

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie

Ärztlicher Leiter: Univ. -Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Klinische und immunhistochemische Charakterisierung steroidogener Enzyme
und Rezeptoren bei Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden
Nebennierenrinden-Karzinomen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Svetlana Korovkin

2015

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Willenberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Biesterfeld

meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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

**Klinische und immunhistochemische Charakterisierung steroidogener Enzyme
und Rezeptoren bei Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden
Nebennierenrinden-Karzinomen**

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Anatomie der Nebennieren	1
1.2 Steroidbiosynthese	2
1.3 Autonome Steroidbiosynthese	3
1.4 Tumore der Nebennierenrinde	6
1.5 Hypothese und Zielsetzung	7
2. Patienten, Material und Methoden	9
2.1 Patienten und Methoden	9
2.1.1 Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf	9
2.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests	9
2.1.3 Patienten, identifiziert über MEDLINE/PubMed (NLM, NIH, USA)	10
2.1.4 Immunhistochemie	10
2.1.4.1 Gewebeaufbereitung	10
2.1.4.2 Antigendemaskierung	11
2.1.4.3 Avidin-/Biotin-Block	11
2.1.4.4 Peroxidase-Block	11
2.1.4.5 Protein-Block	12
2.1.4.6 Primärantikörper und Negativkontrolle	12
2.1.4.7 Primärantikörper	12
2.1.4.8 Detektionssysteme/ Sekundärantikörper	13
2.1.4.9 Färbung	13
2.1.4.10 Nachbehandlung	14
2.2 Material	14
2.2.1 Gewebe	14
2.2.2 Geräte und Chemikalien	14
3. Ergebnisse	17
3.1 Patienten-Screening	17
3.2 Fallidentifizierung über MEDLINE/PubMed (NLM, NIH, USA)	17
3.3 Immunhistochemie	20
4. Diskussion	27

5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis	34
7. Abkürzungsverzeichnis	A
8. Eidesstattliche Versicherung	C

1. Einleitung

1.1 Anatomie der Nebennieren

Die Nebenniere ist ein endokrines Organ, das funktionell zwei endokrine Gewebe unterschiedlicher embryologischer Herkunft vereint.

Das Nebennierenmark stammt im Unterschied zur mesodermalen Herkunft der Rinde von der Neuralleiste ab [Rosol *et al.*, Toxicol Pathol. 2001]. Die Zellen der *Medulla*, als chromaffine Zellen bezeichnet, bilden aus L-Tyrosin die Hormone Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, die bedarfsgerecht ins Blut sezerniert werden.

Die Entwicklung der Nebennierenrinde beginnt in der vierten Schwangerschaftswoche infolge einer epithelialen Verbreiterung zwischen der Urogenitalleiste und dem dorsalen Mesenterium [Hanley *et al.*, Mol Endocrinol. 2001]. Die hier entstehenden Zellen kommen am kranialen Pol des Mesonephros zu liegen und bilden in der achten Schwangerschaftswoche die Anlage zur Organentwicklung.

Aus diesem Gewebe, der definitiven Zone, entwickeln sich die steroidhormonproduzierenden Zellen des adulten *Cortex* [Hammer *et al.*, Endocrinology 2005].

Die Entwicklung der fetalen Nebennierenrinde des Menschen und der hohen Primaten unterscheidet sich von anderen Spezies durch die Anlage der überproportional großen, Dehydroepiandrosteron/-sulfat (DHEA(S))-produzierenden fetalen Zone [Hanley *et al.*, Mol Endocrinol. 2001]. Neben DHEA, das von der Plazenta zu östrogenen Steroiden umgewandelt wird, sezerniert der fetale *Cortex* weitere, zur normalen Entwicklung des Fötus essentielle Hormone. Nach der Geburt kommt es zur Rückbildung der fetalen Zone sowie zum Umbau der definitiven Zone und Strukturierung des *Cortex* in drei funktionell verschiedene Bereiche [Rosol *et al.*, Toxicol Pathol. 2001]. Die äußere Zone, *Zona glomerulosa*, ist aus bogenförmig angeordneten Zellen aufgebaut und produziert neben Corticosteron das Aldosteron, das in Folge einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) die renale Natriumresorption und Kaliumausscheidung kontrolliert. Die mittlere *Zona fasciculata* umfasst ca. 70% der Nebennierenrinde und ist aus langgestreckt angeordneten Zellreihen aufgebaut, die von prominenten Kapillaren umgeben sind. Die Zellen der *Zona fasciculata* weisen zahlreiche Spongiozyten auf und produzieren als „Endstrecke“ der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse vor allem das Gluko- und Mineralkortikoid Cortisol [Rosol *et al.*, Toxicol Pathol. 2001]. Die innen gelegene *Zona reticularis* wird durch netzförmig angeordnete, kleine vielgestaltige Zellen gebildet und produziert neben Glukokortikoiden die Vorstufen androgener und östrogenen Steroide.

1.2 Steroidbiosynthese

Kortikosteroide sind kleine, lipophile Moleküle, die aus Cholesterol synthetisiert werden. Der Transport von Cholesterol in die innere Mitochondrien-Membran wird durch das *Steroidogenic-acute regulatory protein* (StAR) gewährleistet. Die Steroidhormonbiosynthese wird hauptsächlich über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, die über eine Feedback-Schleife die Cortisol- und Corticosteronproduktion kontrolliert, und durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) hinsichtlich der Aldosteronsynthese reguliert.

Der Hypothalamus steuert über die Produktion des Corticotropin-releasing-Hormons (CRH) und des Vasopressins (ADH) die Synthese und Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH) durch die Hypophyse. ACTH ist ein Peptidhormon, das aus der Vorstufe Proopiomelanocortin (POMC) neben Lipotropin und MSH durch die limitierte Proteolyse in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird und dessen Freisetzung einem zirkadianen Rhythmus unterliegt. ACTH bindet an G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren der Nebennierenrinde (MC2R) und steuert über den Proteinkinase A/cAMP-Signaltransduktionsweg die Transkription und Translation des StAR-Proteins und von *Steroidogenic Factor-1* (SF-1). SF-1 reguliert die Transkription und somit die Aktivitäten adrener Zytochrome, wie der 17α -Hydroxylase (CYP17A) und 11β -Hydroxylase (CYP11B1).

Die Nebennierenrinde sezerniert Kortikosteroide entsprechend eines durch das zentrale Nervensystem regulierten zirkadianen Rhythmus. Darüber hinaus unterliegt die Freisetzung der Steroidhormone über die Hemmung der Sekretion von CRH sowie ADH und ACTH durch Cortisol und Corticosteron bei erhöhten Glukokortikoidkonzentrationen im Blut einem negativen Feedback. Andererseits können adäquate Mengen von Glukokortikoiden innerhalb von Minuten in Folge neuronaler Stimulation der Nebennierenrinde in die Blutbahn abgegeben werden. Somit fungieren Stressstimuli als primäre Trigger zur Erhöhung der Kortikosteroid-Freisetzung [Willenberg *et al.*, Fink G (Ed.) Encyclopedia of Stress 2007; Riedemann *et al.*, Mol Brain. 2010].

Die Synthese und Freisetzung von Aldosteron in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde wird unspezifisch durch ACTH, und spezifisch durch Kalium-Ionen sowie Angiotensin II kontrolliert [Aptel *et al.*, Mol Cell Endocrinol. 1996; Otani *et al.*, Acta Med. Okayama 2010; Willenberg *et al.*, Horm Metab Res. 2008]. Die Bildung von Angiotensin II erfolgt durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Bei einer niedrigen Natrium-Konzentration im Urin sowie infolge der durch das *Vas afferens* des juxtaglomerulären Apparates gemessenen Hypotension wird von den Myoepithelzellen im juxtaglomerulären Apparat der Niere Renin freigesetzt. Renin ist ein proteolytisches Enzym, das vom in

der Leber gebildeten Protein Angiotensinogen ein Peptid, das Angiotensin I, abspaltet. Dieses wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II bindet an Typ 1 Rezeptoren (AT2R) der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde und bewirkt so die Aktivierung der Kalzium-/Calmodulin- und Phospholipase C-abhängigen Signalwege [Willenberg *et al.*, Horm Metab Res. 2008]. Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 erhöht den intrazellulären Kalziumeinstrom und aktiviert die Transkriptionsfaktoren ATF-1, CRE-bindendes Protein (SREB) und Nuclear receptor-related 1/ nerve growth factor-induced Clone B (NURR-1/NGFIB). Diese binden an cAMP-response-element (CRE), sowie die für die Aldosteronsynthese (CYP11B2) spezifischen Ad-5 cis-Elemente und NGFIB response element (NBRE-1) [Otani *et al.*, Acta Med. Okayama 2010]. Aldosteronsynthese fungiert als Enzym der Aldosteronbiosynthese [Abb.1]. Aldosteron selbst wirkt über die Natriumretention und Expansion des extrazellulären Volumens wiederum suppressiv auf die Reninbildung [Willenberg *et al.*, Horm Metab Res. 2008].

1.3 autonome Steroidbiosynthese

Der chronische **adrenale Hyperkortisolismus** umfasst eine Gruppe von Symptomen, die aus dem hohen Cortisolspiegel im Blut und damit dem anhaltenden Überangebot an Glukokortikoiden im Gewebe resultieren. Klinisch kann der Hyperkortisolismus durch Umverteilung der Depofette mit Vollmondgesicht, Stiernacken und Stammfettsucht in Erscheinung treten. Typisch sind neben einer Osteoporose auch *Striae rubrae* und Atrophie der Haut sowie eine Insulinresistenz. Mehr als 80% der Patienten mit Cushing-Syndrom weisen einen Bluthochdruck auf [Sharma/Nieman, Endocrinol Metab Clin North Am. 2011]. Aufgrund der mangelnden Spezifität der Symptome wird in den Leitlinien der *Endocrine Society* neben der umfangreichen Anamnese, einschließlich einer Medikamentengabe, empfohlen, auch körperliche Untersuchungsbefunde für die Selektion labordiagnostisch zu testender Parameter bei den betroffenen Patienten einzubeziehen. Dabei sind unter anderem eine Kombination oben genannter Symptome bei Patienten im jungen Alter und das Auftreten von adrenalen Inzidentalomen als Screening-Kriterien zu nennen [Nieman *et. al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2008]. Die Diagnose des Hyperkortisolismus kann durch die Bestimmung des freien Cortisols im 24 h-Urin und den Dexamethason-Hemmtest gesichert werden [Nieman *et. al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2008]. Charakteristisch für einen adrenalen Hyperkortisolismus ist das relativ niedrige ACTH.

Erstmals ausführlich von Jerome Conn beschrieben, ist der **primäre Hyperaldosteronismus** (PA) eine der häufigsten Ursachen der arteriellen Hypertonie [Rossi *et al.*, J Am Coll Cardiol. 2006]. Weiterhin

wurde bei Patienten mit PA, unabhängig vom Grad der Hypertonie, wesentlich häufiger das Auftreten von Schlaganfällen, Myokardinfarkten und Vorhofflimmern beobachtet als beim vergleichbaren Patientenkollektiv mit einer essentiellen Hypertonie [Milliez *et al.*, J Am Coll Cardiol. 2005]. Die adäquate Diagnostik des PA ist daher von wesentlicher Bedeutung für das therapeutische Vorgehen sowie präventive Maßnahmen im Hinblick auf das Auftreten der genannten Komplikationen [Rayner, J Clin Pathol. 2008; Milliez *et al.*, J Am Coll Cardiol. 2005]. Der PA ist durch einen renalen Kaliumverlust (evtl. mit Hypokaliämie), eine arterielle Hypertonie und eine inadäquat hohe Aldosteronkonzentration im Vergleich zu einem gegebenen Renin-Wert (erhöhter Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ)) charakterisiert. Die diagnostischen Strategien beschäftigen sich mit dem Nachweis eines vom Reninspiegel unabhängigen Aldosteronexzesses und der fehlenden Supprimierbarkeit der Aldosteronsekretion [Willenberg *et al.*, DMW 2012].

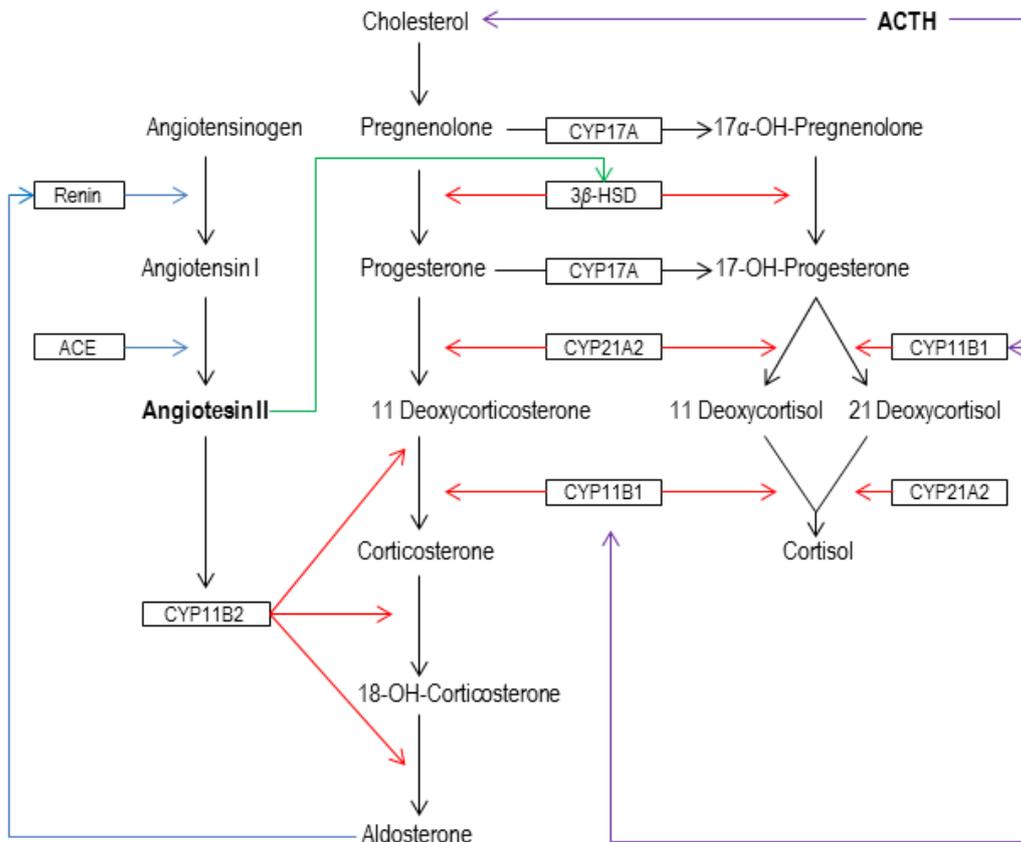


Abb. 1

Schematische Darstellung der Steroidhormonbiosynthese der Nebennierenrinde. Sowohl ACTH als auch Angiotensin II üben Einfluss auf die Steroidhormonbiosynthese aus, wobei durch ACTH präferentiell die Biosynthese der Glukokortikoide und durch Angiotensin II die Bildung von Aldosteron reguliert wird.

Im ersten Schritt der Steroidhormonbiosynthese entsteht infolge der Hydroxylierung des Cholesterols das Pregnenolon.

Im Rahmen der Cortisolbiosynthese wird das Pregnenolon zu 17 α -OH-Pregnenolon umgebaut, anschließend erfolgt unter Einsatz von 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase die Umwandlung von 17 α -OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron. Das 17-OH-Progesteron kann einerseits durch die Steroid-21-Hydroxylase zu 11-Deoxycortisol, andererseits durch das Enzym 11 β -Hydroxylase zu 21-Deoxycortisol hydroxyliert werden. Im letzten Syntheseschritt wird das 21-Deoxycortisol durch die Steroid-21-Hydroxylase zu Cortisol umgewandelt, während die 11 β -Hydroxylase das 11-Deoxycortisol zu Cortisol hydroxyliert.

Im Rahmen der Aldosteronbiosynthese erfolgt unter Einsatz von 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron, daraufhin hydroxyliert die Steroid-21-Hydroxylase Progesteron zu 11-Deoxycorticosteron. Die anschließende Umwandlung von 11-Deoxycorticosteron zu Corticosteron erfolgt unter Einsatz von 11 β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase. Abschließend reguliert die Aldosteronsynthase die Bildung von 18-OH-Corticosterone und deren Umbau zu Aldosteron.

Abk.: CYP17A... 17 α -Hydroxylase, 3 β -HSD... 3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase, CYP21A2... Steroid-21-Hydroxylase, CYP11B1... 11 β -Hydroxylase, CYP11B2... Aldosteronsynthase, 17-OH-Progesterone... 17-Hydroxyprogesteron, 17 α -OH-Pregnenolone... 17 α -Hydroxypregnenolon, ACTH... Adrenocorticotropin, ACE... Angiotensin-konvertierende Enzym.

1.4 Tumore der Nebennierenrinde

Die häufigste Ursache eines adrenalen Hormonexzesses ist das Vorliegen eines Nebennierenrindenadenoms (Willenberg *et al.*, Internist 2007). Während ein adrenaler Glukokortikoidexzess hauptsächlich auf einen Nebennierenrindentumor zurückzuführen ist (Willenberg *et al.*, Internist 2007), kann der primäre Hyperaldosteronismus die Folge verschiedener Nebennierenerkrankungen sein. Neben dem idiopathischen, bilateralen und unilateralen Hyperaldosteronismus (IHA) aufgrund einer Hyperplasie der *Zona glomerulosa* und familiärer Formen des Hyperaldosteronismus sind Aldosteron-produzierende Adenome (APA) eine der häufigsten Ursachen des primären Hyperaldosteronismus (PA) [Rayner, J Clin Pathol. 2008; Stowasser, J Clin Endocrinol Metab. 2009; Gordon *et al.*, Clin Exp Pharmacol Physiol. 1991; Geller *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2008]. Histopathologisch imponiert das APA als homogener, klarzelliger Tumor [Onoda *et al.*, Endocr J. 2009]. Desweiteren erschienen in der Literatur Berichte über einige Fälle von Cortisol-cosezernierenden APA (A/CPA) [Guthrie *et al.*, Am J Med. 1979; Komija *et al.*, Am J Med. 1979; Allan *et al.*, Clin Endocrinol. 2000; Nagae *et al.*, Jpn J Med. 1991; Adachi *et al.*, Intern Med. 2003; Suzuki *et al.*, Hypertens Res. 2007, Willenberg *et al.*, Hypertens Res. 2010]. Die Klassifizierung der Nebennierenadenome erfolgt üblicherweise anhand der klinischen Erscheinungsbilder und der endokrinologischen Laborparameter.

Karzinome der Nebennierenrinde (ACC) sind sehr seltene Tumore mit einer Inzidenz von 2/Mio./Jahr, wobei der ACC- Anteil an allen auftretenden Karzinomen 0,023% beträgt [Slee *et al.*, Cancer 1983]. Die Prognose der ACCs ist schlecht. Die Fünfjahresüberlebensrate der Patienten, die einer medizinischen Behandlung unterzogen wurden, beläuft sich auf etwa 25% bis 43% [Brennan MF, CA 1987]. Eine Deutsche Arbeitsgruppe verzeichnete in einer Studie mit 416 Patienten, die zwischen 1986 und 2007 die Erstdiagnose eines ACCs erhielten, eine erkrankungsspezifische Fünfjahresüberlebensrate für das I. Stadium nach ENSAT 2008 von 84%, 63% für das Stadium II, 51% für das Stadium III und 15% im IV. Stadium [Fassnacht *et al.*, for the German ACC Registry group and the ENSAT ACC working group. Cancer 2009; Johanssen *et al.*, Dtsch Arztebl Int. 2010].

Die Differenzierung der ACC von den Nebennierenrindenadenomen gestaltet sich oft als schwierig [Rossi GP *et al.*, J Am Coll Cardiol. 2006], da die Diagnosestellung der Analyse klinischer, hormoneller sowie histologischer Parameter bedarf [Willenberg *et al.*, Internist 2007, Johanssen *et al.*, Dtsch Arztebl Int. 2010]. Die Klassifizierung der Nebennierenrindentumore sowie deren Malignitätsnachweis sind jedoch von zentraler Bedeutung für die Prognose und Therapie der oben genannten Erkrankungen [Willenberg *et al.*, Internist 2007]. Als Grundlage der histologischen Differenzierung wurden

histopathologische Kriterien von Weiss etabliert [Weiss, Am J Surg Pathol. 1984]. 2002 verifizierte Lucon den Weiss Score als prognostischen Faktor für Nebennierentumore [Lucon *et al.*, Rev Hosp Clin Fac Med. S. Paulo 2002]. Darüber hinaus schlug Aubert [Aubert *et al.*, Am J Surg Pathol. 2002] eine Vereinfachung des Systems vor, wobei nur noch 5 der 9 von Weiss eingeführten histologischen Kriterien zur Charakterisierung herangezogen wurden, der Score für den Malignitätsnachweis jedoch mit dem Weiss-Score stark korrelierte.

Anhand der endokrinen Aktivität können ACC in „funktionelle“ und „nichtfunktionelle“ Tumore klassifiziert werden. Hormoninaktive ACC treten häufig durch unspezifische abdominelle Beschwerden oder als Inzidentalome in Erscheinung [Johansen *et al.*, Urologie 2008]. Funktionelle Neoplasien der Nebennierenrinde sind dagegen durch das alleinige oder parallele Auftreten eines Cushing-Syndroms, eines Conn-Syndroms, eines Androgen- oder Östrogenexzesses oder eines Exzesses von Steroidhormonvorstufen ohne eindeutige endokrine Begleitsymptomatik gekennzeichnet [Slee *et al.*, Cancer 1983]. Hierbei stellen der Hyperkortisolismus und die Virilisierung die häufigsten Erscheinungsbilder funktioneller ACC dar [Hutter *et al.*, Am J Med. 1966].

Seltener hingegen sind **Aldosteron- und Cortisol-koszernierende Nebennierenrindenzinome (A/C-ACC)**. Diese zeichnen sich durch das Auftreten eines Mineralokortikoidhypertonus mit Hypokaliämie und inadäquat hohem Aldosteron bei gleichzeitig supprimiertem Renin sowie vorliegendem Hyperkortisolismus aus.

Als Standard in der Therapie der Nebennierenkarzinome gilt die Adrenalektomie mit dem Ziel einer kompletten Tumorsektion. Weiterhin stehen Chemotherapie, medikamentöse Therapie mit Mitotane sowie die Strahlentherapie als Behandlungsoptionen in Abhängigkeit vom Hormonprofil, dem Tumorstadium sowie der Operabilität und dem Rezidivrisiko der Neoplasien zur Verfügung [Johansen *et al.*, Urologie 2008].

1.5 Hypothese und Zielsetzung

Interessanterweise, hat auch unsere Arbeitsgruppe mehrfach Patienten mit primären Hyperaldosteronismus und Cortisolexzess charakterisiert. Diese im Rahmen einer anderen Dissertation erhobenen Daten [Willenberg *et al.*, Hypertens Res. 2010] decken sich mit den Beobachtungen weiterer Arbeitsgruppen [Feller *et al.*, Clin Cancer Res. 1997; Späth *et al.*, Eur J Endocrinol. 2011], sodass hier ein allgemeines Prinzip der adrenalen Tumorgenese vorliegen könnte. Neben dem Cortisolexzess und einem hohen 18-Hydroxycortisolspiegel wurde auch ein größeres Volumen der A/CPA im Vergleich zu

APA, eine niedrigere Expression von Angiotensin II Typ 1-Rezeptor und Melanocorticotropin 2 Rezeptor sowie eine ähnliche Immunreaktivität der 17 α - Hydroxylase beschrieben [Willenberg *et al.*, Hypertens Res. 2010, Späth *et al.*, Eur J Endocrinol. 2011]. Makroskopisch imponieren die A/CPA ähnlich wie APA als kompakte, homogene Tumore mit gelblicher Schnittfläche, weisen jedoch histologisch sowohl klare, als auch kleine, verdichtete Zellen auf [Hogan *et al.*, Am J Med. 1977].

Aldosteron-produzierende Nebennierenrindenzinome werden als Rarität bezeichnet [Sakai *et al.*, Int J Urol. 1997; Mansmann *et al.*, Endocr Rev. 2004]. Da sich bei systematischer Durchsicht eigener Patientendaten und der Literatur eine Kosekretion von Aldosteron und Cortisol häufiger finden lässt als ein Familiärer Hyperaldosteronismus Typ 1, dies aber in den Systematiken im Gegensatz zur letztgenannten Erkrankung bisher nie Erwähnung fand, stellten wir folgende Hypothesen auf:

1. Bei Aldosteron-produzierenden Nebennierenrindenzinomen findet sich in der Mehrzahl eine autonome Cortisolproduktion.
2. Bei Cortisol-produzierenden Nebennierenrindenzinomen findet sich häufig eine autonome Aldosteronproduktion.

Um die Hypothesen zu untersuchen, verfolgten wir folgende Fragestellungen:

1. Wie oft finden sich in unserem eigenen Krankengut Hinweise auf eine autonome Sekretion von sowohl Cortisol als auch Aldosteron?
2. Wie oft wurde systematisch mit adäquaten Methoden nach diesen beiden Hormonexzeßsyndromen gefahndet?
3. Können die Ergebnisse (immun-)histologischer Untersuchungen der Enzym- und Rezeptorexpression auf Proteinebene in Geweben von Patienten mit Aldosteron- und Cortisol-kosezierenden Nebennierenrindenzinomen (A/C-ACC) die klinisch und labordiagnostisch erhobenen Befunde stützen?
4. Wie stellen sich unsere eigenen Daten im Vergleich zu publizierten Studien dar?

2. Patienten, Material und Methoden:

2.1 Patienten und Methoden:

2.1.1 Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf

Im ersten Schritt erfolgte eine systematische Charakterisierung der vorhandenen Patientendaten von Personen, die in den letzten 15 Jahren mit der Diagnose eines Nebennierenrindenzarzinoms am UKD vorstellig waren. Als Grundlage für die Datenakquise dienten archivierte Patienteninformationen.

Aus den vorliegenden Unterlagen wurden klinische Parameter und endokrine Testergebnisse erhoben, um anhand dieser Informationen Aldosteron-Cortisol-kosezierende Nebennierenrindenzarzinome zu klassifizieren.

Desweiteren wurden Alter und Geschlecht der Patienten, Größe und Metastasierung des Tumors sowie der Progression der Erkrankung berücksichtigt.

2.1.2 Hormondiagnostik und endokrine Funktionstests

Die A/C-ACC wurden durch das Vorliegen eines Hyperkortisolismus und Hyperaldosteronismus definiert.

- Bei der Untersuchung auf das Vorliegen eines **Hyperkortisolismus** wurden folgende Parameter in die Analyse einbezogen:
 - Konzentration des Serum-Cortisols
 - freies Cortisol im 24h-Urin
 - 17-Hydroxycorticosteroid (OHCS) Urinausscheidung
 - Plasma-Adrenocorticotropin (ACTH)-Spiegel
 - Suppression des Cortisols im Dexamethason-Hemmtest
 - Symptomatik/klinische Stigmata eines Cushing-Syndroms.
- Auf das Vorliegen eines **primären Aldosteronismus** wurde unter Berücksichtigung folgender Parameter hin untersucht:
 - Auftreten einer Hypokaliämie
 - Renin-Plasmaspiegel
 - Konzentration von Aldosteron im Serum bzw. Aldosteron(metaboliten) im Urin
 - Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ).

2.1.3 Patienten, identifiziert über MEDLINE/PubMed (NLM, NIH, USA)

Im zweiten Schritt wurden die in der Fachliteratur beschriebenen Fälle von ACC (1955 bis 2009) mit identischem Vorgehen untersucht. Weiterhin wurden die Fallberichte hinsichtlich der Durchführung von Untersuchungen zur immunhistochemischen Charakterisierung steroidogener Enzyme und Rezeptoren der Tumore überprüft.

Um vorhandene Berichte über A/C-ACC zu identifizieren, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Suche erfolgte mit Hilfe der internationalen Literaturliteraturdatenbank MEDLINE (Entrez PubMed, NLM, NIH, USA). Dabei wurden folgende Schlagwörter verwendet:

- *“adrenocortical carcinoma and hormone excess“*
- *“adrenal carcinoma and hormone excess“*
- *“adrenal carcinoma and primary aldosteronism“*
- *“adrenal carcinoma primary aldosteronism cushing“.*

Desweiteren wurden *“related articles“* und Referenzen von relevanten Artikeln durchsucht sowie bereits bekannte Artikel herangezogen.

2.1.4 Immunhistochemie

Das Tumorgewebe von den Nebennierenrindenzinomen, die anhand klinischer und endokriner Parameter als A/C-ACC klassifiziert werden konnten, sowie das Gewebe eines ACC und einer normalen humanen Nebenniere wurden einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen.

2.1.4.1 Gewebeaufbereitung

Die als Gewebeblöcke vorliegenden Tumorpräparate, im 4-prozentigen Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, wurden in Gewebeschichten von 5 bis 6 μm geschnitten. Im nächsten Schritt erfolgte das Aufziehen der Paraffinschnitte auf Objektträger und das Anbacken dieser im Heizofen (2 Stunden bei 60°C). Zum Entparaffinieren der Schnitte wurde Xylol (2×10 min) verwendet. Das Dehydrieren erfolgte in einer absteigenden Alkohol-Verdünnungsreihe (100%, 100%, 90%, 70%, jeweils für 5 min). Anschließend wurden die Schnitte 3 min. im lauwarmen Wasser gespült und 5 min in einer TBST-Lösung gewaschen.

2.1.4.2 Antigendemaskierung

Das Fixieren des Tumorgewebes in einer Formalin-Lösung verursacht eine Quervernetzung der Gewebeproteine und beeinträchtigt dadurch die Immunreaktivität des Gewebes. Die Quervernetzung kann mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren teilweise wieder gelöst werden.

- A) Bei den Gewebeschnitten, die mit den Antikörpern gegen 17- α -Hydroxylase, 11- β -Hydroxylase, Aldosteronsynthase oder StAR-Protein markiert wurden, erfolgte eine Spülung in einem Triton-Bad (5 min). Triton-X100 (*Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether*) wirkt als ungeladenes, neutrales Detergenz der Quervernetzung der Proteine entgegen.
- B) Für die immunhistochemische Färbung mit dem Luteinisierendes Hormon/Choriogonadotropin Rezeptor (LHCGR)-Antikörper und dem AT2R-Antikörper erfolgte die Antigendemaskierung nach der von den Herstellern empfohlenen Methode: Die Gewebeschnitte wurden in der *Target Retrieval Solution* (0,01 M Na-Citratpuffer, pH 6,0) bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt (2×7 min), anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und im TBST-Bad gewaschen. Dabei konnten die Quervernetzungen von Proteinen physikalisch aufgebrochen werden.

2.1.4.3 Avidin-/Biotin-Block

Zum immunhistochemischen Nachweis vom Angiotensin II Typ 1-Rezeptor wird vom Antikörperhersteller das Avidin-Biotin-Verfahren empfohlen. Mit diesem Verfahren wird die unspezifische Färbung des möglicherweise im Gewebe vorliegenden endogenen Biotins unterdrückt, um auf diese Weise falsch positive Ergebnisse bei der Auswertung zu vermeiden. Durch die Inkubation mit unkonjugiertem Avidin (10 min) wird das endogene Biotin blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit unkonjugiertem Biotin (10 min). Diese dient der Blockierung der Biotin Bindungs-Restaktivität des Avidin Moleküls. Nach der Behandlung wurden die Gewebeproben im TBST-Bad gewaschen (5min).

2.1.4.4 Peroxidase-Block

Das Vorhandensein der endogenen Peroxidase in den verwendeten Gewebeschnitten könnte unter Anwendung der LSAB-Methode ebenfalls falsch positive Ergebnisse bzw. unspezifische Hintergrundfärbung erzeugen, da der immunhistochemische Nachweis unter Verwendung von peroxidasekonjugierten Streptavidinmolekülen erfolgt. Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Gewebeproben mit *Dual Endogenous Enzyme Block* (DAKO) 10 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeproben im jeweils frischen TBST-Bad gespült (2×5 min).

untersuchter Parameter	verwendeter Primärantikörper	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung
ACTH-Rezeptor	MC2R-Ak	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz sc13107	1:200
17 α - Hydroxylase	CYP17A-Ak	polyklonal	Kaninchen	Abcam ab64886	1:200
Luteinisierendes Hormon	LHCGR-Ak	polyklonal	Kaninchen	Acris Antibodies SP4393P	1:200
Angiotensin II Typ 1-Rezeptor	AT2R-Ak	monoklonal	Maus	Abcam ab9391	1:200
21-Hydroxylase	CYP21A2-Ak	polyklonal	Kaninchen	Sigma – Aldrich SAB1300942	1:200
11 β - Hydroxylase	CYP11B1-Ak	polyklonal	Kaninchen	Abcam ab71561	1:200
Aldosteron- Synthase	CYP11B2-Ak	polyklonal	Ziege	Santa Cruz sc47655	1:200
StAR-Protein	StAR-Protein-Ak	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz sc25806	1:200

Tabelle 1

Übersicht der untersuchten Parameter und der verwendeten Primärantikörper.

Abk.: ACTH... Adrenocorticotropin, MC2R-Ak... Melanocortin 2 (ACTH) Rezeptor Antikörper, StAR... Steroidogenic-acute regulatory protein.

2.1.4.5 Protein-Block

Desweiteren kann eine unspezifische Proteinbindung zu falsch positiven Ergebnissen führen. Diese wird durch eine 30 minütige Inkubation mit 5%igem Schweineserum (in TBST) zur Bindung unspezifisch reagierender Proteine verhindert.

2.1.4.6 Primärantikörper und Negativkontrolle

Das überschüssige Schweineserum wurde anschließend von den Objektträgern abgetupft und das Gewebe mit jeweiligem Primärantikörper (in *Antibody Diluent* verdünnt) über Nacht inkubiert. Als Negativkontrollreagenz fungierte das 5%ige Schweineserum. Anschließend erfolgte eine Spülung im TBST-Bad (2×5 min).

2.1.4.7 Primärantikörper

Die immunhistochemische Analyse erfolgte unter Anwendung spezifischer Antikörper (siehe Tabelle 1). Zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration erfolgte die nachfolgende Färbung unter Einsatz

der Antikörper jeweils in Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:200 bzw. 1:500. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mikroskopiert und die optimale Antikörperkonzentration durch Beurteilung der Färbintensität und -qualität unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbung für die unterschiedlichen angewendeten Antikörper separat bestimmt. Die Auswahl der Antikörper wurde zur Bestätigung der anhand klinischer und Labor-Parameter sowie der hormonelle Testergebnisse klassifizierten Tumore getroffen.

2.1.4.8 Detektionssysteme/ Sekundäantikörper

Zur Exposition der Gewebeschnitte mit dem Sekundäantikörper wurden 2 Detektionssysteme verwendet. Die mit Primäantikörper inkubierten Gewebeschnitte wurden unter Einsatz von *EnVision+ System-HRP-Labelled Polymer* (DAKO) oder dem *Biotinylated Link Universal* (DAKO) als Substratsystem der immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte mikroskopiert und die Qualität der Färbung mit dem jeweiligen Detektionssystem beurteilt sowie für jedes der verwendeten Antikörper das bestmögliche Substratsystem ermittelt.

- A) Die mit Kaninchen-Antikörpern konfrontierten inkubierten Gewebeproben wurden 60 min lang mit *EnVision+ System-HRP Labelled Polymer* (Peroxidasemarkiertes Polymer konjugiert an Ziegen anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer) inkubiert und wiederholt im TBST-Bad gewaschen (2×5 min).
- B) Die mit Maus- oder Ziegen-Antikörpern konfrontierten Gewebeproben wurden 30 min mit *Biotinylated Link universal* (biotinylierte Anti-Kaninchen-, Anti-Maus- und Anti-Ziege- Immunglobuline in phosphatgepufferter Kochsalzlösung) inkubiert, anschließend im TBST-Bad gespült (2×5 min), 30 min mit Streptavidin HRP (an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin) inkubiert und wiederholt mit TBST gewaschen (2×5 min).

2.1.4.9 Färbung

Die immunhistochemischen Färbung der Gewebeproben wurde in Anlehnung an die *Labelled Streptavidin-Biotin-Methode* (LSAB) bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Farbreagenz wurde eine gebrauchsfertige Substratchromogenlösung eingesetzt, die das *3-amino-9-Ethylkarbazol* (AEC) als Chromogen enthielt. Nach einer 10 minütigen Inkubation trat die gewünschte Farbintensität ein, wobei das Zielantigen eine rote Färbung am Bindungsort des Antikörpers erzeugte. Anschließend wurden die Gewebeproben mit destilliertem Wasser gespült.

Mit einer 2 minütigen Gegenfärbung im Hämatoxylin-Bad wurde die Färbung abgeschlossen.

2.1.4.10 Nachbehandlung

Die Objektträger wurden im destillierten Wasser gewaschen, in *Mounting Medium* eingebettet und mit Deckgläsern versehen.

Anschließend konnten die immunhistochemisch gefärbten Schnitte mikroskopiert und unter Anwendung des Computerprogramms AxioVision 4.72 bei einer sich automatisch einstellenden Belichtungszeit fotografiert werden.

2.2 Material:

2.2.1 Gewebe:

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte am Gewebe von neun A/C-ACC, einem Cortisol-produzierenden ACC sowie einer normalen humanen Nebenniere. Das verwendete Gewebe wurde im Rahmen der operativen Entfernung von Nebennierenrindentumoren durch Adrenalektomie gewonnen (Nebennierenkarzinomregister, Ethikvotum: Conn-Register Nr.: 3027, 1.02.2008, PD Dr. med. Holger S. Willenberg (Johanssen *et al.*, Dtsch Arztebl Int. 2010) und FIRM-ACT-Studie, Ethikvotum: Studien-Nr.: 2416, Prof. Dr. med. S. R. Bornstein, 15.07.2004 (Fassnacht *et al.*, N Engl J Med. 2012)).

Die vorliegenden Tumorpräparate wurden in Gewebeblöcke geschnitten, im 4-prozentigen Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.2.2 Geräte und Chemikalien:

Geräte:

Analysewaage	Mettler AE
Backofen	Memmert
Centrifuge	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Lichtmikroskop	Zeiss, Germany
Mikrotome Blades	Feather, Japan
Objektträger (24x50 mm, 24x32 mm, 18x18 mm)	Marienfel Laboratory Glassware, Deutschland
PH-Meter	WTW, Weilheim

Pipetten (verstellbar: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom	MICROM
Stoppuhr	Oregon scientific
Vortex Mixer	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Wasserbad	SAKURA

Chemikalien:

<i>AEC+ High Sensitivity</i>	DAKO, Hamburg
<i>Substrate Chromogen</i>	
<i>Antibody Diluent</i>	DAKO, Hamburg
<i>Biotin Blocking System</i>	DAKO, Hamburg
Destilliertes Wasser	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken Scheidt
<i>Dual Endogenous</i>	DAKO, Hamburg
<i>Enzyme Block</i>	
EnVision+ System- HRP	DAKO, Hamburg
<i>Labelled Polymer Anti-Rabbit</i>	
Ethanol	Merck, Darmstadt
<i>Faramount Aqueous</i>	DAKO, Hamburg
<i>Mounting Medium</i>	
Hämatoxylin Lösung (Gill II)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
<i>Biotinylated Link universal</i>	DAKO, Hamburg
LSAB+ System-HRP	
<i>Swineserum</i>	DAKO, Hamburg
Streptavidin HRP	DAKO, Hamburg
LSAB+ System-HRP	
<i>Target Retrieval Solution</i>	DAKO, Hamburg
TRIS	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich, München

Tween® 20	Sigma-Aldrich, München
SigmaUltra	
Xylol	Merck, Darmstadt

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

- *Tris- Buffered Saline Tween 20* (TBST-Puffer): 0,05 mol/l Tris-HCL, 0,15 mol/l NaCl, 0,1% Tween, PH 7,6
- Triton-Lösung: 0,5%iges TritonX100 in *Tris-Buffered Saline* (TBS)
- Ethanol-Lösung: C₂H₅OH jeweils nach der gewünschten Konzentration im destillierten H₂O
- Schweineserum-Lösung: normales Schweineserum 5%ig in TBST.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten-Screening

Aufgrund der Daten von Patienten, die mit Nebennierenrindenzarzinom (ACC) im UKD vorstellig waren, konnten anhand von klinischen und labordiagnostischen Parametern sowie endokrinen Testergebnissen 8 von 29 Tumoren als Aldosteron-Cortisol-kosezierend (A/C-ACC) klassifiziert werden. Die anderen 21 Patienten waren normokaliämisch und wiesen keinen Aldosteronexzess auf, so dass sie infolge des fehlenden Nachweises einer Kosekretion hauptsächlich als Cortisol-sezierende Nebennierenrindenzarzinome charakterisiert wurden.

Die Klassifikation der A/C-ACCs als Nebennierenrindenzarzinome erfolgte bei 6 von 8 Fällen anhand der Weiss-Kriterien [Weiss, Am J Surg Pathol. 1984], wobei der Weiss-Score zwischen 4 und 6 lag. In zwei Fällen lagen die Klassifikationsparameter nicht vor, so dass die Diagnosen aufgrund der Metastasierung, der Hormonsekretion sowie auf der Grundlage des histopathologischen Berichtes gestellt wurden.

Das Durchschnittsalter der von A/C-ACC betroffenen Patienten betrug bei der Diagnosestellung 54 Jahre, wobei 75% der Personen Frauen waren. Die Tumorgöße lag im Durchschnitt bei 100 mm (Tabelle 2).

Bei allen Patienten wurde auf das Vorliegen eines Aldosteronexzesses untersucht, eine Erfassung des Cortisol-exzesses erfolgte jedoch nur bei 87,5% der Fälle. Hierbei wurde bei allen untersuchten Patienten das Cushing-Syndrom beschrieben. Bei 85,7% der Fälle konnte ein Hyperkortisolismus mittels Dexamethason-Suppressionstest nachgewiesen werden.

Ein Hyperaldosteronismus wurde bei 62,5% der Fälle diagnostiziert. Die überwiegende Mehrzahl der Patienten (87,5%) wies eine arterielle Hypertonie auf.

Die Laborparameter und endokrinen Tests von Patienten mit Aldosteron-Cortisol-kosezierenden Nebennierenrindenzarzinomen wurden in der Tabelle 3 zusammengefasst.

3.2 Fallidentifizierungen über MEDLINE/PubMed

Als Ergebnis der Literaturrecherche konnten 25 publizierte Fälle als A/C-ACC charakterisiert werden. Dabei erfolgte die Klassifikation als ACC bei sieben Fällen anhand der Weiss-Kriterien [Weiss, Am J Surg Pathol. 1984], bei drei Fällen wurde nicht auf die histologischen Charakteristika des Tumors eingegangen, jedoch der Tumor aufgrund der Metastasierung als ACC definiert. Bei den restlichen 15

Fallberichten wurden die entsprechenden Parameter in die Klassifikation miteinbezogen (*Atypical mitoses, diffuse architecture, necrosis, invasion of tumor capsule* etc. [Weiss, Am J Surg Pathol. 1984]), jedoch nicht explizit auf Weiss-Kriterien verwiesen.

Eine immunhistochemische Charakterisierung steroidogener Enzyme und Rezeptoren der Tumore erfolgte in 2 der publizierten Fälle. Unter Anwendung der Avidin-Biotin Peroxidase Methode wurde von einer der Arbeitsgruppen eine positive Reaktion bei der Färbung mit den Antikörpern gegen Inhibin α , Synaptophysin, Vimentin sowie Protein Ki67 beobachtet, die immunhistochemische Untersuchung unter Verwendung der Antikörper gegen Pankreatin, Cytokeratin 7, Chromogranin und Protein p53 ergab ein negatives Ergebnis [Ali *et al.*, Endocr Pathol. 2007]. Eine weitere Arbeitsgruppe stellte in der immunhistochemischen Untersuchung des vorliegenden Tumorgewebes das Vorhandensein vom Protein Ki67, von der Cholesterin-Monooxygenase (P450SCC), der 3β -Hydroxysteroid-dehydrogenase, sowie der 17α -Hydroxylase, der Steroid-21-Hydroxylase und der 11β -Hydroxylase fest [Sone *et al.*, Endocrine 2009].

	<i>Eigene Patienten</i>	<i>Literatur</i>
Untersuchte Fälle [Anzahl]	8	25
Alter bei Erstdiagnose [Jahre]	54,0 \pm 15,4	44,3 \pm 19,6
Weibliches Geschlecht [%]	75,0	52,4
Tumorgröße [mm]	100 \pm 26	110 \pm 88
Cortisolexcess Screening [%]	87,5	91,7
Nachweistest erfolgt [%]	85,7	90,5
Cushing - Syndrom beschrieben [%]	87,5	83,3
Aldosteronexcess Screening [%]	100,0	100,0
Nachweistest erfolgt [%]	62,5	60,9
Arterieller Hypertonus [%]	87,5	100,0

Tabelle 2

Überblick der klinischen Daten und der stattgefundenen Untersuchungen zur Steroidhormonexzess-diagnostik von Patienten mit Aldosteron-Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenzinomen. Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie der gemessenen Tumorgröße.

Die von den üblichen Standardeinheiten abweichenden Werte wurden unabhängig von den verwendeten Assays unter Einsatz der Standardumrechnungskonstanten umgerechnet. Die Berechnung von Standardabweichungen und Mittelwerten erfolgte mit Microsoft Excel 2007.

In der Literatur wurden Patienten im Alter zwischen 3 und 79 Jahren beschrieben, davon waren 52,4% Frauen und mit einem Durchschnittsalter von 44 Jahren jünger als diejenigen Patienten, die in unserer Klinik mit A/C-ACC vorstellig waren. Bei einer mit unseren Patienten vergleichbaren Tumorgroße wurden alle Fälle auf Aldosteron- und 91,7% der Patienten auf Cortisolexzess untersucht. Im Hinblick auf den Hyperkortisolismus erfolgte der Nachweis bei 90,5% der Fälle durch Dexamethason-Suppressionstest, bei 83,3 % der Patienten wurde das Cushing-Syndrom klinisch beschrieben. Der Hyperaldosteronismus-Nachweis erfolgte bei 60,9% der Fälle, wobei 91,7% der Patienten hypokaliämisch waren und alle eine arterielle Hypertonie aufwiesen. Der Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ) sowie die endokrinen Laborparameter können der Tabelle 3 entnommen werden.

	<i>Eigene Patienten</i>	<i>Literatur</i>
Hypokaliämie [%]	87,5	91,7
Serum-Kalium [mmol/L]	3,3 ± 0,8	2,5 ± 0,9
Plasma-Aldosteron [ng/L]	381,2 ± 277,1	694,3 ± 504,3
Renin [ng/L]	2,3 ± 1,3	2,9 ± 5,2
ARQ [ng/L:ng/L]	611,1 ± 264,8	773,2 ± 912,1
ARQ abnormal [%]	62,5	100,0
Basalcortisol [µg/dL]	36,7 ± 13,7	16,9 ± 6,4
Freies Cortisol im Urin [µg/24h]	755	550
Cortisol nach Dexamethason-Suppression	28,4 ± 24,2	3,7 ± 0,6

Tabelle 3

Ergebnisse der Elektrolyt- und Hormonbestimmungen sowie der endokrinen Funktionstests zur Steroidhormonexzessdiagnostik von Patienten mit Aldosteron-Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenzinomen. Mittelwerte ± Standardabweichung von Serum-Kalium, Plasma-Aldosteron, Renin, dem Aldosteron-Renin-Quotienten, Basalcortisol und dem Cortisol nach Dexamethason-Suppression.

Die von den üblichen Standardeinheiten abweichenden Werte wurden unabhängig von den verwendeten Assays unter Einsatz der Standardumrechnungskonstanten umgerechnet. Die Berechnung von Standardabweichungen und Mittelwerten erfolgte mit Microsoft Excel 2003.

Abk.: ARQ... Aldosteron-Renin-Quotient.

Bei allen Patienten, die im UKD vorstellig waren, nahm die Erkrankung einen progredienten Verlauf. Bei 75% der Fälle konnten mit Hilfe bildgebender Verfahren Metastasen nachgewiesen werden.

In der Literatur wurden Rückfälle und Metastasen dagegen nur teilweise thematisiert. Bei stattgefundener Untersuchung wurden jedoch bei 80% der Patienten Rückfälle angegeben, bei 40% der Fälle wurden Metastasen beschrieben.

Alle durch uns identifizierten Patienten mit A/C-ACC wiesen mit Ausnahme eines Patienten, dessen Aldosteron-Renin-Quotient erhöht war, eine gesteigerte Aldosteron- oder Oxo-Steroid-Ausscheidung auf. Die 17-OHCS Urinkonzentration sowie das Plasma-ACTH wurden nur bei wenigen Fällen erfasst, wobei bei den in der Literatur beschriebenen Patienten die ACTH-Konzentration höher war.

Obwohl alle Patienten auf das Vorliegen eines Aldosteronexzesses untersucht wurden erfolgte der Nachweis des Hyperkortisolismus insgesamt konsequenter als der des Hyperaldosteronismus, trotz der neben der arteriellen Hypertonie vorherrschenden Hypokaliämie.

3.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der neun uns vorliegenden A/C-ACC, eines ACC ohne nachweisbare Hormonsekretion sowie einer normalen Nebenniere beschränkte sich auf die Anwendung von acht verschiedenen Antikörpern.

Aus der experimentellen Ermittlung der am besten geeigneten Primärantikörperkonzentration resultierte der Einsatz der jeweiligen Antikörper in einer Verdünnung von 1:200. Für die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte unter Verwendung von Kaninchen-Antikörpern konnten mit dem *EnVision+ System-HRP Labelled Polymer* als Sekundärantikörper qualitativ bessere Färbeergebnisse erzeugt werden. Für die Ziegen- und Maus-Antikörper eignet sich das Detektionssystem dagegen weniger, da das Färbeergebnis dieser unter Einsatz von *Biotinylated Link universal* und anschließender Inkubation mit Streptavidin HRP subjektiv deutlich besser ausfiel.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung wurden in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Der MC2-Rezeptor dient als Bindungsstelle für ACTH. Mithilfe des MC2R-Antikörpers konnte bei allen untersuchten Präparaten das Vorhandensein von ACTH-Rezeptoren anhand der charakteristischen Färbung nachgewiesen werden.

Alle immunhistochemisch untersuchten Gewebeproben haben den CYP21A2-Ak spezifisch gebunden und verfügten somit über die 21 α -Hydroxylase.

Ergebnisse

<i>Antikörper</i>	<i>MC2R</i>	<i>CYP17A</i>	<i>AT2R</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>CYP11B2</i>	<i>StAR</i>	<i>LHCGR</i>
Clon / Nr.	sc13107	ab64886	ab9391	sab1300942	ab71561	sc47655	sc25806	sp4393p
Spezies	rabbit	rabbit	mouse	rabbit	rabbit	goat	rabbit	rabbit
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	(+)	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	—	+	+	+	(+)	+
A/C-ACC	+	+	—	+	+	+	+	+
A/C-ACC	+	+	+	+	+	+	+	+
ACC	+	+	—	+	+	+	+	+
hNN	+	+	(+)	+	+	+	+	+

Tabelle 4

Übersicht der verwendeten Antikörper und der erzielten Ergebnisse.

Abk.: A/C-ACC... Aldosteron- und Cortisol-kosezierendes Nebennierenrindenzarzinom, ACC... Nebennierenrindenzarzinom, hNN... humane Nebenniere, MC2R... Melanocortin 2 Rezeptor, CYP17A... 17 α -Hydroxylase, AT2R... Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, CYP21A2... Steroid-21-Hydroxylase, CYP11B1... 11 β -Hydroxylase, CYP11B2... Aldosteronsynthase, StAR... *Steroidogenic-acute regulatory Protein*, LHCGR... Luteinisierendes Hormon Rezeptor, sc... Santa Cruz, ab... Abcam, sab... Sigma-Aldrich, sp... Acris *Antibodies*, *rabbit*... Kaninchen, *mouse*... Maus, *goat*... Ziege, +... positive Farbreaktion, (+)... schwach positive Farbreaktion, —... negative Farbreaktion.

Das Vorhandensein der Enzyme 11 β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase, 17 α -Hydroxylase sowie des Luteinisierenden Hormons (LHCGR) und des StAR-Proteins konnte unter Einsatz der entsprechenden Antikörper sowohl im A/C-ACC- als auch im ACC-Gewebe und der normalen Nebennierenrinde nachgewiesen werden.

In der immunhistochemischen Färbung der A/C-ACCs reagierten 7 Karzinome spezifisch mit dem AT2R -Antikörper, 2 Karzinome zeigten dagegen keine charakteristische Färbung. Die Untersuchung des ACC auf Vorhandensein des Angiotensin II Typ1 Rezeptors fiel ebenfalls negativ aus. Die normale Nebennierenrinde zeigte in nur wenigen isolierten Bereichen die charakteristische Färbung, so dass die Spezifität dieser trotz wiederholter Färbevorgänge nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Weiterhin ergab der Nachweis von der 17 α -Hydroxylase sowie dem StAR-Protein bei jeweils einem der A/C-ACC einen im Vergleich zum Kontrollpräparat schwachen Färbeergebnis. Dieses wurde in wiederholten Färbevorgängen verifiziert.

Die mit Schweineserum inkubierten Negativkontrollen zeigten erwartungsgemäß keine Farbreaktion. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung können den Abbildungen 1a bis 8a entnommen werden. In der Abbildung 8b ist ein A/C-ACC in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) dargestellt. Die Abbildung 5b wurde von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Publikation (Späth *et al.*, Eur J Endocrinol. 2011) veröffentlicht.

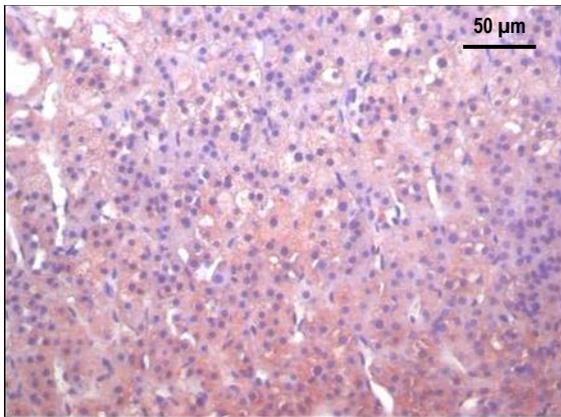


Abb. 1a CYP11B2, normale Nebenniere

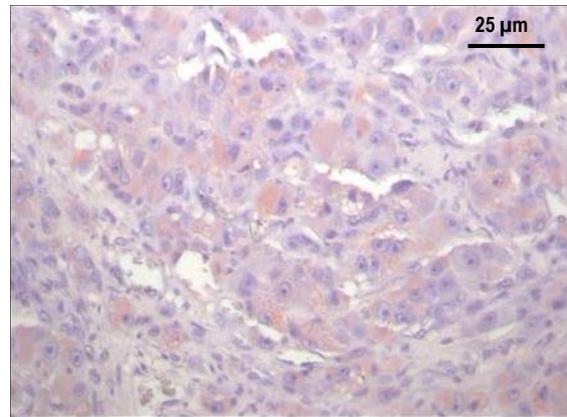


Abb. 1b CYP11B2, A/C-ACC

Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die Aldosteronsynthase einer normalen humanen Nebenniere links und eines Aldosteron- und Cortisol-kosezierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die Aldosteronsynthase enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt. Die Zellkerne erscheinen in der anschließenden Hämatoxylin-Färbung blau.

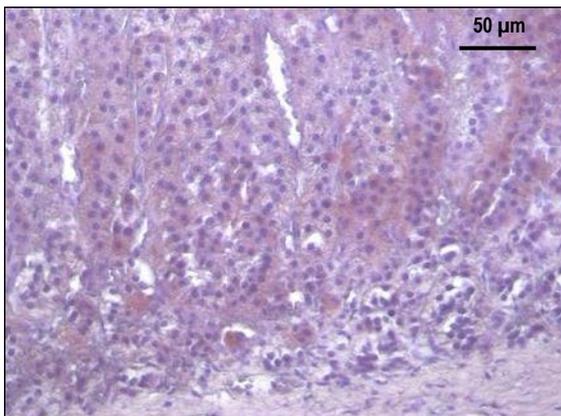


Abb. 2a CYP11B1, normale Nebenniere

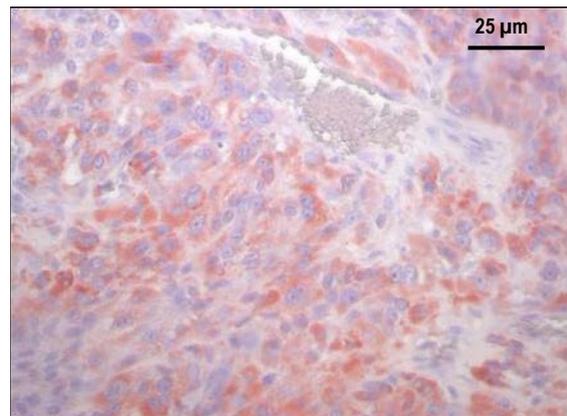


Abb. 2b CYP11B1, A/C-ACC

Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die 11β -Hydroxylase einer normalen humanen Nebenniere links und eines Aldosteron- und Cortisol-kosezierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die 11β -Hydroxylase enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt. Die Zellkerne erscheinen in der anschließenden Hämatoxylin-Färbung blau.

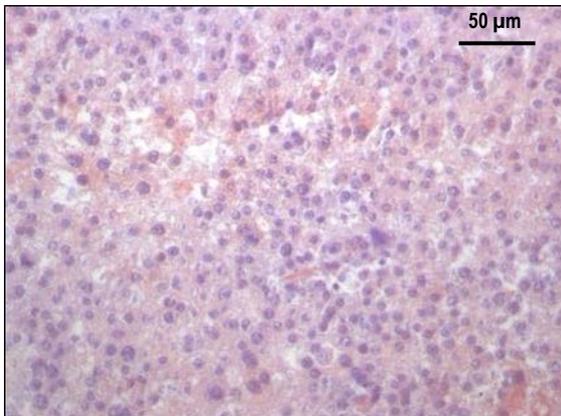


Abb. 3a CYP21A2, ACC

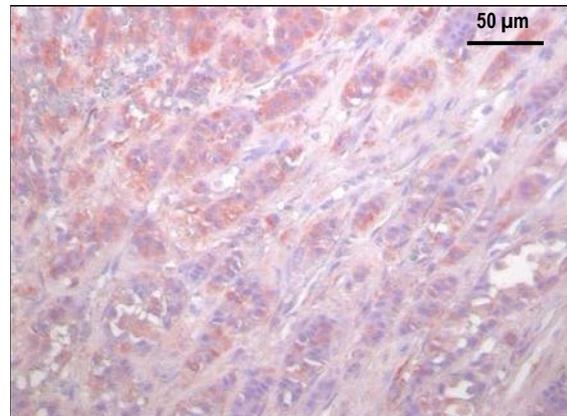


Abb. 3b CYP21A2, A/C-ACC

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die Steroid-21-Hydroxylase eines Neben-nierenrindenzarzinoms ohne klinisch signifikante Hormonsekretion links und eines Aldosteron- und Cortisol-kosezierenden Nebennierenrindenzarzinoms rechts. Die 21-Hydroxylase enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt. Die Zellkerne erscheinen in der anschließenden Hämatoxylin-Färbung blau.

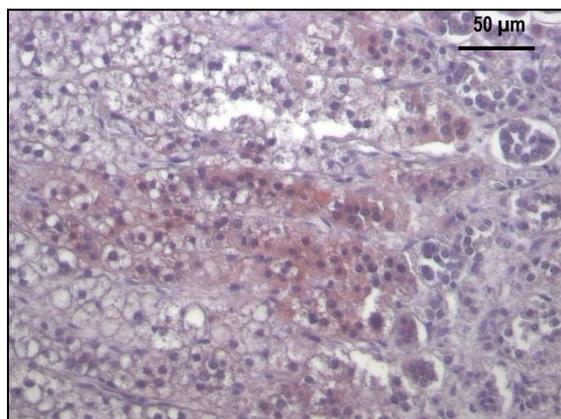


Abb. 4a CYP21A2, normale Nebenniere

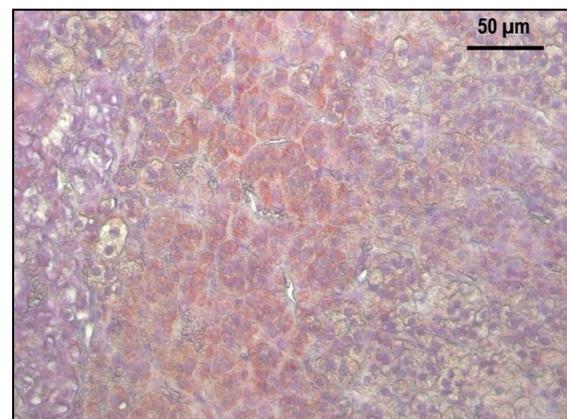


Abb. 4b MC2R, normale Nebenniere

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die Steroid-21-Hydroxylase einer normalen humanen Nebenniere links und Melanocortin 2 Rezeptor-Antigen einer normalen humanen Nebenniere rechts. Die Rezeptor-Antigen enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt.

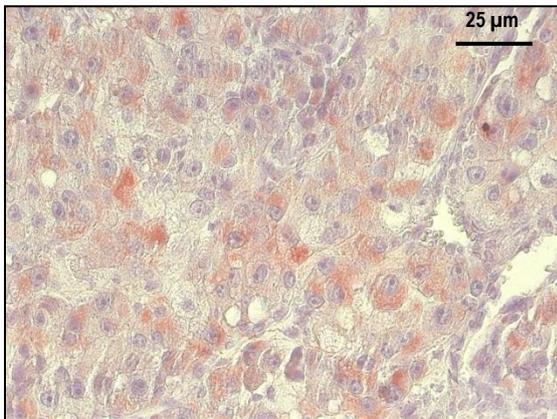


Abb. 5a MC2R, ACC

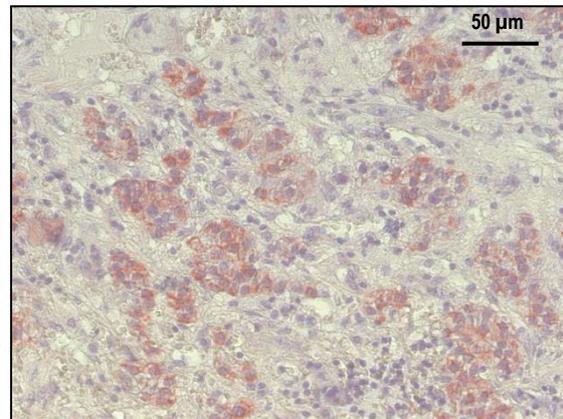


Abb. 5b MC2R, A/C-ACC

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen das Melanocortin 2 Rezeptor-Antigen eines Nebennierenrindenkarzinoms ohne klinisch signifikante Hormonsekretion links und Melanocortin 2 Rezeptor-Antigen eines Aldosteron- und Cortisolsekretzierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die Rezeptor-Antigen enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt.

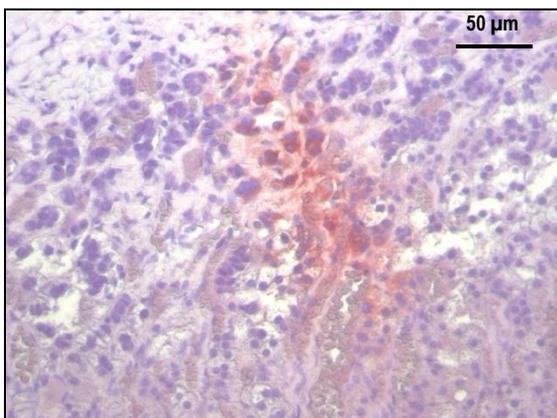


Abb. 6a AT2R, normale Nebenniere

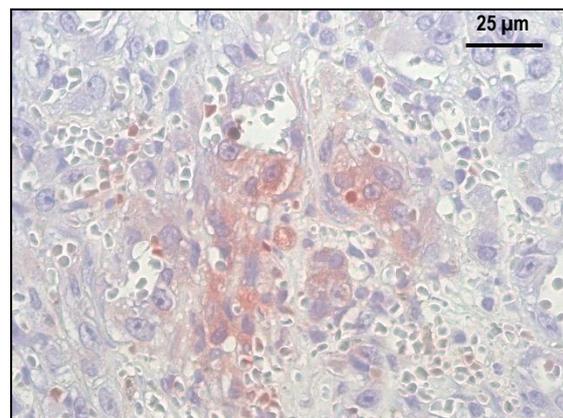


Abb. 6b AT2R, A/C-ACC

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen das Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Antigen einer normalen humanen Nebenniere links und Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Antigen eines Aldosteron- und Cortisolsekretzierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die Rezeptor-Antigen enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt.

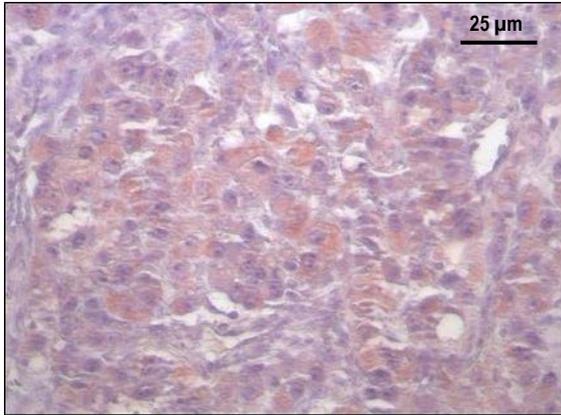


Abb. 7a CYP17A, A/C-ACC

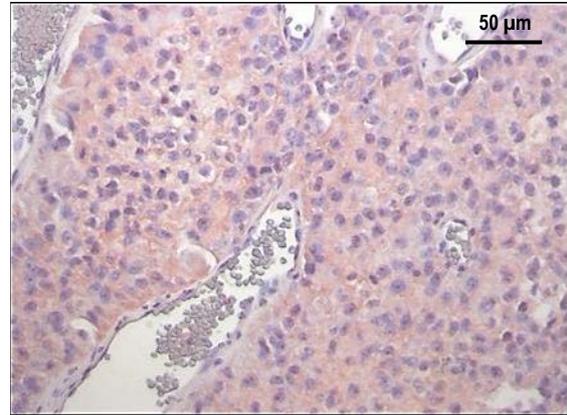


Abb. 7b LH, A/C-ACC

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen die 17 α -Hydroxylase eines Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenkarzinoms links und das Luteinisierende Hormon eines Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die Enzym bzw. Hormon enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt.

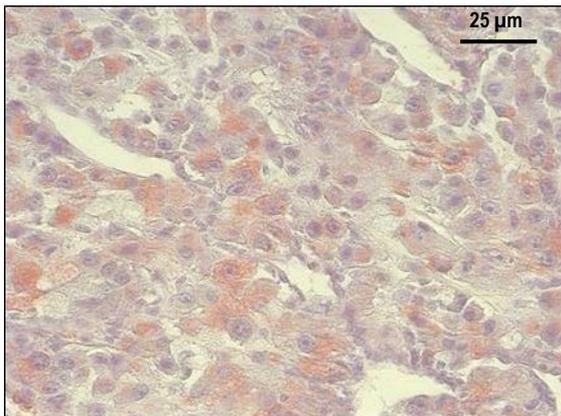


Abb. 8a StAR, A/C-ACC

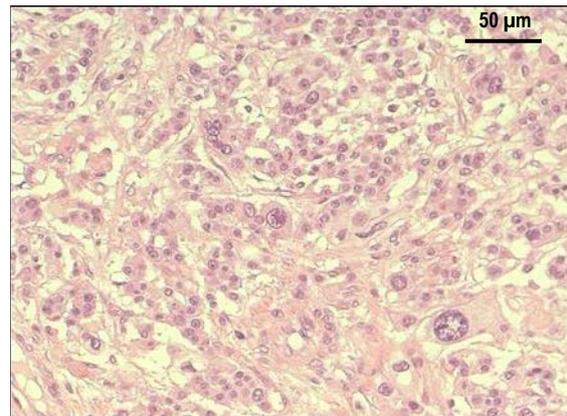


Abb. 8b HE, A/C-ACC

Immunohistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen das Steroidogenic-acute regulatory Protein eines Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenkarzinoms links. Die StAR-Protein enthaltenden Zellen in den einzelnen Arealen des untersuchten Gewebes sind hellrot gefärbt. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenkarzinoms rechts. Die Zellkerne erscheinen in der Hämatoxylin Färbung blau, bei der Gegenfärbung mit Eosin erscheint das Zytoplasma hellrosa.

4. Diskussion

Aldosteron- und Cortisol-kosezernierende Nebennierenrindenzinome stellen ein seltenes Erscheinungsbild der ACCs dar, deren Erwähnung bisher nur im Rahmen einzelner Fallberichte Einzug in die Literatur fand. Dabei erfordert es einer genauen Analyse, um die Malignität und das hormonelle Erscheinungsbild der Tumore zu beurteilen, sodass aufgrund großer Variabilität der klinischen Formen der A/C-ACCs die Diagnose häufig erst im späten Stadium der Erkrankung gestellt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine systematische Durchsicht eigener Patientendaten im Hinblick auf die tatsächliche Häufigkeit der Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Nebennierenrindenzinome im eigenen Krankengut sowie die Beurteilung der stattgefundenen diagnostischen Maßnahmen im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Studien [Späth *et al.*, Eur J Endocrinol. 2011].

In Folge der Untersuchung von Patientendaten des UKD konnte in 8 von 29 vorliegenden ACC-Fällen eine Kosekretion von Aldosteron und Cortisol nachgewiesen werden. Die Datenerfassung erwies sich jedoch als schwierig, da der Hormonexzess nicht immer adäquat untersucht worden ist. Zum Beispiel wurden nur 87,5% der Patienten auf einen Cortisol-Exzess hin untersucht, wobei alle gescreenten Patienten ein Cushing-Syndrom aufwiesen. Ein anschließender Nachweistest durch die Bestimmung des freien Cortisols im 24 h-Urin oder durch den Dexamethason-Hemmtest [Nieman *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 2008] erfolgte jedoch konsequenter.

Der Aldosteron-Exzess wurde dagegen bei allen betroffenen Patienten erfasst. Bei hoher Prävalenz der Hypokaliämie lag bei 87,5% der untersuchten Fälle eine arterielle Hypertonie vor. Ein adäquater Nachweis des primären Hyperaldosteronismus wurde jedoch nur bei 62,5% der Fälle vorgenommen, obwohl dieser eine der häufigsten Ursachen der arteriellen Hypertonie darstellt [Rossi *et al.*, J Am Coll Cardiol. 2006]. Ähnliche Ergebnisse lassen sich der Literaturrecherche entnehmen (Tabelle 2).

Desweiteren erfolgte die Erfassung des ACTH-Spiegels zur Unterstützung der Diagnosesicherung bei 87,5% der im UKD behandelten Patienten. In der Literatur wurde dagegen in nur vier Fällen der ACTH-Wert angegeben, sodass die Einbeziehung dieses wichtigen Parameters in die Analysen nicht möglich war.

Die deutliche Diskrepanz bei der Erfassung der Hormonsekretion sowie des Einsatzes von Nachweistests für den jeweiligen Hormonexzess können wir uns leider nicht erklären, jedoch weisen diese auf Defizite bei der Patientenversorgung hin, die unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit

anderen Zentren in der Vergangenheit bereits zur Sprache brachte [Johanssen *et al.*, Dtsch Arztebl Int. 2010].

Betrachtet man unser Patientengut im Vergleich zu den in der Literatur vorgestellten Fällen, so waren die Patienten mit durchschnittlich 54 Jahren bei der Erstdiagnose älter, als die in der Literatur mit einem Durchschnittsalter von 44 Jahren beschriebenen Patienten. Zwar wird der Altersdurchschnitt durch den Fall eines dreijährigen an A/C-ACC erkrankten Kindes im Datenpool der Literaturrecherche beeinflusst, dies erklärt jedoch nicht die signifikante Altersdifferenz der Patientengruppen. Weiterhin ist die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse durch die geringe Anzahl der uns bekannten Patienten limitiert.

Im Hinblick auf die Geschlechtsverteilung sind Frauen insgesamt häufiger betroffen als Männer, wobei auch hier mit 75% an A/C-ACC erkrankten Frauen im eigenen Patientengut und 52,4% weiblichen Betroffenen in den Fallberichten eine deutliche Diskrepanz in der Geschlechtsverteilung zu Tage tritt. Betrachtet man die Gesamtheit der Nebennierenrindenzinome, so wurde in einer Studie mit 138 an ACC erkrankten Patienten ein Frauenanteil von 68% erfasst [Hutter *et al.*, Am J Med. 1966].

Ein weiterer Aspekt der Untersuchung, in dem die Diskrepanz zwischen den publizierten Fällen und den in unserer Klinik archivierten Patienteninformationen zu Tage tritt, ist die Beschreibung eines Rückfalls oder der Metastasierung des Tumors. So erlitten alle uns bekannten Patienten ein Rezidiv, 6 von 8 Patienten wiesen im Verlauf Metastasen auf. Dagegen wurde nur bei 9 Publikationen ein Rückfall beschrieben. Dies kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass es sich bei den uns aus der Literatur bekannten A/C-ACC Fällen hauptsächlich um Fallberichte handelt, bei denen die Autoren auf die Signifikanz der Erkrankung und die Relevanz der adäquaten Diagnosesicherung aufmerksam machen sowie die jeweiligen Therapieoptionen diskutieren, die Berichte jedoch in einem relativ frühen Erkrankungsstadium publiziert wurden, sodass das mögliche Auftreten eines Rezidivs im postoperativen Verlauf weiterhin in Betracht gezogen werden kann.

Bei 6 von 8 uns bekannten Fällen wurde der Weiss-Score [Weiss, Am J Surg Pathol. 1984] zur histologischen Diagnosesicherung eines ACC herangezogen. Da einige der Literaturberichte bereits vor der Etablierung des Weiss-Scores als Grundlage der histopathologischen Klassifizierung der Nebennierenrindenzinome publiziert wurden, erfolgte eine explizite Betrachtung dieses Parameters als Differenzierungsgrundlage bei nur 7 Fallberichten, bei 15 Fällen wurden jedoch bereits die entsprechenden Parameter in die Klassifikation miteinbezogen.

Weiterhin stellt die TumorgroÙe einen wesentlichen Parameter in der Beurteilung der Malignität der Nebennierenrindentumore dar, wobei der Durchmesser des Tumors von >6 cm mit einem hohen Malignitatsrisiko einhergeht [Mansmann *et al.*, *Endocr Rev* 2004]. Bei einer mittleren TumorgroÙe der A/C-ACCs von 100 ± 26 mm im eigenen Patientengut sowie 110 ± 88 mm in den Literaturberichten wurden alle untersuchten Tumore bei der Diagnosestellung als maligne eingestuft. Isolierte Angaben zur GröÙe der Cortisol-sezernierenden Nebennierenrindenkarzinome, der Aldosteron-sezernierenden Nebennierenrindenkarzinome sowie der ACCs ohne nachweisbare Hormonsekretion liegen uns jedoch nicht vor, sodass die Differenzierung der ACCs als Aldosteron- und Cortisol-kosezernierende Nebennierenrindenkarzinome anhand der TumorgroÙe nicht möglich ist.

Zur Bestätigung unserer Hypothese, dass bei der Mehrzahl der Fälle von ACCs eine autonome Aldosteron- und Cortisol-Kosekretion vorliegt, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine immunhistologische Untersuchung der Enzym- und Rezeptorexpression auf Proteinebene in Geweben von den klinisch und labordiagnostisch als Aldosteron- und Cortisol-kosezernierende Nebennierenrindenkarzinome charakterisierten Tumoren sowie eines ACC ohne nachweisbare Hormonsekretion und einer normalen humanen Nebenniere.

In der immunhistochemischen Untersuchung konnte bei allen vorliegenden Geweben das Vorhandensein der MC2-Rezeptoren und der Enzyme Steroid-21-Hydroxylase, 11β -Hydroxylase, Aldosteronsynthese sowie des Luteinisierenden Hormons (LHCGR) nachgewiesen werden. StAR-Protein und das Enzym 17α -Hydroxylase zeigten bei jeweils einem der A/C-ACC eine schwache immunhistochemische Reaktion, welche auf eine anzunehmende niedrige Dichte im vorliegenden Gewebe zurückgeführt werden könnte. Drei der untersuchten Karzinome zeigten keine spezifische Reaktion mit dem AT2R-Ak. Die normale Nebennierenrinde zeigte unter Einsatz des AT2R-Ak in einigen isolierten Bereichen eine intensive Färbung des Gewebes mit klarem Hintergrund, jedoch konnte die Spezifität dieser bei wiederholten Farbevorgangen nicht verifiziert werden.

Bei der Durchsicht der Literatur hinsichtlich der Durchführung von Untersuchungen zur immunhistochemischen Charakterisierung steroidogener Enzyme und Rezeptoren der A/C-ACCs konnte nur ein Fallbericht identifiziert werden [Sone *et al.*, *Endocrine* 2009]. Die Autoren berichten von einer hohen Cholesterin-Monooxygenase Aktivität in den meisten Tumorzellen. Eine geringe Immunreaktivität wiesen 3β -Hydroxysteroid-dehydrogenase und 17α -Hydroxylase auf, die Immunreaktivität der Steroid-21-Hydroxylase und 11β -Hydroxylase konnten nur in vereinzelt Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin betrachten die Autoren die Heterogenität der Enzymexpression durch das vorliegende

Tumorgewebe als eine der Ursachen der Hypersekretion von Zwischenprodukten der Steroidhormonbiosynthese wie zum Beispiel 11-Desoxycorticosteron.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen bestätigen somit das, aufgrund der auf Proteinebene vorliegenden Enzym- und Rezeptorexpression, vorhandene Potenzial der Zellen in den untersuchten Geweben, die jeweiligen Steroidhormone zu produzieren.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der immunhistochemischen Analyse der ACCs bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [Sasano *et al.*, Hum Pathol. 1993; Fukai *et al.*, Endocr J. 2006; Kouyama *et al.*, Endocr J. 2011]. Desweiteren bezeichnet Sasano die Steroidhormonexpression der einzelnen Tumorzellen als desorganisiert [Sasano *et al.*, Hum Pathol. 1993], wobei bei 6 von den 9 durch die Arbeitsgruppe untersuchten Fällen der ACCs die Expression aller zur Cortisol- und Aldosteronsynthese erforderlichen Enzyme nachgewiesen werden konnten, klinisch jedoch keiner der Tumore durch Kosekretion beider Hormone in Erscheinung trat. Eine weitere Arbeitsgruppe schildert den Fall eines Aldosteron-sezernierenden Nebennierenrindenzinoms ohne klinisch nachweisbare Cortisolsekretion dessen Rezidiv durch ausgeprägten Hyperkortisolismus imponierte [Abma *et al.*, Neth J Med. 2008]. Die Variabilität der klinischen Erscheinungsbilder des Karzinoms wäre hier durch das Vorliegen der entsprechenden Enzym- und Rezeptorexpression, und somit der Fähigkeit zur differentiellen Steroidhormonsynthese, als Grundlage der Hormonsekretion zu begründen. Mit dem gleichen Erscheinungsbild der Kanzerogenese konfrontiert, stellte eine weitere Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass die Veränderung in der Steroidhormonbiosynthese möglicherweise durch Chromosomenamplifikation im Rahmen der stattgefundenen Chemotherapie getriggert worden sei [Barzon *et al.*, Eur J Endocrinol. 2005]. Interessanterweise wies aber die Mehrzahl der Patienten mit einem ACC, das ohne klinische Zeichen des Hyperkortisolismus ausschließlich durch Mineralkortikoidexzess in Erscheinung trat und dem entsprechend als ein A-ACC klassifiziert wurde, erhöhte Parameter der Glukokortikoidmetabolite im Urin auf [Crane *et al.*, Ann Intern Med. 1965]. Damit lag bei diesen Fällen definitionsgemäß ebenfalls ein A/C-ACC vor.

Neben dem Aldosteronexzess stellt die 11 Desoxycorticosteron- (DOC) Sekretion eine mögliche Ursache der arteriellen Hypertonie und der Hypokaliämie bei ACC-Patienten mit dem klinischen Bild eines Hyperkortisolismus dar [Messer *et al.*, Endocr pract. 2007]. Diese geht jedoch, im Gegensatz zu der Stimulation der Mineralkortikoidrezeptoren infolge eines Glukokortikoidexzesses der A/C-ACCs, mit einer Hemmung der 11 β -Hydroxylase und einer damit verursachten Renin-, Angiotensin- und Aldosteronsuppression einher [Messer *et al.*, Endocr Pract. 2007]. Der dabei vorherrschende 11 β -Hydroxylase-Mangel wäre möglicherweise auf eine Interaktion der 11 β -Hydroxylase mit *Cytochrom-P-*

450 Pseudosubstraten im Rahmen der Zoneneinteilung der Nebennierenrinde zurückzuführen [Hornsby, J Steroid Biochem. 1987].

In einer weiteren Studie beschäftigten sich die Autoren mit den Unterschieden in der Ausprägung von APA und ACC. Dabei stellten sie fest, dass die beiden Tumorentitäten initial über die gleiche biochemische Grundausstattung verfügen [Arteaga *et al.*, Ann Intern Med. 1984]. Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf A/CPA wurden bereits von weiteren Arbeitsgruppen gemacht [Willenberg *et al.*, Hypertens Res. 2010; Feller *et al.*, Clin Cancer Res. 1997; Späth *et al.*, Eur J Endocrinol. 2011], sodass die Omnipotenz der Nebennierenrindenzellen bei der Steroidhormonbiosynthese als allgemeines Prinzip aufgefasst werden kann, dem die Steroidhormonbiosynthese im Rahmen der adrenalen Tumorgenese ebenfalls unterliegt.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Korrelation zwischen dem positiven oder negativen Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung und der Höhe des Serumspiegels der jeweiligen Hormone, und somit dem klinischen Erscheinungsbild der Karzinome, beobachtet werden. Damit ist die immunhistochemische Analyse nicht geeignet, um eine autonome Hormonsekretion nachzuweisen, bestätigt jedoch die bereits klinisch und labordiagnostisch erhobenen Befunde. Die systematische Analyse und Quantifizierung der vorliegenden Enzyme und Rezeptoren bedarf somit weiterer Untersuchungen, da unsere Methoden diesbezüglich keine Aussage ermöglichen.

Weiterhin ist die Aussagekraft der von uns in der immunhistochemischen Analyse erzielten Ergebnisse durch die relativ kleine Anzahl der untersuchten Präparate, die Adaptation der angewandten Methode sowie die Qualität der zur Verfügung stehenden Antikörper limitiert.

Unter Verwendung des *EnVision+ System-HRP Labelled Polymers* als Sekundärantikörper konnte bei dem Einsatz von Kaninchen-Antikörpern ein klares Färbeergebnis mit einer deutlichen Abgrenzung der Zellen und Zellkerne bei minimaler Hintergrundfärbung erzeugt werden. Dessen wiederholter Einsatz für die Enzymdetektion mittels Ziegen- und Maus-Antikörpern erwies sich dagegen durch starke Hintergrundfärbung trotz der versuchsweise variierenden Konzentrationen der Antikörper, wiederholten Waschvorgängen in TBST-Bad und unter präzisen Befolgung der vom Hersteller empfohlenen Verarbeitung der Antikörper als mangelhaft. Das Färbeergebnis dieser unter Einsatz von *Biotinylated Link universal* und anschließender Inkubation mit Streptavidin-HRP fiel dagegen subjektiv deutlich besser aus. Einsatz von *Biotinylated Link universal* unter Verwendung der Kaninchenantikörper ergab ähnlich gutes Ergebnis wie das unter Verwendung des *EnVision+ System-HRP Labelled Polymers* als Sekundärantikörper bei einer jedoch vergleichsweise deutlicher ausgeprägten Hintergrundfärbung. Dieses Ergebnis erschien paradox, konnte jedoch in direkter Gegenüberstellung der Färbeergebnisse

mittels genannter Detektionssysteme und Einsatz des gleichen Kaninchenantikörpers auf 2 benachbarten Schnitten des identischen Tumorgewebes im selben Färbeprozess validiert werden, sodass die Ursache am ehesten auf Reaktionsmuster des jeweiligen Nachweissystems mit Antikörpern bestimmter Gattungen zurückzuführen ist.

Weiterhin unterscheidet sich das Färbergebnis abhängig von dem durch den Hersteller erzielten Qualitätsmaß der verwendeten Antikörper deutlich, wobei die Auswahlmöglichkeiten entsprechend der benötigten Produkte eingeschränkt waren und nicht immer auf bessere Produkte zurückgegriffen werden konnte.

Die Prognose der A/C-ACC ist schlecht, in vielen Fällen wird die Erkrankung erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Ursächlich hierfür sind einerseits die Rarität des Tumors, andererseits auch die schwierige Differenzierung gegenüber den Nebennierenrindenadenomen und die Variabilität der Erscheinungsformen des A/C-ACC. So wurde in der Literatur ein Fall von A/C-ACC geschildert, der klinisch ausschließlich durch Hyperaldosteronismus in Erscheinung trat, im Dexamethason-Hemmtest jedoch durch einen signifikanten Hyperkortisolismus imponierte [Kurtulmus *et al.*, *Horm Res.* 2004]. Weiterhin berichtete eine Arbeitsgruppe von einem A/C-ACC, das ursprünglich beim Vorliegen von Hypertension und Hypokaliämie anhand der radiologischen und postoperativen pathologischen Untersuchungsergebnisse als APA klassifiziert wurde, im Verlauf jedoch klinisch durch den fortbestehenden Hyperaldosteronismus sowie das Auftreten eines Hyperkortisolismus auffiel. Die hormonellen Untersuchungsergebnisse ergaben die Diagnose eines A/C-ACC sowie Hinweise auf eine milde Hyperandrogenämie. Nach der chirurgischen Revision wurde der Tumor in der anschließenden histopathologischen Untersuchung als Rezidiv eines A/C-ACC klassifiziert [Peppas *et al.*, *Cases Journal* 2009].

Diese Beispiele verdeutlichen die Bedeutsamkeit einer systematischen, adäquaten Erfassung der Hormonsekretion, die neben klinischen und histologischen Untersuchungsergebnissen einen entscheidenden Parameter bei der Beurteilung der Malignität der Tumore sowie der Diagnostik und der Therapie von A/C-ACCs darstellt.

5. Zusammenfassung

Das Conn-Syndrom ist eine der häufigsten Ursachen der arteriellen Hypertonie. Die diagnostischen Strategien beschäftigen sich mit dem Nachweis des Aldosteronexzesses bzw. dem Nachweis der vom RAAS stimulierten autonomen Aldosteronbildung. Unsere Arbeitsgruppe hat jedoch in der Vergangenheit häufiger Patienten mit primären Hyperaldosteronismus und Cortisolexzess charakterisiert. Diese ersten Daten, die im Rahmen einer anderen Dissertation erhoben wurden (Willenberg/Späth et al. Hypertens Res 2010), decken sich mit den Beobachtungen weiterer Arbeitsgruppen, sodass hier ein allgemeines Prinzip der adrenalen Tumorgenese vorliegen könnte.

Aldosteron- und Cortisol-koszernierenden Nebennierenrindenzarzinome (A/C-ACC) wurden bisher weder klinisch noch experimentell systematisch untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die genaue Charakterisierung des Enzym- und Rezeptorbesatzes in Geweben von Patienten mit A/C-ACC.

Weiterhin wurden die archivierten Patientendaten des UKD im Hinblick auf die Häufigkeit der Aldosteron- und Cortisolkozekretion der Nebennierenrindenzarzinome untersucht. Anschließend erfolgte die Beurteilung der stattgefundenen diagnostischen Maßnahmen im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Studien.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben eine Expression der MC2-Rezeptoren, des StAR-Proteins und der Enzyme 11 β -Hydroxylase, Aldosteronsynthase, 17 α -Hydroxylase, Steroid-21-Hydroxylase, sowie des Luteinisierenden Hormons (LHCGR) bei allen vorliegenden Geweben. Der Nachweis des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors erwies sich als schwierig, wobei drei der A/C-ACCs keine spezifische Reaktion mit dem AT2R-Ak zeigten.

In der systematischen Durchsicht eigener Patientendaten sowie der in der Fachliteratur beschriebenen Fälle wurden zahlreiche Defizite bezüglich der Erfassung klinischer Parameter und endokriner Testergebnisse zur Diagnostik und Klassifikation der Nebennierenrindenzarzinome aufgedeckt.

Somit liefert diese Arbeit Impulse für eine verbesserte Charakterisierung von Patienten mit Nebennierenrindenzarzinom, woraus zunächst Konsequenzen für die Diagnostik, nicht zuletzt aber auch für die Therapie resultieren. Darüber hinaus bietet eine detailliertere histologische und molekularbiologische Aufarbeitung solcher Läsionen eine Grundlage für neue Erkenntnisse zur Tumorgenese und Autonomieentwicklung adrenokortikaler Tumore.

6. Literaturverzeichnis

1. Abma EM, Kluin PM & Dullaart RP. Malignant aldosterone-producing adrenal tumour: reoccurrence with glucocorticoid excess without hyperaldosteronism. *Neth J Med.* 2008 **66** 252-255.
2. Adachi J, Hirai Y, Terui K, Nakano T, Fukuda Y, Suda T, Sasano H. Report of 7 cases of adrenal tumors secreting both cortisol and aldosterone. *Internal Medicine* 1993 **42** 714-718.
3. Ali AE & Raphael SJ. Functional oncocytic adrenocortical carcinoma. *Endocr Pathol.* 2007 **18** 187-189.
4. Allan CA, Kaltsas G, Perry L, Lowe DG, Reznik R, Carmichael D, Monson JP. Concurrent secretion of aldosterone and cortisol from an adrenal adenoma - value of MRI in diagnosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 **53(6)** 749-53.
5. Alterman SL, Dominguez C, Lopez-Gomez A & Lieber AL. Primary adrenocortical carcinoma causing aldosteronism. *Cancer* 1969 **24** 602-609.
6. Aptel HB, Johnson EI, Vallotton MB, Rossier MF, Capponi AM. Demonstration of an angiotensin II-induced negative feedback effect on aldosterone synthesis in isolated rat adrenal zona glomerulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996 **119(1)** 105-11.
7. Arteaga E, Biglieri EG, Kater CE, Lopez JM & Schambelan M. Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma. Preoperative recognition and course in three cases. *Ann Intern Med.* 1984 **101** 316-321.
8. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leteurtre E. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002 **26(12)** 1612-9.
9. Barzon L, Masi G, Fincati K, Pacenti M, Pezzi V, Altavilla G, Fallo F & Palu G. Shift from Conn's syndrome to Cushing's syndrome in a recurrent adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2005 **153** 629-636.
10. Brennan MF. Adrenocortical carcinoma. *CA Cancer J Clin.* 1987 **37(6)** 348-65.
11. Brooks RV, Mc SR, Prunty FT & Wood FJ. Potassium deficiency of renal and adrenal origin. *Am J Med* 1957 **23** 391-407.
12. Crane MG, Harris JJ & Herber R. Primary aldosteronism due to an adrenal carcinoma. *Ann Intern Med.* 1965 **63** 494-503.

13. Deckers S, Derdelinckx L, Col V, Hamels J & Maiter D. Peritoneal carcinomatosis following laparoscopic resection of an adrenocortical tumor causing primary hyperaldosteronism. *Horm Res.* 1999 **52** 97-100.
14. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews* 1998 **19(2)** 101–143.
15. Farge D, Chatellier G, Pagny JY, Jeunemaitre X, Plouin PF & Corvol P. Isolated clinical syndrome of primary aldosteronism in four patients with adrenocortical carcinoma. *Am J Med.* 1987 **83** 635-640.
16. Fassnacht M, Eder M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009 **23** 273-289.
17. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B for the German ACC Registry group and the ENSAT ACC working group. Limited prognostic value of the 2004 UICC staging classification for adrenocortical carcinoma – proposal for a revised TNM classification. *Cancer* 2009 **115** 243–250.
18. Fassnacht M, Kenn W, Allolio B. Adrenal tumors: how to establish malignancy? *J Endocrinol Invest.* 2004 **27(4)** 387-99.
19. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin A, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Schteingart DE, Arlt W, Kroiss M, Leboulleux S, Sperone P, Sundin A, Hermsen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, R.N., M.A., Kenn W, Fojo T, Mueller HH, Skogseid B for the FIRM-ACT trial group. Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *N Engl J Med* 2012; **366** 2189-2197.
20. Feller N, Hoekman K, Kuiper CM, Linn SC, Verheul HM, Wolthers BG, Popp- Snijders C & Pinedo HM. A patient with adrenocortical carcinoma: characterization of its biological activity and drug resistance profile. *Clin Cancer Res.* 1997 **3** 389-394.
21. Foye LV, Jr. & Feichtmeir TV. Adrenal cortical carcinoma producing solely mineralocorticoid effect. *Am J Med.* 1955 **19** 966-975.
22. Fukai N, Hirono Y, Yoshimoto T, Doi M, Ohtsuka Y, Homma K, Shibata H, Sasano H, Hirata Y. A case of estrogen-secreting adrenocortical carcinoma with subclinical Cushing's syndrome. *Endocr J.* 2006 **53(2)** 237-45.

23. Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 **93(8)** 3117–3123.
24. Gordon RD, Stowasser M, Tunny TJ, et al. Clinical and pathological diversity of primary aldosteronism including a new familial variety. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1991 **18** 283-286.
25. Guthrie GP Jr, Kotchen TA. Hypertension and aldosterone overproduction without renin suppression in Cushing's syndrome from an adrenal adenoma. *Am J Med.* 1979 **67(3)** 524-8.
26. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 2005 **146(3)** 1018-24.
27. Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Molecular Endocrinology* 2001 **15** 57-68.
28. Hisamatsu H, Sakai H, Irie J, Maeda K & Kanetake H. Adrenocortical carcinoma with primary aldosteronism associated with Cushing syndrome during recurrence. *BJU Int.* 2002 **90** 971-972.
29. Hogan MJ, Schambelan M, Biglieri EG. Concurrent hypercortisolism and hypermineralocorticoidism. *Am J Med.* 1977 **62(5)** 777-82.
30. Hornsby PJ. Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex. *J steroid Biochem.* 1987 **27** 1161-1171.
31. Hutter AM Jr, Kayhoe DE. Adrenal cortical carcinoma. Clinical features of 138 patients. *Am J Med.* 1966 **41(4)** 572-80.
32. Jackson WP, Zilberg B, Lewis B & Mc KD. Cushing's syndrome in childhood; report of case of adrenocortical carcinoma with excessive aldosterone production. *Br Med J.* 1958 **2** 130-133.
33. Johanssen S, Fasnacht M., Brix D., Koschker AC, Hahner S, Riedmiller H, Allolio B. Das Nebennierenkarzinom. *Urologie* 2008 **47** 172-181.
34. Johanssen S, Hahner S, Saeger W, Quinkler M, Beuschlein F, Dralle H, Haaf M, Kroiss M, Jurowich C, Langer P, Oelkers W, Spahn M, Willenberg HS, Mäder U, Allolio B, Fassnacht M. Deficits in the management of patients with adrenocortical carcinoma in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2010 **107** 885–891.
35. Komija I, Koizumi Y, Kobayashi R, Kotani M, Yamada T, Maruyama Y. Concurrent Hypersecretion of Aldosterone and Cortisol from the Adrenal Cortical Adenoma. *The American Journal of Medicine* 1979 **67** 516-518.
36. Kouyama R, Hiraishi K, Sugiyama T, Izumiyama H, Yoshimoto T, Akashi T, Kihara K, Homma K, Shibata H, Hirata Y. Clinicopathological features, biochemical and molecular markers in 5 patients with adrenocortical carcinoma. *Endocr J.* 2011 **58(7)** 527-34.

37. Kurtulmus N, Yarman S, Azizlerli H & Kapran Y. Co-secretion of aldosterone and cortisol by an adrenocortical carcinoma. *Horm Res.* 2004 **62** 67-70.
38. Lucon AM, Pereira MA, Mendonça BB, Zerbini MC, Saldanha LB, Arap S. Adrenocortical tumors: results of treatment and study of Weiss's score as a prognostic factor. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002 **57(6)** 251-6.
39. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev.* 2004 **25(2)** 309-40.
40. Messer CK, Kirschenbaum A, New MI, Unger P, Gabrilove JL & Levine AC. Concomitant secretion of glucocorticoid, androgens, and mineralocorticoid by an adrenocortical carcinoma: case report and review of literature. *Endocr Pract.* 2007 **13** 408-412.
41. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol.* 2005 **45(8)** 1243-8.
42. Nagae A, Murakami E, Hiwada K, Kubota O, Takada Y, Ohmori T. Primary aldosteronism with cortisol overproduction from bilateral multiple adrenal adenomas. *Jpn J Med.* 1991 **30(1)** 26-31.
43. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *0J Clin Endocrinol Metab.* 2008 **93(5)** 1526-40.
44. Onoda N, Ishikawa T, Nishio K, Tahara H, Inaba M, Wakasa K, Sumi T, Yamazaki T, Shigematsu K, Hirakawa K. Cushing's syndrome by left adrenocortical adenoma synchronously associated with primary aldosteronism by right adrenocortical adenoma: report of a case. *Endocr J.* 2009 **56(3)** 495-502.
45. Otani H, Otsuka F, Inagaki K, Suzuki J, Makino H. Roles of Bone Morphogenetic Protein-6 in Aldosterone Regulation by Adrenocortical Cells. *Acta Med. Okayama* 2010 **64** 213-218.
46. Peppas M, Pikounis V, Papaxoinis G, Macheras A, Economopoulos T, Raptis SA & Hadjidakis D. Adrenocortical carcinoma secreting cortisol, androgens and aldosterone: a case report. *Cases J.* 2009 **2** 8951.
47. Rayner B. Primary aldosteronism and aldosterone-associated hypertension. *J Clin Pathol.* 2008 **61(7)** 825-31.
48. Riedemann T, Patchev AV, Cho K, Almeida OF. Corticosteroids: way upstream. *Molecular Brain* 2010 **3**:2.
49. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicologic Pathology* 2001 **29** 41-48.

50. Rossi GP, Vendraminelli R, Cesari M, Pessina AC. A thoracic mass with hypertension and hypokalaemia. *Lancet* 2000 **356** 1570.
51. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006 **48(11)** 2293-300.
52. Sakai N, Yamada T, Asao T & Murayama T. Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma metastases found seven years after adrenalectomy. *Int J Urol*. 1997 **4** 79-82.
53. Salassa TM, Weeks RE, Northcutt RC & Carney JA. Primary aldosteronism and malignant adrenocortical neoplasia. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1975 **86** 163-172.
54. Sasano H, Suzuki T, Nagura H, Nishikawa T. Steroidogenesis in human adrenocortical carcinoma: biochemical activities, immunohistochemistry, and in situ hybridization of steroidogenic enzymes and histopathologic study in nine cases. *Human Pathology* 1993 **24** 397-404.
55. Sharma ST, Nieman LK. Cushing's syndrome: all variants, detection, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 **40(2)** 379-91.
56. Slee PH, Schaberg A, Van Brummelen P. Carcinoma of the adrenal cortex causing primary hyperaldosteronism. A case report and review of the literature. *Cancer* 1983 **51(12)** 2341-5.
57. Sone M, Shibata H, Homma K, Tamura N, Akahira J, Hamada S, Yahata M, Fukui N, Itoh H, Sasano H & Nakao K. Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone-producing adrenocortical carcinoma. *Endocrine* 2009 **35** 25-33.
58. Späth M, Korovkin S, Antke C, Anlauf M, Willenberg HS. Aldosterone and cortisol co-secreting adrenal tumors – the lost subtype of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol*. 2011 **164** 447-455.
59. Stowasser M. Update in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 **94(10)** 3623-30.
60. Suzuki J, Otsuka F, Inagaki K, Otani H, Miyoshi T, Terasaka T, Ogura T, Omori M, Nasu Y, Makino H. Primary aldosteronism caused by a unilateral adrenal adenoma accompanied by autonomous cortisol secretion. *Hypertens Res*. 2007 **30(4)** 367-373.
61. Veytsman I, Nieman L, Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *Journal of clinical oncology* 2009 **27** 4619-4629.

62. Weingartner K, Gerharz EW, Bittinger A, Rosai J, Leppek R & Riedmiller H. Isolated clinical syndrome of primary aldosteronism in a patient with adrenocortical carcinoma. Case report and review of the literature. *Urol Int.* 1995 **55** 232-235.
63. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984 **8(3)** 163-9.
64. Willenberg HS, Spath M, Maser-Gluth C, Engers R, Anlauf M, Dekomien G, Schott M, Schinner S, Cupisti K & Scherbaum WA. Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 2010 **33** 467-472.
65. Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm Metab Res.* 2008 **40(7)** 435-41.
66. Willenberg HS, Zschucke D, Bornstein SR. Adrenal gland tumors. *Internist (Berl).* 2007 **48(9)** 971-86.
67. Willenberg HS, Bornstein SR, Chrousos GP. Disease, stress-induced. In: Fink G (Ed.) *Encyclopedia of Stress*, 2nd Edition, Elsevier, Oxford 2007 **1** 824-827.
68. Willenberg HS, Gruber M, Eisenhofer G, Bornstein SR. Endokrine Hypertonie – Neuigkeiten und jüngste Entwicklungen. *Dtsch Med Wochenschr* 2012 **137** 627-630.

7. Abkürzungsverzeichnis

3β-HSD	3- β -Hydroxysteroid- dehydrogenase	cAMP	Zyklisches Adenosin- Monophosphat
17-OH-	17 α -Hydroxy-	C-ACC	Cortisol produzierendes Nebennierenrindenzarzinom
ACC	Nebennierenrindenzarzinom	CPA	Cortisol produzierendes Adenom
A/C-ACC	Aldosteron- und Cortisol- kosezierendes Karzinom	CRE	cAMP- <i>response-element</i>
ACCs	Nebennierenrindenzarzinome	CRH	Corticotropin- <i>releasing-</i> Hormon
A/CPA	Aldosteron- und Cortisol- kosezierendes Adenom	CYP	Cytochrom-P450
A/CPAs	Aldosteron- und Cortisol- kosezierende Adenome	CYP11B1	11 β -Hydroxylase
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>	CYP11B2	Aldosteronsynthase
ACTH	Adrenocorticotropin	CYP17A	17 α -Hydroxylase
ADH	Vasopressin	CYP21A2	Steroid-21-Hydroxylase
AEC	3-amino-9-Ethylkarbazol	DAKO	<i>Dual Endogenous Enzyme Block</i>
Ak	Antikörper (Singular)	DAG	Diacylglycerol
Aks	Antikörper (Plural)	DHEA	Dehydroepiandrosteron
APA	Aldosteron produzierendes Adenom	DHEA-S	Dehydroepiandrosteron- Dionsulfat
APAs	Aldosteron produzierende Adenome	ENSAT	<i>European Network for the study of adrenal tumours</i>
ARQ	Aldosteron-Renin-Quotient	HCl	Chlorwasserstoffsäure
ATF-1	<i>activating transcription factor</i>	HE	Hämatoxylin-Eosin
AT2R	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor	hNN	humane Nebenniere

Abkürzungsverzeichnis

H₂O	Wasser	SF-1	Steroidogener Faktor 1
HRP	Meerrettich- (<i>horseraddish</i>) Peroxidase	SREB	<i>cyclic AMP response element binding Protein</i>
IHA	idiopathischer Hyperaldosteronismus	StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
IP3	Inositoltriphosphat	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
LHCGR	Luteinisierendes Hormon/ Choriogonadotropin Rezeptor	TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
LSAB	<i>Labeled</i> -Streptavidin- Biotin-Methode	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
MC2R	Melanocorticotropin 2 Rezeptor	UKD	Universtitätsklinikum Düsseldorf
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon		
NaCl	Natriumchlorid		
NBRE-1	NGFIB <i>response element</i>		
NGFIB	<i>nerve growth factor-induced Clone B</i>		
NURR-1	<i>Nuclear receptor-related 1</i>		
OHCS	17-Hydroxycorticosteroid		
PA	Primärer Hyperaldosteronismus		
pH	potential Hydrogen		
POMC	Proopiomelanocortin		
P450SCC	Cholesterin Monooxygenase		
RAAS	Renin-Angiotensin- Aldosteron-System		
RR	arterieller Blutdruck		

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.