

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

**Epidemiologische, klinische, labordiagnostische und
histologische Charakteristika von Aldosteron-
und Cortisol-kosezernierenden
Nebennierenadenomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Martin Richard Späth

2012

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

gez.:

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

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Holger S. Willenberg

Koreferent: Priv. Doz. Dr. med. Martin Anlauf

meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Willenberg, H. S., Späth, M., Maser-Gluth, C., Engers, R., Anlauf, M., Dekomien, G., Schott, M., Schinner, S., Cupisti, K. et Scherbaum, W. A. (2010) 'Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism', *Hypertens Res*, 33(5), 467-72.

Späth, M., Korovkin, S., Antke, C., Anlauf, M. et Willenberg, H. S. (2011) 'Aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism', *Eur J Endocrinol*, 164(4), 447-55.

| | |
|--|---------------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Anatomie und Physiologie der Nebennierenrinde | 1 |
| 1.2 Mineralokortikoid- und Glukokortikoidsynthese..... | 3 |
| 1.3 Primärer Hyperaldosteronismus | 5 |
| Diagnostik und Therapie | 6 |
| 1.4 Cushing-Syndrom..... | 7 |
| Diagnostik und Therapie | 8 |
| 1.5 Ziel der Arbeit | 9 |
| 2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN | 10 |
| 2.1. Patienten | 10 |
| 2.1.1 Patientenvorstellung und klinische Untersuchungsbefunde | 10 |
| 2.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests | 11 |
| 2.1.3 Bildgebende Diagnostik..... | 13 |
| 2.1.4 Immunhistologische Analysen | 14 |
| 2.1.5 Genetische Diagnostik | 18 |
| 2.1.6 Western Blot-Analysen..... | 18 |
| 2.2 Literaturrecherche | 25 |
| 2.2.1 Untersuchungskriterien | 26 |
| 2.2.2 Umgang mit Laborwerten aus der Literatur | 27 |
| 3. ERGEBNISSE..... | 28 |
| 3.1 Patienten | 28 |
| 3.1.1 Anamnestische Angaben und klinische Untersuchungsbefunde | 28 |
| 3.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests | 28 |
| 3.1.3 Bildgebende Diagnostik..... | 30 |
| 3.1.4 Immunhistologische Analysen | 30 |
| 3.1.5 Genetische Diagnostik | 33 |
| 3.1.6 Western Blot-Analysen..... | 34 |
| 3.2 Literaturrecherche | 34 |
| 3.2.1 Klinisches Erscheinungsbild der Patienten mit A/CPA | 35 |
| 3.2.2 Aufarbeitung des PA | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3 Aufarbeitung des Hyperkortisolismus | 36 |
| 3.2.4 Radiologische Untersuchungen und Subtyppendifferenzierung..... | 37 |
| 3.2.5 Chirurgische Therapie und postoperative Nebenniereninsuffizienz | 38 |
| 3.2.6 Histologische und immunhistologische Untersuchungsergebnisse | 39 |
| 3.2.7 Molekularbiologische Untersuchungen | 40 |
| | |
| 4. DISKUSSION | 43 |
| | |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 50 |
| | |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS..... | 51 |
| | |
| 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | A |
| | |
| 8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | C |

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Nebennierenrinde

Die Nebenniere ist ein paarig angelegtes Organ, welches sich, von einer Kapsel umgeben und in Fettgewebe eingebettet, am oberen Nierenpol befindet. Schneidet man die Nebenniere auf, so lässt sich bereits makroskopisch eine Gliederung in Rinde und Mark erkennen (Schiebler 2005). Entwicklungsgeschichtlich entstehen die Rinde aus dem *Mesoderm* und das Mark aus dem *Ektoderm* (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006). Die Rinde erscheint makroskopisch, aufgrund eines hohen Lipidgehalts, gelblich und lässt sich mikroskopisch in drei Zonen einteilen. Dabei sind, von außen nach innen, die *Zona glomerulosa* (zG), die *Zona fasciculata* (zF) und die *Zona reticularis* (zR) zu unterscheiden. Die zG zeichnet sich dabei durch eine knäuelartige Zellanordnung aus, während die Zellen der zF eher säulenartig und die der zR eher netzartig angeordnet imponieren.

Auch physiologisch betrachtet lässt sich die Nebenniere in Kompartimente einteilen. Dabei ist die Rinde der Ort der Steroidbiosynthese, während das Mark für die Produktion von Adrenalin und Noradrenalin zuständig ist. Den einzelnen Zonen der Rinde kommen dabei unterschiedliche Aufgaben zu.

In der zG wird überwiegend das Mineralokortikoid Aldosteron gebildet, wohingegen in der zF überwiegend Glukokortikoide, wie Cortisol, produziert werden. Die zR ist in der Hauptsache für die Synthese von Androgenvorstufen wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion verantwortlich (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

Die Sekretion der verschiedenen Hormone ist dabei hauptsächlich von zwei Regelkreisen abhängig (Willenberg et al. 2008). Die Mineralokortikoidsekretion unterliegt, neben den Stimuli durch Corticotropin (ACTH), Kalium und Natrium, überwiegend dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Glukokortikoid- und Androgen-Sekretion hingegen hängen hauptsächlich vom Einfluss der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) ab (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

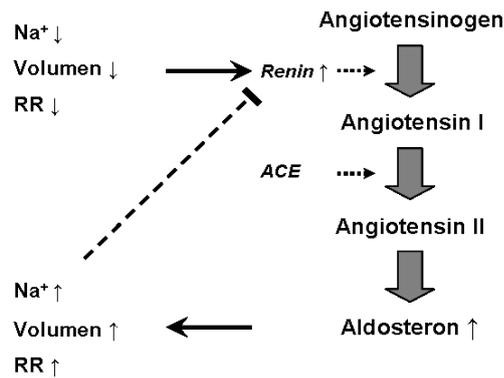


Abb. 1 Schematische Darstellung des RAAS. Abk.: \rightarrow = Stimulation; $- \dashrightarrow$ = Hemmung; $\cdots \rightarrow \downarrow$ = enzymatischer Umsatz; \uparrow = Wertanstieg; \downarrow = Wertverminderung; Na^+ = Natrium; RR = arterieller Blutdruck; ACE = Angiotensin Converting Enzym

Das RAAS wurde erstmalig 1958 beschrieben (Gross 1958) und bezeichnet einen Feedback-Mechanismus zwischen der Niere und der Nebennierenrinde – dargestellt in Abbildung 1. Durch Natrium-, Volumen- und/oder Blutdruckverminderung kommt es im juxtaglomerulären Apparat der Niere zu einer Reninausschüttung. Renin ist ein proteolytisches Enzym und führt im Blut zur Umsetzung von Angiotensinogen, einem α_2 -Globulin der Leber, zu Angiotensin I. Das Dekapeptid Angiotensin I wird durch das, überwiegend in der Lunge lokalisierte, Angiotensin Converting Enzym (ACE) in das Octapeptid Angiotensin II umgewandelt. Dieses Angiotensin II hat vasopressive Wirkung und bindet in der Nebennierenrinde an den membranständigen Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 ($\text{AT}_1\text{-R}$) der Zellen der zG und führt so zur Aldosteronsekretion. Das Aldosteron bewirkt anschließend eine gesteigerte Natriumrückresorption und ADH-Sekretion, die zum Volumenanstieg und damit gemeinsam mit der vasopressiven Wirkung des Angiotensin II zur Steigerung des arteriellen Blutdrucks führt (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

Die HPA-Achse beschreibt den Regelkreis – dargestellt in Abbildung 2 –, der den größten Einfluss auf die Glukokortikoid- und Androgensekretion besitzt. Eine Ausschüttung von Corticoliberin (CRH), einem Peptidhormon aus dem Hypothalamus, führt in der Hypophyse zu einer Sekretion von Proopiomelanocortin (POMC). Aus POMC wird durch proteolytische Spaltung anschließend ACTH, dem wichtigsten Faktor der Cortisol-Sekretion, gebildet.

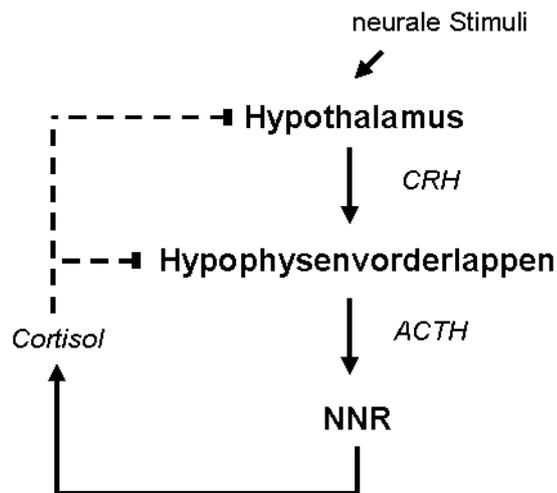


Abb. 2 Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Abk.: → = Stimulation; - -> = Hemmung; CRH = Corticoliberin; ACTH = Corticotropin; NNR = Nebennierenrinde

ACTH bewirkt durch Bindung an den membranständigen und G-Protein gekoppelten ACTH-Rezeptor (MC2-Rezeptor) in der Nebennierenrinde anschließend eine Steroid-Sekretion. Das gebildete Cortisol führt wiederum durch negative Rückkopplung am Hypothalamus zu einer verminderten CRH- und an der Hypophyse zu einer verminderten ACTH-Sekretion. Es entsteht so ein Cortisol-ACTH-Gleichgewicht, welches, beispielsweise durch Stress, über Zytokine und autonome neuronale Regulationsmechanismen an äußere Umstände angepasst werden kann (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

1.2 Mineralokortikoid- und Glukokortikoidsynthese

Die Mineralokortikoid- sowie die Glukokortikoidsynthese erfolgen in der Nebennierenrinde. Dabei werden, durch zonale Unterschiede in der Enzymexpression bedingt, die Mineralokortikoide in der zG und die Glukokortikoide in der zF gebildet (Ghayee et Auchus 2007).

In beiden Fällen handelt es sich um Steroidhormone, welche sich alle vom Sterangerüst des Cholesterols ableiten. Die Synthese der jeweiligen Hormone – skizziert in Abbildung 3 – erfolgt *de novo* vornehmlich durch Regulation des RAAS und der HPA-Achse.

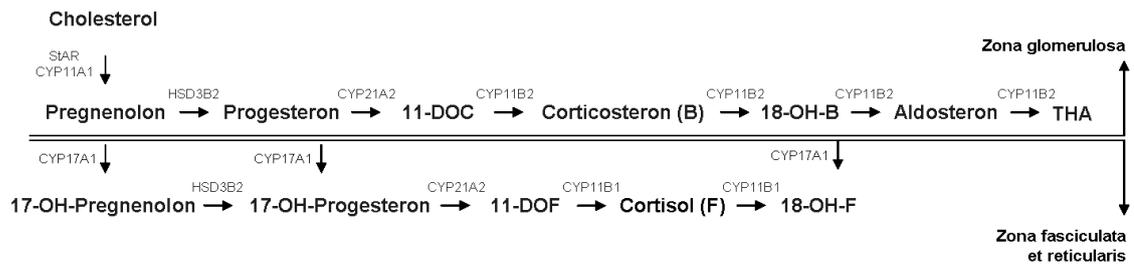


Abb. 3 Schematische Darstellung der Aldosteron- und Cortisolsynthese – angelehnt an Ghayee et Auchus 2007. Abk.: StAR = steroidogenic acute regulatory protein; 11-DOC = 11-Desoxycorticosteron; 18-OH-B = 18-Hydroxycorticosteron; THA = Tetrahydroaldosteron; 17-OH-Pregnenolon = 17-Hydroxypregnenolon; 17-OH-Progesteron = 17-Hydroxyprogesteron; 11-DOF = 11-Desoxycortisol; 18-OH-F = 18-Hydroxycortisol

Die ersten beiden Syntheseschritte sind für alle Steroidhormone gleich. Zunächst erfolgt der Transport des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran durch das steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Anschließend wird das Cholesterin durch die Cholesterin-side-chain Cleavage (*CYP11A1*) hydroxyliert und eine Kohlenstoffpaarbindung gespalten, sodass Pregnenolon und Isocaproaldehyd entstehen. Der Transport durch die Mitochondrienmembran ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Ghayee et Auchus 2007). Nach der Bildung von Pregnenolon teilen sich die Wege zur Mineralokortikoid- und Glukokortikoidproduktion.

Zur Mineralokortikoidsynthese wird in der zG das eben gebildete Pregnenolon durch die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD3B2*) zu Progesteron und dieses anschließend durch die 21-Hydroxylase (*CYP21A2*) zu 11-Desoxycorticosteron (11-DOC) umgewandelt. Daraufhin erfolgt mithilfe der Aldosteronsynthase (*CYP11B2*) die Umwandlung von 11-DOC über die Zwischenstufen Corticosteron (B) und 18-Hydroxycorticosteron (18-OH-B) zu Aldosteron. Aldosteron wiederum kann ebenfalls durch *CYP11B2* zu Tetrahydroaldosteron (THA) umgewandelt werden.

Zur Synthese von Cortisol erfolgt zunächst mithilfe der 17α -Hydroxylase (*CYP17A1*) eine Umwandlung von Pregnenolon zu 17-Hydroxypregnenolon (17-OH-Pregnenolon). *CYP17A1* befindet sich nur in der zF und zR, sodass in der zG Aldosteron synthetisiert wird, weil *CYP17A1* dort nicht beziehungsweise in sehr geringem Ausmaß vorhanden ist (Harkins et al. 1974, Crivello et Gill 1983, Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

17-OH-Pregnenolon wird anschließend durch HSD3B2 zu 17-Hydroxyprogesteron (17-OH-Progesteron) umgewandelt. Darauf folgt die Hydroxylierung des 17-OH-Progesterons durch CYP21A2 zur Bildung von 11-Desoxycortisol (11-DOF). Der letzte Schritt umfasst schließlich die Hydroxylierung von 11-DOF durch die 11 β -Hydroxylase (*CYP11B1*) zu Cortisol. Cortisol wiederum kann weiterhin, ebenfalls durch CYP11B1, zu 18-Hydroxycortisol (18-OH-F) hydroxyliert werden.

1.3 Primärer Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus (PA) wurde ausführlich 1955 von Jerome Conn beschrieben (Conn 1955) und bezeichnet eine Störung des Hormonhaushalts im Sinne einer vermehrten Aldosteronsekretion, welche unabhängig vom RAAS ist. Die Ursache für einen PA liegt bei circa 50% der Fälle in einem Aldosteron produzierenden Nebennierenadenom (APA) und bei den anderen knappen 50% der Fälle in einer uni- oder bilateralen Nebennierenrindenhyperplasie. In seltenen Fällen kann der PA durch familiäre Formen – familiärer Hyperaldosteronismus Typ 1-3 – sowie durch Nebennierenkarzinome bedingt sein (Fischer et al. 2011, Funder et al. 2008, Siegenthaler et Amann-Vesti 2006, Born-Frontsberg et Quinkler 2009, Geller et al. 2008).

Die Prävalenz des PA unter Patienten mit einer arteriellen Hypertonie wurde über lange Zeit diskutiert und es finden sich Angaben zwischen 1,4% und 32%, im Median 8,8%, (Rossi 2011). Der PA wird dabei als die häufigste Ursache für eine sekundäre arterielle Hypertonie genannt (Born-Frontsberg et Quinkler 2009).

Die Symptomatik kann sich je nach Ausprägung und Patient unterscheiden. Die häufigsten Symptome beziehungsweise klinischen Zeichen sind Kopfschmerzen, Sehstörungen, Kardiomegalie und Wasserretention (Fischer et al. 2011, Siegenthaler et Amann-Vesti 2006). In allen Fällen kommt es durch die vermehrte Aldosteronproduktion zu einer vermehrten Natriumrückresorption im Austausch gegen Kalium. Damit verbunden kommt es zu einer vermehrten Flüssigkeitsretention mit anschließendem Blutdruckanstieg und, bei voller Ausprägung des klinischen Bildes, zu einer Hypokaliämie. Weiterhin kann es durch

eine vermehrte Ausscheidung von H^+ -Ionen im renalen Sammelrohr zu einer metabolischen Alkalose kommen (Siegenthaler et al. 2006).

Ferner werden bei Patienten mit PA eine erhöhte Rate an kardio-, zerebro- und renovaskulären Begleiterkrankungen beobachtet (Quinkler et al. 2010). Die erhöhte Aldosteronkonzentration führt zum Beispiel zu kardiovaskulären Umbauprozessen wie linksventrikulären Wandverdickungen (Rossi et al. 2002), einer vermehrten Rate an Schlaganfällen (Nishimura et al. 1999) und einer Mikroalbuminurie (Sechi et al. 2006).

Diagnostik und Therapie

Die aktuelle Leitlinie sieht vor, dass Patienten mit arterieller Hypertonie und folgenden Eigenschaften auf das Vorliegen eines PA untersucht werden sollten (Funder et al. 2008):

- arterielle Hypertonie Grad 2
(systolisch: 160-179 mmHg und/oder diastolisch: 100-109 mmHg)
- arterielle Hypertonie Grad 3
(systolisch: > 180 mmHg und/oder diastolisch: > 110 mmHg)
- therapieresistente arterielle Hypertonie (> 3 Antihypertensiva)
- spontane Hypokaliämie oder diuretikainduzierte Hypokaliämie
- adrenales Inzidentalom
- zerebrovaskuläres Ereignis im Alter < 40 Jahren
- positive Familienanamnese für arterielle Hypertonie < 40 Jahren
- erstgradige Verwandtschaft zu Patienten mit PA

Die Abklärung folgt dabei einem typischen Schema, bestehend aus Screening, Bestätigungstest, Differentialdiagnostik und Bildgebung (Willenberg et al. 2012). Das Screening umfasst dabei zwei Schritte. Im ersten Schritt werden die Aldosteron- sowie Renin-Konzentrationen bestimmt, um daraus den Quotienten (ARQ) zu errechnen. Ein ARQ oberhalb der Norm, die vom jeweils verwendeten Hormonassay abhängig ist (Fischer et al. 2011), lässt anschließend einen Bestätigungstest folgen. Als Bestätigungstests gelten der Kochsalzbelastungstest, der Fludrocortison-Suppressionstest sowie der Captoprilbelastungstest. Wird im Anschluss an einen dieser Tests ein erhöhter Aldosteronwert gemessen, so gilt der PA als bestätigt und es folgt eine Subtypisierung. Dazu werden

die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie sowie die selektive Nebennierenvenenkatherisierung empfohlen.

Die Behandlung eines unilateralen Adenoms erfolgt mithilfe einer Adrenalectomie, während die bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie von einer lebenslangen antimineralokortikoiden medikamentösen Therapie begleitet wird.

1.4 Cushing-Syndrom

Das Cushing-Syndrom (CS) beschreibt eine Reihe von klinischen Zeichen und Symptomen, die aus einem, über längere Zeit bestehenden, Hyperkortisolismus resultieren. Die häufigste Form des CS ist das iatrogene CS, das durch Medikamentenverordnungen verursacht wird. Als weitere Form gibt es das endogene CS, das in eine ACTH-abhängige und in eine ACTH-unabhängige Form eingeteilt wird. Die ACTH-abhängige Form (70%) ist durch eine erhöhte ACTH-Sekretion von hypophysär oder – seltener – ektop bedingt, während die ACTH-unabhängige Form (30%) in einer erhöhten adrenalen Kortisolsekretion ihre Ursache findet (Nieman et al. 2008, Fischer et al. 2011).

Für die Inzidenz finden sich Angaben zwischen 1,2 und 2,4 endogenen Cushingfällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr (Etxabe et Vazquez 1994, Lindholm et al. 2001).

Die klinische Erscheinung und Symptomatik des CS kann interindividuell stark schwanken. So gibt es neben dem Vollbild eines CS auch die präklinische Form – das präklinische CS –, bei dem der Hyperkortisolismus lediglich durch labor-diagnostische Verfahren nachgewiesen wird, da für den ungeübten Untersucher keine eindeutig fassbaren anamnestischen oder klinischen Zeichen für ein CS vorliegen. Ebenso vielfältig, wie die Wirkungen von Glukokortikoiden im menschlichen Organismus, sind die Folgen eines Glukokortikoidexzesses. So kann es zur Beeinflussung des Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsels kommen sowie zu Störungen des hämatopoetischen Systems, des Bindegewebes, des Knochenstoffwechsels, der Haut und des zentralen Nervensystems (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006).

Eines der häufigsten aber auch unspezifischsten Symptome ist die arterielle Hypertonie, welche auf eine erhöhte Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber Angiotensin II und Katecholaminen sowie die zunehmende

mineralokortikoide Wirkung der Glukokortikoide zurückzuführen ist (Siegenthaler et Amann-Vesti 2006). Als weitere Symptome werden Fettumverteilungsstörungen zum Beispiel mit Vollmondgesicht und Stammfettsucht, eine atrophe Haut mit *Striae rubrae distensae* und eine proximale Muskelatrophie angegeben. Zudem finden sich häufig bei Frauen ein Hirsutismus und Menstruationsstörungen sowie Impotenz bei Männern (Fischer et al. 2011). Jedes dieser Symptome ist, einzeln betrachtet, nicht zwangsläufig durch ein CS bedingt, jedoch macht die Kombination mehrerer dieser Symptome die Diagnose wahrscheinlich.

Diagnostik und Therapie

Die Symptome des CS können zum Teil sehr unspezifisch sein. Deshalb wird empfohlen, nur ausgewählte Patientengruppen zu untersuchen, bei denen bestimmte Symptomkonstellationen vorhanden sind (Nieman et al. 2008). Als geeignet erscheinen folgende Symptome und Befunde:

- junges Alter kombiniert mit arterieller Hypertonie, Osteoporose, Diabetes mellitus Typ 2 und dünner Haut
- schnelle Hämatombildung nach leichten Traumata, Plethora, proximale Muskelschwäche und *Striae rubrae distensae*
- Gewichtszunahme in Kombination mit Wachstumsstillstand bei Kindern
- adrenales Inzidentalom

Auch hier folgt die biochemische Diagnostik einem typischen Schema, welches nach der kundigen Anamnese und körperlichen Untersuchung aus Screening, Bestätigung, Differentialdiagnostik und abschließender Bildgebung besteht (Willenberg et al. 2012). Zur initialen Diagnostik wird die Messung von freiem Kortisol im 24h-Sammelurin, die zweimalige Speichelkortisolmessung um Mitternacht beziehungsweise der niedrigdosierte Dexamethason-Suppressionstest (DST) empfohlen. Zur Diagnosesicherung bedarf es zweier pathologischer Ergebnisse in entweder einem Test mit zweimaliger Wiederholung beziehungsweise – besser noch – zwei separaten unterschiedlichen Tests.

Sofern die Diagnose gesichert ist, folgt eine ACTH-Bestimmung zur Differenzierung zwischen der ACTH-abhängigen beziehungsweise ACTH-unabhängigen Form des endogenen CS. ACTH-Werte < 15 pg/ml definieren das ACTH-unabhängige CS und lassen eine bildgebende Diagnostik der Nebenniere mittels

Computertomographie oder Magnetresonanztomographie folgen. Finden sich inadäquat hohe ACTH-Werte, zum Beispiel über 15 pg/ml, so spricht dies für ein ACTH-abhängiges CS und es schließen sich weitere diagnostische Verfahren an.

Für gewöhnlich folgt eine Therapie durch Tumorresektion. Im Fall der Inoperabilität werden die Patienten mit Cortisol-Synthese-Hemmern, wie Mitotane und Ketokonazol, behandelt (Fischer et al. 2011).

1.5 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren erschienen mehrere Artikel in Form von Falldarstellungen beziehungsweise Fallserien über Patienten mit PA in Kombination mit einem Hyperkortisolismus aufgrund von Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenadenomen (A/CPAs).

Das Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung von A/CPAs hinsichtlich ihrer Epidemiologie, Klinik, Labordiagnostik und histologischer Eigenschaften.

Mittels labordiagnostischer Verfahren, endokrinologischer Funktionstest und immunhistochemischer Methoden sollten zwei Patientinnen untersucht und die bereits publizierten Artikel hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede analysiert werden. Dies sollte im Anschluss einen Vergleich der eigenen Untersuchungen mit den Erkenntnissen aus den bereits publizierten Artikeln ermöglichen.

Durch diese strukturierte Aufarbeitung der A/CPAs sollte ein Zwischenstand der wissenschaftlichen Erkenntnisse wiedergespiegelt werden, der in Zukunft gezielte Forschung zu noch nicht geklärten Fragen ermöglichen sollte.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

2.1.1 Patientenvorstellung und klinische Untersuchungsbefunde

Patientin 1:

Zum Zeitpunkt der Vorstellung 57-jährige Frau in der Postmenopause, die eine hypertensive Krise mit Hypokaliämie erlitt und zur weiteren Abklärung in die endokrinologische Ambulanz überwiesen wurde. Die Patientin berichtete über Nykturie, Mundtrockenheit, sporadische Schwindelanfälle und innere Unruhe. Sie war adipös mit einer Körperlänge von 1,53 m bei einem Gewicht von 74,2 kg und einem Body-Mass-Index von 32 kg/m². Ihr Blutdruck lag bei 200/99 mmHg und der Puls bei 82 Schlägen pro Minute. Die Patientin zeigte folgende Symptome eines Cushing-Syndroms: Stammfettsucht, Muskelschwäche, Hirsutismus, Hautatrophie und Osteoporose.

Patientin 2:

Zum Zeitpunkt der Präsentation 49-jährige Frau, die zur weiteren Abklärung eines PA überwiesen wurde. Zwei Monate vor der Visite am Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) war sie wegen einer hypertensiven Krise bereits in einem anderen Krankenhaus in stationärer Behandlung gewesen.

Die Patientin litt an Depressionen und hatte eine 2-jährige Vorgeschichte mit erhöhtem Blutdruck und Gewichtszunahme. Sie berichtete über intermittierende Mundtrockenheit, intensives Durstgefühl und Nykturie. Ihr Blutdruck lag bei 155/105 mmHg. Sie hatte weiterhin typische klinische Symptome eines Cushing-Syndroms in diskreter Ausprägung: Ihre Haut zeigte eine moderate Atrophie und sie litt an proximaler Skelettmuskelschwäche. Diese äußerte sich durch das Unvermögen, nicht mehr aus der Hocke aufstehen zu können. In der Familienanamnese war keine Vorgeschichte von Nebennierentumoren oder arterieller Hypertonie ersichtlich.

2.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests

Im Rahmen der Diagnostik wurden Natrium- und Kalium-Werte bestimmt. Dies erfolgte im Zentralinstitut für klinische Chemie und Labordiagnostik des UKD (Direktor: Prof. Dr. med. F. Boege) mittels einer ionenselektiven Elektrode aus Blutserum.

Die Hormone Aldosteron, ACTH, Cortisol (F), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S), 18-OH-Cortisol (18-OH-F), 18-OH-Corticosteron (18-OH-B), Aldosteron-18-Glucuronid (A18G), Tetrahydroaldosteron (THA) und Renin wurden mit verschiedenen Immunoassays aus Blutplasma der Patienten bestimmt. Die einzelnen Verfahren sind in den nächsten Absätzen jeweils getrennt aufgeführt.

Jegliche durchgeführte Untersuchung und Diagnostik erfolgte mit Patienteneinverständnis im Rahmen des Deutschen Conn-Registers (Registernummer: 3027).

Labordiagnostik

- Die Serumaldosteronkonzentration (PAC) wurde mittels des Radio-Immunoassays (COAT-A-Count, Siemens, Bad Nauheim, Deutschland) bestimmt. Die Blutkonzentrationen ändern sich in Abhängigkeit von Serumkaliumkonzentrationen, ACTH und Renin/Angiotensin II. Werte über 160 ng/l im Liegen sind in der Regel zu hoch.
- ACTH und F wurden mithilfe des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (Elecsys, Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Für ACTH gelten Richtwerte zwischen 7-46 pg/ml und für F zwischen 6-19 µg/dl als normal.
- DHEA-S wurde mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay (Immulite, Siemens, Bad Nauheim, Deutschland) bestimmt. Hier gelten altersabhängige Normbereiche, wobei Serumspiegel zwischen 80-350 µg/dl wahrscheinlich physiologisch sind.
- 18-OH-F, 18-OH-B, A18G und THA wurden durch das Steroidlabor des Instituts für Pharmakologie der Universität Heidelberg mittels eines *in house*-Radioimmunoassays bestimmt, ein Verfahren, das bereits an anderer Stelle näher beschrieben wurde (Vecsei et al. 1983). Dabei gelten für 18-OH-F Werte im Bereich von 30-130 ng/dl und für 18-OH-B Werte im Bereich von 12-55 ng/dl im Sitzen als normal.

Für A18G gilt eine Diurese von weniger als 12 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ bei stärkerem Salzkonsum mit einer Natriumtagesausscheidung von 200 mmol/die als normal. Die Ausscheidung von THA sollte bei einer Normalperson weniger als 65 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ betragen (Balas et al. 2010).

- Die Plasmareninkonzentration (PRC) wurde mittels des Chemilumineszenzimmunoassay (CLIA, Liaison, Diasorin Dietzenbach, Deutschland) aus Patientenplasma in Heidelberg (www.labor-limbach.de) bestimmt. Als nicht-supprimiert gelten Spiegel über 5 ng/l (Willenberg et al. 2009, Balas et al. 2010).

Funktionstests

Die klinischen Untersuchungen und Funktionstests wurden gemäß der aktuellen klinischen Praxis-Leitlinie (Funder et al. 2008) im Konsens mit dem Deutschen Fresenius-Conn-Register durchgeführt (www.conn-register.de, Diederich et al. 2010). Zur Diagnose eines PA wurde als Screeningverfahren der Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ) bestimmt und als Bestätigungstest der Fludrocortison-Suppressionstest (FST) durchgeführt. Zum Ausschluss eines Hyperkortisolismus unterzogen sich die Patientinnen einem Dexamethason-Suppressionstest (DST). Die genaue Durchführung der einzelnen Tests ist in den folgenden Absätzen zu finden.

- ARQ: Als Screeningverfahren im Rahmen der Diagnostik eines PA wird der Quotient aus der Aldosteronkonzentration (A) und der Plasmareninkonzentration (PRC) bestimmt. Da der ARQ durch Medikamente beeinflusst werden kann (Funder et al. 2008, Tomaschitz et Pilz 2010), wurde vor der Bestimmung des ARQ die Pharmakotherapie der Patientinnen umgestellt. Dabei wurden zunächst vier Wochen vorher Aldosteronantagonisten und eine Woche vor der ARQ Bestimmung Schleifendiuretika abgesetzt. Die Blutentnahme zur ARQ Bestimmung erfolgte zwischen 9.00 Uhr und 10.00 Uhr nach vorangegangener 15-minütiger Ruhepause. Weiterhin sollten die Patientinnen bereits mindestens zwei Stunden wach gewesen sein. Als relativ sicherer Hinweis auf einen vorliegenden PA galt ein ARQ > 33 (Willenberg et al. 2009).
- FST: Die Patientinnen erhielten über vier Tage alle 6 h eine Dosis von 0,1 mg Fludrocortison *per os*. Zusätzlich wurde während dieser vier Tage

alle 12-18 h eine Kalium-Brausetablette (40 millival) gegeben, um den Plasma-Kalium-Wert nahe 4,0 mmol/l zu stabilisieren. Ferner wurden die Patientinnen angehalten, sich kochsalzreich zu ernähren, um eine renale Natriumausscheidung von > 200 mmol/die zu erreichen. Dazu wurde die Natriumausscheidung anhand einer 24h-Sammelurinuntersuchung von Tag 4 auf Tag 5 quantifiziert. Am fünften Tag wurden um 9.00 Uhr Aldosteron- sowie Reninspiegel bestimmt. Die Patientinnen befanden sich dabei jeweils in einer sitzenden Körperhaltung. Ein Test wurde als pathologisch und somit der PA als bestätigt gewertet, wenn die A am vierten Tag 60 ng/l überstieg. Weiterhin musste Renin kleiner als 5 ng/l sein. Außerdem wurde der gesammelte Urin benutzt, um die 24h-Cortisoldiurese zu bestimmen.

- DST: Zwei Wochen nach dem FST wurden die Patientinnen erneut einbestellt und es wurden für drei Tage alle 6 h jeweils 0,5 mg Dexamethason in Tablettenform verabreicht. Der Test wurde als pathologisch beziehungsweise als Hinweis auf das Vorliegen eines Hyperkortisolismus gewertet, sofern der, am Morgen nach der letzten Dexamethasongabe gemessene, Serumkortisolwert größer als 1,8 µg/dl war.
- Sechswöchige Spironolactongabe: Zur präoperativen Vorbereitung und um zu überprüfen, ob sich die Blutdruck- und Hormonwerte der Patientinnen mithilfe von Aldosteronantagonisten normalisieren ließen, erfolgte für sechs Wochen die tägliche Gabe von 25-50 mg Spironolacton *per os*.

2.1.3 Bildgebende Diagnostik

Die Computertomogramme und Magnetresonanztomogramme wurden im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des UKD (Direktor: Prof. Dr. med. G. Antoch) angefertigt. Die sonographischen Untersuchungen wurden in der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie des UKD (Direktor: Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum) am Sonoline Versa Plus (Siemens, München, Deutschland) durchgeführt. Bei Patientin 1 wurde die Anreicherung im Nebennierenrindentumor mittels Norcholsterol-Nebennierenzintigraphie sichtbar gemacht. Diese Untersuchung wurde durch die Nuklearmedizinische Klinik des UKD (Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Müller) vorgenommen.

2.1.4 Immunhistologische Analysen

Präparateauswahl

Für die in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen wurde Nebennieren-Gewebe genutzt, welches mit Patienteneinverständnis im Rahmen des Deutschen Conn-Registers (Registernummer: 3027) durch laparoskopisch beziehungsweise retroperitoneoskopisch durchgeführte Adrenalektomien operativ gewonnen wurde. Dabei handelte es sich um neun reine Aldosteron produzierende Adenome (APA), ein reines Cortisol produzierendes Adenom (CPA), zwei Aldosteron- und Cortisol-kosezernierende Adenome (A/CPAs) und schließlich um normale humane Nebennieren (NHN). Die jeweiligen Organpräparate lagen bereits in Paraffinblöcken eingebettet vor.

Anfertigung der Schnittpräparate

Die bereits in Paraffinblöcken eingebetteten Organpräparate wurden mithilfe eines Mikrotoms (HM 400, Microm, Walldorf, Deutschland) auf die Dicke von 7 μ m zugeschnitten. Anschließend wurden diese Schnitte in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben und von dort auf Sialin beschichtete Objektträger (Marienfeld Superior, Lauda Königshofen, Deutschland) übertragen. Diese Objektträger wurden anschließend mit den jeweiligen Schnittpräparaten bei 60°C für 3 h in einen Ofen gegeben, um die Präparate auf den Objektträgern zu fixieren.

Vorbereitung der Schnittpräparate

Um mit der Färbeprozedur beginnen zu können, mussten die angefertigten Schnittpräparate zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal hintereinander für 10 min in ein Xylolbad (100%) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte zur Rehydrierung in eine absteigende Ethanolverdünnungsreihe (3 min à 100%, 3 min à 100%, 2 min à 90%, 2 min à 70%) gegeben. Abschließend wurden die Schnitte in lauwarmem Wasser (1 min) gespült und mit Tris-gepuffertem Salz mit Tween 20 (TBST) (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) für 2 min gewaschen.

Allgemeine Beschreibung der angewendeten Methodik

Vor der eigentlichen Immunmarkierung der zu untersuchenden Antigene mussten zunächst noch einige vorbereitende Schritte erfolgen. Dies war zunächst bei Färbungen gegen die 17 α -Hydroxylase eine Antigendemaskierung. Weiterhin erfolgte bei allen Färbungen eine Blockierung von gewebeeigenem Avidin, Biotin, der endogenen Peroxidase und unspezifischer Proteinbindungsstellen, um die Wahrscheinlichkeit von Hintergrundfärbungen zu minimieren und die Spezifität zu erhöhen.

Die Immunmarkierung, sowohl der MC2- und AT₁-Rezeptoren als auch der 17 α -Hydroxylase, erfolgte in sechs Färbeschritten mithilfe der Catalyzed-Signal-Amplifikations-Methode (CSA) (Bobrow et al. 1989). Diese ist ausführlich, in Anlehnung an die Beschreibung aus dem Handbuch für Immunchemische Färbemethoden (Boenisch 2003), in Abbildung 4 dargestellt und im folgenden Abschnitt erläutert.

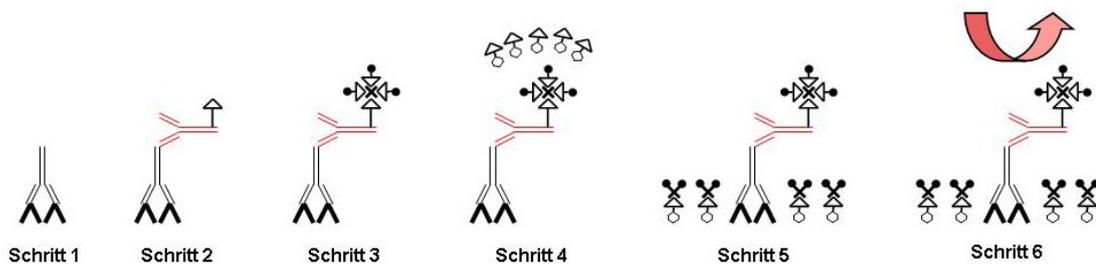


Abb. 4 Schematische Darstellung der CSA-Färbemethode – angelehnt an Boenisch 2003. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung des Primärantikörpers (Primär-AK) an das zu untersuchende Antigen. Im zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Sekundär-AK), der gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Anschließend wird ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex hinzugegeben, dessen Streptavidin an die Biotinmoleküle des Sekundärantikörpers bindet. Im vierten Schritt wird ein Amplifikationsreagenz hinzugegeben, welches Biotinyl-Tyramid, ein biotinhaltiges Substrat, enthält, das wiederum durch die Peroxidase aus dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, aus dem vorherigen Schritt, katalytisch in eine unlösliche Form gebracht wird. Dieses unlösliche Biotin-Substrat geht mit umliegenden Gewebsproteinen eine chemische Bindung ein und wird im folgenden fünften Schritt durch die Zugabe von einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Komplex (Streptavidin-HRP; HRP = horseradish peroxidase) an Streptavidin gebunden. Diese Bindung in Kombination mit einer hohen Anzahl von Peroxidasen der Umgebung des gesuchten Antigens führt zu einem hohen Umsatz von, anschließend im sechsten Schritt zugegebenen, Chromogen in ein Chromophor.

Konkrete Beschreibung der einzelnen Färbeschritte

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Genauere Informationen zu den Antikörpern und ihrer Verwendung liefert Tabelle 1 am Ende des Abschnitts.

- **Antigendemaskierung:**

Bei der Verwendung von Anti-17 α -Hydroxylase-AKs bedurfte es eines Schrittes zur Antigendemaskierung, da es sich um ein intrazellulär gelegenes Enzym handelt. Dazu wurde zusätzlich zu den üblichen Vorbereitungsschritten ein fünfminütiges Bad in TritonX (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) –Phosphat-gepufferte-Salz (PBS) -Lösung (0,5%) eingefügt, um durch Detergenzwirkung die Vernetzung der Membranproteine zu vermindern.
- **Avidin-Biotin-Blockade:**

Der Immunfärbung wurde jeweils eine Blockierung des gewebeeigenen Avidins und Biotins vorangestellt. Diese Blockade erfolgte mit dem Biotin-Blocking-System (Dako, Hamburg, Deutschland). Dazu wurden die Proben jeweils 10 min mit dem Avidin-Blocking Reagenz und anschließend, nach einmaligem Abspülen mit *Aqua dest.*, 10 min mit dem Biotin-Blocking Reagenz inkubiert. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger Waschschrift in TBST.
- **Peroxidase- und Protein-Block:**

Peroxidase- und Protein-Block erfolgten mittels der jeweiligen Reagenzien aus dem CSA-Kit (Dako, Hamburg, Deutschland). Zunächst wurde dazu das Gewebe für 5 min mit dem Peroxidase-Block Reagenz inkubiert. Dann erfolgte ein fünfminütiger Waschschrift in drei frischen Pufferbädern aus TBST (nachfolgend als „Pufferbad“ bezeichnet) und daran schloss sich eine fünfminütige Inkubation mit dem Proteinblock-Reagenz an. Der Proteinblock wurde nicht abgespült, sondern lediglich die überstehenden Tropfen abgeklopft und es schloss sich der erste Schritt der Immunfärbung an.
- **Durchführung der Immunfärbung:**

Als Erstes wurde das Gewebe mit Primär-AK, verdünnt in 2%-Normal-schweineserum (Dako, Hamburg, Deutschland), für 30 min inkubiert – die jeweiligen AKs und dazugehörigen Verdünnungen sind aus Tabelle 1 zu entnehmen. Anschließend erfolgte ein fünfminütiges Pufferbad. Danach folgte die Inkubation mit fertigen Sekundär-AK-Lösungen für 15 min. Die Wahl des Sekundär-AK richtete sich nach der Spezies des Primär-AK. Bei einem Primär-AK von Mäusen oder Kaninchen wurde der Sekundär-AK aus dem CSA-Kit (K1500, Dako, Hamburg, Deutschland) und bei einem Primär-AK

von der Ziege wurde der Sekundär-AK aus dem LSAB-Kit (K0679, Dako, Hamburg, Deutschland) benutzt. Nach einem erneuten Pufferbad schloss sich die 15-minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex an, welcher zu Beginn der Entparaffinierung bereits angemischt wurde. Nach erneutem Pufferbad wurde das Gewebe mit dem Amplifikationsreagenz benetzt. Nach 15 min erfolgte ein weiteres Pufferbad, an welches sich eine 15-minütige Inkubation mit Streptavidin-HRP-Gemisch anschloss. Abschließend erfolgte ein letztes Pufferbad.

Sowohl der Streptavidin-Biotin-Komplex als auch das Amplifikationsreagenz sowie das Streptavidin-HRP-Gemisch entstammten dem CSA-Kit.

| Anti-Körper | Antigen-Demaskierung | Firma | SN | Spezies | Dilutions-Verhältnis |
|--------------------|----------------------|--------------------------|----------|----------------------|----------------------|
| AT ₁ -R | nicht notwendig | Santa-Cruz Biotechnology | sc-81671 | monoklonal Maus | 1:200 |
| MC2-R | nicht notwendig | Santa-Cruz Biotechnology | sc-13107 | polyklonal Kaninchen | 1:500 |
| CYP17A1 | notwenig | Santa-Cruz Biotechnology | sc-46084 | polyklonal Ziege | 1:500 |

Tabelle 1 Diese Tabelle zeigt die jeweiligen Antikörper in Kombination mit der Anwendung einer Antigen-Demaskierung und ihrer jeweiligen Verdünnung. Abk.: SN = Seriennummer; AT₁-R = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1; MC2-R = Corticotropin-Rezeptor;

Nachbehandlung der Präparate

Nach der Immunfärbung wurden die Präparate für 10 min in 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, Dako, Hamburg, Deutschland) als Chromogen gebadet. AEC wurde in ein Chromophor umgesetzt, welcher als sichtbarer roter Farbstoff imponiert. Anschließend erfolgten eine Gegenfärbung der Gewebeschnitte für 1 min in Hämatoxylin und zwei Waschprozeduren mit *Aqua dest.*.

Zur Konservierung wurden die Präparate mithilfe von Faramount-Aqueous-Mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland) unter Deckgläschen eingebettet.

Kontrollen

Zur Überprüfung der Färbungen wurden bei jeder Färbeprozedur Negativ-Kontrollen erstellt. Dazu wurde zusätzlich zu den zu untersuchenden Gewebeproben ein Schnittpräparat von normaler humaner Nebenniere mitgefärbt, bei dem in der Färbeprozedur der Primär-AK durch 2%-Normalschweineserum ersetzt wurde. Außerdem dienten normale Nebennierenmarkzellen aus dem angrenzenden und nicht tumorösen Nebennierengewebe als interne Negativ-Kontrolle.

Bilderstellung

Zu Dokumentationszwecken wurden die Präparate photographiert. Dazu wurde eine Kamera (Axiocam MRc, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) und das dazugehörige Computerprogramm AxioVision 4.72 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) benutzt.

Die Photos wurden bei 4-40 fachen Vergrößerungen und einer sich automatisch einstellenden Belichtungszeit aufgenommen.

2.1.5 Genetische Diagnostik

Zur Bestimmung eines möglichen chimären *CYP11B1/CYP11B2* Gens und dem Ausschluss eines familiären Hyperaldosteronismus Typ 1 (FHA 1) wurde eine long-range PCR, gefolgt von einer Southern Blot-Hybridisierung, durchgeführt. Dieses Verfahren erfolgte, wie bereits an anderer Stelle beschrieben (Yokota et al. 2001), in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum.

2.1.6 Western Blot-Analysen

Der Western Blot ist ein Verfahren zum spezifischen Proteinnachweis. Dazu werden die Proteine aus dem zu untersuchenden Gewebe zunächst extrahiert und entsprechend ihrer Größe und Ladung durch Elektrophorese auf einem Gelmedium aufgetrennt. Anschließend werden sie von diesem Gelmedium mittels vertikal zum Gel angelegter Spannung auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Danach werden die Proteine mittels Immundetektion visualisiert. Dabei bindet als Erstes ein antigenspezifischer AK an sein entsprechendes An-

tigen. An diesen ersten AK bindet im nächsten Schritt ein zweiter biotinylierter AK, der im darauf folgenden Schritt mittels Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und Entwicklerlösung sichtbar gemacht wird.

Der Western Blot wurde durchgeführt, um die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Anti-17 α -Hydroxylase-AK zu kontrollieren und um so die Ergebnisse der Immunfärbungen zu bestätigen.

Die konkreten Beschreibungen der sechs, nacheinander durchgeführten, Schritte sind in den folgenden Abschnitten zu finden.

Schritt 1: Gewebeauswahl

Bei dem zu untersuchenden Gewebematerial handelte es sich um klinisch und histologisch eindeutig identifizierte Nebennierenadenome von Patienten aus dem klinikeigenen Patientenkollektiv. Das Material ist mit Patienteneinverständnis, im Rahmen des Deutschen Conn-Registers (Registernummer: 3027), durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie entnommen und anschließend bei -80°C gelagert worden. Ein Tumor entsprach einem reinen CPA und ein anderer einem reinen APA.

Schritt 2: Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Reagenzien und Geräte:

- Ultraschallsonde: Polytron (Kinematika AG, Luzern, Schweiz)
- CellLytic Puffer (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, Rockford, IL, USA)
- Protein Standard-Marker: Kaleidoscope Prestained Standards (BIO RAD, München, Deutschland)

Zum Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot mussten die Proteine zunächst aus dem Tumorgewebe extrahiert und isoliert werden. Dazu wurde jeweils eine Spatelspitze der Tumoren in 350 μ l CellLyticPuffer gegeben, um die Tumorzellen zu lysieren. Anschließend wurden die Zellsuspensionen jeweils zweimal für 30 s sonifiziert, sodass durch Ultraschall die Zellstrukturen aufgebrochen wurden. Der gesamte Vorgang erfolgte auf einem Eisblock, um die Proteinstrukturen zu erhalten.

Im Anschluss erfolgte die Proteinbestimmung mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits nach Herstellerangaben. Daraufhin wurden jeweils 30 μ g, 50 μ g und

70 μg Protein *ad* 15 μl mit *Aqua dest.* aufgefüllt, um danach erneut 15 μl Probenpuffer dazuzugeben.

Schritt 3: Aufbau der Apparatur und Gießen der Gele

Reagenzien und Geräte:

- Elektrophorese-Apparatur: Mini Protean 3 Cell (BIO RAD, München, Deutschland)
- Protein Standard-Marker: Kaleidoscope Prestained Standards (BIO RAD, München, Deutschland)
- *Aqua dest.*
- 30%-Acrylamid
- 10%-Lauryl sulfat sodium salt (SDS)
- 10%-Ammoniumpersulfat (APS)
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris pH: 8,8
- Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris pH: 6,8

Zunächst wurde die Elektrophorese-Apparatur entsprechend der Herstellerangaben aufgebaut und die Gele entsprechend der Zusammensetzung aus Tabelle 2 angemischt. Danach wurde zunächst das Trenngel mithilfe einer Pipette zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde die Trenngellösung mit *Aqua dest.* überschichtet und zur Polymerisation stehen gelassen. Nach 25 min wurde das *Aqua dest.* abgegossen und durch die Sammelgellösung ersetzt. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, der als Platzhalter für die Geltaschen diente. Nach erneuter Polymerisationszeit von 10 min wurde der Kamm entfernt und die freien Geltaschen – wie im folgenden Abschnitt beschrieben – mit der Probenlösung befüllt.

| Komponenten | Trenngel (12%) | Sammelgel |
|-------------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>Aqua dest.</i> | 1,6 ml | 0,85 ml |
| 30%-Acrylamid | 2,0 ml | 0,255 ml |
| Puffer | 1,3 ml (Trenngelpuffer) | 0,375 ml (Sammelgelpuffer) |
| 10%-SDS | 0,05 ml | 0,015 ml |
| 10%-APS | 0,05 ml | 0,0065 ml |
| TEMED | 0,002 ml | 0,0015 ml |

Tabelle 2 Diese Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Trenngels bzw. des Sammelgels.

Abk.: *Aqua dest.* = Destilliertes Wasser; SDS = Lauryl sulfat sodium salt; APS = Ammoniumpersulfat; TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Schritt 4: Elektrophorese

Reagenzien und Geräte:

- 30%-Acrylamid/Bis-Solution 37,5:1 (BioRad, München, Deutschland)
- 10%-SDS
- 10%-APS
- TEMED
- 1,5 M Tris-HCl pH: 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pH: 6,8
- Proben-Puffer:
 - 3,55 ml *Aqua dest.*
 - 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl; pH: 6,8
 - 2,5 ml Glycerol
 - 2,0 ml 10%-SDS
 - 0,2 ml 0,5%-Bromphenolblau
 - Gebrauchslösung: 950 μ l Proben-Puffer + 50 μ l β -Mercaptoethanol
- 10 x SDS Sammelgel-Puffer:
 - 30,3 g Tris-Base
 - 144,0 g Glycin
 - 10,0 g SDS in 1 l *Aqua dest.*
 - Gebrauchslösung: Verdünnung 1:10 mit *Aqua dest.*
- Transformator: Standard PowerPack P25 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)

Der Schritt der Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung (Laemmli 1970). Dabei wird, wie in Abbildung 5 veranschaulicht, eine Spannung an das Gel angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine zur Anode und die positiv geladenen Proteine zur Kathode wandern. Je kleiner und je negativer Proteine geladen sind, desto schneller wandern sie in Richtung Anode.

Für den Gellauf wurden zunächst die Probenlösungen – 15 μ l Proteingemisch + 15 μ l Probenpuffer – für 4 min zur Proteindenaturierung bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Befüllung der Geltaschen mit 30 μ l Probenlösung beziehungsweise mit 10 μ l des Standard-Markers, der Proteine definierter Größen enthielt, anhand derer im Anschluss die gesuchten Proteine identifiziert werden konnten. Die nicht befüllten Geltaschen dienten als Negativ-Kontrolle.

Nach Befüllen der Geltaschen wurde eine Spannung von 96 V an die Elektrophoresekammer angelegt und die Proteintrennung gestartet. Nach 45 min wurde die Spannung abgeschaltet und als Nächstes erfolgte der im folgenden Abschnitt beschriebene Proteintransfer.

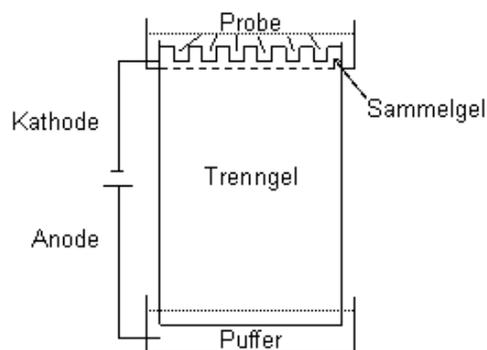


Abb. 5 Skizze der Gelelektrophoresekammer.

Schritt 5: Proteintransfer (Blotting)

Reagenzien und Geräte:

- Blotting-Apparatur (TransBlot SD, BIO RAD Laboratories, München, Deutschland)
- Elektrodenpuffer:
 - 2,9 g Glycin (39 mM)
 - 5,8 g Tris-Base (48 mM)
 - 3,7 ml 10%-SDS (0,037%)

200 ml Methanol (20%)

ad 1 l Aqua dest.

- Filterpapier (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA)
- Nitrocellulose-Membran (Porengröße: 0,45 μm ; Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA)

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte in der Blottingapparatur – zur Veranschaulichung dient Abbildung 6. Dazu wurden zunächst 12 Lagen Filterpapier und die Nitrocellulose-Membran auf die Gelgröße zugeschnitten. Je sechs Lagen Filterpapier wurden anschließend mit Elektrodenpuffer getränkt und die Nitrocellulose-Membran mit *Aqua dest.* inkubiert.

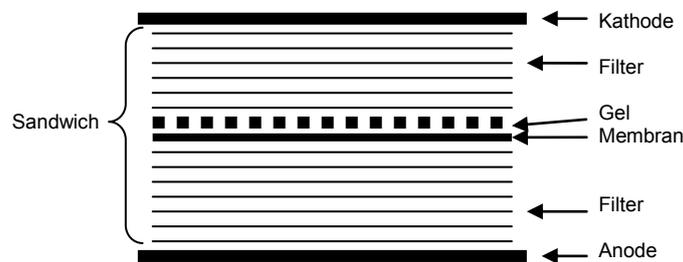


Abb. 6 Schemazeichnung der Sandwich Blotting-Apparatur zum Proteintransfer vom Gel auf die Membran.

Anschließend wurden zunächst sechs Lagen feuchten Filterpapiers auf die Graphit-Anode gelegt und mit einem sauberen Glasstab gewalzt, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Danach wurde die Membran aufgetragen und ebenfalls gewalzt. Daraufhin wurde das SDS-Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Auf das Gel wurden dann weitere sechs Lagen des feuchten Filterpapiers aufgelegt. Abschließend wurde das gesamte Sandwich noch einmal gewalzt, um die letzten möglichen Luftblasen zu entfernen und anschließend den Deckel der Blotting-Apparatur mit der Kathode aufzulegen.

Der Transfer erfolgte mit einer vertikal zum Gel angelegten Spannung von 45 V über eine Dauer von 1,75 h.

Schritt 6: Immunreaktion

Reagenzien und Geräte:

- TBS: 0,1 M Tris/HCl/0,9% NaCl pH: 7,5
- Waschpuffer: TBS
- Blockpuffer:
2 g Bovines Serum-Albumin (BSA)
0,2 g Magermilchpulver
aufgefüllt mit TBS *ad* 40 ml
- Verdünnungspuffer:
0,2 g BSA
0,2 g Magermilchpulver
aufgefüllt mit TBS *ad* 40 ml
- Schüttler: Rocking Shaker Unit AGT50 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, Belgien)
- AKs: Nachweis von CYP17A1:
 - Primär: SN: sc-46084, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
 - Sekundär: SN: E 0466, Dako, Hamburg, Deutschland
- Nachweis von β -Actin:
 - Primär: SN: A5441, Sigma Aldrich Saint Louis, MO, USA
 - Sekundär: SN: E 0453, Dako, Hamburg, Deutschland
- Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA)
- Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA)
- Bildentwickler: AGFA Curix 60 (Siemens, München, Deutschland)

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulose-Membran mit AKs markiert, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Während aller Schritte der Immunreaktion befand sich die Membran auf einem Schüttler. Zunächst wurde die Membran mit Blockpuffer (5% BSA/0,5% Magermilchpulver/TBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Anti-17 α -Hydroxylase-AK als Primär-AK in einer Verdünnung von 1:200 in Verdünnungspuffer (0,5% BSA/0,5% Magermilchpulver/TBS) bei 4°C über eine Nacht. An-

schließlich erfolgte der erste Waschschrift. Dazu wurde die Membran kurz mit TBS ab gespült und danach dreimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen. Nun erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem biotinylierten gegen den Primär-AK gerichteten Sekundär-AK in einer Verdünnung von 1:5000 in Verdünnungspuffer. Anschließend erfolgte ein zweiter – wie oben beschriebener – Waschschrift. Danach wurde die Membran mit Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:10000 in Verdünnungspuffer für 30 min inkubiert und im Anschluss erneut – wie oben beschrieben – gewaschen. Ferner wurde die Membran mit dem ECL plus Kit (40:1) für 5 min inkubiert und anschließend im Bildentwickler mit einer Belichtungszeit zwischen 2 s und 20 s auf Film entwickelt.

Weiterhin erfolgte zum weiteren Nachweis von β -Actin als Ladekontrolle ein Membran-Stripping zur Entfernung der bereits benutzten AKs, da die 17α -Hydroxylase ein Molekulargewicht von 58 kDa und das β -Actin ein Molekulargewicht von 42 kDa aufwies. Das Stripping erfolgte mittels einer erneuten Membran-Inkubation in 98 μ l β -Mercaptoethanol/2,8 ml 10%-SDS/11,2 ml TBS für 30 min bei 60°C. Im Anschluss an das Membran-Stripping wurde die Membran zunächst 5 min, dann 10 min und schließlich 15 min in TBS gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit Anti- β -Actin-AK in einer Verdünnung von 1:5000 in Verdünnungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS ab gespült und danach dreimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Multi-Link-AK in einer Verdünnung von 1:2500 in Verdünnungspuffer für 1,5 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss gestalteten sich die weiteren Schritte, wie oben bereits beschrieben.

2.2 Literaturrecherche

Um die bereits veröffentlichten Fallberichte zu finden, wurde mithilfe der Suchmaschine PubMed[®] die MEDLINE[®] Datenbank durchsucht. Dabei wurden folgende Sucheingaben vorgenommen:

- adrenal cortisol aldosterone case
- aldosterone-producing adenoma cortisol
- cortisol-producing adenoma aldosterone

- aldosterone cortisol adenoma
- adrenocortical adenoma hormone excess
- adrenal adenoma hormone excess
- adrenal adenoma primary aldosteronism
- adrenal adenoma primary aldosteronism cushing

Weiterhin wurden die Bibliographien der bereits gefundenen Artikel nach weiterführenden Artikeln durchsucht.

2.2.1 Untersuchungskriterien

Die gefundenen Artikel wurden einzeln hinsichtlich Patientenkollektiv, Diagnostik und Therapie untersucht. Dabei wurden folgende Punkte konkret beachtet:

- Patientenkollektiv:
Anzahl der beschriebenen Fälle, Geschlecht, Alter, Blutdruck, Body-Mass-Index, Einweisungsgrund
- Mineralokortikoidexzessdiagnostik:
 - Blut: Kalium, Natrium, Renin, ARQ, 18-OH-F, 18-OH-B
 - Urin: freies Aldosteron
 - Kochsalzbelastungstest, Captopril-Test, Orthostase-Test, Fludrocortison-Suppressionstest
- Glukokortikoidexzessdiagnostik:
 - Blut: Cortisol, ACTH, DHEA-S
 - Urin: freies Cortisol, 17-OH-Kortikosteroide, 17-Ketosteroide
 - Dexamethason-Suppressionstest, CRH-Test, Desmopressin-Test
ACTH-Stimulationstest
- Lateralisationsdiagnostik/Tumordiagnostik:
Sonographie, CT, MRT, Nebennierenzintigraphie, Nebennierenvenenkatheter

Außerdem wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen und molekular-biologischen Untersuchungen analysiert.

2.2.2 Umgang mit Laborwerten aus der Literatur

Die in der Literatur angegebenen Werte wurden in die heute üblichen Standardeinheiten umgerechnet. Dabei wurden die Standardumrechnungskonstanten benutzt, ohne Berücksichtigung der Eigenschaften der jeweilig verwendeten und in der Literatur häufig nicht angegebenen Assays. Als Normwertbereiche für die Berechnung der PRC- aus PAC-Werten legten wir die in der Praxisleitlinie (Funder et al. 2008) empfohlenen Werte zu Grunde. Wenn es in Artikeln Angaben gab, ob ein Wert zu hoch oder zu niedrig war, so wurden sie in unsere Berechnungen einbezogen, sofern es um Berechnungen dieser Variablen ging. Sie wurden nicht in Berechnungen von Mittelwerten oder Standardabweichungen einbezogen. Zu diesen Berechnungen wurde das Programm Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten

3.1.1 Anamnestische Angaben und klinische Untersuchungsbefunde

Die beiden Patientinnen zeigten in der klinischen Untersuchung typische Symptome für ein Conn- und Cushing-Syndrom. Patientin 1 stellte sich wegen einer hypertensiven Krise vor und klagte über Nykturie, Mundtrockenheit, sporadische Schwindelanfälle und innere Unruhe. Als typische Symptome eines Cushing-Syndroms zeigte sie Stammfettsucht, Muskelschwäche, Hirsutismus, Hautatrophie und Osteoporose. Patientin 2 klagte über intermittierende Mundtrockenheit, intensives Durstgefühl und Nykturie. Ferner zeigte sie eine moderate Hautatrophie und litt an proximaler Skelettmuskelschwäche.

Genauere Angaben zur klinischen Diagnostik sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zu finden.

| klinische Parameter | Patientin 1 | Patientin 2 |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Alter (Jahre) | 57 | 49 |
| Blutdruck (mmHg) | 200/99 | 155/105 |
| Hypertoniegrad | 1 | 3 |
| BMI (kg/m ²) | 32 | - |

Tabelle 3 Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen und gibt Aufschluss über das Alter, den Blutdruck, den Grad der arteriellen Hypertonie sowie den Body-Mass-Index (BMI).

3.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests

Die Ergebnisse der Hormonuntersuchungen der vorgestellten Patientinnen zeigten präoperativ Hinweise für eine autonome Aldosteron- und Cortisolsekretion. Die genauen Ergebnisse der Mineralokortikoidexzessesdiagnostik sind in Tabelle 4 und die Ergebnisse der Glukokortikoidexzessesdiagnostik in Tabelle 5 zu finden.

ERGEBNISSE

| Hormon | Zeitpunkt | Norm | Patientin 1 | Patientin 2 |
|-------------------------|-----------------------|----------|-------------|-------------|
| Aldosteron (ng/l) | basal | 11-160 | 278 | 291 |
| | nach FST | < 60 | 442 | 324 |
| | nach DST | > 50 | 63 | 260 |
| | nach Spironolacton | - | 84 | 311 |
| | 8 Wochen postoperativ | 11-160 | 14 | 20 |
| Renin (ng/l) | basal | 5,0-25,0 | < 1 | 2,3 |
| | nach FST | Ziel < 5 | 1,7 | 2,1 |
| | nach DST | - | 2,9 | 4,0 |
| | nach Spironolacton | 5,0-25,0 | 2,2 | 5,6 |
| ARQ | präoperativ | < 33 | 278 | 127 |
| | postoperativ | < 33 | 6,4 | 1,8 |
| | nach Spironolacton | - | 38 | 56 |
| Natrium (mmol/l) | basal, Serum | 135-145 | 148 | 142 |
| | basal, Urin | < 200/d | 55 | 45 |
| Kalium (mmol/l) | basal, Serum | 3,5-4,5 | 2,9 | 2,7 |
| | basal, Urin | < 126/d | 19 | 41 |
| SUSPPUP (l/mmol) | basal | 5,5 | 6,0 | 17,7 |
| A18G im 24h-Urin (µg/d) | basal | 3,5-17,5 | 17,6 | - |
| THA im 24h-Urin (µg/d) | basal | 10-70 | 171,4 | - |
| | nach FST | < 50 | 60 | 210 |
| 18-OH-B (ng/dl) | basal | 12-55 | 106 | 170 |
| | nach FST | - | 220 | 143 |
| | nach DST | - | 25 | 141 |
| | nach Spironolacton | - | 8 | 139 |
| | postoperativ | 12-55 | 5 | 30 |
| 18-OH-F (ng/dl) | basal | 30-130 | 246 | 485 |
| | nach FST | - | 480 | 433 |
| | nach DST | - | 225 | 599 |
| | nach Spironolacton | - | 124 | 481 |
| | postoperativ | 30-130 | 39 | 18 |

Tabelle 4 Ergebnisse der Hormon- und Elektrolytbestimmungen zur Mineralokortikoidexzessdiagnostik: basal, nach den Funktionstests und postoperativ. Abk.: FST = Fludrocortison-Suppressionstest; DST = Dexamethason-Suppressionstest; ARQ = Aldosteron-Renin-Quotient; SUSPPUP = $\text{Natrium}_{(\text{Serum})} / \text{Natrium}_{(\text{Urin})} / (\text{Kalium}_{(\text{Serum})})^2 / \text{Kalium}_{(\text{Urin})}$; A18G = Aldosteron-18-Glucuronid; THA = Tetrahydroaldosteron, 18-OH-B = 18-Hydroxycorticosteron; 18-OH-F = 18-Hydroxycortisol; - = kein Wert vorhanden

| Hormon | Zeitpunkt | Norm | Patientin 1 | Patientin 2 |
|-------------------------------|--------------|----------|-------------|-------------|
| Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) | basal | 6,0-19,0 | 14,0 | 10,1 |
| | nach DST | < 1,8 | 8,4 | 10,2 |
| | postoperativ | - | 6,6 | 2,3 |
| ACTH (pg/ml) | basal | 7-46 | < 1,0 | < 1,0 |
| DHEA-S ($\mu\text{g/dl}$) | basal | 80-350 | < 15 | < 15 |

Tabelle 5 Überblick der Untersuchungsergebnisse zur Glukokortikoidexzessesdiagnostik.

Abk.: DST = Dexamethason-Suppressionstest; ACTH = Corticotropin; DHEA-S = Dehydroepiandrosteronsulfat

3.1.3 Bildgebende Diagnostik

Bei beiden Patientinnen wurde jeweils ein CT angefertigt und es wurden bei beiden Fällen Tumoren nachgewiesen, sodass weitere Untersuchungen veranlasst wurden. Der CT-Befund wurde jeweils bestätigt. Genauerem Aufschluss darüber gibt Tabelle 6.

| Patientin | Tumorgröße (cm) | Seite | CT | Szintigramm | MRT |
|-----------|-----------------|--------|----|-------------|------|
| 1 | 2,9 × 3,1 | links | ja | ja | nein |
| 2 | 3,5 | rechts | ja | nein | ja |

Tabelle 6 Diese Tabelle zeigt die gemessenen Tumorgrößen sowie die durchgeführten Untersuchungen.

Abk.: ja = Untersuchung durchgeführt; nein = Untersuchung nicht durchgeführt; CT = Computertomogramm; MRT = Magnetresonanztomogramm

3.1.4 Immunhistologische Analysen

In den histologischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Tumoren der Patientinnen 1 und 2 zum Großteil aus Zellen des *Zona glomerulosa*-Typs bestanden. Das an den Tumor grenzende adrenerge Restgewebe war dünn und in beiden Fällen histologisch unauffällig.

In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich für die 17α -Hydroxylase eine starke Expression in allen untersuchten Geweben – den Tumoren der beiden Patientinnen sowie im Cortisol produzierenden Adenom (CPA), dem Aldosteron produzierendem Adenom (APA) und der normalen humanen Nebenniere (NHN). Eine Auswahl an Beispielbildern zur Färbung gegen 17α -Hydroxylase liefert Abbildung 7. Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 ($\text{AT}_1\text{-R}$) hin-

gegen zeigte in den Tumoren der beiden Patientinnen und im CPA geringere Ausprägungen als im APA und in der NHN – Beispielbilder sind dargestellt in Abbildung 9. Die Färbungen gegen den MC2-Rezeptor – Beispielbilder dargestellt in Abbildung 8 – zeigten in beiden Patienten-Tumoren und im CPA geringere Ausprägungen als im APA und der NHN.

Die normalen Nebennierenmarkzellen, die als interne Negativ-Kontrolle dienten, sowie die separaten Negativ-Kontrollen zeigten, wie erwartet, keine Antikörperreaktion.

Beispielbilder für Färbungen gegen 17 α -Hydroxylase

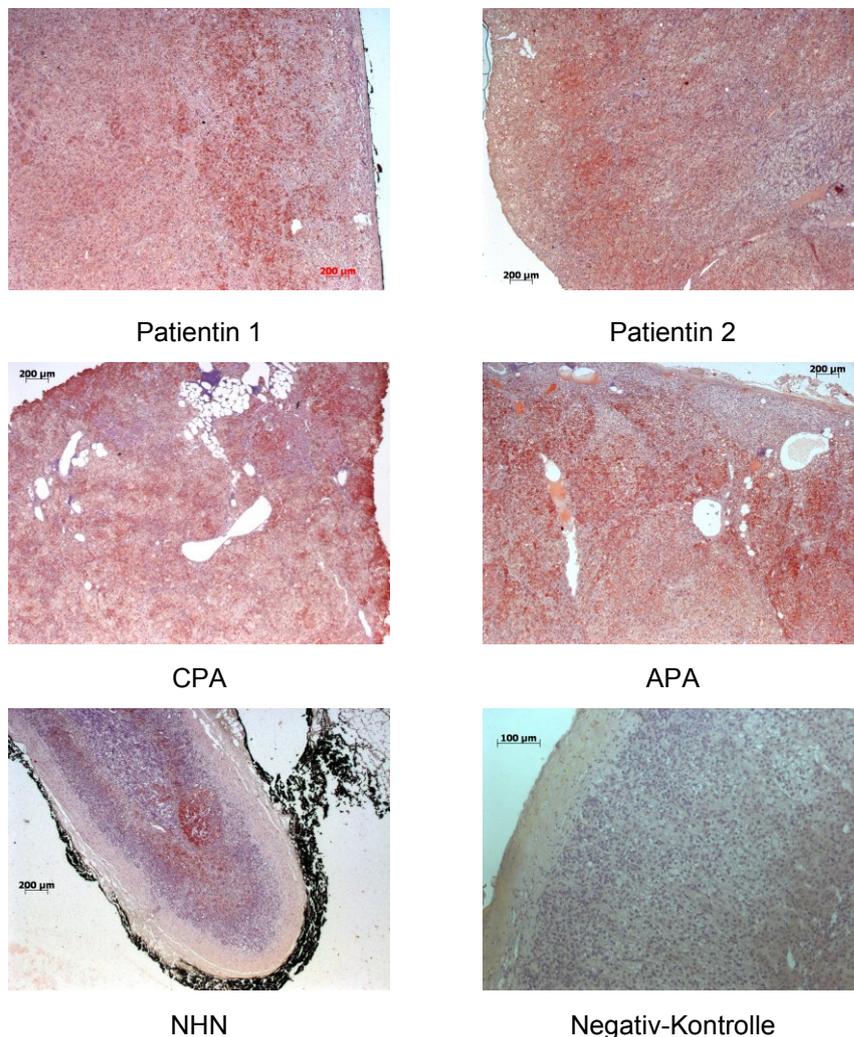
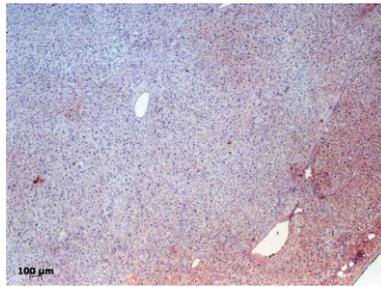
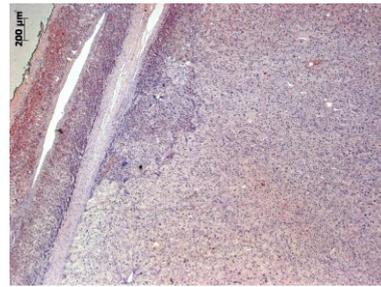


Abb. 7 Diese Abbildung zeigt exemplarisch die Färbungsergebnisse gegen die 17 α -Hydroxylase in den Tumoren der vorgestellten Patientinnen, einem Cortisol produzierenden Nebennieradenom (CPA), einem Aldosteron produzierenden Nebennieradenom (APA), einer normalen humanen Nebenniere (NHN) sowie einer Negativ-Kontrolle. Abb. nach Willenberg et al. 2010.

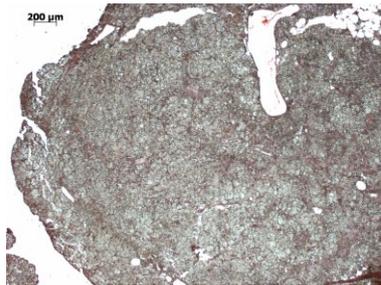
Beispielbilder für Färbungen gegen MC2-Rezeptor



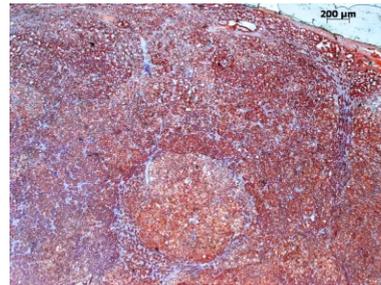
Patientin 1



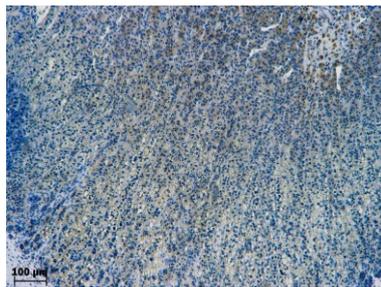
Patientin 2



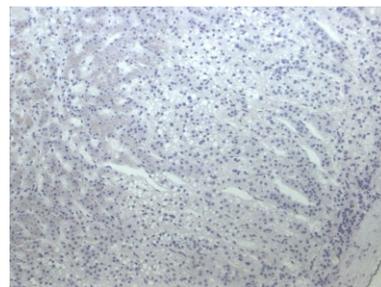
CPA



APA



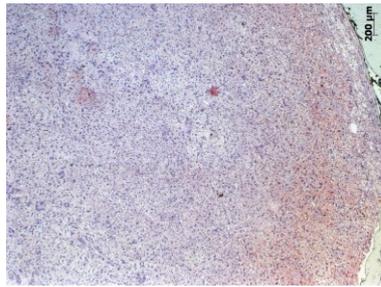
NHN



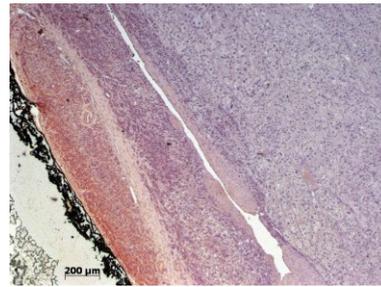
Negativ-Kontrolle

Abb. 8 Exemplarische Darstellung der Färbungsergebnisse gegen die MC2-Rezeptoren in den Tumoren der vorgestellten Patientinnen, einem Cortisol produzierenden Nebennierenadenom (CPA), einem Aldosteron produzierenden Nebennierenadenom (APA), einer normalen humanen Nebenniere (NHN) sowie einer Negativ-Kontrolle. Abb. nach Willenberg et al. 2010.

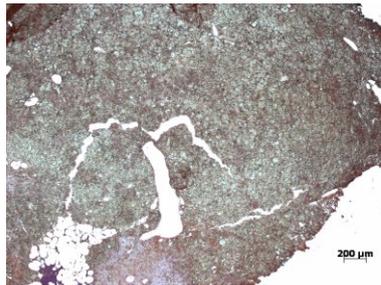
Beispielbilder für Färbungen gegen AT₁-Rezeptor



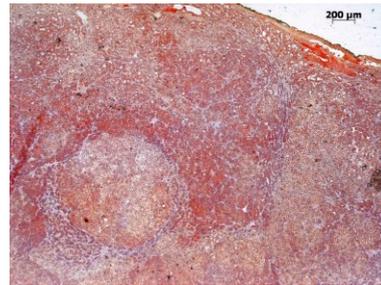
Patientin 1



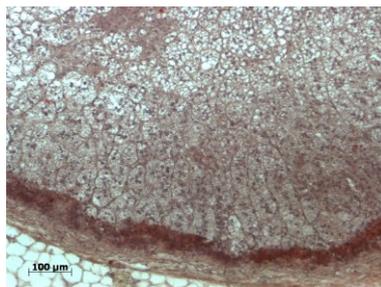
Patientin 2



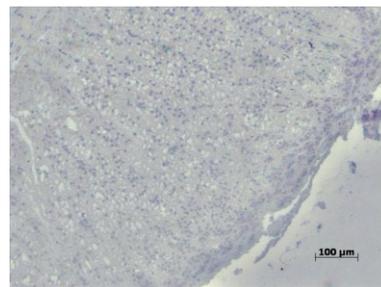
CPA



APA



NHN



Negativ-Kontrolle

Abb. 9 Exemplarischer Überblick über die Färbungsergebnisse gegen die AT₁-Rezeptoren in den Tumoren der vorgestellten Patientinnen, einem Cortisol produzierenden Nebennierenadenom (CPA), einem Aldosteron produzierenden Nebennierenadenom (APA), einer normalen humanen Nebenniere (NHN) sowie einer Negativ-Kontrolle. Abb. nach Willenberg et al. 2010.

3.1.5 Genetische Diagnostik

Bei beiden Patientinnen waren die Untersuchungen hinsichtlich des Hybridgens *CYP11B1/CYP11B2* negativ.

Die Amplifikation dieses vergleichsweise großen Gens war aus dem Paraffingewebe der Patienten nicht möglich. Somatische Mutationen können somit weder nachgewiesen, noch ausgeschlossen werden.

3.1.6 Western Blot-Analysen

In den Western Blots zum Nachweis von 17 α -Hydroxylase (CYP17A1) (58 kDa) und β -Actin (42 kDa) zeigten sich Banden der 17 α -Hydroxylase sowohl im CPA als auch im APA. Die Banden im CPA sind dabei stärker ausgeprägt als im APA. Die Bande der β -Actin-Ladekontrolle ist im CPA etwas deutlicher als im APA. Das Ergebnis zeigt Abbildung 10.

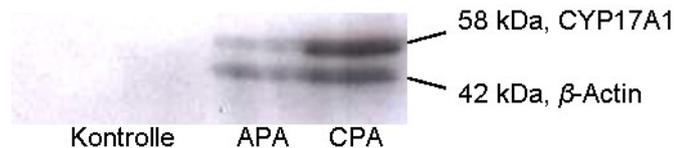


Abb. 10 Nachweis von CYP17A1 und β -Actin sowohl im APA als auch im CPA. Die Kontrolle zeigt keine Reaktion
 Abk.: CYP17A1 = 17 α -Hydroxylase; APA = Aldosteron produzierendes Nebennierenadenom; CPA = Cortisol produzierendes Nebennierenadenom. Abb. nach Willenberg et al. 2010.

3.2 Literaturrecherche

Bei der Literaturrecherche wurden insgesamt 26 Artikel beziehungsweise 34 klinische Fälle von A/CPAs in englischer Sprache gefunden:

1. Adachi et al. 2003
2. Allan et al. 2000
3. Baert et al. 1995
4. Fujii et al. 2005
5. Guthrie et Kotchen 1979
6. Hobma et al. 1990
7. Hogan et al. 1977
8. Honda et al. 2001
9. Imai et al. 1991
10. Komiya et al. 1979
11. Makino et al. 2001
12. Markou et al. 2005
13. Nagae et al. 1991
14. Oki et al. 2008
15. Okura et al. 2006
16. Onoda et al. 2009
17. Rossi et al. 2008
18. Saito et al. 2007
19. Sasaki et al. 2006
20. Sugawara et al. 2003
21. Suzuki et al. 2007
22. Tanaka et al. 2002
23. Tsunoda et al. 2008
24. Tunny et al. 1990
25. Willenberg et al. 2010
26. Yamakita et al. 2002

Weiterhin sind folgende Artikel zu erwähnen, die jedoch, da sie in japanischer Sprache verfasst wurden, nicht in die Auswertung aufgenommen werden konnten:

1. Abe 1994
2. Kajimi et al. 2004
3. Matsuo et al. 2007
4. Murakami et al. 1999
5. Naito et al. 1981
6. Omura et al. 2007
7. Suda et al. 2004
8. Tachiki et al. 2007
9. Takeno et al. 2003
10. Yamada et al. 2004

3.2.1 Klinisches Erscheinungsbild der Patienten mit A/CPA

Die beschriebenen Patienten mit A/CPA waren durchschnittlich 52 (34-80) Jahre alt und überwiegend weiblichen Geschlechts. Die große Mehrheit der Patienten stellte sich wegen therapieresistentem arteriellen Hypertonus in Kombination mit Elektrolytverschiebungen vor. Eine Vorstellung wegen der Symptomatik eines Hyperkortisolismus erfolgte bei 14% der Patienten und bei 24% der Fälle waren klinische Zeichen eines Cushing-Syndroms bei Erstvorstellung beschrieben. Bei 74% war ein präklinisches Cushing-Syndrom oder eine subklinische autonome Glukokortikoid-Hypersekretion beschrieben.

Abgesehen davon wurde bei zwei Patienten, aufgrund einer postoperativen Nebenniereninsuffizienz, ein Hyperkortisolismus nachträglich diagnostiziert.

3.2.2 Aufarbeitung des PA

Bei 81,8% der Fälle zeigte sich eine Hypokaliämie und der durchschnittliche ARQ lag bei 506 – eine ausführliche Darstellung der erhobenen Laborparameter zeigt Tabelle 7. Bei etwas mehr als der Hälfte der Fälle wurde ein Bestätigungstest zur Diagnose des PA herangezogen:

- oraler Kochsalzbelastungstest (4×)
- Fludrocortison-Suppressionstest (4×)
- Captopril-Suppressionstest (10×)
- Orthostase-Test (14×)

- Bestimmung von Aldosteron beziehungsweise Aldosteronmetaboliten im Urin (12x)

Dabei fiel auf, dass der Kochsalzbelastungstest bei 60% der Fälle auffällige Befunde lieferte. Der FST hingegen zeigte abnorme Werte bei 100% der Fälle. Die Captopril-Testung zeigte bei 80% einen nicht ausreichenden Anstieg der Reninwerte und bei 100% einen unausreichenden Aldosteronabfall. Die Orthostasetests zeigten bei 84,6% keinen Reninanstieg und bei 38,5% einen Aldosteronanstieg. Bei 3 der 14 durchgeführten Tests kam es nach vierstündigem Stehen beziehungsweise Gehen zu einem Abfall der Plasmaaldosteronkonzentration.

Eine abnorme Ausscheidung von Aldosteron(-metaboliten) wurde bei 37% beschrieben.

| Laborparameter | Alle Patienten mit A/CPA |
|--------------------------|---------------------------------|
| Serum Kalium (mmol/l) | 3.1 ± 0.8 |
| Hypokaliämie (%) | 81.8 |
| Plasma Aldosteron (ng/l) | 414.6 ± 429.5 |
| Renin (ng/l) | 2.1 ± 2.7 |
| ARQ (ng/l : ng/l) | 506.2 ± 629.5 |
| ARQ abnormal (%) | 90.9 |

Tabelle 7 Literaturlauswertung hinsichtlich der Mineralokortikoidexzessdiagnostik. Mittelwerte ± Standardabweichung von Serum Kalium, Plasma Aldosteron, Renin und dem Aldosteron-Renin-Quotienten. Abk.: A/CPA = Aldosteron- und Cortisol-kosezernierendes Nebennierenadenom; ARQ = Aldosteron-Renin-Quotient

3.2.3 Aufarbeitung des Hyperkortisolismus

Der DST wurde bei 32 Fällen durchgeführt, wobei bei 90,6% abnorme Werte für Cortisol festgestellt wurden – einen genaueren Überblick über die Suppressionstests gibt Tabelle 8.

| Cortisol ($\mu\text{g}/\text{dl}$) | Alle Patienten mit A/CPA |
|---|---------------------------------|
| basal | 14.7 \pm 5.5 |
| nach niedrig dosiertem Dexamethason-Suppressionstest | 10.0 \pm 7.9 |
| nach hoch dosiertem Dexamethason-Suppressionstest | 7.9 \pm 8.2 |

Tabelle 8 Literaturlauswertung hinsichtlich der Glukokortikoidexzessdiagnostik. Mittelwerte \pm Standardabweichung von Cortisol – basal, nach niedrig bzw. hoch dosiertem Dexamethason-Suppressionstest. Abk.: A/CPA = Aldosteron- und Cortisol-konzernierendes Nebennierenadenom.

Weitere Tests auf Hyperkortisolismus waren:

- Corticotropin-Releasing-Hormon-(CRH)-Test (12 \times)
- Desmopressingabe (1 \times)
- ACTH-Test (7 \times)

Die CRH-Testungen zeigten einen erniedrigten Anstieg der ACTH-Konzentration bei 40% und einen nicht ausreichenden Anstieg der Cortisol-Konzentration bei 70% der untersuchten Fälle.

Die einmalig durchgeführte Desmopressingabe zeigte Veränderungen der Cortisol- beziehungsweise ACTH-Werte.

Die ACTH-Tests zeigten in jedem Fall eine normale Reaktion der Cortisol- und Aldosteronspiegel und einen uneindeutigen Anstieg der 17-OH-Progesteronwerte.

Bei 17% der Patienten erfolgte die Bestimmung von freiem Cortisol beziehungsweise bei 42,9% von 17-Ketosteroiden und/oder 17-Hydroxykortikosteroiden jeweils im Urin. Zusätzlich zeigten sich bei 55,9% erniedrigte ACTH-Werte. Eine Bestimmung von DHEA-S erfolgte bei 57,1% und bei 35% der untersuchten Fälle zeigten sich erniedrigte Werte.

3.2.4 Radiologische Untersuchungen und Subtyppendifferenzierung

Zur radiologischen Diagnostik wurden die folgenden Methoden genutzt:

- CT (23 \times)
- MRT (8 \times)
- Abdomensonographie (3 \times)
- Pyelogramm (1 \times)

Dabei zeigte sich eine korrekte Tumorlokalisation bei 100% der CT- beziehungsweise bei 87,5% der MRT-Scans.

Mittels der oben aufgeführten Verfahren konnten bei 31 der 34 Fälle Raumforderungen festgestellt werden, wobei in einem Fallbericht keine genauen Angaben gemacht wurden (Tunny et al. 1990).

Bei 29 Fällen (85,3%) wurden solitary Adenome gefunden, während bei fünf Patienten (14,3%) multiple Raumforderungen festgestellt wurden. In drei der letztgenannten Fälle handelte es sich um bilaterale Auffälligkeiten. Der durchschnittlich gemessene Adenomdurchmesser betrug 26,2 mm.

Zur Seitendifferenzierung der Tumoren wurde eine selektive Nebennierenvenenkatheterisierung beziehungsweise eine Nebennierenzintigraphie bemüht.

Die Katheterisierung wurde bei zehn Patienten durchgeführt und ergab bei sieben Fällen eine korrekte Tumorlokalisation. Bei zwei der drei unklaren Fälle, bei denen eine korrekte Tumorlokalisation durch die Katheterisierung initial nicht möglich war, konnte die korrekte Lokalisation schließlich durch erneute Katheterisierung einige Jahre später beziehungsweise durch pathologische Gewebsuntersuchungen postoperativ doch noch festgestellt werden. Eine Cortisol-Mehrsekretion fiel initial jedoch nicht auf und führte zur Fehlinterpretation der Ergebnisse. In einem Artikel wurde allerdings nicht erwähnt, ob die Katheterisierung erfolgreich war; Daten wurden ebenfalls nicht gezeigt.

Die Methode der Nebennierenzintigraphie wurde bei 19 Fällen genutzt und führte immer zu einer korrekten Tumorlokalisierung. Bei einem Fall war dazu allerdings eine Wiederholung der Untersuchung einige Jahre später nötig.

3.2.5 Chirurgische Therapie und postoperative Nebenniereninsuffizienz

Alle beschriebenen Patienten unterzogen sich einer Adrenaektomie. Dabei erfolgte bei zwei Fällen präoperativ keine Abklärung hinsichtlich einer Aldosteron-Cortisol-Kosekretion und die Patienten entwickelten postoperativ eine Nebenniereninsuffizienz. Trotz der präoperativen Abklärung einer Aldosteron-Cortisol-Kosekretion in den übrigen Fällen und einer postoperativen oralen Gabe eines Glukokortikoids, zeigten weitere sechs Patienten die Symptome einer Nebenniereninsuffizienz. Ein Patient bot diese Symptomatik zweimal, jeweils nach einem Reduktionsversuch der Glukokortikoiddosis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei 17 Fällen eine postoperative Glukokortikoids substitution stattfand und dass sich bei 12 dieser Fälle keine Symptome einer Nebenniereninsuffizienz zeigten.

3.2.6 Histologische und immunhistologische Untersuchungsergebnisse

Bei allen beschriebenen Fällen wurden die entfernten Tumoren histologisch untersucht und immer wurde die Diagnose eines Adenoms gestellt. Dabei wurden bei fünf Fällen die Weiss-Kriterien (Weiss et al. 1989) zur Klassifikation des Tumorgewebes genutzt, um ein Malignom unwahrscheinlich zu machen. Bei den restlichen Fällen fand die Klassifikation nach Weiss keine ausdrückliche Erwähnung.

Makroskopisch zeigten alle Tumoren eine goldgelbe Schnittfläche. Histologisch zeigten sie große klare Zellen (Klarzellen, klZ) und kleine kompakte Zellen (Kompaktzellen, koZ). Bei 37,1% (13 Fälle) wurde eine Atrophie des angrenzenden und nicht tumorösen Gewebes beschrieben.

Eine Untersuchung mit immunhistochemischen Methoden wurde bei 57,1% (20 Fälle) vorgenommen – einen konkreten Überblick liefert Tabelle 9 –, wobei die Expressionen von *CYP17A1* (20×), *CYP11B1* (8×), *CYP11B2* (2×), *CYP11A1* (8×), *CYP21A2* (8×), *HSD3B2* (10×), DHEA-ST (9×), MC2-R (2×) und AT₁-R (2×) untersucht wurden.

Die Untersuchungen hinsichtlich *CYP17A1* zeigten positive Reaktionen in allen Fällen, wenn auch zum Teil nur fokal begrenzt. Auch die Färbungen gegen *CYP11A1*, *CYP21A2*, *CYP11B1* und *CYP11B2* waren alle positiv. Dabei wurde in einem Artikel eine positive Immunreaktion gegen *CYP11B1*, vorwiegend in den Kompaktzellen, und gegen *CYP11B2*, vorwiegend in den Klarzellen, beschrieben.

Eine *HSD3B2*-Expression wurde in allen Tumorgeweben festgestellt, wohingegen sich in angrenzenden und nicht tumorösen Gewebsteilen keine Expression zeigte.

Bei der Untersuchung von DHEA-ST zeigten drei Fälle eine positive und sechs Fälle eine negative Reaktion. Bei den drei positiven Fällen gab es dabei keine klinischen Daten, die eine Androgensekretion vermuten ließen. Ferner zeigten

alle dem Tumor angrenzenden Gewebesteile eine positive Immunreaktion für DHEA-ST, jedoch waren sie bei 83% lediglich gering positiv oder erniedrigt.

| Autor | Pat-Nr | Cytochrom-P450 | | | | | HSD3B2 | | DHEA-ST | | MC2-R | AT ₁ -R |
|------------|--------|----------------|-------|-------|------|------|--------|----|---------|----|-------|--------------------|
| | | 17A | 11B1 | 11B2 | 11A1 | 21A2 | T | NT | T | NT | R | R |
| Adachi | 1 | + | | | | | + | | + | | | |
| | 2 | + | | | | | | | - | | | |
| | 3 | + | | | | | | | | | | |
| | 4 | + | | | | | | | - | | | |
| | 5 | + | | | | | + | | | | | |
| | 6 | + | | | | | + | | | - | | |
| | 7 | + | | | | | | | | | | |
| Fujii | | | + | + | | | | | | | | |
| | | | (koZ) | (klZ) | | | | | | | | |
| Imai | 1 | + | + | | + | + | + | | | | | |
| | 2 | + | + | | + | + | + | | | | | |
| Makino | | + | + | | + | + | + | | - | + | | |
| Oki | | + | | | | | | | - | - | ↓ | |
| Okura | | + | | | + | + | | | - | | ↓ | |
| Saito | 1 | ++ (koZ) | + | | + | + | + | | | ~ | ~ | |
| | 2 | + | + | | + | + | + | | | | ~ | |
| | | (klZ) | | | | | | | | | | |
| Sugawara | | fokal | + | | + | + | | | - | - | ~ | |
| Suzuki | | fokal | | | | | | | | | | |
| Tanaka | | | + | + | | | + | | | | | |
| Willenberg | 1 | + | | | | | | | | | ↓ | ↓ |
| | 2 | + | | | | | | | | | ↓ | ↓ |
| Yamakita | | + | + | | + | + | + | - | + | | | |

Tabelle 9 Übersicht über die immunhistochemischen Untersuchungen der bisher publizierten Artikel. Abk.: Pat-Nr = Patientenummer; HSD3B2 = 3-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase; DHEA-ST = Dehydroepiandrosteronsulfotransferase; T = tumoröses Gewebe; NT = angrenzendes nicht tumoröses Gewebe; MC2-R = Corticotropin-Rezeptor; AT₁-R = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1; koZ = Kompaktzellen; klZ = Klarzellen; + = positive Färbereaktion; - = negative Färbereaktion; ↓ = erniedrigte Expression; ~ = gering positive Färbereaktion. Tabelle nach Späth et al. 2011.

3.2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Molekularbiologische Untersuchungen wurden in vier Artikeln beschrieben. Dabei wurden die Expressionen von HSD3B2-, CYP17A1-, CYP11B1-, CYP11B2-,

CYP11A1-, *CYP21A2*- und DHEA-ST-mRNA sowohl in den Tumoren als auch in nicht tumorösen Anteilen der A/CPAs untersucht.

Eine Analyse mittels Northern Blot erbrachte einen positiven Nachweis von *CYP11A1*, *CYP17A1* und *CYP21A2* sowohl in tumorösem (T) als auch in nicht tumorösem (NT) Gewebe. Außerdem wurden, mittels densitometrischen Analysen der Blottingbanden, mRNA-Quotienten von *CYP17A1* aus T und angrenzendem NT eines A/CPA errechnet und mit den Werten eines reinen APA, CPA und nicht funktionellen Adenoms verglichen (Tabelle 10). Dabei zeigte sich im A/CPA eine höhere Expression von *CYP17A1*-mRNA in T als in NT. Demgegenüber wurde im APA eine höhere Expression in NT als in T festgestellt. Bei der Untersuchung des CPA wurde eine Expression nur in T festgestellt. Schließlich zeigte die Untersuchung des nicht funktionellen Adenoms eine Expression nur in NT.

| Tumor | CYP17A1-mRNA |
|----------------------------|-----------------------------------|
| A/CPA | Tumorgewebe > normales Restgewebe |
| APA | Tumorgewebe < normales Restgewebe |
| CPA | nur Tumorgewebe |
| nicht funktionelles Adenom | nur normales Restgewebe |

Tabelle 10 Darstellung der mRNA-Quotienten in einem A/CPA, APA, CPA und nicht funktionellen Adenom. Abk.: *CYP17A1*-mRNA = Messenger Ribonukleinsäure der 17 α -Hydroxylase; A/CPA = Aldosteron- und Cortisol-koszernierendes Nebennierenadenom; APA = Aldosteron produzierendes Nebennierenadenom; CPA = Cortisol produzierendes Nebennierenadenom

Bei einem anderen Fall wurden bei einem Patienten multiple bilaterale Tumoren beschrieben, die mittels *in-situ* Hybridisierung (ISH) untersucht wurden (Tabelle 11). Dabei gab es einen Tumor auf der rechten, einen auf der linken Seite und multiple kleine, beidseits lokalisierte Tumoren. Die ISH ergab auf der rechten Seite eine starke Expression von *CYP17A1* und *HSD3B2* – laut der Autoren kompatibel mit einer vorwiegenden Cortisol-Sekretion –, während *CYP17A1*, *HSD3B2* und *CYP11B* auf der linken Seite eine normale Expression zeigten, die – laut der Autoren – für eine Aldosteronproduktion sprachen. In den kleinen bilateralen Knötchen wurden sowohl *HSD3B2* als auch *CYP11B* festgestellt. Angrenzendes nicht tumoröses Restgewebe zeigte jedoch supprimierte Werte von *HSD3B2* und *CYP11B*.

| Gewebe | Protein | Expressionsstärke |
|---------------------|----------------------------|-------------------|
| rechts | CYP17A1, HSD3B2 | +++ |
| links | CYP17A1, HSD3B2, CYP11B | + |
| bilaterale Knötchen | HSD3B2, CYP11B | + |
| Rest | HSD3B2, DHEA-ST | ↓ |

Tabelle 11 Darstellung der Ergebnisse der *in-situ* Hybridisierung. Abk.: CYP17A1 = 17 α -Hydroxylase; HSD3B2 = 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase; CYP11B = Cytochrom-P450-11B; DHEA-ST = Dehydroepiandrosteronsulfotransferase; +++: Starke Expression; + = normale Expression; ↓ = supprimierte Expression. Tabelle nach Späth et al. 2011.

Das Verfahren der real-time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) fand in zwei weiteren Untersuchungen Anwendung.

In dem einen Fall wurde das Verhältnis von *CYP17A1*-mRNA zu *CYP11B2*-mRNA eines A/CPA bestimmt und mit dem eines APA, CPA und einer NHN verglichen. Diese Untersuchung zeigte, dass die Werte des A/CPA (1,9) zwischen denen eines APA ($0,9 \pm 0,1$) und denen eines CPA ($2,3 \pm 0,5$) beziehungsweise einer NHN (2,8) lagen.

In dem anderen Fall wurde das Verhältnis von *CYP11B2*-mRNA zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase eines APA bestimmt und mit dem eines CPA verglichen. Dabei wurde zwischen Geweben unterschieden, die entweder überwiegend aus Klarzellen oder aus Kompaktzellen bestanden. Die Klarzellen zeigten Werte ähnlich denen eines CPA und die Kompaktzellen zeigten Werte ähnlich denen eines APA.

4. Diskussion

Der primäre Hyperaldosteronismus (PA) ist die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie und ist überdies mit zusätzlichen Risiken für zerebro-, kardio- und renovaskulären Komplikationen assoziiert (Rossi et al. 2006, Quinkler et al. 2010). Neben den verschiedenen bekannten Ursachen für einen PA, wie der idiopathischen uni-/ bilateralen Nebennierenrindenhyperplasie, familiärem Hyperaldosteronismus und dem Aldosteron produzierenden Nebennierenadenom, ist das Aldosteron- und Cortisol-kosezernierende Adenom (A/CPA) zu erwähnen.

In unserem Patientengut befanden sich 5% an A/CPAs, jedoch ließen sich dazu keine systematischen Arbeiten finden. Daher wurden zwei Patientinnen aus unserem Patientengut mit postoperativer Nebenniereninsuffizienz genau untersucht und die Literatur, soweit möglich, systematisch ausgewertet.

Nach den ersten Publikationen zum A/CPA im Jahre 1979 gab es hierzu in den letzten Jahren viele weitere, vor allem aus dem japanischen Raum. Warum A/CPAs vor allem in japanischer Gegend beschrieben wurden, ist vielleicht dadurch zu erklären, dass es überwiegend japanische Journale waren, bei denen die Artikel publiziert wurden, sodass das Thema in dieser Region besondere Aufmerksamkeit bekam. Zudem zeigte sich auch bei den Literaturrecherchen zum reinen PA eine besondere Aufmerksamkeit der japanischen Arbeitsgruppen. Ursächlich lässt sich dieser Zusammenhang jedoch nicht ergründen und verdient in Zukunft weiterer Betrachtung.

Bei den bereits publizierten Fällen handelte es sich überwiegend um Patienten mit PA in Kombination mit einem präklinischen Cushing-Syndrom beziehungsweise – zu geringerem Anteil – mit einem klinisch erkennbaren Cushing-Syndrom. Alle Patienten, wie unsere eigenen, unterzogen sich einer Adrenalektomie, wobei zwei Fälle publiziert wurden, bei denen der Hyperkortisolismus präoperativ nicht diagnostiziert wurde. Diese beiden Patienten sowie sieben weitere Patienten zeigten postoperativ die Symptome einer Nebenniereninsuffizienz. Aufgrund der Häufigkeit und der Folgen einer Nebenniereninsuffizienz nach Adrenalektomie bei A/CPAs bedarf diese Form des PA einer genauen Betrachtung.

Im Rahmen der Mineralokortikoiddiagnostik fanden wir bei unseren beiden Patientinnen erniedrigte Kaliumwerte. Dies entspricht den Angaben aus vorherigen Publikationen, in denen zu 82% Patienten mit Hypokaliämie beschrieben wurden. Der Grund ist nicht ursächlich festzustellen, jedoch ist anzumerken, dass einige Patienten vor der Einführung des Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) diagnostiziert wurden. Eine Hypokaliämie war damals zur Diagnose eines PA nötig, sodass Patienten ohne Hypokaliämie nicht in die Studien zum PA einbezogen werden konnten. In zukünftigen Studien sollte dieser Sachverhalt noch weiter evaluiert werden. In den meisten neueren Untersuchungen wurde, wie bei uns, der ARQ zur Diagnose eines PA herangezogen, welcher in geringerer Anzahl mit einem Bestätigungstest kombiniert wurde. Bei unseren Patientinnen wurde der PA in beiden Fällen bestätigt und es fielen darüber hinaus deutlich erhöhte Werte an 18-Hydroxycortisol (18-OH-F) und dessen Vorläufer, 18-Hydroxycorticosteron (18-OH-B), auf. Diese Parameter waren zuvor noch nicht in Zusammenhang mit A/CPAs beschrieben worden.

In der Literatur wird zwischen Angiotensin II - responsiven und -nichtresponsiven APAs anhand der Produktion von Cortisol, der Zelltypen, dem Ausmaß der Steroidsupprimierbarkeit durch Dexamethason und der Bildung von Hybridsteroiden – wie 18-OH-F – unterschieden (Stowasser et al. 1993, Stowasser et al. 1996, Gordon 1995). Leicht erhöhte Werte von 18-OH-B können auch durch gewöhnliche APAs hervorgerufen werden (Funder et al. 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Gesunden bereits sezerniertes Cortisol durch Zellen der *Zona glomerulosa* zu 18-OH-F metabolisiert werden kann (Freel et al. 2004). Deshalb mögen mäßig erhöhte Hybridsteroiden eventuell auf eine übermäßige Produktion von Aldosteron oder Cortisol beziehungsweise deren Vorläufern zurückzuführen sein. Bei unseren ausführlich beschriebenen Patientinnen fanden sich jedoch deutlich erhöhte Werte.

Erhöhte Werte von 18-OH-F sind ein typisches Merkmal von familiärem Hyperaldosteronismus Typ 1 (FHA 1). Dabei handelt es sich um eine seltene Unterform des PA, die vorwiegend bei Patienten mit einer familiären Häufung einer arteriellen Hypertonie zu finden ist (Sutherland et al. 1966, New et Peterson 1967). Ursächlich ist ein ungleiches Crossing-over während der meiotischen Teilung zwischen *CYP11B1* und *CYP11B2* (Lifton et al. 1992, Pascoe et al. 1992). Das daraus resultierende chimäre *CYP11B1/CYP11B2*-Gen führt zu ei-

ner ACTH-abhängigen Aldosteron-Synthase-Aktivität und der Fähigkeit 18-OH-F aus 18-OH-B zu produzieren. Neben dem FHA 1 wurden auch beim familiären Hyperaldosteronismus Typ 3 (FHA 3) stark erhöhte Werte von 18-OH-F beschrieben (Geller et al. 2008). Die Ursache für den FHA 3 liegt in einer Mutation des, für einen Kalium-Kanal kodierenden, *KCNJ5*-Gens (Choi et al. 2011). Die Familienanamnese der beiden oben beschriebenen Patienten bot jedoch keinen Anhalt für eine familiäre Belastung und auch das *CYP11B1/CYP11B2*-Gen konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Untersuchung in Hinblick auf die *KCNJ5*-Mutation war nicht möglich, da zu dem Zeitpunkt der Untersuchung diese Mutation noch nicht publiziert war. Eine direkte Ursache für die deutlich erhöhten Werte bei den beschriebenen Patienten ließ sich damit nicht finden. Bei zukünftigen Fällen eines A/CPA ist es zur weiteren Evaluation daher sinnvoll, 18-OH-F und 18-OH-B zu bestimmen, um weitere Untersuchungen anschließen und eruieren zu können, ob es Regelmäßigkeiten im Auftreten und der Höhe von 18-OH-F/B gibt und ob sich diese beiden Hormone eventuell als Screening-Methode für A/CPAs eignen könnten.

Bei der Betrachtung der maximalen Tumordurchmesser wiesen unsere beiden Patientinnen Größen oberhalb von 30 mm auf. Dies entspricht insofern den Literaturangaben, bei denen A/CPAs im Durchschnitt 26,2 mm groß sind, als dass sie damit deutlich größer als gewöhnliche APAs waren. Für gewöhnliche APAs finden sich hierzu Angaben von 15 mm (Allan et al. 2000, Funder et al. 2008, Reznik et Armstrong 1994). Es fällt somit ein Unterschied von circa 10 mm auf, der einen auf die Fährte eines malignen Geschehens führen könnte. Ein Anhalt für Malignität fand sich jedoch bei keinem Fall. Dieser Größenunterschied könnte jedoch ein Grund für den labordiagnostisch messbaren und zum Teil klinisch sichtbaren Hyperkortisolismus sein. Denn APAs, die rein aus Zellen der *Zona glomerulosa* bestehen, sind selten. Für gewöhnlich bestehen APAs aus verschiedenen Zellarten (Ganguly 1992, Shigematsu et al. 2009, Neville et O'Hare 1985), sodass grundsätzlich die Möglichkeit der Aldosteron- und Cortisol-Kosekretion besteht (Willenberg et al. 2010, Reincke et al. 1998). Es bestehen drei mögliche Gründe, die zur Diagnose einer Cortisol-Kosekretion führen. Erstens ist es möglich, dass A/CPAs einen höheren Anteil an Cortisol produzierenden Zellen als gewöhnliche APAs haben – siehe Abbildung 11, Option I. Zweitens wäre es möglich, dass die produzierte Menge an Cortisol

erst durch die vermehrte Tumorgroße klinisch und diagnostisch relevant wird, obwohl das Verhältnis zwischen Aldosteron und Cortisol produzierenden Zellen gleich dem eines reinen APAs ist – siehe Abbildung 11, Option II. Die dritte Möglichkeit ist, dass Tumoren mit einem Durchmesser größer zwei Zentimetern aufgrund der überdurchschnittlichen Größe dem Untersucher suspekt erscheinen, sodass dieser eine ausgeweitete Diagnostik bemüht.

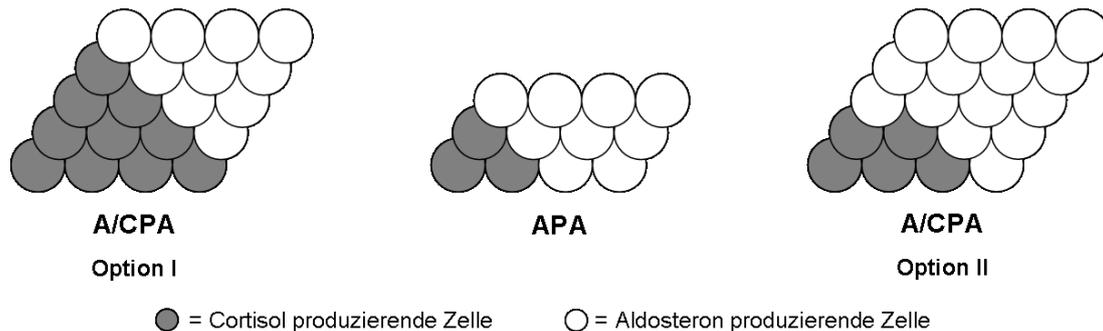


Abb. 11 Darstellung der Ursachen einer klinisch relevanten Cortisol-Sekretion. Ein Vergleich zweier A/CPA-Varianten mit einem APA. Abb. nach Späth et al. 2011.

Auch die oben bereits erwähnte Ausprägung der Cushing-Symptomatik lässt einen Zusammenhang zwischen Klinik und Tumorgroße vermuten. Die Fälle eines klinisch erkennbaren Cushing-Syndroms waren zwar in der Minderheit, jedoch waren sie ausschließlich bei Tumoren mit einem Mindestdurchmesser von 28 mm zu finden. Typische Befunde eines präklinischen Cushing-Syndroms hingegen lagen zwar auch bei relativ großen Durchmessern vor, jedoch waren sie überwiegend bei Durchmessern ≤ 20 mm vertreten. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zum PA in Kombination mit präklinischem Hyperkortisolismus ergab, dass es bei 76 untersuchten Fällen nur einen Fall mit Aldosteron- und Cortisol-Kosekretion gab (Fallo et al. 2011). Die untersuchten Tumoren lagen jedoch in der Größenordnung von 6-21 mm, wobei der einzige festgestellte Fall der Kosekretion eine Größe im Bereich der bereits publizierten Fälle zeigte. Die These der Größenabhängigkeit wurde damit nicht widerlegt und bedarf noch weiterer Untersuchung.

Zur Lateralisierungsdiagnostik wurde bei zehn Fällen das als Goldstandard (Funder et al. 2008) beschriebene Verfahren der selektiven Nebennierenvenenkatheterisierung (AVS) angewandt. Dabei wurden sowohl Aldosteron- als auch Cortisol-Konzentrationen im Blut einer Nebennierenvene (AV) und einer peri-

pheren Vene (PV) oder der *Vena cava inferior* (VCI) bestimmt. Der Vergleich der Cortisol-Konzentrationen der PV/ VCI mit den Cortisol-Konzentrationen der AV gab Anhalt für die korrekte Lage des Katheters. Ferner wurden Aldosteron-/Cortisolquotienten als sogenannte Selektivitätsindices bestimmt, wobei die Cortisol-Konzentration als Korrekturwert für den Konzentrationsvergleich von Aldosteron in der AV beziehungsweise PV/ VCI diene (Mulatero et al. 2010). Bei drei der zehn Patienten, die sich der Katheterisierung unterzogen, kam es zu nicht eindeutigen Ergebnissen. Dies basierte möglicherweise auf falsch niedrigen Selektivitätsindices, aufgrund erhöhter peripherer Cortisol-Konzentrationen und kontralateraler Suppression. Dieser Fehler könnte unter Umständen bei anderen zukünftigen Patienten zur fälschlichen Diagnose einer bilateralen Sekretion, und damit verbunden zur Wahl eines nicht geeigneten Therapie-schemas führen (Funder et al. 2008: Abbildung 1). Dies ist, bei den zu A/CPAs publizierten Artikeln, zwar nicht eingetreten, da sich alle Patienten einer Adrenalektomie unterzogen, jedoch verdient diese Tatsache Beachtung und sollte bei der Interpretation bedacht werden.

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine geringe Expression sowohl von MC2- als auch von AT₁-Rezeptoren, deren Expression in A/CPAs bisher noch nicht untersucht worden war, und eine starke Expression der 17 α -Hydroxylase. Dies ist, in Anbetracht der multifaktoriell beeinflussten Aldosteronsekretion, plausibel (Willenberg et al. 2008).

Die Bindung von ACTH an seinen Rezeptor führt zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) und einer Expression vom Steroidogenem Faktor 1 (SF-1). Sowohl cAMP als auch SF-1 führen zu einer positiven Verstärkung der MC2-Rezeptoren (Naville et al. 1999, Sarkar et al. 2000). Die hier vorstellten Patientinnen zeigten jedoch geringe Plasmakonzentrationen von ACTH. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Expression der MC2-Rezeptoren sein, da eine geringe Konzentration an ACTH, dem oben beschriebenen Mechanismus folgend, in einer geringen Expression an MC2-Rezeptoren mündet. Der geringe Nachweis von MC2-Rezeptoren im reinen CPA bestätigte den bereits, bei *in-vitro* Tests, beschriebenen Sensitivitätsverlust von Nebennierenrindenzellen aus CPAs gegenüber ACTH (Willenberg et al. 1998).

Die geringere Expression von AT₁-Rezeptoren in A/CPAs, im Vergleich zu reinen APAs, erscheint ebenfalls nachvollziehbar, da bereits an anderer Stelle eine enge Korrelation der Regulation von AT₁- und MC2-Rezeptoren durch noch nicht identifizierte Einflussfaktoren vermutet wurde (Schubert et al. 2001). Diesem Gedanken folgend, könnte bei A/CPAs eine geringe ACTH-Plasmakonzentration zu einer geringen Expression von sowohl MC2- als auch AT₁-Rezeptoren führen. Eine andere Erklärung – beziehungsweise der gemeinsame Nenner – könnte in der, von Till Dringenberg auf der 10. Nebennierenkonferenz 2012 in Dresden, vorgestellten Hypothese zur Nebennierenrindenzonierung bestehen. Sie hat zur Grundlage, dass die Expression von AT₁-Rezeptoren direkt durch Glukokortikoide negativ reguliert wird (Bogdarina et al. 2009) und es mit zunehmender Größe der APAs wahrscheinlicher wird, dass auch ein Glukokortikoidexzess eintritt, der über einen negativen Feedback-Mechanismus die ACTH-abhängige Expression des MC2-Rezeptors unterdrückt (Dringenberg et al. 2012).

Die Untersuchungen zur Präsenz der 17 α -Hydroxylase im Tumorgewebe ergaben einen relativ starken Nachweis bei den beiden A/CPAs sowie in den Geweben der APAs, des CPA und der NHN. Die 17 α -Hydroxylase konnte ebenfalls bei vielen weiteren immunhistochemischen Studien zu A/CPAs nachgewiesen werden. Der starke Nachweis im APA erschien zunächst etwas ungewöhnlich, da es bei anderen Untersuchungen, als Enzym alleinig zur Cortisolbiosynthese gehörend, zur Bestätigung der Cortisolproduktion der Tumoren herangezogen wurde (Adachi et al. 2003, Dringenberg et al. 2012). Die Ergebnisse der nachfolgenden Western Blot-Analysen bestätigten den Nachweis von 17 α -Hydroxylase-Protein bei den APAs. Auch andere Kollegen hatten bereits ähnliche Ergebnisse beschrieben (Reincke et al. 1998). Der Anteil an 17 α -Hydroxylase bei A/CPAs und CPAs war, gemessen anhand der RNA-Expression, höher als bei reinen APAs (Suzuki et al. 2007). Diese Untersuchungen zur RNA-Expression konnten in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, jedoch zeigte sich auch im Western Blot, rein qualitativ betrachtet, ein stärkerer Nachweis von 17 α -Hydroxylase im CPA als im APA. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Nachweis der 17 α -Hydroxylase im Tumorgewebe kein spezifischer Nachweis für eine Cortisolproduktion ist.

Demzufolge ist es umso wichtiger mittels präoperativer diagnostischer Maßnahmen die Diagnose eines A/CPA zu stellen. Die Erkenntnisse aus unseren Untersuchungen zeigen, dass an ein A/CPA gedacht werden sollte, wenn ein Patient folgende Kriterien erfüllt:

1. eine durch Bestätigungstests gesicherte Diagnose eines PA
2. eine verminderte Cortisolsuppression im Dexamethason-Suppressionstest
3. erhöhtes freies Cortisol im Urin beziehungsweise erniedrigte Plasmakonzentrationen von ACTH
4. erhöhte Hybridsteroiden wie zum Beispiel 18-OH-F
5. ein Tumordurchmesser $\geq 2,5$ cm (Willenberg et al. 2010, Späth et al. 2011).

Abschließend und schlussfolgernd lässt sich somit festhalten, dass das A/CPA eine eigenständige Unterform des PA darstellt. Zwar ist die Ursache der Aldosteron und Cortisol-Kosekretion dieser Tumoren noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen, jedoch verdienen die A/CPAs aufgrund ihrer speziellen klinischen und diagnostischen Implikationen größere Beachtung bei der Diagnostik eines PA, nicht zuletzt auch zur Prävention postoperativer Nebenniereninsuffizienzen.

5. Zusammenfassung

Die aktuelle Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des primären Hyperaldosteronismus (PA) empfiehlt eine eindeutige Subtypisierung zur Therapieauswahl. Ein Screening auf exzessive Hormonsekretion neben Aldosteron ist dabei nicht vorgesehen, wobei ein PA selten durch reine *Zona glomerulosa*-Nebennierenadenome verursacht ist und in den letzten Jahren mehrere Patienten mit Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenadenomen (A/CPAs) beschrieben wurden.

Es wurden daher zwei A/CPAs anhand zweier Patientinnen hinsichtlich ihrer klinischen, hormonellen und histologischen Charakteristika genau untersucht. Die Hormondiagnostik, inklusive 18-Hydroxycorticosteron (18-OH-B)- und 18-Hydroxycortisol (18-OH-F)-Analytik, erfolgte basal, nach Fludrocortison-suppression, nach Dexamethasonsuppression, nach Spironolactontherapie sowie nach Adrenaektomie. Überdies wurden immunhistochemisch die Expressionen von Angiotensin-II-Typ-1- (AT₁-R) und Corticotropin-Rezeptoren (MC2-R) sowie der 17 α -Hydroxylase (*CYP17A1*) bei beiden A/CPAs untersucht. Beide Patientinnen zeigten postoperativ die Symptome einer Nebennierenrindeninsuffizienz für mehr als sechs Monate. Aldosteron, 18-OH-B und 18-OH-F normalisierten sich innerhalb von acht Wochen. Die histologischen Untersuchungen ergaben in beiden Fällen eine schwache Expression von AT₁-R und MC2-R neben einer starken Expression von *CYP17A1*. Ein familiärer Hyperaldosteronismus Typ 1 wurde durch eine Genanalyse ausgeschlossen.

Ferner wurden die bisher veröffentlichten Studien zu A/CPAs analysiert und die Frage der Tumorgenese anhand verschiedener Hypothesen diskutiert.

Eine präoperative Diagnose von A/CPAs kann postoperativen Nebenniereninsuffizienzen vorbeugen und insbesondere bei PA in Kombination mit Adenomen größer als 2,5 cm, nicht supprimierbarem Cortisol im Niedrigdosis-Dexamethason-Test, erhöhtem freien Cortisol im Urin beziehungsweise erniedrigten Plasmakonzentrationen von ACTH und erhöhten Hybridsteroiden, wie 18-OH-F, sollte an A/CPAs gedacht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, K. (1994) 'Recent progress on the diagnosis and therapy of secondary hypertension', *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 83(9), 1606-13.
- Adachi, J., Hirai, Y., Terui, K., Nakano, T., Fukuda, Y., Suda, T. et Sasano, H. (2003) 'A report of 7 cases of adrenal tumors secreting both cortisol and aldosterone', *Intern Med*, 42(8), 714-8.
- Allan, C. A., Kaltsas, G., Perry, L., Lowe, D. G., Reznick, R., Carmichael, D. et Monson, J. P. (2000) 'Concurrent secretion of aldosterone and cortisol from an adrenal adenoma - value of MRI in diagnosis', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 53(6), 749-53.
- Baert, D., Nobels, F. et Van Crombrugge, P. (1995) 'Combined Conn's and Cushing's syndrome: an unusual presentation of adrenal adenoma', *Acta Clin Belg*, 50(5), 310-3.
- Balas, M., Zosin, I., Maser-Gluth, C., Hermsen, D., Cupisti, K., Schott, M., Schinner, S., Knoefel, W. T., Scherbaum, W. A. et Willenberg, H. S. (2010) 'Indicators of mineralocorticoid excess in the evaluation of primary aldosteronism', *Hypertens Res*, 33(8), 850-6.
- Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J. et Litt, G. J. (1989) 'Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays', *J Immunol Methods*, 125(1-2), 279-85.
- Boenisch, T. (2003) *Handbuch Immunchemische Färbemethoden, DakoCytomation*, Carpinteria, CA, USA: DakoCytomation.
- Bogdarina, I. G., King, P. J. et Clark, A. J. (2009) 'Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids', *J Mol Endocrinol*, 43(2), 73-80.

- Born-Frontsberg, E. et Quinkler, M. (2009) 'Conn's syndrome', *Internist (Berl)*, 50(1), 17-26.
- Choi, M., Scholl, U. I., Yue, P., Bjorklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C. J., Lolis, E., Wisgerhof, M. V., Geller, D. S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Wang, W., Carling, T. et Lifton, R. P. (2011) 'K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension', *Science*, 331(6018), 768-72.
- Conn, J. W. (1955) 'Primary aldosteronism', *J Lab Clin Med*, 45(4), 661-4.
- Crivello, J. F. et Gill, G. N. (1983) 'Induction of cultured bovine adrenocortical zona glomerulosa cell 17-hydroxylase activity by ACTH', *Mol Cell Endocrinol*, 30(1), 97-107.
- Diederich, S., Willenberg, H. S., Schirpenbach, C., Hahner, S. et Quinkler, M. (2010) 'Primary hyperaldosteronism--more common than previously thought', *MMW Fortschr Med*, 152(7), 32-5.
- Dringenberg, T., Schwitalla, M., Haase, M., Scherbaum, W. A. et Willenberg, H. S. (2012) 'Control of CYP11B2/CYP11B1 Expression Ratio and Consequences for the Zonation of the Adrenal Cortex', *Horm Metab Res*.
- Etxabe, J. et Vazquez, J. A. (1994) 'Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40(4), 479-84.
- Fallo, F., Bertello, C., Tizzani, D., Fassina, A., Boulkroun, S., Sonino, N., Monticone, S., Viola, A., Veglio, F. et Mulatero, P. (2011) 'Concurrent primary aldosteronism and subclinical cortisol hypersecretion: a prospective study', *J Hypertens*, 29(9), 1773-7.

- Fischer, E., Beuschlein, F. et Reincke, M. (2011) 'Diagnosis of endocrinological hypertension: when to screen, and by which method?', *Dtsch Med Wochenschr*, 136(11), 537-40.
- Freel, E. M., Shakerdi, L. A., Friel, E. C., Wallace, A. M., Davies, E., Fraser, R. et Connell, J. M. (2004) 'Studies on the origin of circulating 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol in normal human subjects', *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9), 4628-33.
- Fujii, H., Kamide, K., Miyake, O., Abe, T., Nagai, M., Nakahama, H., Horio, T., Takiuchi, S., Okuyama, A., Yutani, C. et Kawano, Y. (2005) 'Primary aldosteronism combined with preclinical Cushing's syndrome in an elderly patient', *Circ J*, 69(11), 1425-7.
- Funder, J. W., Carey, R. M., Fardella, C., Gomez-Sanchez, C. E., Mantero, F., Stowasser, M., Young, W. F., Jr. et Montori, V. M. (2008) 'Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline', *J Clin Endocrinol Metab*, 93(9), 3266-81.
- Ganguly, A. (1992) 'Cellular origin of aldosteronomas', *Clin Investig*, 70(5), 392-5.
- Geller, D. S., Zhang, J., Wisgerhof, M. V., Shackleton, C., Kashgarian, M. et Lifton, R. P. (2008) 'A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism', *J Clin Endocrinol Metab*, 93(8), 3117-23.
- Ghayee, H. K. et Auchus, R. J. (2007) 'Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis', *Rev Endocr Metab Disord*, 8(4), 289-300.
- Gordon, R. D. (1995) 'Primary aldosteronism', *J Endocrinol Invest*, 18(7), 495-511.

- Gross, F. (1958) 'Renin and hypertension, physiological or pathological agents?', *Klin Wochenschr*, 36(15), 693-706.
- Guthrie, G. P., Jr. et Kotchen, T. A. (1979) 'Hypertension and aldosterone overproduction without renin suppression in Cushing's syndrome from an adrenal adenoma', *Am J Med*, 67(3), 524-8.
- Harkins, J. B., Nelson, E. B., Masters, B. S. et Bryan, G. T. (1974) 'Preparation and properties of microsomal membranes from isozonal cells of beef adrenal cortex', *Endocrinology*, 94(3), 897-902.
- Hobma, S., Hermus, A., Pieters, G., Smals, A. et Kloppenborg, P. (1990) 'Concurrent hypercortisolism and hyperaldosteronism due to an adrenal adenoma', *Klin Wochenschr*, 68(19), 981-3.
- Hogan, M. J., Schambelan, M. et Biglieri, E. G. (1977) 'Concurrent hypercortisolism and hypermineralocorticoidism', *Am J Med*, 62(5), 777-82.
- Honda, T., Nakamura, T., Saito, Y., Ohyama, Y., Sumino, H. et Kurabayashi, M. (2001) 'Combined primary aldosteronism and preclinical Cushing's syndrome: an unusual case presentation of adrenal adenoma', *Hypertens Res*, 24(6), 723-6.
- Imai, T., Seo, H., Murata, Y., Funahashi, H., Satoh, Y., Sasano, H., Matsui, N. et Takagi, H. (1991) 'Dexamethasone-nonsuppressible cortisol in two cases with aldosterone-producing adenoma', *J Clin Endocrinol Metab*, 72(3), 575-81.
- Kajimi, T., Shirai, N., Omi, T., Naito, S., Odanaka, E., Baba, K., Iwamoto, H., Sasano, H. et Saitou, N. (2004) 'A case of Cushing's syndrome and primary aldosteronism with sustained high level of plasma renin activity', *Folia Endocrinol Jpn*, (80 (Suppl.)), 15-9.

- Komiya, I., Koizumi, Y., Kobayashi, R., Kotani, M., Yamada, T. et Maruyama, Y. (1979) 'Concurrent hypersecretion of aldosterone and cortisol from the adrenal cortical adenoma', *Am J Med*, 67(3), 516-8.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Rich, G. M., Cook, S., Ulick, S. et Lalouel, J. M. (1992) 'A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension', *Nature*, 355(6357), 262-5.
- Lindholm, J., Juul, S., Jorgensen, J. O., Astrup, J., Bjerre, P., Feldt-Rasmussen, U., Hagen, C., Jorgensen, J., Kosteljanetz, M., Kristensen, L., Laurberg, P., Schmidt, K. et Weeke, J. (2001) 'Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study', *J Clin Endocrinol Metab*, 86(1), 117-23.
- Makino, S., Oda, S., Saka, T., Yasukawa, M., Komatsu, F. et Sasano, H. (2001) 'A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with preclinical Cushing's syndrome and hypersecretion of parathyroid hormone', *Endocr J*, 48(1), 103-11.
- Markou, A., Tsigou, K., Papadogias, D., Kossyvakis, K., Vamvakidis, K., Kounadi, T. et Piaditis, G. (2005) 'A unique case of a benign adrenocortical tumor with triple secretion of cortisol, androgens, and aldosterone: development of multiple sclerosis after surgical removal of the tumor', *Hormones (Athens)*, 4(4), 226-30.
- Matsuo, Y., Sugano, K., Tani, Y., Matsushita, M., Himeno, Y., Kawach, Y., Maruyama, H., Taki, K., Sasano, H. et Hirata, M. (2007) 'A case of Cushing's syndrome by hemilateral adrenal tumor associated with primary aldosteronism by bilateral adrenal gland', *Clinical Endocrinology (Hormone to Rinsho)*, (55), 169-74.

- Mulatero, P., Bertello, C., Sukor, N., Gordon, R., Rossato, D., Daunt, N., Leggett, D., Mengozzi, G., Veglio, F. et Stowasser, M. (2010) 'Impact of different diagnostic criteria during adrenal vein sampling on reproducibility of subtype diagnosis in patients with primary aldosteronism', *Hypertension*, 55(3), 667-73.
- Murakami, H., Arihara, Y., Sato, F., Totsume, K., Ito, S., Sone, M., Takahashi, K., Ihibashi, C., Sasano, H., Chiba, H., Origasa, S. et Mori, T. (1999) 'Two cases of Cushing's syndrome associated with aldosterone over secretion', *Clinical Endocrinology (Hormone to Rinsho)*, (47), 210-6.
- Nagae, A., Murakami, E., Hiwada, K., Kubota, O., Takada, Y. et Ohmori, T. (1991) 'Primary aldosteronism with cortisol overproduction from bilateral multiple adrenal adenomas', *Jpn J Med*, 30(1), 26-31.
- Naito, M., Kondo, M. et Konishi, T. (1981) 'A case of Cushing's syndrome with hypersecretion of aldosterone', *Mie-Igaku*, 252.
- Naville, D., Penhoat, A., Durand, P. et Begeot, M. (1999) 'Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene', *Biochem Biophys Res Commun*, 255(1), 28-33.
- Neville, A. M. et O'Hare, M. J. (1985) 'Histopathology of the human adrenal cortex', *Clin Endocrinol Metab*, 14(4), 791-820.
- New, M. I. et Peterson, R. E. (1967) 'A new form of congenital adrenal hyperplasia', *J Clin Endocrinol Metab*, 27(2), 300-5.
- Nieman, L. K., Biller, B. M., Findling, J. W., Newell-Price, J., Savage, M. O., Stewart, P. M. et Montori, V. M. (2008) 'The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline', *J Clin Endocrinol Metab*, 93(5), 1526-40.

- Nishimura, M., Uzu, T., Fujii, T., Kuroda, S., Nakamura, S., Inenaga, T. et Kimura, G. (1999) 'Cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism', *Am J Kidney Dis*, 33(2), 261-6.
- Oki, K., Yamane, K., Sakashita, Y., Kamei, N., Watanabe, H., Toyota, N., Shigeta, M., Sasano, H. et Kohno, N. (2008) 'Primary aldosteronism and hypercortisolism due to bilateral functioning adrenocortical adenomas', *Clin Exp Nephrol*, 12(5), 382-7.
- Okura, T., Miyoshi, K., Watanabe, S., Kurata, M., Irita, J., Manabe, S., Fukuoka, T., Higaki, J. et Sasano, H. (2006) 'Coexistence of three distinct adrenal tumors in the same adrenal gland in a patient with primary aldosteronism and preclinical Cushing's syndrome', *Clin Exp Nephrol*, 10(2), 127-30.
- Omura, M., Hashimoto, S., Sasano, H. et Nishikawa, T. (2007) 'A case of preclinical Cushing's syndrome coincided with aldosterone producing adenoma in the different adrenal gland', *J Jpn Endocr Soc (Nippon Naibunpitsu Gakkai Zasshi)*, (83), 29-32.
- Onoda, N., Ishikawa, T., Nishio, K., Tahara, H., Inaba, M., Wakasa, K., Sumi, T., Yamazaki, T., Shigematsu, K. et Hirakawa, K. (2009) 'Cushing's syndrome by left adrenocortical adenoma synchronously associated with primary aldosteronism by right adrenocortical adenoma: report of a case', *Endocr J*, 56(3), 495-502.
- Pascoe, L., Curnow, K. M., Slutsker, L., Connell, J. M., Speiser, P. W., New, M. I. et White, P. C. (1992) 'Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2', *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(17), 8327-31.
- Quinkler, M., Born-Flintberg, E. et Fourkoti, V. G. (2010) 'Comorbidities in primary aldosteronism', *Horm Metab Res*, 42(6), 429-34.

- Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M. et Alolio, B. (1998) 'Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex', *J Endocrinol*, 156(3), 415-23.
- Reznek, R. H. et Armstrong, P. (1994) 'The adrenal gland', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40(5), 561-76.
- Rossi, E., Foroni, M., Regolisti, G., Perazzoli, F., Negro, A., Santi, R., Grasselli, C., Galli, P. et Gardini, G. (2008) 'Combined Conn's syndrome and subclinical hypercortisolism from an adrenal adenoma associated with homolateral renal carcinoma', *Am J Hypertens*, 21(11), 1269-72.
- Rossi, G. P. (2011) 'Diagnosis and treatment of primary aldosteronism', *Endocrinol Metab Clin North Am*, 40(2), 313-32, vii-viii.
- Rossi, G. P., Bernini, G., Caliumi, C., Desideri, G., Fabris, B., Ferri, C., Ganzaroli, C., Giacchetti, G., Letizia, C., Maccario, M., Mallamaci, F., Mannelli, M., Mattarello, M. J., Moretti, A., Palumbo, G., Parenti, G., Porteri, E., Semplicini, A., Rizzoni, D., Rossi, E., Boscaro, M., Pessina, A. C. et Mantero, F. (2006) 'A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients', *J Am Coll Cardiol*, 48(11), 2293-300.
- Rossi, G. P., Di Bello, V., Ganzaroli, C., Sacchetto, A., Cesari, M., Bertini, A., Giorgi, D., Scognamiglio, R., Mariani, M. et Pessina, A. C. (2002) 'Excess aldosterone is associated with alterations of myocardial texture in primary aldosteronism', *Hypertension*, 40(1), 23-7.
- Saito, T., Ikoma, A., Saito, T., Tamemoto, H., Suminaga, Y., Yamada, S., Kawakami, M., Suzuki, T., Sasano, H. et Ishikawa, S. E. (2007) 'Possibly simultaneous primary aldosteronism and preclinical Cushing's syndrome in a patient with double adenomas of right adrenal gland', *Endocr J*, 54(2), 287-93.

- Sarkar, D., Kambe, F., Hayashi, Y., Ohmori, S., Funahashi, H. et Seo, H. (2000) 'Involvement of AP-1 and steroidogenic factor (SF)-1 in the cAMP-dependent induction of human adrenocorticotrophic hormone receptor (ACTHR) promoter', *Endocr J*, 47(1), 63-75.
- Sasaki, N., Iwase, M., Arima, H., Nohara, S., Bandai, S., Yao, T., Fujii, K. et Iida, M. (2006) 'Overt diabetes mellitus in a patient with combined primary aldosteronism and Cushing's syndrome', *Intern Med*, 45(21), 1237-42.
- Schiebler, T. H. (2005) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs*, Springer, 9., vollst. überarb. Aufl. ed., Berlin: Springer Medizin.
- Schubert, B., Fassnacht, M., Beuschlein, F., Zenkert, S., Allolio, B. et Reincke, M. (2001) 'Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 54(5), 627-32.
- Sechi, L. A., Novello, M., Lapenna, R., Baroselli, S., Nadalini, E., Colussi, G. L. et Catena, C. (2006) 'Long-term renal outcomes in patients with primary aldosteronism', *JAMA*, 295(22), 2638-45.
- Shigematsu, K., Nishida, N., Sakai, H., Igawa, T., Suzuki, S., Kawai, K. et Takahara, O. (2009) 'Primary aldosteronism with aldosterone-producing adenoma consisting of pure zona glomerulosa-type cells in a pregnant woman', *Endocr Pathol*, 20(1), 66-72.
- Siegenthaler, W. et Amann-Vesti, B. R. (2006) *Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen*, Thieme, 9., völlig neu bearb. Aufl ed., Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Späth, M., Korovkin, S., Antke, C., Anlauf, M. et Willenberg, H. S. (2011) 'Aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism', *Eur J Endocrinol*, 164(4), 447-55.

- Stowasser, M., Bachmann, A. W., Tunny, T. J. et Gordon, R. D. (1996) 'Production of 18-oxo-cortisol in subtypes of primary aldosteronism', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23(6-7), 591-3.
- Stowasser, M., Tunny, T. J., Klemm, S. A. et Gordon, R. D. (1993) 'Cortisol production by aldosterone-producing adenomas in vitro', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 20(5), 292-5.
- Suda, T., Shibata, Y., Kurihara, I., Kobayashi, S., Yokota, K., Konishi, T., Hayashi, K., Honma, K., Nakagawa, K., Murai, M., Sasano, H., Saito, I. et Saruta, T. (2004) 'A case of Cushing's syndrome with overproduction of aldosterone', *Folia Endocrinol Jpn*, (80 (Suppl.)), 44-8.
- Sugawara, A., Takeuchi, K., Suzuki, T., Itoi, K., Sasano, H. et Ito, S. (2003) 'A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with a probable post-operative adrenal crisis: histopathological analyses of the adrenal gland', *Hypertens Res*, 26(8), 663-8.
- Sutherland, D. J., Ruse, J. L. et Laidlaw, J. C. (1966) 'Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone', *Can Med Assoc J*, 95(22), 1109-19.
- Suzuki, J., Otsuka, F., Inagaki, K., Otani, H., Miyoshi, T., Terasaka, T., Ogura, T., Omori, M., Nasu, Y. et Makino, H. (2007) 'Primary aldosteronism caused by a unilateral adrenal adenoma accompanied by autonomous cortisol secretion', *Hypertens Res*, 30(4), 367-73.
- Tachiki, M., Ozaki, Y., Tanabe, A., Isozaki, O. et Takano, K. (2007) 'A case of primary aldosteronism found in a case formally undergone surgery for Cushing's syndrome', *J Jpn Endocr Soc (Nippon Naibunpitsu Gakkai Zasshi)*, (83), 233-5.

- Takeo, R., Iguchi, M., Kudo, T., Takahashi, K., Kishimoto, M., Takamashi, H., Okimura, Y. K., Kaji, H., Chihara, K. et Sasano, H. (2003) 'A case of primary aldosteronism associated with preclinical Cushing's syndrome caused by aldosterone producing adenoma and cortisol producing adenoma in a unilateral adrenal gland', *J Jpn Endocr Soc (Nippon Naibunpitsu Gakkai Zasshi)*, (79), 103-6.
- Tanaka, M., Izeki, M., Miyazaki, Y., Horigome, M., Yoneda, T., Tsuyuki, S., Takami, S. et Aiba, M. (2002) 'Combined primary aldosteronism and Cushing's syndrome due to a single adrenocortical adenoma complicated by Hashimoto's thyroiditis', *Intern Med*, 41(11), 967-71.
- Tomaschitz, A. et Pilz, S. (2010) 'Aldosterone to renin ratio--a reliable screening tool for primary aldosteronism?', *Horm Metab Res*, 42(6), 382-91.
- Tsunoda, K., Abe, K., Yamada, M., Kato, T., Yaoita, H., Taguma, Y., Goto, Y. et Ioridani, N. (2008) 'A case of primary aldosteronism associated with renal artery stenosis and preclinical Cushing's syndrome', *Hypertens Res*, 31(8), 1669-75.
- Tunny, T. J., Klemm, S. A. et Gordon, R. D. (1990) 'Some aldosterone-producing adrenal tumours also secrete cortisol, but present clinically as primary aldosteronism', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 17(3), 167-71.
- Vecsei, P., Abdelhamid, S., Mittelstadt, G. V., Lichtwald, K., Haack, D. et Lewicka, S. (1983) 'Aldosterone metabolites and possible aldosterone precursors in hypertension', *J Steroid Biochem*, 19(1A), 345-51.
- Weiss, L. M., Medeiros, L. J. et Vickery, A. L., Jr. (1989) 'Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma', *Am J Surg Pathol*, 13(3), 202-6.

- Willenberg, H. S., Gruber, M., Eisenhofer, G. et R., B. S. (2012) 'Endokrine Hypertonie – Neuigkeiten und jüngste Entwicklungen', *Dtsch Med Wochenschr*, 137, 627-30.
- Willenberg, H. S., Kolentini, C., Quinkler, M., Cupisti, K., Krausch, M., Schott, M. et Scherbaum, W. A. (2009) 'The serum sodium to urinary sodium to (serum potassium)² to urinary potassium (SUSPPUP) ratio in patients with primary aldosteronism', *Eur J Clin Invest*, 39(1), 43-50.
- Willenberg, H. S., Schinner, S. et Ansurudeen, I. (2008) 'New mechanisms to control aldosterone synthesis', *Horm Metab Res*, 40(7), 435-41.
- Willenberg, H. S., Späth, M., Maser-Gluth, C., Engers, R., Anlauf, M., Dekomien, G., Schott, M., Schinner, S., Cupisti, K. et Scherbaum, W. A. (2010) 'Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism', *Hypertens Res*, 33(5), 467-72.
- Willenberg, H. S., Stratakis, C. A., Marx, C., Ehrhart-Bornstein, M., Chrousos, G. P. et Bornstein, S. R. (1998) 'Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome', *N Engl J Med*, 339(1), 27-31.
- Yamada, Y., Omura, M., Sasano, H., Kadota, Y., Nishikawa, T. et Sekihara, H. (2004) 'Cortisol over expression from right adrenal gland coincided with aldosterone oversecretion from both sides of adrenal gland found in a case of double right adrenal tumor', *Clinical Endocrinology (Hormone to Rinsho)*, (52), 141-50.
- Yamakita, N., Murai, T., Miyamoto, K., Matsunami, H., Ikeda, T., Sasano, H., Mune, T. et Yasuda, K. (2002) 'Variant of pre-clinical Cushing's syndrome: hypertension and hypokalemia associated with normoreninemic normoaldosteronism', *Hypertens Res*, 25(4), 623-30.

Yokota, K., Ogura, T., Kishida, M., Suzuki, J., Otsuka, F., Mimura, Y., Oishi, T., Hirata, M., Tobe, K. et Makino, H. (2001) 'Japanese family with glucocorticoid-remediable aldosteronism diagnosed by long-polymerase chain reaction', *Hypertens Res*, 24(5), 589-94.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------------|---|----------------|--|
| 11-DOC | 11-Desoxycorticosteron | B | Corticosteron |
| 11-DOF | 11-Desoxycortisol | BMI | Body-Mass-Index |
| 17-OH- | 17-Hydroxy- | | <u>Körpergewicht(kg)</u> |
| 18-OH- | 18-Hydroxy | | <u>Körpergröße²(m)</u> |
| A | Aldosteronkonzentration | BSA | Bovines Serum-Albumin |
| A18G | Aldosteron-18- Glucuronid | cAMP | Zyklisches Adenosin- Monophosphat |
| A/CPA | Aldosteron- und Cortisol- kosezernierendes Adenom | CPA | Cortisol produzierendes Adenom |
| A/CPAs | Aldosteron- und Cortisol- kosezernierende Adenome | CPAs | Cortisol produzierende Adenome |
| ACE | Angiotensin Converting Enzym | CRH | Corticotropin-Releasing- Hormon/ Corticoliberin |
| ACTH | Corticotropin | CS | Cushing Syndrom |
| ADH | Anti-diuretisches Hormon | CSA | Catalyzed-Signal- Ampflikations-Methode |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol | CT | Computertomogramm |
| AK | Antikörper (Singular) | CYP | Cytochrom-P450 |
| AKs | Antikörper (Plural) | CYP11A1 | Cholesterol-side-chain- Cleavage |
| APA | Aldosteron produzierendes Adenom | CYP11B1 | 11 β -Hydroxylase |
| APAs | Aldosteron produzierende Adenome | CYP11B2 | Aldosteronsynthase |
| APS | Ammoniumpersulfat | CYP17A1 | 17 α -Hydroxylase |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser | CYP21A2 | 21-Hydroxylase |
| ARQ | Aldosteron-Renin- Quotient | DHEA | Dehydroepiandrosten- dion |
| AT₁-R | Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 | DHEA-S | Dehydroepiandrosten- dionsulfat |
| AV | Nebennierenvene | DHEA-ST | Dehydroepiandrosten- dionsulfotransferase |
| AVS | Nebennierenvenen- katheterisierung | DST | Dexamethason- Suppressionstest |
| | | F | Cortisol |
| | | FHA | Familiärer |

ABKÜRZUNGEN

| | | | |
|--------------------------|--|----------------|--|
| | Hyperaldosteronismus | PRC | Plasmareninkonzentration |
| FST | Fludrocortison-Suppressionstest | PV | Periphere Vene |
| H⁺-Ion | Wasserstoffion | R | gesundes Restgewebe |
| HPA-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse | RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| | | RNA | Ribonukleinsäure |
| HRP | Meerrettich-(horseradish) Peroxidase | RR | arterieller Blutdruck |
| | | RT-PCR | Real-time Polymerasekettenreaktion |
| HSD3B2 | 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Typ 2) | SDS | Lauryl sulfat sodium salt |
| | | SF-1 | Steroidogener Faktor 1 |
| ISH | <i>in-situ</i> Hybridisierung | SN | Seriennummer |
| kIZ | Klarzellen | StAR | steroidogenic acute regulatory protein |
| koZ | Kompaktzellen | | $\frac{\text{Natrium}_{\text{Serum}}}{\text{Natrium}_{\text{Urin}}}$ |
| LSAB | Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode | SUSPPUP | $\frac{(\text{Kalium}_{\text{Serum}})^2}{\text{Kalium}_{\text{Urin}}}$ |
| MC2-R | Corticotropin-Rezeptor | T | tumoröses Gewebe |
| mRNA | Boten (messenger) RNA | TBS | Tris-gepuffertes Salz |
| MRT | Magnetresonanztomogramm | TBST | Tris-gepuffertes Salz mit 20 Tween |
| Na⁺ | Natrium | TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| NHN | normale humane Nebenniere | THA | Tetrahydroaldosteron |
| NNR | Nebennierenrinde | UKD | Universtitätsklinikum Düsseldorf |
| NT | nicht tumoröses Gewebe | | |
| PA | Primärer Hyperaldosteronismus | VCI | <i>Vena cava inferior</i> |
| | | zF | <i>Zona fasciculata</i> |
| PAC | Serumaldosteronkonzentration | zG | <i>Zona glomerulosa</i> |
| | | zR | <i>Zona reticularis</i> |
| PBS | Phosphat gepufferte Salz-Lösung | | |
| PCR | Polymerasekettenreaktion | | |
| POMC | Proopiomelanocortin | | |

8. Eidesstattliche Versicherung

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

11.02.2013, Martin Richard Späth