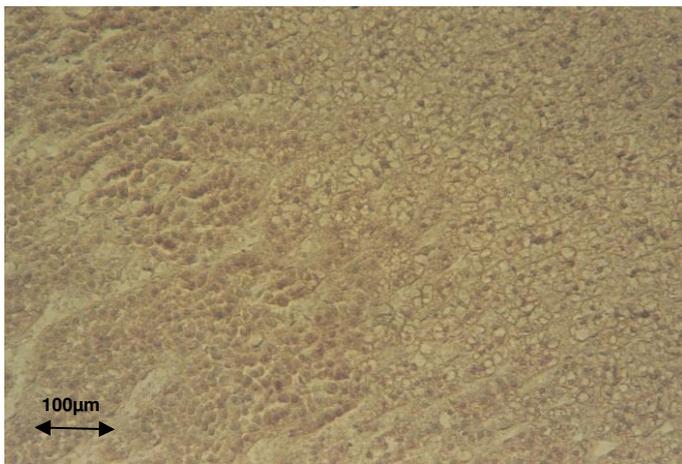


Abb. 8
Humane normale Nebenniere
Positive Zellfärbung
MC4 Rezeptor Antikörper
Verdünnung 1:50

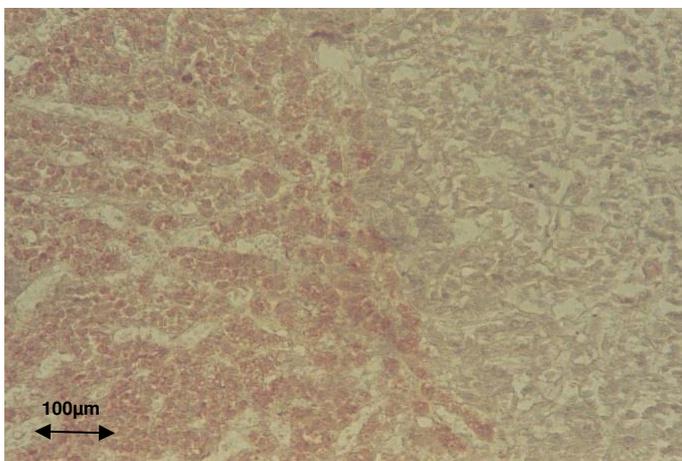


Abb. 9
Humane normale Nebenniere
Klar positive Zellfärbung
MC5 Rezeptor Antikörper
Verdünnung 1:50

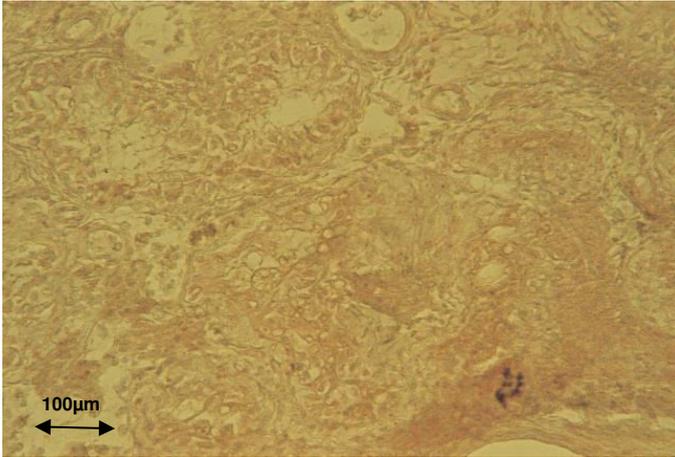


Abb. 10

Leydigzellhyperplasie
Schwach positive Zellfärbung
MC5 Rezeptor Antikörper
Verdünnung 1:50

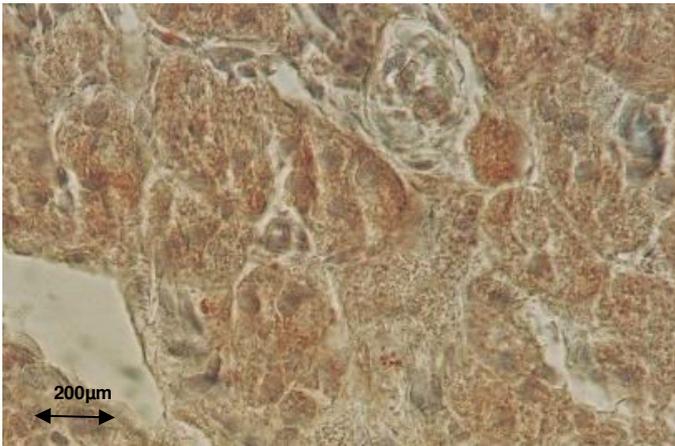


Abb. 11

Testikulärer adrenaler
Resttumor
Schwach positive Zellfärbung
MC5 Rezeptor Antikörper
Verdünnung 1:50

5. Diskussion

Bei Patienten mit einem AGS liegen TARTs mit einer Prävalenz von bis zu 94% vor. Für die Genese dieser Tumore bzw. den Ursprung der TART-Zellen existieren verschiedene Hypothesen. Eine mögliche Erklärung für einen adrenalen Ursprung ist die Tatsache, dass die aus dem Glukokortikoidmangel beim AGS resultierenden hohen Plasmaspiegel von beispielsweise ACTH als Wachstumsfaktor für die Tumore dient. Weiter hinweisend für diese Tatsache ist, dass diese Tumore auch bei anderen Krankheitsbildern mit pathologisch erhöhten ACTH-Werten auftreten. Beim *Morbus Addison*, einer in den meisten Fällen auf einer Autoimmunadrenalitis mit Auto-Antikörpern gegen 17 α -Hydroxylase basierenden erworbenen Form der Nebennierenrindeninsuffizienz mit konsekutiv erhöhten plasmatischen ACTH-Spiegeln (46) und beim *Nelson-Syndrom* mit ausgeprägtem ACTH-Exzess nach beidseitiger Adrenalektomie, z.B. bei ACTH-abhängigen Hypercortisolismusformen (47). Des Weiteren wurden Fälle mit TART im Rahmen eines Morbus Cushings bekannt (48).

Ausreichend ist diese Erklärung dennoch vielleicht nicht, da auch medikamentös gut eingestellte Patienten mit normwertigen ACTH-Plasmaspiegeln TARTs entwickeln können (28).

Bei AGS Patienten haben Stikkelbroeck *et al.* gezeigt, dass weder eine mangelnde Substitution der Hormone zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten noch die einzelnen Behandlungspläne der Patienten (tägliche Hydrocortisondosis bezogen auf die Körperoberfläche, Zeitpunkt der Einnahme der Medikamente und wie häufig die Patienten die Medikamente täglich zu sich nehmen) eine Vorhersage über die Größe des Tumors ermöglichen (28). So muss auf jeden Fall weiterhin nach Einflussfaktoren gesucht werden.

Einen weiteren Hinweis auf die adrenalen Genese der TARTs lieferte eine Studie von Claahsen-van der Grinten *et al.*, welche zeigte, dass bei AGS-Patienten mit dem Verdacht auf einen Resttumor die Konzentration von 21-Desoxycortisol in den testikulären Venen in sieben von acht Fällen signifikant höher ist als in den peripheren Venen. Bei dem achten Patienten war die Punktion der entsprechenden Venen nur unvollständig möglich gewesen (49). Die Synthese von 21-Desoxycortisol benötigt eine 11 β -Hydroxylierung. Das

entsprechende Enzym für diesen Syntheseschritt ist in testikulärem Gewebe, einschließlich Leydigzellen, nicht aktiv (50).

Der Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor konnte weiterführend per mRNA Amplifikation auf den TARTs nachgewiesen werden (11) (49), was ebenfalls ein Hinweis auf aberrantes adrenales Gewebe sein könnte, da auch dieser Rezeptor typischerweise in der *Zona glomerulosa* exprimiert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Angiotensin-II ebenfalls ein Wachstumsreiz für die Nebennieren und TARTs darstellt und dass es unter hohen Plasmaspiegeln zu einer Hyperplasie der entsprechenden adrenalen Zone kommt (51). Chatelain *et al.* haben in der genannten Studie gezeigt, dass bei der Ratte unter Wasserentzug hohe Angiotensin-II-Plasmaspiegel zu einer Gewichtszunahme der *Zona glomerulosa* geführt haben. Die ACTH-Plasmaspiegel sind in dieser Versuchsreihe unbeeinflusst vom Wasserentzug geblieben. Werden im Gegensatz dazu die Angiotensin-II-Plasmaspiegel durch Hemmung des Angiotensin-Coverting-Enzyms gesenkt, so resultierte eine Gewichtsabnahme der *Zona glomerulosa* (51).

Auch bei gesunden Neugeborenen finden sich in 7,5-15% der Fälle Nebennierenzellen innerhalb des Hodens, welche sich allerdings bereits in der frühen Kindheit zurückbilden (52) (53). Es wird diskutiert, ob eben dieses Gewebe bei Männern mit AGS bestehen bleibt und als Vorläufer der TARTs anzusehen ist.

Eine zonale Gliederung der Resttumore wurde noch nie beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass innerhalb des TART-Gewebes explizit der Nachweis der Expression von CYP 11 B1 und CYP 11 B2 gelang, kann ein Nachweis zonaler Elemente der *Zona glomerulosa* sowie der *Zona fasciculata* postuliert werden (49). Unserer Einschätzung nach wäre dies nicht ungewöhnlich, da erst die mikroanatomische Struktur der Nebennierenrinde mit der streng ausgerichteten Durchblutung zur typischen Zonierung der Nebennierenrinde führt (23). Bei hohen ACTH-Spiegel könnte außerdem der Signalweg über den ACTH-Rezeptor und cAMP die Dominanz des Signalwegs über Angiotensin II und

hohen intrazellulären Calciumspiegeln gebrochen werden, was die parallele Expression der *CYP11B1* und *CYP11B2*-Enzyme plausibel macht (23).

TARTs ähneln mikroskopisch und histologisch den LZH, die klinische Unterscheidung ist oft nicht möglich und erst die (eventuell überflüssigen) Operationspräparate liefern dann die nötige Differenzierung. Problematisch wird die Unterscheidung, wenn die TARTs als Erstmanifestation des AGS auftreten. Dies ist sicherlich nicht in der Mehrzahl so, aber dennoch beschrieben. Bei beiden Geweben handelt es sich um steroidogene Zellen, allerdings enthalten die TART-Zellen im Gegensatz zu LZH in in der Mehrzahl der Fälle keine Reinke-Kristalle (11).

Des Weiteren sollten differentialdiagnostisch immer das häufig bilaterale Auftreten der TARTs, das junge Alter der betroffenen Männer, die fehlenden Metastasen aufgrund der Dignität der TARTs, das eventuelle Ansprechen auf eine Glukokortikoidtherapie, sowie weiterführend entsprechende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen in Betracht gezogen werden (54).

Dieser Arbeit liegt deshalb die Fragestellung zugrunde, auf welche Art und Weise TARTs von LZH differenziert werden können. Wie oben erläutert, hat es in der Vergangenheit bereits viele Bemühungen in diese Richtung gegeben, da es bei den männlichen Patienten je nach Lebensabschnitt von entscheidender Bedeutung ist, diese Entitäten sicher zu differenzieren. Der Ansatz dieser Arbeit ist die immunhistochemische Differenzierung der beiden genannten Gewebe mittels verschiedener Melanocortin-Rezeptoren sowie des Cortisol-Antikörpers. Tabellarisch sind die Ergebnisse oben aufgeführt. Selbige gilt es nun zu diskutieren.

Die Färbungen gegen den **ACTH-Rezeptor** waren positiv in den hNN und in den TARTs, ein Umstand der den gemeinsamen Ursprung von TART-Zellen und Nebennierenrindenzellen stützt (55). Weil LZH nicht mit diesem Antikörper markiert werden konnten (56) öffnet sich hier möglicherweise ein diagnostisches Fenster für die histologische Differenzierung mittels Stanzbiopsie.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich bei TART-Tumoren insgesamt um eine seltene Problematik handelt, was unsere Präparateanzahl limitierte und berücksichtigt werden muss. Allerdings ist dem hinzuzufügen, dass trotz des fehlenden Ansprechens einer der beiden Patienten auf die orale Medikation die immunhistochemischen Färbungen den Nachweis des ACTH Rezeptors erbracht haben.

Zur klinischen Diagnose der TARTs empfiehlt sich der Ultraschall, da sich diese Untersuchungstechnik als ebenso sensitiv erwiesen hat wie die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie, allerdings kostengünstiger und wesentlich leichter verfügbar ist. Die Tastuntersuchung der Hoden ist nicht ausreichend sensitiv und ein negativer Tastbefund schließt das Vorhandensein eines Tumors keinesfalls aus (57). Im Ultraschall findet sich der TART nach übereinstimmenden Studien von Stikkelbroeck *et al.* und Martinez-Aguayo *et al.* in seiner Lokalisation angrenzend an das *Mediastinum testis* und ist bis zu einer Größe von 2 cm echoarm (58) (59).

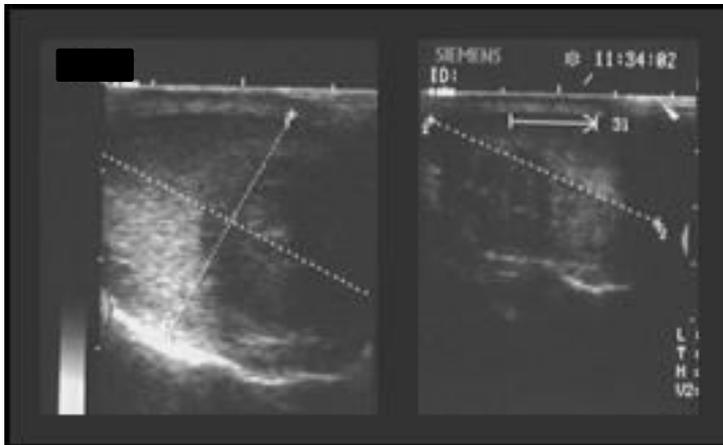


Abb. 12 Sonographischer Befund eines TARTs

In Übereinstimmung dazu ein sonographischer Befund eines TARTs in Abbildung 12. Der Patient ist aktuell im Universitätsklinikum Düsseldorf in Behandlung und hat sich bislang keiner operativen Maßnahme unterzogen, obwohl dies in Erwägung gezogen worden war. Wegen der Incompliance ist die endokrinologische Kontrolle des AGS unzureichend.

Die Größe der Tumore ist abhängig vom Genotyp der Patienten. So hat sich ergeben, dass Patienten, die eine Deletion oder Konversion des CYP21A2 Gens haben, eine signifikant höhere Tumorgöße aufwiesen im Vergleich zu Patienten, die diesen schweren Gendefekt nicht besitzen (28).

Reisch *et al.* zeigten, dass es, wie bereits erläutert, im Rahmen des AGS zu einem vergrößerten Nebennierenvolumen verglichen zur Normalbevölkerung kommt. Es ließen sich allerdings keine positiven Korrelationen zwischen dem Volumen der TARTs und dem Volumen der Nebennieren finden. Weiterführend zeigten sich auch in dieser Studie keine positiven Korrelationen zwischen der Größe des Tumors und der serologischen Hormonkonstellation. Allerdings geben die Autoren einschränkend zu bedenken, dass es sich bei der die Größe der adrenalen Resttumoren beeinflussenden Hormonkonstellationen durchaus auch um Langzeitparameter handeln kann, die die Studie nicht erfasst (60).

Ein Fallbericht von Fenichel *et al.* aus dem Jahr 2008 stellte die Kliniker in Frankreich ebenfalls vor das Problem der Diagnosefindung. Bei einem *compound* heterozygoten 30-jährigen Patienten für den 21-Hydroxylase Defekt war im Rahmen der Infertilitätsdiagnostik eine einseitige Hodenschwellung aufgefallen. Aufgrund der bekannten Erkrankung wurden ein TART sowie differentialdiagnostisch ein Leydigzelltumor in Betracht gezogen. Es konnten keine mRNA für die 11- β -Hydroxylase oder den ACTH-Rezeptor im Tumor gefunden werden. Allerdings wurden auch keine typischen Kriterien eines malignen Leydigzell-Neoplasmas demonstriert, so dass nach drei weiteren Jahren mit tumorfreiem Intervall retrospektiv ein TART postuliert wurde. In diesem Fall wurde der Verlust typischer adrenalen Expressionsfaktoren postuliert (61).

Nebennierenrindentumore können beispielsweise im Rahmen Cortisol produzierender Adenome aufgrund des negativen Feedback-Loops eine verminderte Expression des ACTH Rezeptors aufweisen (62).

In Übereinstimmung zu unseren Resultaten und klinischen Beobachtungen wurde herausgefunden, dass ACTH die Steroidogenese der testikulären Leydigzellen im Verlauf der fetalen Entwicklung – hier in einem Mausmodell –

beeinflusst. Im Gegensatz hierzu zeigte sich kein Einfluss von ACTH auf erwachsene Leydigzellen (63).

Die Forschergruppe identifizierte MC2R-Expression in den *fetalen* Hoden mittels PCR, auf *adulten murinen* Hoden hingegen konnten keine Melanocortin-2-Rezeptoren nachgewiesen werden. Weiterführend wurde während einer Inkubation von Hoden mit ACTH *in vitro* bestimmt, ob ACTH einen Effekt auf die Steroidproduktion hat. Es zeigten sich eine deutlich stimulierte Testosteronproduktion in allen *fetalen* Stadien, jedoch keine signifikanten Einflüsse auf die Testosteronproduktion in den erwachsenen Hoden (63).

Auch die Abwesenheit von MC2R auf Leydigzellen bestätigte sich in dieser Untersuchung.

Gelegentlich kommt es beim Auftreten von Leydigzelltumoren zu einer Produktion von 17-Hydroxyprogesteron (64). Findet sich also ein Patient, welcher an einem AGS erkrankt ist und erhöhte serologische Werte von 17-Hydroxyprogesteron aufweist, so kann die Diagnose eines Leydigzelltumors fälschlicherweise übersehen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass das AGS ein Syndrom mit adrenalem Enzymmangel darstellt, resultieren daraus verminderte Spiegel von Cortisol, aber erhöhte Werte der Vorläuferhormone, wie beispielsweise des 17-Hydroxyprogesterons im Rahmen des 21-Hydroxylase-Mangels. Differentialdiagnostisch ist allerdings zu bedenken, dass im Falle eines Leydigzelltumors keine Suppression der Synthese mittels Dexamethason-Gabe bzw. keine Steigerung der Vorläufersteroiden mittels Stimulation durch ACTH erreicht werden kann. Beides wäre im Fall des Vorliegens eines AGS möglich (64).

Rezeptoren für **MC3R** konnten in den Färbungen auf Nebennierenrindengewebe nachgewiesen werden, allerdings nur vereinzelt. Für LZH und die TARTs waren diese Färbungen negativ. Dieses Ergebnis muss von zwei Seiten betrachtet werden, denn in der Vergangenheit gab es zur Expression dieser Rezeptoren verschiedene Ausführungen. In der Niere konnte

er nachgewiesen werden (40), in der Nebenniere haben sich über den Versuch des mRNA Nachweises negative Ergebnisse gezeigt (39) (65).

Pro- γ -MSH wurde als Mediator entdeckt, welcher die Aktivität von ACTH potenziert kann, allerdings keinen direkten Effekt auf die Steroidogenese ausübt. Pro- γ -MSH erhöht die Aktivität der Hormon sensitiven Lipase (HSL), welche Cholesterol aus dem Cholesterolester-Speicher der Nebenniere freisetzt und es dem ACTH so ermöglicht, die weiteren Schritte der Steroidogenese zu aktivieren. Al-Dujaili *et al.* wiesen 1981 nach, dass Pro- γ -MSH die ACTH-Aktivität in Nebennieren von Ratten als auch von Menschen beeinflusst, in dem es nach Stimulation zu erhöhten Cortisol- und Aldosteron-Spiegeln kam (66).

Die Tatsache, dass die Färbungen mit dem **MC4R** auf LZH und TARTs negativ, aber auf den hNN positiv ist, verdient weitere Beachtung und sollte sich weiterer Forschung unterziehen. Es kann ein Zusammenhang mit den oben zitierten neuroendokrinen Funktionen des Rezeptors vermutet werden.

In der Vergangenheit wurde bereits Rezeptor-mRNA des MC4R auf humanen Nebennierenrinden nachgewiesen (65). Konträr dazu gelang Gantz *et al.* kein Nachweis dieser Rezeptoren auf humanen Nebennierenrinden (39). Die genannte Studie sowie weitere zeigten das α -MSH die Steroidogenese der menschlichen Nebennierenrinde mittels des Melanocortin-4 sowie Melanocortin-3-Rezeptors *in vitro* beeinflusst (67).

Über die Expression von Melanocortin-4-Rezeptoren auf Hodengewebe wurden verschiedene Ergebnisse publiziert. Einerseits konnten innerhalb muriner Hoden mittels transgener Zelllinien keine Rezeptoren nachgewiesen werden (68). Andererseits ergab sich ein positiver Rezeptornachweis in einer Studiengruppe, die *in-situ* Hybridisierung zum Nachweis der Rezeptoren nutzte und mRNA der MC4R in Hoden erwachsener Ratten nachweisen konnte.

Die Daten zeigten eine von Entwicklungsstadien abhängige teilweise geringe Ausprägung im Bereich des Keimepithels der *Tubuli seminiferi* in Zellen, welche *Spermatocyten* zu sein scheinen (69). So kann nicht definitiv bestimmt werden, welche Zellen genau den Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren.

Im Hoden sind Sertoli- und Leydigzellen in zwei verschiedenen Kompartimenten lokalisiert, ohne einen bestehenden Zellzusammenhang. Trotzdem gibt es Interaktionen zwischen diesen Zellen, so dass angenommen werden kann,

dass sich die Zell-Zell-Interaktion über diffundierbare Faktoren abspielt. Neben Testosteron ist einer dieser Faktoren der *insulin-like-growth-factor 1* (Somatomedin C). Er wird von den Sertolizellen sezerniert und könnte eine wichtige Rolle in Bezug auf das Wachstum der Leydigzellen spielen (70).

Andere Versuche, die untersucht haben, welche Effekte konditionierte Medien kultivierter Sertolizellen auf Leydigzellen ausüben, zeigten, dass das Medium die Steroidogenese in Leydigzellen von Ratten und Mäusen *in vitro* stimuliert. Die bislang unbekannt Faktoren stimulieren einen frühen Schritt der Steroidhormonbiosynthese (70).

Weiterführend gibt es ebenfalls nachweisbare Effekte von Leydigzellen auf die Sertolizellfunktion aufgrund der Tatsache, dass Testosteron für die normale Funktion der *Tubuli seminiferi* unerlässlich ist. Dieses Hormon agiert also wie ein parakriner Faktor. Zusätzlich existieren verschiedene nicht-steroidale Faktoren, die seitens der Leydigzellen sezerniert werden und die Funktion der Sertolizellen beeinflussen. Zum Beispiel sezernieren Leydigzellen Peptide, die aus dem Vorläufer POMC abgespalten wurden. Nachweisbar ist dies durch die vorhandene POMC mRNA. Diese Peptide üben gegensätzliche Effekte auf die Sertolizellen aus. β -Endorphin beispielsweise hemmt die Zellproliferation, α -MSH und Adrenocorticotropin stimulieren verschiedene Funktionen der Sertolizellen (71).

Des Weiteren kann angenommen werden, dass Leydigzellen in eine autokrine oder parakrine Rolle involviert sind, welche die Inhibin B-Produktion der Sertolizellen reguliert (72). Niedergang und Regeneration der Leydigzellen und der damit verbundene Anstieg bzw. Abfall der Produktion der Bestandteile des Inhibins seitens der Sertolizellen geben Grund zu dieser Annahme (72).

Es wurde gezeigt, dass Nebennierenmarkzellen neben Noradrenalin und Adrenalin eine ganze Reihe weiterer Faktoren sezernieren. Es handelt sich um Faktoren, die auch auf die steroidhormonsynthetisierenden Zellen wirken und die dortige Hormonsynthese beeinflussen (73).

Die Färbung mit dem **MC5R**-Antikörper war in allen drei Geweben vollständig bis schwach positiv, was den Ausführungen entspricht, dass sich dieser

Rezeptor auf vielen peripheren Geweben findet, darunter bekanntermaßen auch in adrenalem und testikulärem Gewebe (43) (42).

Die Färbungen mit **Cortisol-Antikörpern** haben zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt. Wir hatten uns versprochen, mit diesem monoklonalen Antikörper weitere Differenzierungen zwischen den Geweben vornehmen zu können, allerdings ist dies durch das nahezu ubiquitäre Vorkommen von Cortisol in Gefäßen etc. nicht möglich gewesen. In keiner der vorliegenden Färbungen konnten eindeutige Zellfärbungen nachgewiesen werden, vielmehr wurden diese von einer unspezifischen Hintergrundfärbung überlagert. Unternehmungen, weiterführend speziellere Antikörper gegen 11-Desoxycortisol bzw. 21-Desoxycortisol zu erwerben, blieben leider erfolglos.

Der **MC1R** konnten weder auf LZH noch auf den TARTs nachgewiesen werden. Auf den hNN konnten vereinzelt positive Zellen identifiziert werden. Dies entspricht den Ausführungen, dass dieser Rezeptor hauptsächlich auf kutanem Gewebe exprimiert wird und Pigmentation induziert (34).

Bezug nehmend auf den **Fallbericht** der Patientin mit einem AGS und einem Morbus Basedow möchten wir noch einige Punkte diskutieren.

Die Körpergröße von AGS-Patienten ist signifikant niedriger und der *body mass index* (BMI) signifikant höher als in vergleichbaren gesunden Populationen. In der erwähnten Studie zeigte sich eine durchschnittliche Körpergröße von 168 cm in der Kontrollgruppe und 159 cm in der AGS Gruppe. Der BMI betrug 21,35 ($\pm 0,52$) in der Kontrollgruppe verglichen mit 24,60 ($\pm 0,86$) in der AGS Gruppe (74). Die von uns beschriebene Patientin bestätigt diese Ergebnisse. Sie misst 159 cm und wiegt 68 kg. Daraus ergibt sich ein BMI von 26,9. Gründe hierfür liegen in der späten Diagnosestellung im Alter von 17 Jahren, so dass hier das Knochenwachstum schon weit fortgeschritten und der vorzeitige Schluss der Epiphysenfugen eingetreten waren.

Patientinnen, die an einem 21-Hydroxylase-Mangel leiden, haben eine scheinbar verminderte Fruchtbarkeit. Bei den einfach-virilisierenden Formen ist die Schwangerschaftsrate im Vergleich zur Normalbevölkerung leicht reduziert.

Patientinnen, die an der Salz-verlust-Form leiden, haben eine stark reduzierte Fertilität.

Es sind mehrere Faktoren identifiziert worden, die die Fruchtbarkeitsrate der erkrankten Patientinnen beeinflussen. So zum Beispiel die Überproduktion adrenaler Androgene und Progesterone, welche die ovarielle Follikulogenese blockieren, des Weiteren das Syndrom der *polycystischen Ovarien* (PCO). Außerdem beeinflussen gegebenenfalls stattgehabte operative Eingriffe und die verzögerte psychosexuelle Entwicklung sowie eine reduzierte allgemeine sexuelle Aktivität die Fertilitätsrate (75).

Es zeigen sich signifikant verminderte durchschnittliche Geburtenraten bei AGS Frauen, verglichen mit gesunden Frauen. Patientinnen, die an der Salz-verlust-Form leiden, zeigten extrem verminderte Fertilitätsraten. Psychologische bzw. psychosexuelle Faktoren sollten hier in jedem Fall in Erwägung gezogen werden.

Patientinnen mit der *simple-virilizing* Form leiden vermehrt unter unregelmäßigen Menstruationszyklen, hier ist allerdings die letztendliche Erfolgsrate für eine gewünschte Schwangerschaft gut. Man sollte immer zuerst die medikamentöse Einstellung der Patientinnen mittels Mineralo- und Glukokortikoiden, sowie die serologische Androgenkonstellation betrachten. Die Frage, wie streng im Rahmen der Planung und sich anschließender Gravidität die Androgenlevel kontrolliert werden sollten, bleibt weitestgehend offen (76). Glukokortikoide mit einer längeren Halbwertszeit haben sich als nützlich erwiesen, den Menstruationszyklus zu regulieren und die Fertilität zu optimieren (77).

Diese medikamentöse Therapie in Kombination mit psychologischem Support kann dazu beitragen, die Fruchtbarkeit und damit die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft bei Frauen, die an einem AGS erkrankt sind, zu verbessern. (75).

Hoepffner *et al.* berichten über drei Fälle von eingetretenen Schwangerschaften bei Frauen mit einer verbleibenden 21-Hydroxylase-Aktivität von 2-4% (78). In unserem Fall bietet die Patientin drei verschiedene Mutationen, passend zu einem AGS in der sogenannten *Compound* heterozygoten Form.

Wird eine Patientin mit einem bekannten Adrenogenitalen Syndrom aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches ärztlich vorstellig, so ist eine gründliche körperliche Untersuchung unerlässlich. Bei der gynäkologischen Untersuchung ist insbesondere der vaginale *Introitus* zu betrachten, welcher häufig ein *Handicap* für die Patientinnen darstellt (77).

Da sich der Partner unserer Patientin mit einer genetischen Untersuchung einverstanden erklärt hatte und eine heterozygote Merkmalsanlage ausgeschlossen werden konnte, war eine weiterführende medikamentöse Therapie während der Schwangerschaft nicht mehr erforderlich.

Der Morbus Basedow ist eine autoimmune Erkrankung der Schilddrüse mit Antikörpern, welche gegen die TSH-Rezeptoren gerichtet sind und eine Hyperthyreose induzieren (79).

Es ist unerlässlich, Schilddrüsenerkrankungen während der Schwangerschaft gut zu überwachen und zu therapieren, da diese spezielle hormonelle Situation die Schilddrüsenfunktion in besonderer Weise beeinflusst. Eine Hypothyreose sollte vermieden werden, da selbige schwere *fetale* Schäden anrichten kann, so zum Beispiel im Bereich der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Weiterführend droht das vermehrte Auftreten von Fehl- bzw. Frühgeburten (80). Frauen, die an einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung leiden und erhöhte serologische Parameter von Autoantikörpern wie TPO- und Thyreoglobulin-Antikörpern zeigen, sollten während der Schwangerschaft unbedingt mit Jod therapiert werden. Im Falle eines Morbus Basedow sollte ebenfalls Jodprophylaxe betrieben werden, allerdings immer unter Einbeziehung des aktuellen Krankheitszustandes (81).

In unserem Fall wurde unter ständigem Monitoring eine Jodtherapie gut vertragen und es traten keine Probleme auf.

Ist eine thyreostatische Therapie während der Schwangerschaft notwendig, sollte der Einsatz von Thiamazol, wegen des drohenden Risikos einer *Aplasia cutis congenita*, vermieden werden (82). Die Therapie der ersten Wahl wäre in diesem Fall Propylcil (82).

Glücklicherweise war die Patientin in einem Zustand, der keinen Einsatz thyreostatischer Medikation erforderlich machte.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu beachten, dass bei einer guten thyreoidalen Stoffwechsellage trotz Status nach Behandlung mit thyreostatischer Medikation keine Folgeschäden für das Ungeborene zu erwarten sind (83).

Diese Studie bestätigt sich auch in unserem Fallbericht, da die Patientin eine gesunde Tochter geboren hat.

In den Jahren vor sowie während der Schwangerschaft wurde die nun hypothyreote Stoffwechsellage mit Levothyroxin ausgeglichen. Dies geschah in Übereinstimmung mit der Studie von Poppe *et al.* welche zeigte, dass eine medikamentöse Substitution der Schilddrüsenhormone vor allem in der frühen Schwangerschaft sehr wichtig ist, um Komplikationen zu vermeiden (84).

Als Fazit für diesen Fallbericht lässt sich festhalten, dass es für Frauen mit einem Adrenogenitalen Syndrom sowie zusätzlichen endokrinologischen Dysfunktionen möglich ist, schwanger zu werden. Es ist wichtig, den Hormonstatus zu evaluieren sowie ein erfolgreiches medikamentöses Konzept zu entwickeln.

Die Lösung in dem vorgestellten Fall war die zusätzliche abendliche Gabe von Dexamethason. Weiterführend ist es während der Schwangerschaft unerlässlich, den Schilddrüsenhormonstatus im Auge zu behalten, um weiterführende Schäden, auch für das Ungeborene, zu vermeiden.

Zusammenfassend lässt sich abschließend festhalten, dass differentialdiagnostisch bei AGS-Patienten mit Hodenschwellung und sonographischem Tumornachweis immer auch an einen TART gedacht werden sollte.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bieten dem Kliniker in Zukunft eine Möglichkeit, über einen minimal invasiven Zugang mit einer sich anschließenden Punktionsstudie dem Patienten gegebenenfalls eine Operation zu ersparen.

Neuartig gelang im Rahmen dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Methoden die Differenzierung zwischen TART und LZH mittels des ACTH Rezeptors, welcher sich auf gesunden Nebennierenrinden und des TARTs nachweisen ließ, auf den LZH allerdings nicht.

Kritisch zu betrachten bleibt allerdings, dass nicht jedem an einem TART erkrankten Patienten mittels Dexamethasontherapie geholfen werden kann und letztlich doch eine Operation in Erwägung gezogen werden muss, falls kein Größenregress eintritt bzw. die Nebenwirkungen der Medikation den Nutzen überwiegen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Schiebler TH, Schmidt W.** *Anatomie*. 8.Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio : Springer, 2002.
2. **Mesiano S, Jaffe RB.** Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997, Vol. 18, 3, pp. 378-403.
3. **Silbernagl S, Despopulus A.** *Taschenatlas der Physiologie*. 6.Auflage. Stuttgart, New York : Thieme, 2003.
4. **Willenberg HS, Zschucke D, Bornstein SR.** Nebennierentumoren. *Internist.* 2007, Vol. 48, 9, pp. 971-986.
5. **Bongiovanni AM, Root AW.** The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med.* Jun 1963, Vol. 268, pp. 1391-1399.
6. **Bongiovanni AM, Eberlein WR.** Plasma and urinary corticosteroids in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem.* 1956, Vol. 223, 1, pp. 85-94.
7. **Bongiovanni AM.** Unusual steroid pattern in congenital adrenal hyperplasia; deficiency of 3 β -hydroxy dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961, Vol. 21, pp. 860-862.
8. **Biglieri EG, Herron MA, Brust N.** 17-hydroxylation deficiency in man. *J Clin Invest.* 1966, Vol. 45, 12, pp. 1946-1954.
9. **Flück CE, Miller WL.** P450 oxidoreductase deficiency: a new form of congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr.* 2006, Vol. 18, 4, pp. 435-441.
10. **Jaresch S, Schlaghecke R, Jungblut R, Krüskemper HL, Kley HK.** Stumme Nebennierenrindentumore bei Patienten mit Adrenogenitalem Syndrom. *Klin Wochenschr.* 1987, Vol. 65, p. 627.
11. **Clark RV, Albertson BD, Munabi A, Cassorla F, Aguilera G, Warren DW, Sherins RJ, Loriaux DL.** Steroidogenic enzyme activities, morphology and receptor studies of a testicular adrenal rest in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990, Vol. 70, 5, pp. 1408-1413.
12. **Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R.** Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, Vol. 74, 3, pp. 685-689.
13. **Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M.** Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase

messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, Vol. 83, 7, pp. 2585-2588.

14. **Prader, A.** Der Genitalbefund beim Pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenalen Syndroms. *Helv Paediatr Acta.* 1954, Vol. 9, 3, pp. 231-248.

15. **Whitehead FJ, Couper RT, Moore L, Bourne AJ, Byard RW.** Dehydration deaths in infants and young children. *Am J Forensic Med Pathol.* 1996, Vol. 17, 1, pp. 73-78.

16. **Jääskeläinen J, Voutilainen R.** Growth of patients with 21 hydroxylase deficiency: an analysis of the factors influencing adult height. *Pediatr Res.* 1997, Vol. 41, 1, pp. 30-33.

17. **Helleday J, Siwers B, Ritzen EM, Carlstrom K.** Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, Vol. 76, 4, pp. 933-936.

18. **London, DR.** The consequences of hyperandrogenism in young women. *J R Soc Med.* 1987, Vol. 80, 12, pp. 741-745.

19. **Zachmann M, Tassinari D, Prader A.** Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency: a study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983, Vol. 56, 2, pp. 222-229.

20. **Chua SC, Szabo P, Vitek A.** Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, Vol. 84, 20, pp. 7193-7197.

21. **Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA.** Human CYP 11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, Vol. 83, 3, pp. 1033-1036.

22. **Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC.** Characterization of two genes encoding human steroid 11-beta-hydroxylase (P-450(11)b). *J Biol Chem.* 1989, Vol. 264, 35, pp. 20961-20967.

23. **Dringenberg T, Schwitalla M, Haase M, Scherbaum WA, Willenberg HS.** Control of CYP11B2/CYP11B1 Expression Ratio and Consequences for the Zonation of the Adrenal Cortex. *Horm Metab Res.* 2013, Vol. 45, 2, pp. 81-85.

24. **Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I.** New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm Metab Res.* 2008, Vol. 40, 7, pp. 435-441.

25. **Peter, M.** Congenital adrenal hyperplasia: 11beta-hydroxylase deficiency. *Semin Reprod Med.* 2002, Vol. 20, 3, pp. 249-254.

26. **White PC, Speiser PW.** Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Rev.* 2000, Vol. 21, 3, pp. 245-291.
27. **Wilkins L, Fleishmann W, Howard JE.** Macrogenitosomia precox associated with hyperplasia of the adrenogenic tissue of the adrenal and death from corticoadrenal insufficiency. *Endocrinology.* 1940, Vol. 26, pp. 385-395.
28. **Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CG, Noordam K, Hermus AR.** High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, Vol. 86, 12, pp. 5721-5728.
29. **Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Takahashi S, Meuleman EJ, Hulsbergen-van de Kaa C, Sweep FC, Hermus AR.** Testicular adrenal rest tumors in adult males with congenital adrenal hyperplasia: evaluation of pituitary-gonadal function before and after successful testis-sparing surgery in eight patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, Vol. 92, 2, pp. 612-615.
30. **Eberle, A.** *The Melanotropins.* Basel : Karger, 1988.
31. **Hadley ME, Haskell-Luevano C.** The proopiomelanocortin system. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, Vol. 885, pp. 1-21.
32. **Cone, RD.** *The melanocortin receptors.* Totowa NJ : Humana Press, 2000.
33. **Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA.** Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology.* 1996, Vol. 137, 5, pp. 1627-1633.
34. **Chhajlani V, Wikberg JE.** Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA (FEBS 11553). *FEBS Lett.* 1966, Vol. 309, 3, pp. 417-420.
35. **Manna SK, Aggarwal BB.** Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol.* 1998, Vol. 161, 1, pp. 2873-2880.
36. **Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD.** The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science.* 1992, Vol. 257, 5074, pp. 1248-1251.
37. **Xia Y, Wikberg JE.** Localization of ACTH receptor mRNA by in situ hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1996, Vol. 286, 1, pp. 63-68.

38. **Wikberg, JE.** Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol.* 375, 1999, Vols. 1-3, pp. 295-310.
39. **Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DeValle J, Yamada T.** Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 1993, Vol. 268, 11, pp. 8246-8250.
40. **Chhajlani, V.** Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int.* 1996, Vol. 38, 1, pp. 73-80.
41. **Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, Skottner A.** New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res.* 2000, Vol. 42, 5, pp. 393-420.
42. **Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, Yamada T.** Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994, Vol. 200, 3, pp. 1214-1220.
43. **Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD.** Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell.* 1997, Vol. 91, 6, pp. 789-798.
44. **Willenberg HS, Bornstein SR, Dumser T, Ehrhart-Bornstein M, Barocka A, Chrousos GP, Scherbaum WA.** Morphological changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. *Endocr Res.* 1998, Vol. 24, 3-4, pp. 963-967.
45. **Tiryaki T, Aycan Z, Hücümenoğlu S, Atayurt H.** Testis sparing surgery for steroid unresponsive testicular tumors of the congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Surg Int.* 2005, Vol. 21, 10, pp. 853-855.
46. **Seidenwurm D, Smathers RL, Kan P, Hoffman A.** Intratesticular adrenal rests diagnosed by ultrasound. *Radiology.* 1985, Vol. 155, 2, pp. 497-481.
47. **Johnson RE, Scheithauer B.** Massive hyperplasia of testicular adrenal rests in a patient with Nelson's syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1982, Vol. 77, 4, pp. 501-507.
48. **Hamwi GJ, Gwinup G, Mostow JH, Besch PK.** Activation of testicular adrenal rest tissue by prolonged excessive ACTH production. *J Clin Endocrinol Metab.* 1963, Vol. 23, pp. 861-869.
49. **Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Sweep FC, Span PN, Ross HA, Meuleman EJ, Hermus AR.** Testicular Tumors in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase Deficiency show functional features of Adrenocortical tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, Vol. 92, 9, pp. 3674-3680.

50. **Blumberg-Tick J, Boudou P, Nahoul K, Schaison G.** Testicular tumors in congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991, Vol. 73, 5, pp. 1129-1133.
51. **Chatelain D, Montel V, Dickes-Coopman A, Chatelain A, Deloof S.** Trophic and steroidogenic effects of water deprivation on the adrenal gland of the adult female rat. *Regul Pept.* 2003, Vol. 110, 3, pp. 249-255.
52. **Sullivan JG, Gohel M, Kinder RB.** Ectopic adrenocortical tissue found at groin exploration in children: incidence in relation to diagnosis, age and sex. *BJU Int.* 2005, Vol. 95, 3, pp. 407-410.
53. **Souverijns G, Peene P, Keuleers H, Vanbockrijck M.** Ectopic localisation of adrenal cortex. *Eur Radiol.* 2000, Vol. 10, 7, pp. 1165-1168.
54. **Rutgers JL, Young RH, Scully RE.** The testicular "tumor" of the adrenogenital syndrome. A report of six cases and review of the literature on testicular masses in patients with adrenocortical disorders. *Am J Surg Pathol.* 1988, Vol. 12, 7, pp. 503-513.
55. **Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K.** Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells.* 1996, Vol. 1, 7, pp. 663-671.
56. **Lachenmayer A, Lichtenauer UD, Cox T, Schott M, Malendowicz LK, Goretzki PE, Cupisti K, Scherbaum WA, Bornstein SR, Willenberg HS.** Nestin as a marker in the classification of adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2009, Vol. 41, 5, pp. 397-401.
57. **Avila NA, Premkumar A, Merke DP.** Testicular adrenal rest tissue in congenital adrenal hyperplasia: comparison of MR imaging and sonographic findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1999, Vol. 172, 4, pp. 1003-1006.
58. **Stikkelbroeck NM, Suliman HM, Otten BJ, Hermus AR, Blickman JG, Jager GJ.** Testicular adrenal rest tumours in postpubertal males with congenital adrenal hyperplasia: sonographic and MR features. *Eur Radiol.* 2003, Vol. 13, 7, pp. 1597-1603.
59. **Martinez-Aguayo A, Rocha A, Rojas N, García C, Parra R, Lagos M, Valdivia L, Poggi H, Cattani A and Group., Chilean Collaborative Testicular Adrenal Rest Tumor Study.** Testicular adrenal rest tumors and Leydig and Sertoli cell function in boys with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, Vol. 92, 12, pp. 4583-4589.
60. **Reisch N, Scherr M, Flade L, Bidlingmaier M, Schwarz HP, Müller-Lisse U, Reincke M, Quinkler M, Beuschlein F.** Total adrenal volume but not testicular adrenal rest tumor volume is associated with hormonal control in

patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, Vol. 95, 5, pp. 2065-2072.

61. **Fenichel P, Bstandig B, Roger C, Chevallier D, Michels JF, Sadoul JL, Hieronimus S, Brucker-Davis F.** Unilateral testicular tumour associated to congenital adrenal hyperplasia: Failure of specific tumoral molecular markers to discriminate between adrenal rest and leydigioma. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008, Vol. 69, 5, pp. 453-458.

62. **Willenberg HS, Späth M, Maser-Gluth C, Engers R, Anlauf M, Dekomien G, Schott M, Schinner S, Cupisti K, Scherbaum WA.** Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 2010, Vol. 33, 5, pp. 467-472.

63. **O'Shaughnessy PJ, Fleming LM, Jackson G, Hochgeschwender U, Reed P, Baker PJ.** Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis. *Endocrinology.* 2003, Vol. 144, 8, pp. 3279-3284.

64. **Solish SB, Goldsmith MA, Voutilainen R, Miller WL.** Molecular characterization of a Leydig cell tumor presenting as congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989, Vol. 69, 6, pp. 1148-1152.

65. **Doghman M, Delagrang P, Blondet A, Berthelon MC, Durand P, Naville D, Bégeot M.** Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control. *Endocrinology.* 2004, Vol. 145, 2, pp. 541-547.

66. **Al-Dujaili EA, Hope J, Estivariz FE, Lowry PJ, Edwards CR.** Circulating human pituitary pro-gamma-melanotropin enhances the adrenal response to ACTH. *Nature.* 1981, Vol. 291, 5811, pp. 156-159.

67. **Dhillo WS, Small CJ, Gardiner JV, Bewick GA, Whitworth EJ, Jethwa PH, Seal LJ, Ghatei MA, Hinson JP, Bloom SR.** Agouti-related protein has an inhibitory paracrine role in the rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, Vol. 301, 1, pp. 102-107.

68. **Daniel PB, Fernando C, Wu CS, Marnane R, Broadhurst R, Mountjoy KG.** 1 kb of 5' flanking sequence from mouse MC4R gene is sufficient for tissue specific expression in a transgenic mouse. *Mol Cell Endocrinol.* 2005, Vol. 239, 1-2, pp. 63-71.

69. **Mountjoy KG, Jenny Wu CS, Dumont LM, Wild JM.** Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory,

musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology*. 2003, Vol. 144, 12, pp. 5488-5496.

70. **Saez JM, Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Tabone E, Rivarola MA.** Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem*. 1987, Vol. 27, 1-3, pp. 317-329.

71. **Lejeune H, Skalli M, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM.** The paracrine role of Sertoli cells on Leydig cell function. *Cell Biol Toxicol*. 1992, Vol. 8, 3, pp. 73-83.

72. **O'Connor AE, De Kretser DM.** Inhibins in normal male physiology. *Semin Reprod Med*. 2004, Vol. 22, 3, pp. 177-185.

73. **Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP.** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998, Vol. 19, 2, pp. 101-143.

74. **Helleday J, Siwers B, Ritzén EM, Carlström K.** Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993, Vol. 76, 4, pp. 933-936.

75. **Stikkelbroeck NM, Hermus AR, Braat DD, Otten BJ.** Fertility in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol Surv*. 2003, Vol. 58, 4, pp. 275-284.

76. **Jääskeläinen J, Hippeläinen M, Kiekara O, Voutilainen R.** Child rate, pregnancy outcome and ovarian function in females with classical 21-hydroxylase deficiency. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000, Vol. 79, 8, pp. 687-692.

77. **Merke, DP.** Approach to the adult with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008, Vol. 93, 3, pp. 653-660.

78. **Hoepffner W, Schulze E, Bennek J, Keller E, Willgerodt H.** Pregnancies in patients with congenital adrenal hyperplasia with complete or almost complete impairment of 21-hydroxylase activity. *Fertil Steril*. 2004, Vol. 81, 5, pp. 1314-1321.

79. **Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R.** Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest*. 2005, Vol. 115, 8, pp. 1972-1983.

80. **Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinoeer D, Mandel SJ, Stagnaro-Green A.** Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, Vol. 92, 8 Suppl, pp. S1-47.

81. **Bournaud C, Orgiazzi JJ.** Iodine excess and thyroid autoimmunity. *J Endocrinol Invest.* 2003, Vol. 26, 2 Suppl, pp. 49-56.
82. **Iwayama H, Hosono H, Yamamoto H, Oshiro M, Ueda N.** Aplasia cutis congenita with skull defect in a monozygotic twin after exposure to methimazole in utero. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007, Vol. 79, 10, pp. 680-684.
83. **Laurberg P, Nygaard B, Glinoe D, Grussendorf M, Orgiazzi J.** Guidelines for TSH-receptor antibody measurements in pregnancy: results of an evidence-based symposium organized by the European Thyroid Association. *Eur J Endocrinol.* 1998, Vol. 139, 6, pp. 584-586.
84. **Poppe K, Velkeniers B, Glinoe D.** Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007, Vol. 66, 3, pp. 309-321.

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Holger S. Willenberg für die Überlassung des Themas sowie die freundliche und stets herzliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Baldus danke ich herzlich für die Begutachtung der Arbeit und Übernahme des Korreferats.

Dem Team des endokrinologischen Labors der Universitätsklinik Düsseldorf danke ich für die freundliche Einarbeitung in die immunhistochemische Methodik.

Bei Frau Johanna Kempkes und Frau Dr. med. Heike Kerner möchte ich mich für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit im Hinblick auf Grammatik, Rechtschreibung und Stringenz bedanken.

Meinen Eltern Helga und Winfried Cox danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums der Humanmedizin sowie während der Erstellung dieser Arbeit. Ohne ihren Rückhalt wäre dies sicher nicht möglich gewesen.

Meinem Mann Thomas Kempkes danke ich von Herzen für die liebevolle Unterstützung während der Studienjahre sowie die immer wiederkehrenden Hinweise, die Promotion zu einem glücklichen Ende zu führen. Ohne ihn hätte ich dieses Ziel nicht erreicht.

*Am Ziel deiner Wünsche wirst du jedenfalls eines vermissen:
dein Wandern zum Ziel*

M. von Ebner-Eschenbach

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorliegende Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

30.03.2013, Theresa Kempkes