

**DIE EXPRESSION DER ALDOSTERON - SYNTHASE
IN DER HUMANEN NEBENNIERE**

Katharina Knoll

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung

Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

**Die Expression der Aldosteron - Synthase
in der humanen Nebenniere**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Knoll

aus Bozen

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Felix Beuschlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Auernhammer
Prof. Dr. Klaus Hallfeldt
Prof. Dr. Carsten Otto
Prof. Dr. Günter K. Stalla

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomie und Physiologie der Nebenniere	1
1.1.1. Anatomie der Nebenniere	1
1.1.2. Embryologie der Nebenniere.....	3
1.1.3. Physiologie der Nebenniere.....	4
1.1.3.1. Wirkung der Mineralokortikoide	5
1.1.3.2. Hormonelle Schaltkreise zur Regulation der Mineralokortikoide	6
1.1.3.3. Steroidhormonsynthese	8
1.2. Pathologie der Nebennierenrinde	10
1.2.1. Primärer Hyperaldosteronismus.....	10
1.2.1.1. Symptomatik des primären Hyperaldosteronismus.....	10
1.2.1.2. Ätiologie des primären Hyperaldosteronismus.....	11
1.2.1.3. Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus.....	14
1.2.1.4. Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus	15
1.2.1.5. Therapie des primären Hyperaldosteronismus.....	17
1.2.2. Das Inzidentalom	18
1.2.2.1. Prävalenz des Inzidentaloms	18
1.2.2.2. Differentialdiagnose des Inzidentaloms	19
1.2.2.3. Diagnostisches Vorgehen bei Vorliegen eines Inzidentaloms	19
1.2.2.4. Therapie des Inzidentaloms.....	20
1.3. Aktuelle Studien zur humanen Aldosteronsynthese - Expression	21
1.3.1. Die Enzymexpression der humanen Nebennierenrinde.....	21
1.3.2. Auftreten und Bedeutung der APCCs	22
1.3.3. Erstbeschreibung von Foci.....	25
1.3.4. Die Bedeutung nodulärer Strukturen der Nebenniere.....	27
1.3.5. CYP11B2 - und CYP11B1 - Expression Aldosteron - produzierender Adenome	27
1.3.6. CYP11B2 - Expression im Verhältnis zur Adenomgröße	28
1.3.7. Genetische Untersuchungen Aldosteron - produzierender Adenome.....	29
1.3.8. Genetische Untersuchungen von Nebenknoten	31
1.3.9. Genetische Untersuchungen der APCCs.....	32
1.4. Zielsetzung der Arbeit	34
2. Material und Methoden.....	35
2.1. Das Untersuchungskollektiv.....	35

2.2. Materialien.....	37
2.2.1. Zusammensetzung der Lösungen und Buffer	37
2.2.2. Reagenzien.....	37
2.2.3. Geräte und Technik.....	38
2.3. Methoden	39
2.3.1. Die Technik der Immunhistochemie.....	39
2.3.1.1. Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie	39
2.3.1.2. Direkte und indirekte Form der Immunhistochemie.....	40
2.3.1.3. Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie	41
2.3.1.4. Praktische Durchführung der Immunhistochemie	42
2.3.2. Der CYP11B2 Antikörper.....	43
2.3.3. Protokoll der Nebennierenverarbeitung und CYP11B2 - Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit	44
2.4. Klassifikation der CYP11B2 - Färbung	48
2.4.1. Noduli.....	48
2.4.2. Aldosterone producing cell clusters (APCCs).....	49
2.4.3. Foci.....	49
2.4.4. Ausprägungsgrad der Zona Glomerulosa	50
2.5. Qualitätssicherung	51
2.6. Statistische Auswertung	52
3. Ergebnisse	53
3.1. Deskriptive Statistik der CYP11B2 - Expression	53
3.2. Korrelationen	56
3.2.1. Externe Variablen	56
3.2.1.1. Geschlecht	56
3.2.1.2. Alter	58
3.2.1.3. Body - Mass - Index und Herzgewicht	60
3.2.2. Interne Variablen.....	62
3.2.2.1. Die Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa.....	62
3.2.2.2. Fokale Expressionsformen der Aldosteronsynthese	63
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
4. Diskussion	65
4.1. Häufigkeiten Aldosteron - produzierender und nodulärer Formationen.....	66
4.1.1. Grad der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa.....	66
4.1.2. Gesamtzahl der Noduli mit und ohne CYP11B2 - Expression.....	68

4.1.3. Gesamtzahl der Foci	71
4.1.4. Gesamtzahl der APCCs.....	72
4.1.4.1. Überlegungen zur Bedeutung der APCCs	73
4.2. Korrelationen zwischen der Zona Glomerulosa und individuellen Kenndaten	78
4.2.1. Die Bedeutung des Alters	78
4.2.2. Korrelation des Body - Mass - Index und des Herzgewichtes mit der CYP11B2 - Expression	82
4.2.3. Die Korrelation des Geschlechts mit der adrenalen CYP11B2 - Expression	86
4.3. Zusammenhänge innerhalb der Zona Glomerulosa	91
4.3.1. Korrelationen zwischen der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa und Foci 91	
4.3.2. Korrelationen zwischen APCCs und Foci.....	92
4.3.3. Korrelationen zwischen CYP11B2 - exprimierenden Noduli und Foci oder APCCs	93
4.4. Die Pathogenese Aldosteron - produzierender Adenome.....	94
4.4.1. Die Bedeutung genetischer Veränderungen	95
4.4.2. Die Bedeutung der APCCs.....	97
4.4.3. Die Bedeutung der Nodulation.....	99
4.4.4. Modell für die Entwicklung Aldosteron - produzierender Adenome auf der Basis unserer Ergebnisse.....	101
4.5. Einschränkungen.....	104
4.5.1. Externe Validität	104
4.5.2. Interne Validität.....	106
4.6. Bedeutung unserer Studie	108
4.7. Ausblick	109
4.8. Zusammenfassung	110
5. Anhang.....	113
6. Literaturverzeichnis	117
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	126
8. Danksagung.....	127

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Physiologie der Nebenniere

1.1.1. Anatomie der Nebenniere

Die Nebennieren sind paarige endokrine Organe mit retroperitonealer Lage. Sie liegen kappenförmig dem oberen Nierenpol auf. Die Nebennieren eines gesunden Erwachsenen wiegen jeweils durchschnittlich vier Gramm (1, 2) und weisen eine dreieckige Form auf. Im Durchschnitt ist eine Nebenniere fünf Zentimeter lang, zweieinhalb Zentimeter hoch und eineinhalb Zentimeter breit (3, 4). Jede Nebenniere ist gemeinsam mit der Niere von einer Fettschicht (*capsula adiposa renalis*) und einer fibrösen Kapsel (*fascia renalis* oder Gerotafaszie) umgeben (3).

Die arterielle Versorgung der Nebenniere erfolgt über drei Gefäße: die *Arteria suprarenalis superior* aus der *Arteria phrenica inferior*, die *Arteria suprarenalis media* unmittelbar aus der Aorta und die *Arteria suprarenalis inferior* aus der *Arteria renalis*. Die Arterien speisen ein subkapsuläres Arteriennetz, aus welchem Arteriolen und Kapillaren in Rinde und Mark ziehen (1). Der venöse Abfluss erfolgt über die *Vena centralis* an der Mark - Rinden - Grenze. Nach Austritt der Vene am Hilus wird sie als *Vena suprarenalis* bezeichnet. Sie mündet auf der linken Körperhälfte in die *Vena renalis*, auf der rechten Seite hingegen direkt in die *Vena cava inferior* (5). Der lymphatische Abfluss aus der Nebennierenrinde erfolgt in die *Arteria suprarenalis superior* und *media*, der des Markes erfolgt in die *Vena renalis*. Die erste Lymphknotenstation sind für beide Nebennieren die *Lymphonodi lumbales* (5).

Die Nebenniere besteht aus Rinde und Mark, die von einer gemeinsamen Bindegewebskapsel umgeben sind; beide erfüllen endokrine Aufgaben. Die Funktion der Nebennierenrinde wird durch hormonelle Regelkreise gesteuert (1). Das Nebennierenmark wird durch sympathische Nervenfasern innerviert und wird aufgrund seiner embryologischen Herkunft als modifiziertes sympathisches Ganglion angesehen (3).

Bei histologischer Betrachtung der Nebenniere zeigt sich die Trennung des Organs in zwei funktionell und embryologisch unterschiedliche Anteile besonders deutlich:, wobei im Anschnitt die Rinde aufgrund ihres hohen Gehalts an Lipiden gelblich und das Mark bräunlich - gräulich imponiert (1). Das Nebennierenmark beansprucht etwa zehn Prozent des Volumens der Nebenniere (6) und besteht aus zylinderförmigen, in Strängen angeordneten Zellen. Die polygonalen, chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks produzieren entweder Noradrenalin

oder Adrenalin (3). Im Mark befinden sich zudem Arteriolen, muskuläre Drosselvenen, multipolare Ganglienzellen und zahlreiche nicht myelinisierte Nervenfasen (1, 3, 6).

Die Nebennierenrinde nimmt neunzig Prozent des Volumens der gesamten Nebenniere ein und besteht aus drei Zonen (3). Direkt an der äußeren Kapsel liegt die Zona Glomerulosa, mittig die Zona Fasciculata und an das Mark grenzend die Zona Reticularis. Jede der drei Zonen produziert ein für die entsprechende Zone charakteristisches Steroidhormon: die Zona Glomerulosa Mineralokortikoide, die Zona Fasciculata Glukokortikoide und die Zona Reticularis Androgene (7). Zwischen den Zellen der Nebennierenrinde verlaufen sinusoidale Kapillaren, welche die in der Nebenniere produzierten Hormone aufnehmen und über den Blutkreislauf im Körper verteilen (5).

Die Zona Glomerulosa des Menschen besteht aus fokalen, direkt unterhalb der Kapsel gelegenen Zellnestern mit bogenförmigen Ausläufern bis in die Zona Fasciculata. Die Zellen der Zona Glomerulosa sind klein, haben ein hohes Kern - Plasma - Verhältnis und weisen im Vergleich zu Zellen der Zona Fasciculata wenig intrazytoplasmatische Lipide auf.

Die Zona Fasciculata ist die breiteste Zone der Rinde und nimmt über zwei Drittel deren Volumens ein. Sie besteht aus radiär gerichteten Zellsträngen, die sich von der Zona Reticularis bis zur Zona Glomerulosa erstrecken. Die Zellen dieser Zone sind aufgrund zahlreicher zytosolischer Lipidtropfen größer und heller als die Zellen der restlichen Nebennierenrinde. Die Lipide werden bei der Aufarbeitung des Gewebes für histologische Untersuchungen (Einbettung) herausgelöst, sodass die Zellen der Zona Fasciculata an ihrem hellen, glasigen Zytoplasma erkannt werden können. Die Zona Reticularis besteht aus netzartig verzweigten, anastomosierenden Zellsträngen mit weiten Sinus. Die Zellen wirken kompakt und besitzen reichlich Lipofuszingranula (1, 3).



Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Nebenniere

1.1.2. Embryologie der Nebenniere

Die Nebennierenrinde entsteht aus der Urogenitalrinne, einer gemeinsamen Anlage für Nieren, Nebennierenrinde und Geschlechtsorgane. Die beiden Anteile der Nebenniere entstehen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Organogenese und vereinen sich dann zu einem Organ. Die Rinde stammt vom mittleren Keimblatt (Mesoderm) ab, während das Nebennierenmark von der Neuralleiste und somit vom äußeren Keimblatt (Ektoderm) abstammt.

In der dritten bis vierten Gestationswoche migrieren auf beiden Körperseiten Zellen des Zölomepithels und die darunterliegenden mesenchymalen Zellen des Mesonephrons an die dorsale Bauchwand (8-10). Sie bilden das adrenogonadale Primodium, woraus im Rahmen der Organogenese Teile der Geschlechtsorgane und die Nebennieren entstehen. Ab der fünften Gestationswoche trennt sich das adrenogonadale Primordium in ein gonadales und ein adrenales Primordium (4, 9).

In der siebenten Gestationswoche proliferieren die mesodermalen Zölomepithelzellen des adrenalen Primordiums und differenzieren sich, sodass ab der achten Woche zwei unterschiedliche Zonen in der fetalen Nebenniere erkennbar sind: eine innere, fetale Zone und eine äußere, definitive Zone. Die Zellen der definitiven Zone sind Vorläufer für den adulten Nebennierencortex. Die fetale Zone produziert die Steroidhormone Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteron - Sulfat (DHEA - S), welche vor allem im letzten Trimenon für den Erhalt der Schwangerschaft von Bedeutung sind (8, 9, 11).

In der neunten Woche wandern Neuralleistenzellen medialseitig der fetalen Nebenniere ein und werden im Verlauf von Nebennierenrindenzellen umgeben. Die Neuralleistenzellen differenzieren sich zu chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (10, 12). Schließlich entsteht ebenso in der neunten Gestationswoche die Nebennierenkapsel aus einwandernden Mesenchymzellen (4, 9, 10).

Im zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft proliferiert die fetale Zone der Nebenniere und produziert Steroidhormone, während die definitive Zone kein Wachstum aufweist. Die fetale Zone persistiert bis zur Geburt und bildet sich innerhalb des sechsten Lebensmonats zurück (9, 10). Aus der definitiven Zone der embryonalen Nebenniere entwickeln sich postnatal Zona Glomerulosa, Zona Fasciculata und Zona Reticularis. Die Schichten der Nebennierenrinde entstehen durch zentripetale Zellwanderung von Progenitorzellen aus den äußeren Schichten in die inneren Schichten der Nebennierenrinde. Im Zuge dieser Wanderung kommt es zur Zelldifferenzierung der Progenitorzellen in die Zellen der jeweiligen Zone (10). Die Zona Fasciculata und Glomerulosa sind bereits kurz nach der Geburt erkennbar, während sich die Zona Reticularis ab dem dritten Lebensjahr bildet und erst ab der Adrenarche ihre volle Dicke erreicht (12, 13).

1.1.3. Physiologie der Nebenniere

Die anatomische Trennung der Nebenniere in Rinde und Mark spiegelt sich auch in ihrer Funktion wieder: Das Nebennierenmark produziert Noradrenalin und Adrenalin. Diese Transmittersubstanzen regulieren den Metabolismus vor allem jener Organe, die nicht ausreichend sympathisch innerviert sind, und dienen in Stresssituationen der schnellen Mobilisation von physiologischen Reserven (5).

Die Nebennierenrinde produziert verschiedene Steroidhormone. Die Zona Reticularis produziert Androgene, vor allem Dehydroepiandrosteron - Sulfat (DHEA - S) und Androstendion. DHEA - S spielt beim Mann nur eine untergeordnete Rolle, bei der Frau

reguliert es die Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale, insbesondere der Körperbehaarung (3).

Die Zona Fasciculata produziert Glukokorticoide, vor allem Kortisol. Deren Sekretion wird durch die Hypothalamus - Hypophysen - Nebennierenrindenachse über die Ausschüttung von Corticotropin Releasing Hormone (CRH) und adrenokortikotropen Hormon (ACTH) reguliert. Kortisol beeinflusst verschiedene Organsysteme. Es bewirkt eine Mobilisierung von Reserven für die Bewältigung einer Stressreaktion. Kortisol wirkt katabol, steigert den Proteinabbau, die Lipolyse und die hepatische Glukoneogenese, was zu einer Steigerung des Blutzuckerspiegels, einer Umverteilung der Fettreserven und einem Abbau von Knochenmasse und von kollagenem Bindegewebe der Haut führt. Durch die Hemmung der Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren und der Bildung von lymphatischem Gewebe wirkt Kortisol entzündungshemmend und immunsuppressiv. Schließlich weist Kortisol eine mineralokortikoide Wirkung auf und führt zu Wasser - und Natriumretention und zu Kaliumsekretion (3). Die Zona Glomerulosa produziert Mineralokortikoide. Deren Wirkungen, Regulation und Synthese werden gesondert besprochen.

1.1.3.1. Wirkung der Mineralokortikoide

Das bedeutendste Mineralokortikoid ist Aldosteron. Wie alle Hormone der Nebennierenrinde ist Aldosteron ein Steroidhormon. Insofern ist es lipidlöslich und diffundiert ungehindert durch die Zellmembran in die Zielzellen. Dort bindet es an den zytosolischen Mineralokortikoidrezeptor (7). Nach Bindung des Aldosterons wandert der Hormon - Rezeptor - Komplex in den Zellkern. Im Nukleus bindet der Komplex an die Glucocorticoid Responsive Elements (GRE), Promotorelemente der DNA, und agiert als Transkriptionsfaktor für diverse Gene (14-16). Neben dieser sogenannten genomischen Wirkung weist Aldosteron zusätzlich schnelle, nicht - genomische Wirkungen auf, welche über einen G - Protein - gekoppelten Rezeptor vermittelt werden (16, 17).

Infolge der genomischen Aldosteronwirkung kommt es zu einer verstärkten Neusynthese von epithelialen Natriumkanälen (ENaC), Na^+ - K^+ - ATPasen und Kaliumkanälen in den Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre der Niere. Die ENaC - und Kaliumkanäle werden in die apikalen, die Na^+ - K^+ - ATPasen in die basalen Zellmembranen eingebaut (16, 18). In den Schaltzellen der Sammelrohre induziert Aldosteron die Bildung und den apikalen Einbau von H^+ - K^+ - ATPasen. In der Folge kommt es in den betroffenen Zellen zur vermehrten Resorption von Natrium. Dem Natrium folgt passiv Wasser, sodass das intravasale Volumen und damit der

Blutdruck steigt (16). Durch die vermehrte Expression von Kaliumkanälen und Protonenpumpen kommt es zur verstärkten Ausscheidung von Protonen und Kalium, was sekundär zu Hypokaliämie und durch Protonenverlust zu einer metabolischen Alkalose führen kann.

Neben der renalen Wirkung erhöht Aldosteron die Natriumresorption im Darm und in den Speicheldrüsen. Das Mineralokortikoid bewirkt eine verstärkte Expression von epithelialen Natriumkanälen in Endothelzellen, was zu einer Versteifung der Gefäßwand und zu einer Verminderung der Synthese des vasodilatatorischen Stickstoffmonoxids führt (16). Außerdem verstärkt Aldosteron die Ansprechbarkeit der Gefäße auf Katecholamine und Vasopressin, steigert zentral den Sympathikotonus und führt über beide Mechanismen zu einer Erhöhung des Vasotonus (19). Schließlich fördert Aldosteron die Fibrosierung und die Zellproliferation, vor allem perivaskulär, kardial und renal (15, 16, 19, 20).

Der Mineralokortikoidrezeptor ist nicht spezifisch für Aldosteron, sondern kann auch Glukokortikoide binden. Um zu verhindern, dass Kortisol, welches im Vergleich zu Aldosteron im Überschuss im Körper vorhanden ist, den Mineralokortikoidrezeptor bindet und aktiviert, exprimieren Nierenzellen und Zellen anderer Organe das Enzym 11 β - Hydroxysteroid - Dehydrogenase Typ 2 (11 β HSD). Dieses Enzym bewirkt die Umwandlung von Kortisol in das inaktive Kortison, welches den Mineralokortikoidrezeptor bindet, aber nicht aktiviert (7, 15, 21). Mineralokortikoide werden in der Leber zu Tetrahydroaldosteron metabolisiert, glucuronidiert und renal ausgeschieden (4).

1.1.3.2. Hormonelle Schaltkreise zur Regulation der Mineralokortikoide

Die Regulation der Mineralokortikoid - und Aldosteronproduktion erfolgt durch das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System. Renin ist eine Serin - Protease und wird in der Niere gebildet. Ihre Bildung und Freisetzung wird durch den juxtaglomerulären Apparat gesteuert. Der juxtaglomeruläre Apparat ist eine funktionelle Einheit, welche sich in jedem Nephron befindet. Zellen an der Macula densa des juxtaglomerulären Apparats messen den Natriumgehalt des Ultrafiltrats und fördern bei erniedrigter Natriumchlorid - Konzentration im Primärurin die Reninfreisetzung aus mesangialen Zellen des juxtaglomerulären Apparats. Ebenso verstärkt die Stimulation endothelialer Dehnungsrezeptoren bei vermindertem Blutdruck (20) und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems die Reninsekretion (4).

Renin spaltet von Angiotensinogen ein Dekapeptid mit dem Namen Angiotensin I ab (7). Angiotensinogen ist ein Peptid, welches vorwiegend in der Leber synthetisiert und in den

Kreislauf abgegeben wird. Nach der Abspaltung von Angiotensinogen wird von Angiotensin I durch Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Angiotensin II, ein Oktapeptid, abgespalten (siehe Abb. 2). ACE ist ein ubiquitäres Enzym, welches in besonders hoher Konzentration in den Endothelien der Lungenstrombahn vorkommt.

Das Spaltprodukt Angiotensin II stimuliert den Angiotensin II - Rezeptor Typ 1 (AT₁ - Rezeptor). Dieser G - Protein - gekoppelte Rezeptor löst über die Phospholipase C - Inositol - Triphosphat - Kaskade eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern aus. Zudem bewirkt der aktivierte AT₁ - Rezeptor eine Depolarisation der Zelle, wodurch spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet werden und Kalzium aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere fließt (22).

Kalzium bindet Calmodulin; der entstehende Kalzium - Calmodulin - Komplex aktiviert die Proteinkinasen I und IV. Diese phosphorylieren verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung aktiviert die Transkriptionsfaktoren und führt zu einer Stimulation jener Gene, die Enzyme der Aldosteronsynthese sowie Proteine codieren, welche die Verfügbarkeit der Ausgangssubstanz Cholesterin regulieren (14, 22). Unter anderem bewirkt der intrazelluläre Kalziumanstieg zudem eine Steigerung der Expression des Gens CYP11B2, welches die Aldosteronsynthese codiert. Es resultiert eine Steigerung der Aldosteronsynthese in der Zona Glomerulosa. Im Sinne eines negativen Feedbacks hemmen hohe Aldosteronspiegel die Reninausschüttung und somit die eigene Genese (7).

Die Aldosteronproduktion wird des Weiteren direkt durch den extrazellulären Kaliumgehalt reguliert. Die Zellen der Zona Glomerulosa weisen zahlreiche Kaliumkanäle auf, welche selektiv für Kalium permeabel sind. Bei Anstieg des extrazellulären Kaliums strömt verstärkt Kalium in die Zellen der Zona Glomerulosa. Die erhöhte intrazelluläre Kaliumkonzentration verschiebt das Membranpotential und führt zur Depolarisation. In der Folge öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle, die einen Kalziumeinstrom in die Zelle ermöglichen. Über bereits erläuterte Mechanismen führt das intrazelluläre Kalzium letztendlich zu einer Steigerung der Aldosteronproduktion (22, 23).

Schließlich kann ACTH stimulierend auf die Aldosteronproduktion wirken. Primär ist ACTH im Rahmen der hypothalamisch - hypophysär - adrenalen Achse für die Regulation des Kortisolspiegels verantwortlich. Es kann allerdings auch in den Zellen der Zona Glomerulosa einen intrazellulären Kalziumanstieg induzieren, indem es den G - Protein - gekoppelten cAMP - Adenylatcyclase - Proteinkinase A - Signalweg aktiviert (7, 19).

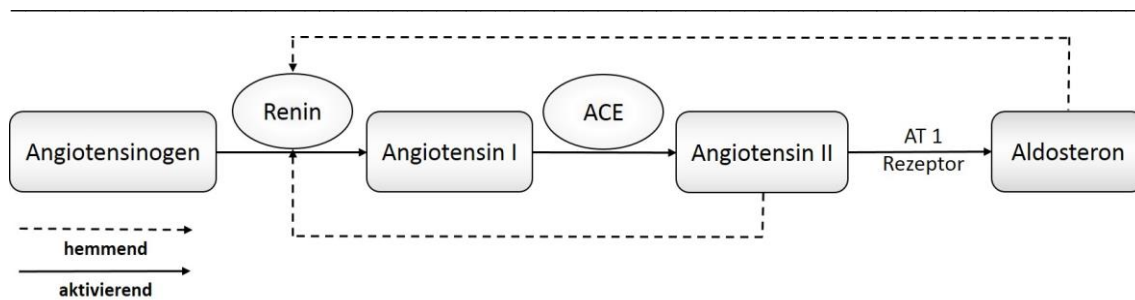


Abbildung 2: **Das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System**

1.1.3.3. Steroidhormonsynthese

In der Nebennierenrinde erfolgt die Synthese unterschiedlicher Hormone. Jede der drei anatomischen Zonen exprimiert Enzyme, welche für die Bildung des jeweils für die Zone typischen Hormons verantwortlich sind (7). Alle Hormone der Nebenniere gehören der Klasse der Steroidhormone an und werden aus der Ausgangssubstanz Cholesterin gebildet.

Die meisten Enzyme der Steroidhormongenese gehören zu der Gruppe der Zytochrom - P450 Enzyme und befinden sich in verschiedenen Zellorganellen. Steroidhormone diffundieren während ihrer Genese zwischen den einzelnen Organellen mit den entsprechenden Enzymen (6). Das Cholesterin für die Hormonsynthese stammt vorwiegend aus den low density lipoproteins (LDL) im Blutplasma, welche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, oder aus den Cholesterinspeichern der Zelle (7). Die ersten enzymatischen Schritte der Kortisol- und Aldosteronsynthese sind identisch.

Cholesterin wird durch das Steroid acute regulatory protein (StAR) von der Zellmembran in das Mitochondrium transportiert (7). Das StAR - Protein stellt den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidhormonsynthese dar (14). Im Mitochondrium erfolgt eine zweifache Hydroxylierung des Cholesterins und die Spaltung seiner Seitenkette durch das Enzym side - chain - cleavage (auch CYP11A1, 20,22 - Desmolase genannt). Es entsteht Pregnenolon. Pregnenolon wird am glatten endoplasmatischen Retikulum durch die 3 β -Hydroxysteroid - Dehydrogenase Typ 2 zu Progesteron umgewandelt (24).

Progesteron wird in der Zona Fasciculata und Zona Glomerulosa durch die 21- Hydroxylase (CYP21A2) zu 11 - Desoxykortikosteron hydroxyliert. Ab diesem Schritt unterscheidet sich die Steroidhormonsynthese der Zona Glomerulosa von derer der Zona Fasciculata. In der Zona Glomerulosa wird 11 - Desoxykortikosteron in das Mitochondrium transportiert und dort durch das Enzym Aldosteronsynthese P450 (CYP11B2) weiterverarbeitet. Dieses multifunktionelle Enzym bewirkt stufenweise eine Hydroxylierung am 11 β - C-Atom und eine zweifache Oxidation am 18- C-Atom. Aus Desoxykortikosteron entstehen Kortikosteron, 18 - Hydroxykortikosteron

und schließlich ein Diol, das spontan durch Dehydratation zu Aldosteron zerfällt (24). Die durch die Aldosteronsynthase katalysierte Reaktion stellt neben dem StAR - Protein den zweiten die Geschwindigkeit bestimmenden Schritt der Aldosteronsynthese dar (14).

Eng verwandt mit CYP11B2 ist das Enzym 11 β - Hydroxylase (CYP11B1). Dieses katalysiert in der Zona Fasciculata den letzten Schritt der Kortisolsynthese: die Oxidation von Desoxykortikosteron und Dihydroxyprogesteron in der inneren Mitochondrienmembran zu Kortisol. Dihydroxyprogesteron entsteht ausschließlich in der Zona Fasciculata durch die folgenden Schritte: Konversion von Pregnenolon zu 17 α - Hydroxypregnenolon durch CYP17A1, Oxidation zu 17 α - Hydroxyprogesteron durch 3 β - Hydroxysteroid - Dehydrogenase und Hydroxylierung durch CYP21A2 zu 11 - Desoxykortisol (7, 24) (Abb. 3).

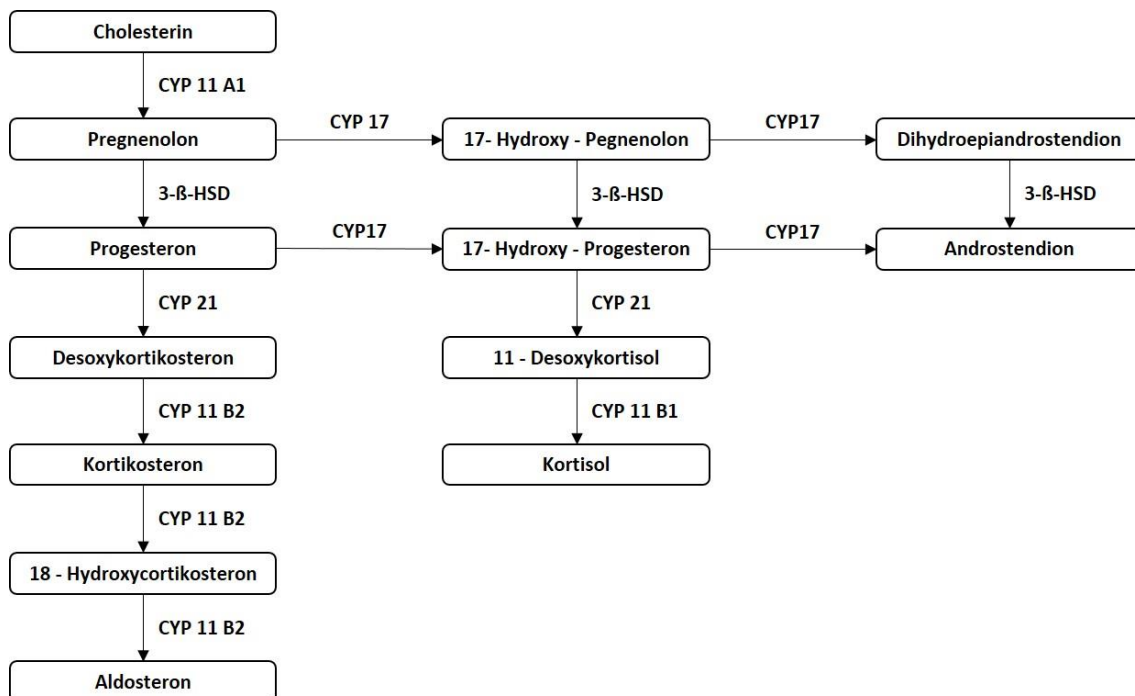


Abbildung 3: Steroidhormonproduktion

Die Gene der beiden Enzyme 11- β - Hydroxylase (CYP11B1) und Aldosteronsynthase (CYP11B2) liegen auf Chromosom acht in enger Nachbarschaft zueinander. Obwohl die Aminosäuresequenz der beiden Enzyme zu 93 % homolog ist (24), unterliegt deren Regulation zwei unterschiedlichen Mechanismen. Die Transkription des Gens *CYP11B1* wird durch ACTH gesteuert und ist Bestandteil der hypothalamisch - hypophysär - adrenalen Achse (7). Das Gen *CYP11B2* hingegen gehört dem Angiotensin - Aldosteron - Regelkreis an. Die Expression des Enzyms wird durch den extrazellulären Kaliumspiegel und durch Angiotensin II stimuliert.

1.2. Pathologie der Nebennierenrinde

Erkrankungen der Nebennieren manifestieren sich meist in einer Veränderung der Hormonproduktion, wobei man Über- und Unterfunktionssyndrome unterscheiden kann. Die Ätiologie der Störungen kann trotz ähnlicher Klinik vielfältig sein.

Je nach betroffener Zone der Nebenniere wird das entsprechende Hormon im Überschuss oder in verminderter Menge produziert. In Abhängigkeit davon unterscheidet man folgende klinischen Erscheinungsbilder:

Betroffene Zone	Produziertes Hormon	Pathologie
Zona Glomerulosa	Aldosteron	Überfunktion: Conn - Syndrom
Zona Fasciculata	Kortisol	Überfunktion: Cushing - Syndrom
Zona Reticularis	Androgene	Dysfunktion: Androgenitales Syndrom
Nebennierenmark	Adrenalin und Noradrenalin	Überfunktion: Phäochromozytom
Gesamte Nebennierenrinde	Aldosteron, Kortisol, Androgene	Unterfunktion: Addison - Syndrom

Tabelle 1: Über- und Unterfunktionssyndrome der Nebenniere

1.2.1. Primärer Hyperaldosteronismus

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Pathologie der Zona Glomerulosa und dem primären Hyperaldosteronismus. Daher wird im Folgenden detailliert nur auf dieses Krankheitsbild eingegangen.

1.2.1.1. Symptomatik des primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus ist eine Erkrankung unterschiedlicher Ätiologie, welche mit einer verstärkten Aldosteronproduktion einhergeht.

Der erhöhte Aldosteronspiegel führt zu einer vermehrten Resorption von Natrium und in der Folge von Wasser in der Niere. Die Volumenretention begünstigt die Entwicklung eines Bluthochdrucks. Über einen direkten Einfluss auf die Gefäße bewirkt Aldosteron außerdem eine generelle Steigerung des Vasotonus. Diese beiden Mechanismen führen bei Betroffenen zu einer Hypertonie (2, 15). Die verstärkte Resorption von Natrium führt zu einer hochnormalen Natriumkonzentration im Blut, selten jedoch zur Hypernatriämie, da bei hohem

Serumnatrium das Natrium - Escape - Phänomen eintritt (25). Im Laufe weniger Wochen sinkt die renale Natriumresorption trotz konstant erhöhten Aldosteronspiegeln. Dieser Effekt wird unter anderem durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) vermittelt (4).

Aufgrund der proliferationsfördernden Wirkung von Aldosteron auf Bindegewebe, insbesondere auf das Bindegewebe der Gefäße und des Herzens, weisen Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus bei gleichem Blutdruckspiegel häufiger Endorganschäden als Patienten mit essentiellm Hypertonus auf. Erhöht sind insbesondere das Risiko für Schlaganfall und kardiale Erkrankungen, wie koronare Herzerkrankung, linksventrikuläre Hypertrophie, Vorhofflimmern und Herzinfarkt (21, 26-30). Die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität ist weniger durch die Aldosteron - vermittelte Hypertonie als vielmehr durch die direkte Wirkung des Aldosterons auf die Gewebe und der damit verbundenen Bindegewebsproliferation, dem sogenannten remodeling, bedingt (15, 21, 27).

Aldosteron stimuliert des Weiteren die Kaliumsekretion und kann zur Hypokaliämie führen. Eine Hypokaliämie tritt nur bei etwa einem Drittel der Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus auf. Sie kann zu Polyurie, Polydipsie, Obstipation und Veränderungen des Elektrokardiogramms führen. Schließlich fördert Aldosteron die renale Protonenausscheidung und kann zur metabolischen Alkalose führen. Die Alkalose manifestiert sich meist mit Parästhesien und muskulärer Schwäche (2, 18).

Der primäre Hyperaldosteronismus wurde erstmals von Jerome W. Conn im Jahre 1955 beschrieben (31). Die klinische Trias aus Hypertonie, erniedrigtem Kaliumspiegel und metabolischer Azidose wird heute in Reminiszenz an den Erstbeschreiber als Conn - Syndrom bezeichnet. Häufig jedoch sind Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus bis auf eine Hypertonie asymptomatisch (19). Die Diagnose wird oft erst bei der Abklärung eines therapieresistenten Hypertonus gestellt (2).

1.2.1.2. Ätiologie des primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus kann durch verschieden Ursachen bedingt sein:

1. Ein Aldosteron - produzierendes Adenom der Nebennierenrinde
2. Eine bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie
3. Familiäre Formen des primären Hyperaldosteronismus
4. Ein Nebennierenkarzinom

1.2.1.2.1. Das Aldosteron - produzierende Adenom

Ein Aldosteron - produzierendes Adenom ist nach der bilateralen Nebennierenrindenhyperplasie die zweithäufigste Ursache eines primären Hyperaldosteronismus und verursacht als solche mindestens ein Drittel aller Fälle von Hyperaldosteronismus (2, 18). Werden nur Patienten mit hypokaliämischen Formen des primären Hyperaldosteronismus untersucht, weisen bis zu 70 % ein Aldosteron - produzierendes Adenom auf (2). Auch dem klassischen Conn - Syndrom, wie es von Jerome W. Conn beschrieben wurde, liegt ein Aldosteron - produzierendes Adenom zugrunde. Aldosteron - produzierende Adenome treten meist im Alter von 30 bis 50 Jahren auf und sind häufiger bei Frauen als bei Männern. Sie weisen im Vergleich zur bilateralen Nebennierenhyperplasie häufiger einen schweren klinischen Verlauf mit Hypokaliämie und therapierefraktärem Hypertonus auf (2). Patienten mit Aldosteron - produzierendem Adenom weisen in 92 % ein singuläres, unilaterales Adenom auf, selten werden bilaterale oder multiple Adenome diagnostiziert (1, 2).

Bei etwa der Hälfte aller Aldosteron - produzierenden Adenome können somatische Mutationen identifiziert werden. Etwa 40 % weisen eine Mutation im *KCNJ5* Gen auf, welches einen Kalium - Kanal codiert (GIRK4: G protein - activated inward rectifier potassium channel) (32). Weitere, seltenere Mutationen betreffen in etwa 5 % der Fälle das Gen *ATP1A1*, welches die $\alpha 1$ - Untereinheit der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase codiert, in 1,7 % das Gen *ATP2B3*, welches eine plasmamembrangebundene Ca^{2+} - ATPase codiert (PMCA3: plasma membrane Ca^{2+} - ATPase) (33) und in etwa 9 % das Gen *CACNA1D*, welches eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalziumkanals codiert (Cav1.3 - Untereinheit des L - type voltage dependent Ca^{2+} channel) (34). All diese Mutationen führen zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle, zu vermehrter Expression von *CYP11B2* und so zu einer Steigerung der Aldosteronproduktion (22, 35, 36).

Histopathologisch stellt sich das Adenom typischerweise als klar umschriebener, goldgelber Knoten mit einer Kapsel dar. Meist sind Aldosteron - produzierende Adenome kleiner als zwei Zentimeter, 58 % der Adenome wiegen unter vier Gramm. Bei mikroskopischer Betrachtung können Adenome verschiedene Zelltypen vorweisen, die meist den Zellen einer Zone der Nebennierenrinde ähneln oder eine intermediäre Morphologie mit Charakteristika aller drei Zonen aufweisen (1, 2).

In der histopathologischen Untersuchung gibt es keine klaren Unterscheidungskriterien zwischen einem Aldosteron - produzierenden Adenom und einem nicht pathologischen Aldosteron - produzierenden Knoten der Nebenniere (37). Die Diagnose kann nur unter

Berücksichtigung der klinischen Symptomatik, laborchemischer Ergebnisse und apparativer Untersuchungen erfolgen (37).

Im Gegensatz zu Kortisol - produzierenden Tumoren wurde bei Aldosteron - produzierenden Adenomen in der histopathologischen Untersuchung keine Nebennierenrindenatrophie, sondern eine Hyperplasie der angrenzenden Zona Glomerulosa beschrieben (2, 11, 37).

1.2.1.2.2. Die bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie

Die bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie ist mit 60 % der Fälle die häufigste Ursache des primären Hyperaldosteronismus, vor allem bei Betrachtung normokaliämischer Patienten (18). Sie betrifft vor allem ältere Patienten männlichen Geschlechts und äußert sich in einer meist milden klinischen Symptomatik. Nur 16 % der Patienten mit bilateraler Nebennierenhyperplasie weisen eine Hypokaliämie auf, während diese bei etwa der Hälfte der Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenom auftritt (21, 38). Selten kommt eine unilaterale Nebennierenrindenhyperplasie vor, welche klinisch meist nur schwer von einem Aldosteron - produzierenden Adenom unterschieden werden kann (2).

1.2.1.2.3. Familiäre Formen des Hyperaldosteronismus

Ein bis maximal zehn Prozent der Fälle von primärem Hyperaldosteronismus haben einen familiären Hintergrund. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei familiäre Formen des primären Hyperaldosteronismus bekannt.

- Familiärer Hyperaldosteronismus Typ I

Der autosomal dominante familiäre Hyperaldosteronismus Typ 1 wird auch Glucocorticoid - Responsive - Hyperaldosteronism genannt. Durch eine Rekombination der Gene *CYP11B2* (welches die Aldosteronsynthese codiert) und *CYP11B1* (welches ein Enzym der Kortisolsynthese codiert) entsteht ein chimäres Genprodukt aus dem Promoter von *CYP11B1* und den codierenden Sequenzen von *CYP11B2* (39, 40). Da die Expression von *CYP11B1* durch ACTH aktiviert wird, kommt es bei den Betroffenen durch ACTH zu einer Stimulation der *CYP11B2* - Expression über den *CYP11B1* - Promotor. Es resultiert eine exzessive Aldosteronproduktion, welche dem zirkadianen Rhythmus der ACTH - Ausschüttung folgt. Durch die Verabreichung einer geringen Glukokortikoid - Dosis (meist Dexamethason) kann die hypophysär - hypothalamisch - adrenale Achse unterdrückt und sowohl die ACTH - Konzentration als auch die Aldosteronproduktion gesenkt werden (23, 39).

- Familiärer Hyperaldosteronismus Typ II

Obwohl der familiäre Hyperaldosteronismus Typ II 1991 erstmals beschrieben wurde, ist dessen Pathophysiologie noch nicht geklärt. Er wird autosomal dominant vererbt, tritt im Erwachsenenalter mit einer milden Symptomatik auf (41). Eine Therapie mit Dexamethason ist nicht indiziert (2). Die Diagnose wird gestellt, wenn mehr als zwei Familienmitglieder von einem primären Hyperaldosteronismus betroffen sind und die beiden anderen familiären Formen ausgeschlossen wurden (16). Es ist davon auszugehen, dass sich hinter dem familiären Hyperaldosteronismus Typ II unterschiedliche genetische Ursachen verbergen (40).

- Familiärer Hyperaldosteronismus Typ III

Diese 2008 erstmals beschriebene Form des familiären Hyperaldosteronismus ist durch eine frühe Manifestation mit einer schweren arteriellen Hypertonie und Hypokaliämie bereits im Kindesalter gekennzeichnet (42). Ursächlich liegt eine Mutation in dem *KCNJ5* Gen zugrunde, welches einen Kalium - Kanal codiert. Eine kausale Therapie ist derzeit nicht bekannt (2, 23, 40, 42).

1.2.1.2.4. Das Nebennierenrinden - Karzinom

Das Nebennierenrindenzarzinom ist mit unter einem Prozent eine seltene Ursache des primären Hyperaldosteronismus, muss aber als Differentialdiagnose eines Aldosteron - produzierenden Adenoms in Erwägung gezogen werden (43). Karzinome sind meist größer als Adenome (43), wiegen meist über hundert Gramm und weisen charakteristische Malignitätszeichen auf: Zellpleomorphismen, erhöhte Mitoserate, Nekrosen, Gefäßinvasion und makroskopische Einblutungen (1, 2). Nur in Ausnahmefällen sezernieren Nebennierenrindenzarzinome ausschließlich Aldosteron, meist sezernieren sie zusätzlich andere Steroidhormone und deren Vorstufen (44).

1.2.1.3. Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus gilt als die häufigste Ursache eines sekundären Hypertonus. Die Prävalenz scheint nach neuen Studien höher zu liegen als bisher angenommen, insbesondere wenn auch Patienten ohne Hypokaliämie betrachtet werden. Aktuell wird davon ausgegangen, dass etwa zehn Prozent aller Hypertoniker an einem primären Hyperaldosteronismus leiden (21), wobei verschiedene Studien bei unselektionierten Hypertonikern Prävalenzen zwischen 4,6 % und 16,6 % beschrieben (19, 45-49). Bei der Untersuchung von Patienten mit therapieresistenter Hypertonie betrug die Prävalenz zwischen 17 und 23 % (19).

Eine genaue Aussage zur Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus zu treffen ist schwierig, da die Häufigkeit der Diagnose erheblich von der untersuchten Grundbevölkerung und von den angewandten diagnostischen Tests abhängt (19). Hannemann et al. (50) untersuchten eine Population unselektierter Hypertoniker hinsichtlich eines primären Hyperaldosteronismus. Eine erhöhte Aldosteron - Renin - Ratio wiesen 7 % der Untersuchten auf, jedoch konnte nur bei 0,2 % der Personen zusätzlich eine erhöhte Aldosteron - und erniedrigte Reninkonzentration im Blutplasma gefunden werden.

Bei genauerer Betrachtung zeigt sich zudem ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Blutdrucks der untersuchten Personen und der gefundenen Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus. Laut Mosso et al. (49) beträgt die Prävalenz 2 % bei Hypertonie ersten Grades (140 - 160 mmHg systolisch und/oder 90 - 99 mmHg diastolisch), 8 % bei Hypertonie zweiten Grades (160 - 180 mmHg systolisch und/oder 100 - 110 mmHg diastolisch) und 13 % bei Hypertonie dritten Grades (über 180 mmHg systolisch und/oder über 110 mmHg diastolisch).

1.2.1.4. Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus

Die Diagnose des primären Hyperaldosteronismus wird durch eine klinische und laborchemische Stufendiagnostik gestellt (siehe Abbildung 4).

Aufgrund des hohen Anteils an normokaliämischen Patienten mit primären Hyperaldosteronismus sollte trotz Fehlen der klassischen klinischen Trias aus Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Azidose ein Screening nach primärem Hyperaldosteronismus erfolgen. Insbesondere bei Patienten mit therapierefraktärer oder hochgradiger Hypertonie, bei jungen Hypertonikern, bei Patienten mit positiver Familienanamnese für primären Hyperaldosteronismus sowie bei Patienten mit Inzidentalomen oder bei Patienten mit Hypokaliämie in Verbindung mit Hypertonie sollte als Screening - Test die Aldosteron - Renin - Ratio (ARR) bestimmt werden (51, 52).

Ein erhöhter Aldosteronspiegel bei supprimiertem Renin spricht für einen primären Hyperaldosteronismus. Die Aldosteron - Renin - Ratio ist ein sensitiver, aber nicht sehr spezifischer Test, der anfällig für Störungen ist (19, 21, 47). Eine Medikation mit Substanzen, welche das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System beeinflussen, sollte vor Durchführung des Tests umgestellt oder pausiert werden (36, 53).

Bei Nachweis einer pathologischen Aldosteron - Renin - Ratio muss ein Bestätigungstest erfolgen. Folgende Möglichkeiten stehen zur Auswahl:

-
- Oraler oder intravenöser Kochsalzbelastungstest
 - Captopriltest
 - Fludrokortison - Suppressionstest

Alle Tests prüfen die Supprimierbarkeit der Aldosteronproduktion (19, 21, 51, 52). Bleibt Aldosteron während des Testes über dem Referenzwert, geht man davon aus, dass die Synthese unabhängig vom hormonellen Regelkreis erfolgt. Die Diagnose des primären Hyperaldosteronismus gilt dann als gesichert (2, 51, 52).

Um zwischen einer bilateralen Nebennierenrindenhypertrophie und einem Aldosteron - produzierenden Adenom zu unterscheiden und das seltene Nebennierenrindenzellkarzinom auszuschließen, wird eine Bildgebung der Nebennieren bei allen Patienten mit gesichertem primären Hyperaldosteronismus durchgeführt (21, 51). Eine Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) kann Läsionen mit Mindestdurchmesser von ungefähr einem Zentimeter identifizieren, sehr kleine Adenome bleiben jedoch oft unerkannt (54). Zudem kann die Schnittbildgebung keine Aussage über die hormonelle Aktivität der identifizierten Knoten treffen.

Aus diesem Grunde wird die selektive Nebennierenvenenkatheterisierung als Referenzmethode für die definitive Diagnosestellung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms angesehen (21, 51). Sie wird insbesondere dann durchgeführt, wenn in der Bildgebung keine für eine bilaterale Nebennierenrindenhypertrophie oder für ein Adenom typischen Veränderungen erkennbar sind und/oder beidseits Nebennierenknoten auffallen. Zudem ist die selektive Nebennierenvenenkatheterisierung unverzichtbar, wenn eine operative Therapie des Hyperaldosteronismus angestrebt wird. Bei der Nebennierenvenenkatheterisierung wird selektiv Blut aus den Nebennierenvenen entnommen und die Aldosteronkonzentration (bzw. der Aldosteron - Kortisol - Quotient) seitengetrent gemessen. Patienten mit Lateralisation (dreifach oder vierfach erhöhte Produktion von Aldosteron durch eine Nebennierenrinde im Vergleich zur Gegenseite) werden einer operativen Adrenalectomie zugeführt, Patienten ohne Lateralisation profitieren von einer medikamentösen Therapie (36).

Die Nebennierenvenenkatheterisierung ist trotz ihrer Invasivität ein wichtiges diagnostisches Mittel, da Aldosteron - produzierende Adenome einerseits häufig von geringem Durchmesser sind und somit in der Bildgebung oft nicht erkannt werden, und da andererseits mit größeren, hormonell nicht aktiven Knoten der ipsi- oder kontralateralen Nebennierenrinde verwechselt werden können (2). So stimmen bei 38 % der Patienten die Ergebnisse der Bildgebung und der Nebennierenvenenkatheterisierung nicht überein (55).

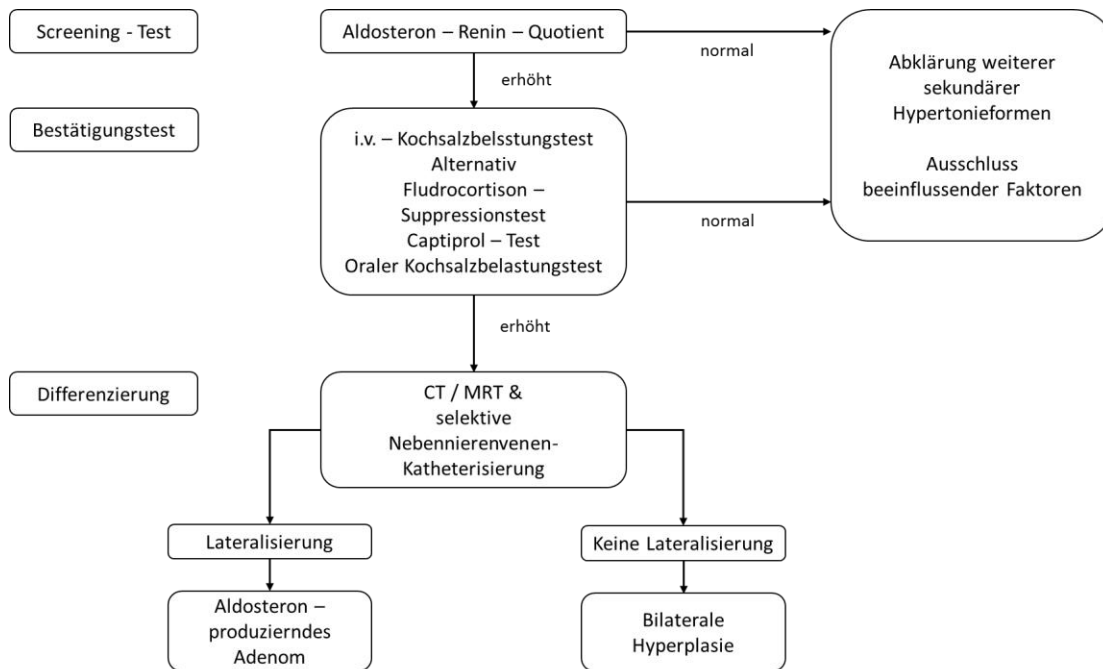


Abbildung 4: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf primären Hyperaldosteronismus nach Potthoff et al. (18)

1.2.1.5. Therapie des primären Hyperaldosteronismus

Die Therapie des primären Hyperaldosteronismus erfolgt in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Ätiologie operativ oder medikamentös.

Bei einem Aldosteron - produzierenden Adenom wird primär operativ vorgegangen und eine Adrenalectomie durchgeführt. Diese erfolgt meist laparoskopisch oder retroperitoneoskopisch (21). Bei Verdacht auf Nebennierenrindenzinom wird ein offener Zugang gewählt (56). Um eine postoperative Zona Glomerulosa - Insuffizienz zu vermeiden, wird vier bis sechs Wochen vor der Operation täglich Spironolacton verabreicht (18). Kommt es dennoch postoperativ zu einem Versagen der durch die erhöhten Aldosteronspiegel supprimierten und atrophierten Zona Glomerulosa der gesunden Nebenniere, wird temporär Fludrocortison substituiert (57). Die Operation führt als kausale Therapie bei fast allen Patienten zu einer Normalisierung des Kaliumhaushaltes und zu einer Verbesserung der Hypertonie. Bei vierzig Prozent kommt es nach der Operation zur Normotonie ohne Notwendigkeit einer weiteren antihypertensiven Medikation (36).

Bei der bilateralen Nebennierenrindenzinomie wird ein lebenslanger medikamentöser Therapieansatz gewählt. Standard ist die Therapie mit einem Aldosteronantagonisten (Spironolacton oder Eplerenon). Spironolacton ist stärker wirksam als Eplerenon und hat eine

längere Halbwertszeit, weist aber antiandrogene Nebenwirkungen auf. Häufig reicht die Einnahme eines Aldosteronantagonisten zur Blutdruckeinstellung nicht aus, sodass er oft mit einem kaliumsparenden Diuretikum, beispielsweise Amilorid oder Triamteren, kombiniert wird (18). Familiäre Formen des Hyperaldosteronismus werden auf die gleiche Art wie die bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie behandelt. Auf Besonderheiten der Therapie des familiären Hyperaldosteronismus Typ I wurde bereits eingegangen.

1.2.2. *Das Inzidentalom*

Durch den breiten Einsatz von Schnittbildverfahren in der Medizin werden zunehmend Raumforderungen der Nebennieren bei Patienten entdeckt, welche keine bekannte Erkrankung der Nebennieren und keine entsprechenden klinischen Symptome aufweisen. Diese tumorartigen Läsionen werden als Inzidentalome bezeichnet. Definitionsgemäß sind Inzidentalome Raumforderungen der Nebennieren mit einer Größe von über einem Zentimeter, welche zufällig im Rahmen einer radiologischen Untersuchung entdeckt werden. Strenggenommen sollte vor der Entdeckung des Inzidentaloms kein Verdacht auf eine Nebennierenerkrankung bestehen, und die Bildgebung sollte aufgrund einer anderen Verdachtsdiagnose durchgeführt werden (58).

In diesem Sinne sind Patienten mit bereits bestehenden Symptomen, welche auf eine autonome Hormonproduktion von Seiten der Nebenniere hinweisen, von dieser Diagnose ausgeschlossen. Auch bei Patienten mit bekannten Tumorleiden spricht man bei einer zufällig entdeckten Raumforderung der Nebenniere nicht von einem Inzidentalom, da es sich bei 50 bis 75 % um eine Metastase des Primarius handelt (43).

1.2.2.1. Prävalenz des Inzidentaloms

Die Häufigkeit von Inzidentalomen hängt von der Auflösung der verwendeten CTs und MRTs ab. In der Literatur wird eine Inzidenz von einem (59) bis vier Prozent bei radiologischen Untersuchungen (43) beschrieben. Die Prävalenz der Inzidentalome steigt mit zunehmenden Alter. In radiologischen Untersuchungen wurden Inzidentalome bei 0,2 bis 1 % der unter dreißigjährigen Patienten und bei 7 % der über Siebzigjährigen gefunden (43).

Diese Zahlen zur Prävalenz von Inzidentalomen werden durch pathologische Untersuchungen bestätigt. Im Rahmen von autopsischen Studien wurden bei sechs Prozent der Nebennieren Knoten gefunden, welche nicht durch eine Schnittbildgebung vorbeschrieben waren (43). Die

pathologische Untersuchung kann allerdings auch sehr kleine Läsionen entdecken, die den bildgebenden Verfahren verborgen bleiben.

1.2.2.2. Differentialdiagnose des Inzidentaloms

Inzidentalome sind Raumforderungen der Nebenniere mit unterschiedlichem Ursprung. Laut National Institute of Health Consensus Conference aus dem Jahre 2002 sind 70 % der Inzidentalome hormonell inaktiv, 15 % sind Metastasen extraadrenaler Tumoren (56). Tumore, die häufig in die Nebenniere metastasieren, sind das kleinzellige Lungenkarzinom, das klarzellige Nierenzellkarzinom und das maligne Melanom (60). Eine subklinische Kortisolproduktion weisen 10 % der Inzidentalome auf, 2 bis 5 % eine subklinische Aldosteronproduktion und 3 bis 5 % sind Phäochromozytome (43). Karzinome machen insgesamt nur 2 % der Inzidentalome aus. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Karzinom vorliegt, stark von der Größe der Läsion abhängig. Der Anteil an Karzinomen beträgt bei Inzidentalomen mit einem Durchmesser von unter vier Zentimetern 2 %, bei Läsionen unter sechs Zentimetern 6 % und bei Raumforderungen über sechs Zentimetern 25 % (56).

1.2.2.3. Diagnostisches Vorgehen bei Vorliegen eines Inzidentaloms

Angesichts eines Inzidentaloms müssen zwei Fragen geklärt werden:

- Ist die Läsion benigne oder maligne?
- Liegt eine Hormonproduktion vor, oder ist die Läsion hormonell inaktiv?

Die Dignität der Raumforderung wird mittels Schnittbildgebung (kontrastmittelunterstützter Computertomographie oder Magnetresonanztomographie) beurteilt. Dabei werden in der Computertomographie die Dichte in Hounsfield Units (HU), das Kontrastmittelverhalten und die Morphologie des Inzidentaloms beurteilt. Eine Feinnadelpunktion sollte nur im Einzelfall erfolgen, da bei malignen Tumoren die Gefahr der Tumorzellverschleppung und bei einem Phäochromozytom die Gefahr der hypertensiven Krise besteht (56).

Per definitionem sollten Patienten mit Inzidentalomen keine klinischen Symptome eines Hormonexzesses aufweisen. Dennoch können subklinische Veränderungen der Hormonproduktion bestehen. Bis zu zwanzig Prozent der Patienten mit inaktivem Inzidentalom entwickelt im Laufe der Jahre eine exzessive Hormonproduktion, weshalb mindestens eine laborchemische Kontrolle empfohlen wird (43).

Zur Beurteilung der Hormonproduktion werden folgende Parameter bestimmt:

	Hyperkortisolismus	Phäochromozytom	Hyperaldosteronismus
Screening	Dexamethason -Hemmtest ± Mitternachtskortisol im Speichel ± freies Kortisol im 24h Urin + ACTH / DHEA - S	Plasma - Metanephrine	Aldosteron - Renin - Quotient
Bestätigung	Mind. 2 pathologische Tests zur Diagnosestellung	Metanephrine im 24h - Sammelurin	Intravenöser Kochsalztest, anschließend ggf. Nebennierenvenenkatheter

Tabelle 2: Diagnostische Schritte zur Beurteilung der hormonellen Funktionalität eines Inzidentaloms. Angepasst nach Fischer et al. (43)

1.2.2.4. Therapie des Inzidentaloms

Die Therapie des Inzidentaloms ist abhängig von dessen Größe und Hormonproduktion. Bei allen Läsionen über vier Zentimeter Durchmesser und bei allen Tumoren mit nicht sicher auszuschließender Malignität in der Bildgebung wird eine operative Entfernung der Raumforderung angestrebt. Ebenso werden hormonaktive Tumoren entfernt. Kleinere, hormonell inaktive Tumoren werden belassen und der Verlauf beobachtet. Bei Wachstum oder Hormonproduktion wird operativ vorgegangen (61). Bezüglich der Nachbeobachtung gibt es noch keine klaren Richtlinien.

1.3. Aktuelle Studien zur humanen Aldosteronsynthese - Expression

Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Klassifikation Aldosteron - produzierender Areale innerhalb der Zona Glomerulosa, die im Methodenteil näher erörtert wird, beruht auf dem aktuellen Stand der Forschung. In der vergangenen Dekade kam es aufgrund der Entwicklung spezifischer, gegen CYP11B1 und CYP11B2 gerichteter Antikörper zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf die Expression der Steroidhormon - produzierenden Enzyme der humanen Nebennierenrinde, die an dieser Stelle erwähnt sein sollen.

Seit der Beschreibung der Nebennieren - Histologie von Säugetieren durch Arnold im Jahre 1866 (62) wurde angenommen, die unterschiedlichen Zonen der humanen Nebennierenrinde seien strikt voneinander getrennt und konzentrisch um das Nebennierenmark angeordnet, wie es bei Nagern der Fall ist (24).

Immunhistochemische Untersuchungen von Nishimoto et al. (63) mittels gegen CYP11B2 und CYP11B1 gerichteter Antikörper dokumentierten im Jahr 2010 schließlich die Verteilung der Enzyme in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde gesunder humaner Nebennieren.

1.3.1. Die Enzymexpression der humanen Nebennierenrinde

Die funktionelle Charakterisierung der humanen Nebennierenrinde durch Nishimoto et al. (63) verwarf die bisherige Vorstellung einer konzentrischen Zonierung. Die Autoren bestätigten zwar die unterschiedliche Enzymexpression der Nebennierenzonen mit einer Expression von CYP11B1, dem Schlüsselenzym der Kortisolsynthese, in der Zona Fasciculata und einer Expression von CYP11B2, der Aldosteronsynthese, in der Zona Glomerulosa. Während jedoch alle Zellen der Zona Fasciculata CYP11B1 exprimierten, beschränkte sich die Expression von CYP11B2 auf einen Bruchteil jener Zellen, die histomorphologisch der Zona Glomerulosa angehörten. Innerhalb der Zona Glomerulosa fanden Nishimoto et al. (63) sowohl Zellen, die das für die Zone charakteristische Enzym CYP11B2 exprimierten, als auch Zellen, die weder eine Expression von CYP11B2 noch von CYP11B1 aufwiesen. Aufgrund dieser Expressionsform von CYP11B2 bezeichneten die Autoren die humane Zona Glomerulosa als diskontinuierlich.

Bei differenzierter Betrachtung der CYP11B2 - Expression der humanen Zona Glomerulosa unterschieden Nishimoto et al. (63) zwei charakteristische Erscheinungsformen: das konventionelle (conventional pattern) und das abgewandelte (variegated pattern) Expressionsmuster. Als konventionelle Zona Glomerulosa wurden diffus unter der Kapsel verteilte, einzeln oder in kleinen Gruppen liegende, Aldosteron - produzierende Zellen

bezeichnet, welche von Zellen ohne CYP11B2 - Expression umgeben waren. Nebennieren, welche ein abgewandeltes Muster aufwiesen, besaßen Cluster aus CYP11B2 - positiven Zellen, die sich in einer charakteristischen Form präsentierten und von Nishimoto et al. (63) die Bezeichnung Aldosterone Producing Cell Cluster (APCC) erhielten. Zusätzlich zu diesen APCCs wiesen die Nebennieren mit variegated pattern auch verstreut unter der Kapsel liegende, alveolär gruppierte Aldosteron - produzierende Zellen auf, welche den Zellen der Zona Glomerulosa mit konventioneller Aldosteronsynthese - Expression ähnelten. APCCs erstreckten sich von der Nebennierenkapsel bis tief in die Zona Fasciculata und wiesen eine Breite von 200 - 300 Mikrometern und eine Tiefe von 100 - 500 Mikrometern auf. Alle Zellen der APCCs exprimierten das Enzym Aldosteronsynthese, wiesen aber unterschiedliche Erscheinungsformen auf: Die Zellen der APCCs, die in Verbindung mit der Nebennierenrindenkapsel standen, ähnelten morphologisch Zona Glomerulosa - Zellen. Jene Zellen der APCCs, welche sich in die Zona Fasciculata erstreckten, zeigten denselben sinusoidalen Aufbau in Zellsträngen und dasselbe helle, lipidreiche Zytoplasma wie die Kortisol - produzierenden Zellen der Zona Fasciculata. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen den Zellen der angrenzenden Nebennierenzonen und denen innerhalb eines APCCs sowie dem gleichzeitigen Fehlen einer Kapsel waren APCCs nur mittels Immunhistochemie und nicht mittels Hämatoxylin - Eosin - Färbung darstellbar. Bei einer Doppelfärbung mit Antikörpern sowohl gegen CYP11B1 als auch gegen CYP11B2 konnte in den direkt an ein APCC angrenzenden Zellen keine Expression dieser Enzyme nachgewiesen werden. Da APCCs allein durch die CYP11B2 - Expression und somit ihrer Funktion, die Aldosteronproduktion, definiert wurden und sich morphologisch nicht von der konventionellen Zonierung der Nebennierenrinde unterscheiden ließen, waren Nebennieren mit konventioneller und abgewandelter Zona Glomerulosa Expression ohne spezifische Darstellung der Aldosteronsynthese voneinander nicht unterscheidbar.

Das Konzept der APCCs und die Unterscheidung zweier Ausprägungsformen der Zona Glomerulosa von Nishimoto et al. (63) wurde in späteren Publikationen aufgegriffen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten seine Ergebnisse bestätigen und darauf aufbauend eigene Untersuchungen durchführen.

1.3.2. Auftreten und Bedeutung der APCCs

Die Beschreibung der APCCs warf die Frage nach ihrer Bedeutung auf, vor allem im Rahmen der physiologischen Hormonproduktion und der Pathophysiologie Aldosteron - produzierender Adenome, die bis heute nicht vollständig beantwortet werden können.

In ihrer Studie untersuchten Nishimoto et al. (63) sowohl Nebennieren von gesunden Personen als auch von Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen. APCCs konnten die Autoren in etwas weniger als der Hälfte (42 %) der adenomtragenden Nebennieren, jedoch in der überwiegenden Mehrzahl (88 %) der Organe ohne bekannte endokrinologische Pathologie nachweisen. Peritumorale APCCs konnten Nishimoto et al. (63) ebenfalls in Nebennieren von Patienten mit Kortisol - produzierenden Adenomen nachweisen, obwohl die CYP11B2 - Expression in der restlichen Zona Glomerulosa dieser Patienten vollständig supprimiert war. Diese Beobachtungen verleiteten Nishimoto et al. (63) zum Schluss, APCCs seien auch bei supprimiertem Renin - Angiotensin - Aldosteron - System aktiv und könnten aufgrund ihrer nicht supprimierbaren und somit autonomen Aldosteronproduktion Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome darstellen.

Weitere Studien bestärkten die Theorie einer autonomen Hormonproduktion in APCCs. Nanba et al. (64) untersuchten Nebennieren von Patienten mit klinisch diagnostiziertem primären Hyperaldosteronismus immunhistochemisch. Alle Patienten wiesen in der präoperativ durchgeführten Diagnostik einen adrenalen Knoten in der Schnittbildgebung oder eine Lateralisation der Hormonproduktion bei der selektiven Nebennierevenenkatheterisation auf. Nach der Adrenalektomie wies der Großteil der Patienten (69 %) ein Aldosteron - produzierendes Adenom in der immunhistochemischen Untersuchung der Operationspräparate auf. Bei einem Viertel der Patienten wurde, trotz klinisch scheinbar gesicherter Diagnose, kein Hauptknoten mit CYP11B2 - Expression gefunden, sondern multiple APCCs. Einzelne Patienten wiesen eine diffuse Zona Glomerulosa - Hyperplasie auf, andere wiederum multiple adrenokortikale Noduli, von denen nur einzelne CYP11B2 exprimierten, während eine weitere Gruppe keine Aldosteron - produzierende Formationen aufwies, weder APCCs noch Adenome. Diese Vielfalt immunhistochemischer Befunde erstaunte angesichts der ähnlichen klinischen Symptomatik und der identischen präoperativen Diagnostik und unterstrich die Bedeutung einer histologischen Diagnosesicherung.

Die Hälfte der von Nanba et al. (64) untersuchten Patienten mit einem Aldosteron - produzierenden Adenom wies APCCs im peritumoralen Gewebe auf. Das Auftreten von APCCs in adenomtragenden Nebennieren interpretierten die Autoren als Hinweis für die fehlende Suppressibilität der Aldosteronproduktion in APCCs trotz hoher Hormonspiegel im Kreislauf. Eine erhöhte Aldosteronkonzentration im Blut, welche Symptome des primären Hyperaldosteronismus hervorruft, sollte durch negative Rückkoppelung ebenso zu einer Suppression der Hormonproduktion in der gesunden Zona Glomerulosa führen. Insofern sei das Vorhandensein von APCCs in tumortragenden Nebennieren ein Beweis für deren autonome, vom Renin - Angiotensin - Aldosteron - System ungekoppelte, hormonelle Aktivität.

In diesem Sinne, folgerten Nanba et al. (64), könnten APCCs das erste immunhistochemisch fassbare Korrelat einer autonomen Aldosteronproduktion darstellen, die sich potentiell zu einem hormonproduzierenden Adenom weiterentwickeln könnten.

Andererseits beschrieben Nanba et al. (64) eine signifikant höhere Anzahl an APCCs in Nebennieren von Personen, bei denen histologisch kein Adenom nachgewiesen wurde, im Vergleich zu Patienten mit einem Aldosteron - produzierenden Adenom. Diese Differenz könnte als Hinweis auf eine Suppression der hormonellen Aktivität der peritumoralen APCCs durch das Aldosteron - produzierende Adenom bei Individuen mit Adenom interpretiert werden, und würde der von Nishimoto et al. (63) aufgestellten Theorie der autonomen Aldosteronproduktion in APCCs widersprechen. Allerdings argumentierten Nanba et al. (64), alle untersuchten Nebennieren würden von Patienten mit einem klinisch diagnostizierten lateralisierenden primären Hyperaldosteronismus stammen. Sowohl Personen mit einem Aldosteron - produzierenden Adenom als auch jene mit multiplen APCCs wiesen in der präoperativen Blutuntersuchung eine erhöhte Aldosteronkonzentration bei supprimierter Reninkonzentration auf. In beiden Gruppen war somit präoperativ eine ausreichende Anzahl Aldosteron - produzierender Zellen vorhanden, um klinische Symptome und / oder laborchemische Veränderungen hervorzurufen. Für den klinisch relevanten Hormonexzess waren gemäß Nanba et al. (64) entweder ein Aldosteron - produzierendes Adenom oder mehrere APCCs verantwortlich. Allerdings konnten Nanba et al. (64) APCCs auch in Nebennieren von drei Personen ohne Nebennierenerkrankung nachweisen, im Durchschnitt fünf APCCs je Organ. Interessanterweise bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl von APCCs in Organen von gesunden Personen und in Nebennieren jener Patienten, die als Träger multipler APCCs klassifiziert worden waren, obwohl letztere Symptome eines primären Hyperaldosteronismus aufwiesen.

Die Untersuchungen von Nanba et al. (64) warfen zwei Fragen auf: Könnte die verminderte Anzahl von APCCs in adenomtragenden Nebennieren im Vergleich zu normalen und mit multiplen APCCs versehenen Nebennieren ein Hinweis auf die Supprimierbarkeit der Hormonproduktion innerhalb der APCCs darstellen? Könnten aufgrund ihres Auftretens in normalen Nebennieren die APCCs möglicherweise physiologische Strukturen ohne pathologische Bedeutung für die exzessive Hormonproduktion bei den betroffenen Patienten darstellen?

Nishimoto et al. (63) und Nanba et al. (64) verwendeten bei ihren Analysen polyklonale, durch Immunisation von Kaninchen gewonnene Antikörper. Im Jahre 2013 synthetisierten Gomez - Sanchez et al. (24) erstmals einen monoklonalen, gegen CYP11B2 gerichteten Antikörper,

welcher eine spezifischere Färbung der Aldosteronsynthese - exprimierende Zellen als die bisher bekannten, polyklonalen Antikörper gestattete.

Mittels immunhistochemischer Färbungen gesunder humaner Nebennieren mit dem monoklonalen Antikörper bestätigten Gomez - Sanchez et al. (24) die von Nishimoto et al. (63) beschriebenen Expressionsmuster der Aldosteronsynthese in der Zona Glomerulosa und das Auftreten von APCCs. Laut Gomez - Sanchez et al. (24) ähnelten humane APCCs rein morphologisch der Zona Glomerulosa von Ratten, welche mit salzreicher Diät ernährt wurden. Jene Tiere, die über ihre Ernährung einen Natriumüberschuss zu sich nahmen, zeigten anstelle der speziestypischen kontinuierlichen Zona Glomerulosa Expression bloß Nester Aldosteron - produzierender Zellen, welche von Zellen ohne CYP11B2 Expression umgeben waren. Trotz veränderter Expression von CYP11B2 in der Zona Glomerulosa blieb Aldosteron im Plasma der Tiere nachweisbar (24). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Rolle der Ernährung, insbesondere der Natriumzufuhr, auf die humane Zona Glomerulosa und auf die Bildung von APCCs beim Menschen noch ungeklärt. Sollten APCCs durch den Salzkonsum beeinflussbar sein, würde dies gegen deren autonome Hormonproduktion und deren Bedeutung als Vorläufer Aldosteron - produzierender Knoten sprechen und stünde damit der Hypothese von Nishimoto et al. (63) und Nanba et al. (64) entgegen.

1.3.3. Erstbeschreibung von Foci

Eine weitere Analyse der adrenalen CYP11B2 - Expression bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen und von Personen ohne bekannte endokrinologische Erkrankung erfolgte durch Boulkroun et al. (65). Die Autoren untersuchten die funktionelle Morphologie der Zona Glomerulosa mittels Antikörper, die gegen CYP11B2, gegen CYP11B1 und gegen Disabled 2 (Dab2) gerichtet waren. Disabled 2 ist ein Enzym, das als Marker für Zellen der Zona Glomerulosa bei Nagern und Menschen dient.

In den immunhistochemischen Untersuchungen deckte sich die in der Hämatoxylin - Eosin - Färbung histomorphologisch definierte Zona Glomerulosa mit den Disabled 2 - exprimierenden Zellen, während nur ein Bruchteil der Zona Glomerulosa - Zellen CYP11B2 exprimierten. Boulkroun et al. (65) folgerten daraus, dass die Aldosteronproduktion bei gesunden Individuen nicht in der gesamten Zona Glomerulosa erfolge; vielmehr seien bestimmte Areale endokrin inaktiv, möglicherweise aufgrund von Veränderungen des Wasser - und Salzhaushaltes, wie beispielsweise durch eine erhöhte Natriumzufuhr mit der Nahrung oder durch Medikamenteneinnahme.

In Anlehnung an Nishimoto et al. (63) unterschieden Boulkroun et al. (65) zwei Muster der Aldosteronsynthese - Expression: ein konventionell - kontinuierliches und ein fokales. Bei der detaillierteren Analyse der fokalen Aldosteronsynthese - exprimierenden Formationen unterschieden Boulkroun et al. (65) Foci, Megafoci und APCCs. APCCs beschrieben sie als Zellhaufen, deren äußere Zellschicht Kontakt zur Kapsel und die inneren eine sinusoidale Anordnung aufwiesen (63, 65). Die Zellen der APCCs wiesen eine ausgeprägte CYP11B2 - Expression ohne Nachweis von Disabled 2 oder CYP11B1 auf. Im Gegensatz dazu führten Boulkroun et al. (65) für CYP11B2 - und Disabled 2 - exprimierende Zellansammlungen ohne CYP11B1 - Expression, die in fokaler Anordnung verstreut in Kapselnähe lagen, den Begriff Foci ein. Je nach Größe des Durchmessers der Foci (größer oder kleiner als 300 Mikrometer) wurden diese als Megafoci oder einfach als Foci bezeichnet.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung Aldosteron - produzierender Adenome konnten Boulkroun et al. (65) bei einem Großteil der Adenome eine Coexpression von CYP11B2 und Disabled 2, gelegentlich auch eine Coexpression von CYP11B1, CYP11B2 und Disabled 2 nachweisen. Die Anzahl an Megafoci war im peritumoralen Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, die Anzahl der APCCs und der Foci nicht. Da in ihren Studien APCCs im peritumoralen Gewebe in gleicher Anzahl wie in Nebennieren gesunder Kontrollen vorkamen und da APCCs im Gegensatz zu Foci, Megafoci und Aldosteron - produzierenden Adenomen keine Disabled 2 - Expression aufwiesen, distanzieren sich Boulkroun et al. (65) von der These, APCCs seien Vorläufer von Adenomen. Die von Nishimoto et al. (63) postulierte autonome Aldosteronproduktion in APCCs konnten Boulkroun et al. (65) somit nicht bestätigen.

Interessanterweise beschrieben Boulkroun et al. (65) in Adenom - tragenden Nebennieren anstelle der erwarteten Suppression der CYP11B2 - Expression durch erhöhte periphere Hormonspiegel keine peritumorale Suppression der Zona Glomerulosa, sondern in 56 % der untersuchten Individuen sogar eine Hyperplasie mit fokaler Verdickung oder kontinuierlicher Ausbreitung der Aldosteronsynthese.

Auf ähnliche Erkenntnisse stießen später auch Dekkers et al. (66), während die Versuche von Nakamura et al. (67) ein entgegengesetztes Ergebnis erbrachten. Nakamura et al. (73) beschrieben zwar eine Hyperplasie der an das Adenom grenzenden Zona Glomerulosa in der histologischen Untersuchung, in der immunhistochemischen Analyse fanden sie allerdings eine signifikant geringere Aldosteronsynthese - Expression in den Zellen der hyperplastischen Zona Glomerulosa im Vergleich zu den Adenomzellen. Die Frage der hormonellen Aktivität der Zona Glomerulosa in adenomtragenden Nebennieren bleibt somit ungeklärt.

1.3.4. Die Bedeutung nodulärer Strukturen der Nebenniere

Besonderes Augenmerk richteten Boulkroun et al. (65) auf histologische Veränderungen des peritumoralen Gewebes, insbesondere auf die Vaskularisation und die Nodulation. Die Nebennieren jener Patienten, die an Aldosteron - produzierenden Adenomen litten, wiesen zahlenmäßig mehr mikroskopisch und makroskopisch erkennbare Noduli als die Kontrollgruppe auf. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Nodulation im peritumoralen Gewebe und der Anzahl an APCCs, Foci, Megafoci oder klinischen Parametern (Aldosteronspiegel im Urin, Kalium im Plasma). Da die verstärkte Knotenbildung in der Umgebung Kortisol - produzierender Adenome nicht auftrat, vermuteten die Autoren eine Wechselwirkung zwischen Aldosteron - produzierenden Adenomen und der Bildung von Noduli.

Boulkroun et al. (65) diskutierten folgende Möglichkeiten, um einen Zusammenhang zwischen Aldosteron - produzierenden Adenomen und der verstärkten Nodulation adenomtragender Nebennieren im Vergleich zu Gesunden zu erklären:

- Die Nodulation sei Folge eines „tissue remodelings“, welches durch den erhöhten Aldosteronspiegel in der Umgebung des Adenoms entstände
- Die Nodulation sei ein physiologischer Alterungsprozess der Nebenniere, der mit zunehmenden Alter und mit zunehmender Dauer einer eventuell vorbestehenden Hypertonie zunehme
- Noduli seien Vorläuferläsionen von Aldosteron - produzierenden Adenomen, wobei für diese These noch weitere Evidenz gesammelt werden müsse

1.3.5. CYP11B2 - und CYP11B1 - Expression Aldosteron - produzierender Adenome

Sowohl Nanba et al. (64) als auch Nishimoto et al. (63) untersuchten neben peritumoralen Nebennierengewebe auch die Enzymexpression innerhalb Aldosteron - produzierender Adenome. Die von Nishimoto et al. (63) untersuchten aldosteronproduzierenden Adenome exprimierten in unterschiedlichem Ausmaß sowohl Enzyme der Aldosteron - als auch der Kortisolsynthese. Dabei unterschieden die Autoren mittels immunhistochemischer Doppelfärbung drei Zelltypen innerhalb eines Adenoms: Zellen mit Aldosteronsynthese - Expression (CYP11B1+/CYP11B2-), Zellen mit Expression Kortisol - produzierender Enzyme (CYP11B1-/CYP11B2+) und Zellen, in denen weder Enzyme der Aldosteron - noch der Kortisolsynthese (CYP11B1-/CYP11B2-) nachweisbar waren. Die meisten Adenome wiesen

Zellen aller drei Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß auf. In ähnlicher Weise unterschieden Nanba et al. (64) bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen zwischen Adenomen mit reiner CYP11B2 - Expression und Adenomen mit Coexpression von CYP11B1 und CYP11B2. Der basale ACTH - und Kortisolspiegel war in beiden Gruppen gleich, allerdings besaßen die Patienten mit CYP11B2/CYP11B1 - Coexpression im Durchschnitt größere Adenome und niedrigere Kaliumspiegel.

Analog zur Enzymexpression konnten auch zwei morphologisch unterschiedliche Gruppen von Adenomen unterschieden werden: Adenome mit überwiegend Zona Fasciculata - artigen Zellen und Adenome, deren Zellen denen der Zona Glomerulosa glichen. Die Vielfalt Aldosteron - produzierender Adenome verschiedener Patienten, sowohl in der Morphologie als auch in der Enzymexpression, weckte bei den Autoren die Vermutung, die Tumoren entstünden entweder aus unterschiedlichen Vorläuferzellen oder aus undifferenzierten Vorläuferzellen, welche sowohl die Fähigkeit zur Aldosteron - als auch zur Kortisolproduktion besäßen.

1.3.6. CYP11B2 - Expression im Verhältnis zur Adenomgröße

Die Bedeutung mikronodulärer Nebennieren - Strukturen untersuchten Karashima et al. (68) an Patienten, bei denen die Diagnose eines primären lateralisierenden Hyperaldosteronismus mittels Nebennierenvenenkatheter gestellt und erst nach der Adrenalectomie mittels Histopathologie ein Aldosteron - produzierendes Adenom nachgewiesen worden war. Karashima et al. (68) unterschieden zwischen Patienten mit kleinen Aldosteron - produzierenden Knoten (Mikroadenomen, Durchmesser unter sechs Millimeter) und klassischen, größeren Adenomen (Makroadenomen, Durchmesser über sechs Millimeter). Patienten mit Mikro - und Makroadenomen unterschieden sich weder klinisch, noch bezüglich der Renin - Aldosteron - Ratio und des Kaliumspiegels im Blut.

Mittels Realtime - PCR Untersuchungen der mRNA - Expression verschiedener Enzyme der Steroidsynthese wiesen Karashima et al. (68) eine stärkere CYP11B1 - und eine schwächere CYP11B2 - Expression bei Makroadenomen als bei Mikroadenomen nach. Zu einem vergleichbaren Ergebnis gelangten Nanba et al. (64) bei immunhistochemische Färbungen: Die Stärke der CYP11B2 - Expression innerhalb eines Aldosteron - produzierenden Adenoms korrelierte invers mit der Größe des Adenoms. Diese Erkenntnisse bieten eine Erklärung dafür, dass Mikroadenome trotz geringerer Zellmasse ausreichend Aldosteron produzieren, um klinische Symptome eines Hyperaldosteronismus hervorzurufen. Inwiefern diese Aussage verallgemeinert werden kann, ist fraglich. Beide oben genannten Studien untersuchten

Nebennieren von Patienten mit klinischen Symptomen eines Hyperaldosteronismus. Voraussetzung für die Entwicklung klinischer Symptome ist ein erhöhter Aldosteronspiegel im Blut. Erhöhte Hormonspiegel können sowohl Ergebnis eines kleinen, hochaktiven Adenoms als auch eines größeren, aber weitgehend hormonell inaktiven Adenoms sein. Womöglich ist die inverse Korrelation zwischen Aldosteronproduktion und Adenom - Größe nur aufgrund der Selektion symptomatischer Patienten sichtbar und verschwindet bei der Untersuchung von CYP11B2 - exprimierenden Mikroadenomen einer klinisch asymptomatischen Population.

Karashima et al. (68) fanden zudem eine stärkere CYP11B2 - Expression im peritumoralen Gewebe von Patienten mit Mikroadenomen im Vergleich zu Patienten mit Makroadenomen. Die naheliegende Schlussfolgerung, Mikroadenome produzierten nicht genügend Aldosteron, um die benachbarte Zona Glomerulosa zu unterdrücken, scheint angesichts der klinischen Symptomatik, welche durch hohe Aldosteronspiegel hervorgerufen wird und sich nicht von derer von Patienten mit adrenalen Makroadenomen unterscheidet, unwahrscheinlich. Die Autoren formulierten die Vermutung, die histologisch identifizierten Mikroadenome würden sich auf dem Boden einer unphysiologisch aktivierten Zona Glomerulosa entwickeln. Die übermäßige Aktivierung der Aldosteronproduktion in der Zona Glomerulosa, welche den Ausgangspunkt für die Entwicklung von Aldosteron - produzierenden Adenomen darstellen würde, wäre bei Mikroadenomen noch nachweisbar, bei Makroadenomen, die über einen längeren Zeitraum wachsen, hingegen nicht mehr.

1.3.7. Genetische Untersuchungen Aldosteron - produzierender Adenome

Nachdem mehrere Studien mittels immunhistochemischer Färbungen die funktionelle Anatomie der humanen Zona Glomerulosa beleuchtet hatten, blieb weiterhin die Frage nach dem Entstehungsmechanismus Aldosteron - produzierender Adenome und nach der Bedeutung der neu beschriebenen APCCs offen.

Seitdem 2011 Choi et al. (32) erstmals eine *KCNJ5* - Mutation als Auslöser für die exzessive Hormonproduktion bei Aldosteron - produzierenden Adenomen beschrieben hatten, wandte sich das Interesse der Forschungsgemeinde den genetischen Hintergründen des primären Hyperaldosteronismus zu. Mehrere Mutationen mit fördernder beziehungsweise potenzierender Wirkung auf die Aldosteronproduktion wurden in der Folge identifiziert. Laut Zennaro et al. (27) können aktuell in etwa 50 % aller Aldosteron - produzierenden Adenome Mutationen in einem der folgenden Gene nachgewiesen werden: *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* und *ATP2B3*.

Eine histologische, immunhistochemische und genetische Charakterisierung Aldosteron - produzierender Adenome und insbesondere des an die Adenome angrenzenden Gewebes erfolgte durch Monticone et al. (54). Die Autoren untersuchten Nebennieren von Patienten, denen die klinische Diagnose eines Aldosteron - produzierenden Adenoms gestellt wurde, mittels Immunhistochemie und DNA - Sequenzierung. In der immunhistochemischen Untersuchung fanden Monticone et al. (54) bei 77 % der Patienten ein singuläres Adenom der Nebenniere, bei den restlichen 23 % eine multinoduläre Hyperplasie. Auf ähnliche Ergebnisse stießen auch Dekkers et al. (66). Die Autoren sahen damit das bisherige Modell des primären Hyperaldosteronismus, welches ätiologisch das unilaterale Adenom von der bilateralen diffusen Hyperplasie unterscheidet, widerlegt. Vielmehr plädierten sie für einen fließenden Übergang zwischen den beiden Entitäten, wobei die unilaterale multinoduläre Hyperplasie der Nebennierenrinde als Intermediärstufe fungieren könnte. Monticone et al. (54) fanden in 45 % der untersuchten Nebennieren im Gewebe, welches nicht dem eigentlichen Adenom angehörte, APCCs. APCCs traten häufiger in multinodulären Nebennieren auf als in Organen mit einem einzelnen Adenom. In der DNA Sequenzierung wiesen die Hälfte (51 %) der untersuchten Adenome eine mit Hyperaldosteronismus assoziierte Mutation auf: bei 38 % konnten *KCNJ5* -, bei 4,2 % *CACNA1D* - und bei 38 % ATPase - Mutationen (*ATP1A1* und *ATP2B3*) nachgewiesen werden.

Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten Dekkers et al. (66) bei der Untersuchung von Nebennieren von Patienten mit einem klinisch diagnostizierten lateralisierenden primären Hyperaldosteronismus. Mittels Histologie unterschieden sie zwischen Nebennieren mit solitären Adenomen oder mit multinodulärer Hyperplasie, je nachdem, ob ein singulärer oder mehrere adrenale Knoten nachgewiesen werden konnten. Obwohl über die Hälfte der untersuchten Nebennieren multiple Knoten aufwiesen, war meist nur ein einziger Knoten hormonell aktiv und entsprach der Definition eines Aldosteron - produzierenden Adenoms. Multiple APCCs wiesen 51 % der von Dekkers et al. (66) untersuchten Nebennieren auf, unter anderen auch vier Nebennieren, in denen kein Aldosteron - produzierender Knoten gefunden wurde. Dies wurde als möglicher Hinweis dafür gewertet, dass in diesen Nebennieren ohne Adenom die multiplen APCCs für die exzessive Hormonproduktion, welche zur Diagnose Hyperaldosteronismus geführt hatte, verantwortlich seien. Zwischen dem Vorhandensein der APCCs und weiteren immunhistochemischen oder klinischen Parametern der Nebenniere konnten Dekker et al. (66) keinen Zusammenhang nachweisen.

Neben der histologischen und immunhistochemischen Charakterisierung untersuchten Dekkers et al. (66) die adrenalen Noduli auch genetisch. Eine *KCNJ5* - Mutation konnten die

Autoren in 62 % der Nebennieren mit singulärem Aldosteron - produzierenden Adenom und in 32 % der multinodulären Nebennieren nachweisen. In einer Nebenniere, in der zwei Noduli somatische Mutationen trugen, waren sogar zwei unterschiedliche Mutationen des *KCNJ5* - Gens zu finden. *ATP2B3* - Mutationen trugen 9 % der solitären Adenome, während *ATP1A1* - oder *CACNA1D* - Mutationen nur in je einem Knoten einer multinodulären Nebenniere nachgewiesen wurde. Bis auf einen einzigen Fall wurden die Mutationen immer nur in einem, meist dem größten, Aldosteron - produzierenden Knoten nachgewiesen. Die Autoren folgerten, dass Mutationen, welche für die unkontrollierte Hormonproduktion in Aldosteron - produzierenden Adenomen verantwortlich sind, erst zu einem späten Zeitpunkt der Tumorgenese erfolgen. Die Nodulation hingegen könnte einerseits das erste histologisch erkennbare Korrelat eines Aldosteron - produzierenden Adenoms darstellen, wenn Noduli bereits in frühen Stadien der Adenomgenese entstehen und sich nach Akkumulation von Mutationen zu einem Tumor weiterentwickeln. Andererseits könnte die Nodulation einen physiologischen Prozess darstellen und beispielsweise im Rahmen des Alterns oder aufgrund einer salzreichen Diät entstehen. Die hohe Prävalenz von Nebennierenknoten, sowohl bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen als auch in der asymptomatischen Bevölkerung, spricht für die zweite These und gegen eine pathologische Bedeutung der Noduli. Sie lässt vermuten, die Knotenbildung in der Nebenniere und die hormonelle Aktivität einzelner Knoten seien zwei unterschiedliche Prozesse, deren Zusammentreffen erst die Entstehung eines Aldosteron - produzierenden Tumors ermöglichten.

1.3.8. Genetische Untersuchungen von Nebenknoten

Neben Aldosteron - produzierenden Adenomen versuchten verschiedene Arbeitsgruppen auch mögliche Vorläuferläsionen der Adenome genetisch zu analysieren. Insbesondere war der Mutationsstatus von Noduli, die neben einem Aldosteron - produzierenden Adenom beobachtet wurden (sogenannte sekundäre Noduli oder Nebenknoten) Gegenstand dieser Untersuchungen.

Fernades - Rosa et al. (69) untersuchten bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenom sowohl das Adenom (Hauptknoten) als auch sekundäre Aldosteron - produzierende Noduli (Nebenknoten) auf die häufigsten bei Hyperaldosteronismus bekannten Mutationen: *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3*. Von den Hauptknoten wiesen 30 % eine *KCNJ5* - Mutation, 26 % eine *CACNA1D* - Mutation, 7 % eine *ATP1A1* - Mutation und 37 % keine Mutation auf.

Bei detaillierterer Analyse der Nebennieren mit *KCNJ5* - Mutationen im Hauptknoten konnte in der Hälfte der Fälle im Nebenknoten dieselbe *KCNJ5* - Mutation wie im Hauptknoten nachgewiesen werden. Eine Nebenniere mit drei Aldosteron - produzierenden Nebenknoten trug eine *KCNJ5* - Mutation im Hauptknoten und in zwei der Nebenknoten, während der dritte keine Mutation aufwies. Insgesamt wiesen 59 % der Nebennieren, welche eine Mutation im Hauptknoten trugen, keine genetische Veränderung in den Nebenknoten auf. Nebennieren, in deren Hauptknoten keine Mutationen gefunden wurden, wiesen in 90 % keine Mutation im Nebenknoten auf, bei 10 % war letzterer *KCNJ5* - mutiert. Unabhängig vom Mutationsstatus des Hauptknotens trugen somit alle Nebenknoten, in denen eine Mutation nachgewiesen wurde, eine *KCNJ5* - Mutation. Da *KCNJ5* - Mutationen die häufigste nachgewiesene genetische Veränderung bei Aldosteron - produzierenden Adenomen darstellen, erwarteten die Autoren ein vermehrtes Auftreten dieser Mutation. Bemerkenswert war jedoch der Nachweis von *KCNJ5* - Mutationen in Nebenknoten, wenn der Hauptknoten nicht mutiert war oder eine *CACNA1D* - Mutation trug.

Einschränkend gilt jedoch, dass gegenwärtig in nur etwa der Hälfte aller Aldosteron - produzierenden Adenome Mutationen nachgewiesen werden können. Jene Haupt - und Nebenknoten, in denen Fernades - Rosa et al. (69) keine Mutationen nachwies, könnten genetische Veränderungen tragen, welche aktuell nicht bekannt sind. Diese Mutationen könnten ebenso wie *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* und *ATP2B3* die Hormonproduktion anregen, oder hingegen die Proliferation nodulärer Strukturen fördern.

1.3.9. Genetische Untersuchungen der APCCs

Einen Einblick in die genetischen Hintergründe der APCCs lieferten Nishimoto et al. (70), indem sie mittels Micro - Array sie das Transkriptom von APCCs mit dem des normalen adrenalen Gewebes gesunder Nierenspende verglichen. Das Transkriptom der APCCs zeigte eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Transkriptom der Zona Glomerulosa. APCCs besaßen jedoch eine verstärkte Expression der Aldosteronsynthese im Vergleich zu Zona Glomerulosa - Zellen. APCCs wiesen zudem einige Gemeinsamkeiten mit Zellen der Zona Fasciculata auf, während das Transkriptom von Zellen der Zona Reticularis große Unterschiede zu dem der APCCs zeigte. Nishimoto et al. (70) folgerten, APCCs entstünden aus Zellen der Zona Glomerulosa.

Um einen genetischen Zusammenhang zwischen APCCs und Aldosteron - produzierenden Adenomen aufzudecken, suchten Nishimoto et al. (70) in APCCs nach Mutationen der Gene *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* und *ATP2B3*. In 35 % der APCCs fanden sie eine der genannten

Mutationen, ohne dass diese Mutation im angrenzenden Gewebe nachweisbar war, wobei 26 % der APCCs Mutationen des *CACNA1D* - Gens trugen und 9 % der APCCs des *ATP1A1* - Gens. Das Vorhandensein dieser, für Aldosteron - produzierende Adenome typischen Mutationen interpretieren die Autoren als Hinweis, dass APCCs Vorläuferläsionen dieser Tumore darstellen würden. Bemerkenswerterweise waren in keinem APCC Mutationen des *KCNJ5* - Gens nachweisbar, obwohl diese die häufigste Mutation bei klinisch diagnostizierten Aldosteron - produzierenden Adenomen darstellt. Ferner fanden Nishimoto et al. (70) zwei APCCs mit unterschiedlichen Mutationen innerhalb einer Nebenniere und folgerten, einzelne APCCs entstünden unabhängig voneinander aus Zellen der Zona Glomerulosa infolge somatischer Mutationen, welche zu einer autonomen Hormonproduktion führten.

In ihrem Kollektiv aus vierzig gesunden Nierenspendern konnten Nishimoto et al. (70) keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Rasse (Kaukasier, Hispanisch, Afroamerikaner) oder Alter der untersuchten Person und der Anzahl von APCCs in den Nebennieren nachweisen. Allerdings fanden die Autoren (70) signifikant mehr APCCs bei Frauen als bei Männern. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung nach Alter und Rasse erhalten. Alter, Geschlecht und Rasse zeigten keinen Einfluss auf das Vorhandensein von Mutationen innerhalb der APCCs. Allerdings konnten in Nebennieren mit einer höheren Anzahl an APCCs häufiger Mutationen in den einzelnen APCCs nachgewiesen werden.

Neben Nishimoto et al. (70) versuchten auch Fernades - Rosa et al. (69), die genetischen Ursprünge der APCCs aufzudecken. Bei der Untersuchung von Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen detektierten die Autoren in 22 % der Adenom - tragenden Nebennieren ein oder mehrere APCCs. Allerdings konnten Fernades - Rosa et al. (69) mittels Sanger - Sequenzierung in keinem APCCs Mutationen von *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* oder *ATP2B3* nachweisen. Dies interpretierten die Autoren als Hinweis, dass APCCs entweder keine oder sehr frühe Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome darstellen würden, bei denen die typischen Mutationen erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Adenomgenese auftreten würden. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse von Fernades - Rosa et al. (69) und Nishimoto et al. (70) kann aktuell keine gesicherte Aussage zu den genetischen Ursprüngen der APCCs getroffen werden. Auch die Frage, ob diese Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome darstellen, bleibt offen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Morphologie der Zona Glomerulosa in einer gesunden Kohorte zu beschreiben und daraus Erkenntnisse über die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms zu gewinnen.

Asymptomatische Nebennierenknoten unklarer Ätiologie werden häufig bei Patienten gefunden, die aus anderweitigen Gründen einer abdominalen Bildgebung unterzogen werden. Die Bedeutung dieser Inzidentalome in Bezug auf die Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus und insbesondere des Aldosteron - produzierenden Adenoms ist gegenwärtig unklar. Wir untersuchten das Auftreten und die Häufigkeit Aldosteron - produzierender Noduli, mögliche subklinische Vorstufen hormonproduzierender Adenome. Neben der Untersuchung mikro - und makronodulärer Strukturen der Nebenniere richteten wir unser Augenmerk auf die Bedeutung fokaler Aldosteron - produzierender Formationen der Nebenniere. Ferner untersuchten wir die Stärke der Aldosteronsynthese - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa und das Auftreten einer Suppression oder Hyperplasie derselben.

Neben der Beschreibung der physiologischen Formen der Aldosteronproduktion war die Korrelation der morphologischen Daten mit dem Alter, dem Geschlecht und dem Body - Mass - Index der untersuchten Individuen ein wichtiger Aspekt unserer Studie. Dies ermöglichte uns, mögliche Einflussfaktoren auf die Aldosteronproduktion und die Adenomentstehung zu identifizieren. Die Korrelation der Ausprägung adrenaler Aldosteron - produzierender Strukturen untereinander hingegen ermöglichte uns, mögliche Wechselbeziehungen zwischen den Läsionen aufzudecken.

Schließlich versuchten wir, unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse und der aktuellen Literatur, ein Modell für die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms zu formulieren.

Die grundlegenden Schwerpunkte, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind somit folgende:

1. Beschreibung der funktionellen Anatomie der Zona Glomerulosa in der asymptotischen Normalbevölkerung
2. Prävalenz Aldosteron - produzierender Knoten in der asymptotischen Bevölkerung
3. Nachweis von Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome
4. Formulierung eines Modells für die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms

2. Material und Methoden

2.1. Das Untersuchungskollektiv

Die in unserer Studie untersuchten Nebennieren stammen aus gerichtlichen Sektionen des Institutes für Rechtsmedizin in München. Es handelt sich bei den untersuchten Individuen um eine nicht vorselektierte Stichprobe des Sektionsgutes, welche repräsentativ für das Patientenkollektiv der Rechtsmedizin ist.

Nebennieren von insgesamt 209 obduzierten Personen wurden in die Studie eingeschlossen. Die Betroffenen wurden im Zeitraum zwischen September 2009 und Februar 2010 sezziert. Für die hier vorliegende Studie wurden die Nebennieren sowie basale klinische Charakteristika eines jeden Falls gesammelt. Im Rahmen der rechtsmedizinischen Sektion erfolgte die routinemäßige Aufnahme aller rechtsmedizinisch relevanten Werte, unter anderem des Herzgewichtes. Angaben zu klinischen Befunden und der medizinischen Vorgeschichte wurden, wenn vorhanden, in die Datensammlung mit aufgenommen.

Einschlusskriterien für die Aufnahme in diese Studie waren die Volljährigkeit der obduzierten Person, die technische Durchführbarkeit der Nebennieren - Entnahme und morphologisch intakte Nebennieren ohne Anzeichen auf Fäulnis. Ausschlusskriterien waren vorbekannte Erkrankungen der Nebennieren und nicht auffindbare oder bereits verwesende Nebennieren.

Bei den 209 in das Untersuchungskollektiv aufgenommenen Individuen handelte es sich um Personen im Alter zwischen 18 und 96 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 60 Jahren ($59,3 \pm 18,7$ Jahre). 151 Männern (72,2 %) standen 58 Frauen (27,8 %) gegenüber. Dieses Ungleichgewicht war am ehesten durch die Auswahl einer Kohorte aus dem Patientengut der Rechtsmedizin bedingt. Männer erleiden häufiger einen unnatürlichen Tod als Frauen (71, 72).

Frauen waren im Durchschnitt älter als Männer (Durchschnittsalter weiblich 64 Jahre und männlich 57 Jahre). Bezüglich Körpergröße ($171,6 \pm 9,0$ cm) und Gewicht ($79 \pm 19,7$ kg) zeigte sich eine große Heterogenität des Untersuchungskollektivs. Der Body - Mass - Index lag im Durchschnitt bei $26,5 \pm 5,8$ kg/m² (Männer 27 kg/m², Frauen 25 kg/m²), und umfasste eine Spanne zwischen 16 und 49 kg/m².

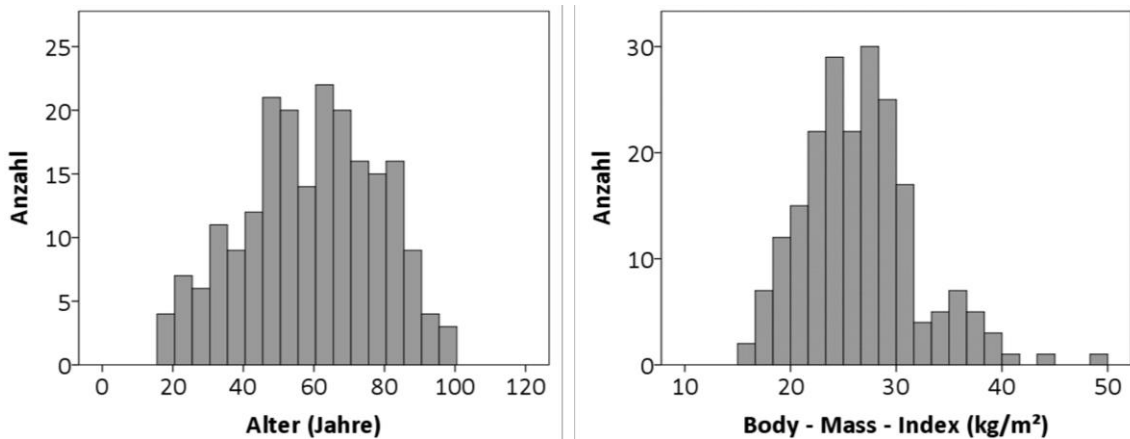


Abbildung 5: Verteilung des Alters und des Body - Mass - Index bei den untersuchten Fällen

Bezüglich der Todesursachen wurden folgende Daten gesammelt:

Todesursache	Anzahl der Fälle	Prozent (%)
Myokardinfarkt	33	15,8
Plötzlicher Herztod	30	14,4
Lungenembolie	14	6,7
Vaskulär	11	5,3
Trauma/ Mord	34	16,3
Suizid	30	14,4
Intoxikation	31	14,8
Infektion	10	4,8
Sonstige	7	3,3
Unbekannt	9	4,3
Gesamt	209	100

Tabelle 3: Todesursachen

Allgemein wird von einem natürlichen Tod ausgegangen, wenn eine vorbestehende oder neu aufgetretene Erkrankung ursächlich für das Versterben war. Unnatürliche Todesursachen sind klassischerweise Homizid, Suizid, Unfälle oder Intoxikationen (73). Bei Betrachtung der Todesursachen in unserer Kohorte fällt auf, dass neben kardiovaskulären unklare und unnatürliche Todesursachen überwiegen. Dies entspricht der üblichen Verteilung der Todesursachen bei den Sektionen der Rechtsmedizin München.

Bekannte Erkrankungen oder in der gerichtsmedizinischen Sektion sichtbare Pathologien der Nebenniere waren ein Ausschlusskriterium. Insofern nehmen wir an, dass die in die Studie eingeschlossenen Personen zum Todeszeitpunkt bezüglich der Nebenniere gesund oder zumindest klinisch asymptomatisch waren. Deshalb gehen wir davon aus, dass die gesammelten Daten, wenn auch mit gewissen Einschränkungen, auf die gesunde Normalbevölkerung übertragen werden können.

2.2. Materialien

2.2.1. Zusammensetzung der Lösungen und Buffer

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung
Antigen Retrieval Buffer (Tris-EDTA Buffer pH 9,0)	10mM TRIS 1mM EDTA 1000ml Aqua destillata 0.05% Tween 20
Blocking Buffer	0,1M TRIS pH7,4 20% Humanes Serum 0.5% SDS
Primary Antibody Buffer	0,01M TRIS pH7,4 20% Humanes Serum 0.1% Tween
Washing Buffer	PBS 0.02% Tween
Tap Water Substitute	1g Natriumhydrogencarbonat 10g Magnesiumsulfat- Heptahydrat Aqua destillata
Peroxidase Blocking	Methanol 0,03% Wasserstoffperoxid
Differenzierungslösung	125µl Salzsäure aufgelöst in 50ml Ethanol 70%

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Buffer und Lösungen

2.2.2. Reagenzien

Reagenzien	Kommerzieller Name	Hersteller
Primärantikörper	Mouse anti human CYP11 B2 - 4 Antibody	Dr. Celso Gomez - Sanchez (26.09.2012)
Sekundärantikörper	Imm PRESS Reagent Kit	Vector Labs; Burlingame, USA
Chromogenes Substrat	3´3´Diaminobenzidine Tabletten	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Humanes Serum	Humanes Serum Gruppe AB Hitzeinaktiviert	Life technologies; Brown Deer, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung	Phosphate Buffered Saline tablets	Gibco life technologies; Paisley, UK
Detergens	Polysorbat 20 (Tween20)	Calbiochem od Merck KGaA; EDM Chemicals, Inc. San Diego, USA
Salzsäure	Rauchende Salzsäure 37%	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Hydrogen- Peroxid 30%	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
TRIS	Tris(hydroxymethyl) - amino - methan, TRIZMA base	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Disodium	Serva Electrophoresis; Heidelberg, Deutschland
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfat)	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland
Natrium Hydrogen Carbonat	Natrium Hydrogen Carbonat	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Magnesium Sulfat	Magnesium Sulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Methanol	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland
Xylol	Xylol Isomerengemisch	Burdick & Jackson Honeywell Seelze GmbH; Seelze, Deutschland
Alkoholreihe	Ethanol 70% Ethanol 96% Ethanol 100%	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Harris Hämatoxylin	Accustain Harris Hämatoxylinlösung Modifiziert	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland
Aqua destillata	Aqua Bidestillata	H. Kerndl GmbH; Weissenfeld, Deutschland
Permout	Chemival Permout Mountig Medium	Fischer Chemical Hampton; New Hampshire, USA

Tabelle 5: Handelsnamen und Hersteller der verwendeten Reagenzien

2.2.3. Geräte und Technik

Geräte	Modell und Hersteller	Referenz
Mikroskop	Leica DMRB Mikroskop	Leica Mikroskopie und Systeme; Wetzlar, Deutschland
Kamera	Spot Insight QE	Visitron Systems Imaging and Microscopy; Puchheim, Deutschland
Gewebe - Infiltrations - Automat	Automatische Gewebeeinfiltration Leica TP1020	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie; Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	Mikrotom HM355 E	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Wasserbad	Wasserbad SB 80	Microm; Walldorf, Deutschland
Druckdampfkochtopf	Sicomatic - S	Silit- Werke GmbH & Co; Riedlingen / Württ., Deutschland
Mikrowelle	Daewoo KOR 6485	Daewoo Electronics Corp.; Eschborn, Deutschland
Vortex	Vortex - Genie 2	Scientific Industries, Inc.; Bohemia, New York USA
Objekträger	Histo-Bond ca. 76 x 26 x 1mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.; Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser	Deckgläser 24x50mm	Menzel Gläser; Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Eppendorf - Pipetten	Eppendorf AG;

		Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Reagenzgläser	Microtube 2,0 ml Microtube 0,5 ml Microtube 5,0 ml	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Wheaton Coplin staining jars	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland
Fettstift	Pap Pen Immunostaining Pen	Kisker Biotech GmbH & Co.; Steinfurt, Deutschland
Terafilm	Parafilm M- Verschlussfolie	Brand GmbH + Co; Wertheim, Deutschland
Staubfreie Tücher	Precision wipes	Kimtech science; Kimberly- Clark Professional; Roswell, USA

Tabelle 6: Handelsnamen und Hersteller der verwendeten Geräte

2.3. Methoden

2.3.1. Die Technik der Immunhistochemie

Im Rahmen dieser Studie wurden humane Nebennieren mittels Immunhistochemie analysiert.

2.3.1.1. Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zum Nachweis von Makromolekülen in Geweben mithilfe von Antikörpern (74). Die spezifische Bindung des Antikörpers an seine Antigene ermöglicht deren Nachweis im untersuchten Gewebe. Die Identifikation gewebespezifischer Zellelemente ermöglicht es, die Gewebezugehörigkeit festzustellen, der Nachweis charakteristischer Enzyme, eine indirekte Aussage zur Aktivität der analysierten Gewebe zu treffen.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen werden Antikörper verwendet, die gegen jene Strukturen gerichtet sind, welche im Gewebe dargestellt werden sollen. Nach Inokulation des Gewebes mit dem Antikörper wird der an sein Epitop gebundene Antikörper durch verschiedene Methoden nachgewiesen.

Bei der Durchführung der Immunhistochemie sind das strenge Einhalten der Inkubationszeiten und das sorgfältige Waschen der Gewebe zwischen den einzelnen Reaktionsschritten unerlässlich, um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Meist werden die Gewebeschnitte auf einem Objektträger aufgezogen und in die jeweils vorgesehenen Lösungen getaucht. Bei der Verwendung der Primärantikörper werden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger mit

einem Fettstift knapp umrandet, um die Menge an verwendeten Antikörper gering zu halten und ein Auslaufen der Lösung zu vermeiden. Die Waschvorgänge zwischen den einzelnen Inkubationsschritten zur Entfernung überschüssiger Antikörper oder Reagenzien erfolgen mit Pufferlösungen, meist phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder Tris - gepufferter Salzlösung (TBS). Durch mehrmaliges Eintauchen in saubere Waschlösung werden Reste von Antikörpern und Reagenzien zuverlässig entfernt. Vor der erneuten Inkubation mit Antikörpern muss die Puffersubstanz vollständig entfernt werden, damit keine Verdünnung der Antikörperlösung eintritt.

Vor der Auswertung immunhistochemischer Färbungen muss der an seine Zielstruktur gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu haben sich verschiedene Methoden etabliert, die auf der Kopplung des Antikörpers mit einem Farbstoff, einem Fluorochrom oder einem Enzym basieren. Man spricht in diesem Zusammenhang von „markierten“ Antikörpern. Durch Anregung des Fluorochroms, durch Zugabe des umzusetzenden Substrates zur Darstellung der durch das Enzym katalysierten Reaktion oder durch Visualisierung des Farbstoffes kann der an das Antigen gebundene Antikörper nachgewiesen werden (75).

2.3.1.2. Direkte und indirekte Form der Immunhistochemie

Man unterscheidet heutzutage zwei Methoden zur Sichtbarmachung der Antigen - Antikörper - Bindung: die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode wird der Primäantikörper selbst, der sowohl gegen das gesuchte Epitop gerichtet als auch mit einem Marker - Molekül gekoppelt ist, nachgewiesen.

Die indirekte Methode der Immunhistochemie, auch Mehrschrittmethod genannt, erfolgt unter Einsatz mehrerer Antikörper. Das nachzuweisende Epitop wird durch einen primären Antikörper gebunden. Der Primär - Antikörper richtet sich gegen das gesuchte Antigen und ist nicht mit Enzymen oder Farbstoffen markiert. Der Nachweis der Bindung erfolgt durch einen Sekundäantikörper. Dieser ist gegen den unkonjugierten Primäantikörper, meist gegen dessen konstantes Fc - Fragment, gerichtet. Oft stammt der Sekundäantikörper aus einer anderen Spezies als der Primäantikörper. Der Sekundäantikörper kann markiert sein oder als Brücke zu einem dritten, markierten Antikörper dienen.

Bei der Mehrschrittmethod binden mehrere Sekundäantikörper an einen Primäantikörper, sodass es zur Amplifikation des Signals kommt. Dadurch steigt die Sensitivität des Antigennachweises im Vergleich zu der direkten Methode. Ein weiterer Vorteil der indirekten

Immunhistochemie ist die kostengünstigere Herstellung, da kein gleichzeitig antigenspezifischer und markierter Antikörper benötigt wird. Schließlich kann die Kopplung des Antikörpers an ein Markermolekül zu einer Verringerung der Antikörper - Affinität führen, was durch die Verwendung getrennter Primär - und Sekundärantikörper bei der Mehrschrittmethode vermieden wird (75).

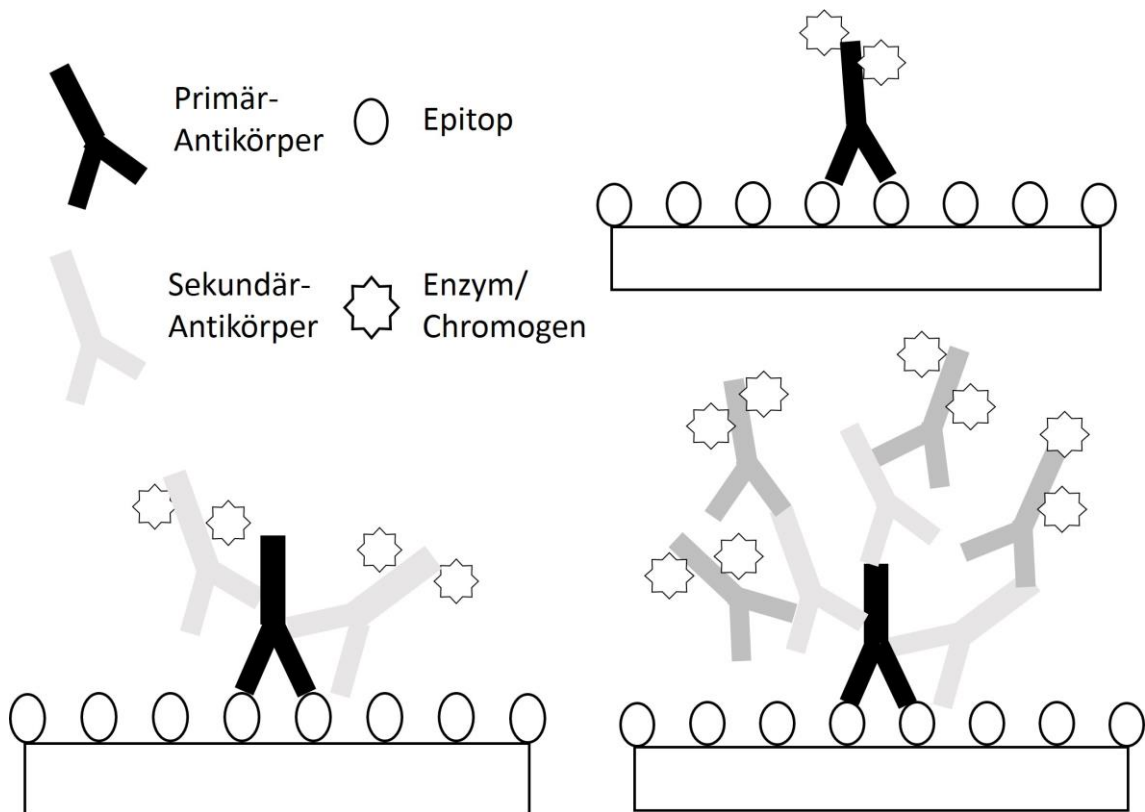


Abbildung 6: Direkte Immunhistochemie mit markiertem Primärantikörper (oben rechts), Indirekte Immunhistochemie - Zweischrittmethode (unten links) und Indirekte Immunhistochemie - Mehrschrittmethode (unten rechts) (Abbildung nach Lang (75))

2.3.1.3. Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie

Vor der immunhistochemischen Analyse eines Gewebes muss dieses histologisch aufgearbeitet werden. Dabei erfolgen Fixierung, Processing, Schneiden und Antigen - Demaskierung.

Um dem natürlichen Vorgang der Nekrose und den daraus resultierenden Zellschäden entgegenzuwirken, werden humane Gewebe vor histologischen Untersuchungen entweder schockgefroren oder durch Immersionsfixation fixiert. Bei der Immersionsfixation wird das

Gewebe in aufsteigende Reihen von neutral gepufferter wässriger Formaldehydlösung für einen Zeitraum von mehreren Stunden getaucht. Die Fixierung hemmt die Denaturierung durch Proteasen und Hydrolasen. Gleichzeitig verhindert sie auch die Bindung von Antikörpern an deren Epitope im Gewebe, weswegen diese Epitope vor der immunhistochemischen Färbung wieder „demaskiert“ werden müssen (75).

Nach der Fixierung in Formaldehydlösung wird das Gewebe mit Wasser gewaschen, mit Alkoholen (Ethanol und Xylol) entwässert und in Paraffin eingebettet (75). Für den Einbettungsprozess wird das Einbettungsmedium durch Erhitzen verflüssigt, sodass es in das Gewebe eindringen kann und beim Abkühlen das infiltrierte Gewebe verfestigt. Das einzubettende Gewebepräparat wird in drei bis fünf Millimeter dicke Blöcke geschnitten und in spezielle Einbettungskassetten gelegt. In diese Kassetten wird erhitztes, flüssiges Paraffin gegossen. Das Paraffin benötigt zur Infiltration des Gewebes mehrere Stunden. Dann wird das flüssige Paraffin in Blöcke ausgegossen (Embedding). Beim Abkühlen kommt es zur Auskristallisation des Paraffins. Je schneller die Abkühlung erfolgt, desto homogener ist der resultierende Paraffinblock. Die Einbettung erfolgt meist mittels Einbettungsautomaten, um den Prozess zu beschleunigen und standardisierte Bedingungen zu gewährleisten. Die maschinelle Einbettung dauert 12 bis 24 Stunden. Man erhält einen festen Block aus Paraffin, in den das Gewebe eingebettet ist (75).

Mittels eines Mikrotoms werden von den Paraffinblöcken Gewebeschnitte angefertigt. Für die Immunhistochemie ist eine Schnittdicke von drei bis vier Mikrometern üblich. Die Schnitte werden mit einem Pinsel von der Schnittfläche abgehoben, im Wasserbad gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Das Trocknen erfolgt an der Luft oder auf Heizplatten und dient dem Anhaften der Schnitte auf dem Objektträger (75).

2.3.1.4. Praktische Durchführung der Immunhistochemie

Vor der immunhistochemischen Färbung muss der Gewebsschnitt entparaffiniert werden, ansonsten können die wässrigen Lösungen der Färbungen nicht in das Gewebe dringen. Die Entparaffinierung erfolgt mit dem Lösungsmittel Xylol. Anschließend wird der Gewebeschnitt in absteigender Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser rehydriert (75).

Um die Bindung des Antikörpers an seine Epitope im Gewebe zu erleichtern und die Sensitivität des Epitop - Nachweises zu steigern, erfolgt eine Antigen - Demaskierung (Epitope Retrieval). Dabei werden durch die Fixierung entstandene Quervernetzungen zwischen

Aminosäuren und Zellmembranen aufgebrochen und Bindungsstellen für die Antikörper freigelegt. Die Demaskierung kann auf verschiedene Arten erfolgen, abhängig von der Art der Einbettung, des Gewebes und des verwendeten Antikörpers.

Proteolytisch induziertes Epitope Retrieval (PIER) erfolgt mithilfe von Proteasen. Die Enzyme spalten fixierungsbedingte Vernetzungen, führen jedoch bei längerer Einwirkzeit zur Anverdauung und Denaturierung des Gewebes. Heat induced Epitope Retrieval (HIER) erfolgt durch Einwirken feuchter Hitze. Die Hitzeexposition erhöht die Permeabilität von formalinfixiertem Gewebe und legt Epitope frei. In der Praxis werden Gewebeschnitte mittels Mikrowelle, Wasserbad, Dampfgarer oder Dampfdruckkochtopf erhitzt. Die Schnitte bleiben beim Erwärmen von einer Retrievallösung, meist EDTA - oder Citrat - Puffer umgeben (75).

Nach ausgiebiger Spülung der Gewebeschnitte mit Puffersubstanzen erfolgt schließlich die Inkubation mit dem Antikörper und, abhängig von der verwendeten Methode, mit Sekundäantikörper und den Reagenzien oder gebrauchsfertigen Reagens - Kits. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten der Färbung werden die Objektträger mit Pufferlösungen gereinigt (Waschen der Schnitte). Falls erwünscht, kann nach der immunhistochemischen Färbung auch eine Gegenfärbung erfolgen, beispielsweise mit Methylengrün oder Hämatoxylin.

Anschließend werden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Das Klären erfolgt, wie beim Einbetten, mit Xylol. Schließlich wird eine Einbettsubstanz aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt. Nach diesem Vorgehen bleiben die Schnitte über lange Zeit erhalten und können unter dem Mikroskop betrachtet werden (75).

2.3.2. *Der CYP11B2 Antikörper*

In der hier vorliegenden Arbeit verwendeten wir für die immunhistochemischen Färbungen einen gegen die Aldosteronsynthese (CYP11B2) gerichteten murinen Antikörper, der uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Gomez - Sanchez bereitgestellt wurde (24).

Immunhistochemische Untersuchungen zur funktionellen Aktivität der Aldosteronsynthese wurden bereits vor Jahrzehnten durchgeführt.

Die Herstellung selektiver Antikörper gegen CYP11B2 erwies sich jedoch als schwierig, da die Aminosäuresequenz der Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 zu 93 % homolog ist. Polyklonale Antikörper, wie Ogishima et al. (43) bereits 1991 durch Immunisation von Kaninchen gewann,

erwiesen sich als anfällig für Kreuzreaktionen, und die damit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen waren nicht zufriedenstellend.

Gomez - Sanchez et al. (24) publizierten 2013 die erfolgreiche Synthese spezifischer monoklonaler muriner Antikörper gegen CYP11B1, dem letzten Enzym der Kortisolsynthese, und gegen CYP11B2, der Aldosteronsynthese. Letzterer Antikörper wurde bei unserer Studie eingesetzt.

2.3.3. Protokoll der Nebennierenverarbeitung und CYP11B2 - Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit

Die immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Arbeit erfolgten an humanen Nebennieren. Da es sich um Gewebe von bereits verstorbenen Personen aus rechtsmedizinischen Sektionen handelte, wurde bei der Entnahme besonderes Augenmerk auf die Morphologie der Nebennieren geachtet. Nur intaktes Gewebe ohne Fäulniszeichen wurde in die Studie eingeschlossen.

Die Nebennieren wurden bei der gerichtlichen Sektion identifiziert und gemeinsam mit der sie umgebenden Fettkapsel entnommen. Die Organe wurden in manchen Fällen mit einem einzelnen diagnostischen Schnitt geteilt, ansonsten blieben die Organe unversehrt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Nebennieren in einer zehnprozentigen Formaldehydlösung aufbewahrt. Nach der rechtsmedizinischen Sektion wurden die Organe von dem umgebenden Fett befreit. Die Nebennieren wurden senkrecht zur Längsachse in Scheiben mit einer Breite von drei Millimetern geschnitten. Für jede Nebenniere wurden aus diesen Schnitten vier repräsentative Schnitte gewählt, welche einen gleichmäßigen Abstand voneinander aufwiesen. Somit standen pro Fall insgesamt acht Nebennieren - Schnitte zur Verfügung, je vier pro Organ. Die Schnitte wurden so ausgewählt, um eine möglichst repräsentative Darstellung der Nebennierenmorphologie zu sichern.

Für die Einbettung wurden die ausgewählten Schnitte in Präparationskassetten gelegt und in einem Präparate - Korb mit fließendem Wasser gespült, um überschüssiges Formaldehyd auszuwaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Präparate durch Immersion in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Nebennierenanschnitte wurden in jeweils zwei Gefäßen mit siebzigprozentigem, achtzigprozentigem, neunzigprozentigem und hundertprozentigem Alkohol für zwei Stunden pro Gefäß gelagert. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte für zwei Stunden in Xylol getaucht.

Die Paraffinierung erfolgte mit dem Gewebeeinfiltrationsautomaten Leica TP 1020. Nach der Einbettung wurden die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom HM355E von Thermo Fisher Scientific in Scheiben mit einer Dicke von vier Mikrometern geschnitten. Die Schnitte wurden auf einem Wasserbad gestreckt, und jeweils zwei Anschnitte einer Nebenniere wurden auf einem Objektträger aufgefangen.



Abbildung 7: Objektträger mit zwei Nebennierenanschnitten einer Person vor der immunhistochemischen Bearbeitung (Breite des Objektträgers entspricht etwa 2,5 cm)

Die Objektträger mit den Nebennierenschnitten wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Institut für Rechtsmedizin in München aufbewahrt. Für die immunhistochemische Färbung wurde jeweils ein Objektträger pro Individuum ausgewählt. Jeder Objektträger enthielt zwei Nebennierenanschnitte.

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mit Xylol zweimal für zehn Minuten entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert: zweimal für jeweils zwei Minuten in hundertprozentigem Ethanol, einmal für je zwei Minuten in fünfundneunzigprozentigem, siebenzigprozentigem und dreißigprozentigem Ethanol und einmal für fünf Minuten in Aqua destillata.

Das in dieser Studie angewandte Protokoll der immunhistochemischen Färbung lehnt sich an das von Gomez - Sanchez (24) publizierte Protokoll an, das in unserem Labor entsprechend der Resultate der Probefärbungen angepasst wurde.

Das Epitope - Retrieval erfolgte mittels Hitzebehandlung im Druckdampfkochtopf Sicomatic - S der Firma Silit. Die Retrievallösung, ein Tris - EDTA - Puffer mit einem pH - Wert von neun, wurde mittels Mikrowelle bis unter den Siedepunkt erhitzt. Dann wurden die Objektträger in

die Retrievallösung getaucht. Für eine schonende HIER - Prozedur wurden die Objektträger in einem mit Puffersubstanz gefüllten Behältnis auf dem Gareinsatz des Dampfkochtopfs befestigt. Der Kochtopf wurde bodenbedeckend mit Wasser gefüllt und verschlossen. Auf einer elektrischen Heizplatte wurde der Dampfkochtopf auf die zweite Stufe erhitzt. Gemäß der Bedienungsanleitung bauten sich dadurch im Inneren ein Druck von 0,8 Bar und eine Temperatur von 116 Grad Celsius auf. Der Kochvorgang wurde nach zehn Minuten beendet und der Dampfkochtopf zum Abkühlen für weitere zehn Minuten in ein mit kaltem Wasser gefülltes Behältnis gestellt. Nach dem Erkalten wurde der Kochtopf geöffnet und die Objektträger entnommen.

Es folgten drei Waschschrte mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für je fünf Minuten. Das Blocken der endogenen Peroxidase erfolgte zehn Minuten lang mit in Methanol gelöstem, 0,3 - prozentigem Wasserstoffperoxid. Nach dem Blocken wurden die Gewebeschnitte zweimal mit PBS für je fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger durch Schleudern und Abwischen mit fettfreien Tüchern von Flüssigkeitsresten befreit. Die einzelnen Anschnitte der Nebennieren wurden mit einem Fettstift umrandet, und jeder Nebennieren - Anschnitt wurde zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungen für eine Stunde mit dem Blocking - Buffer inkubiert. Der Blocking - Buffer wurde, wie auch der Antikörperpuffer, bei jedem Durchgang frisch zubereitet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Blocking - Buffer mittels fettfreier Tücher entfernt, und die Gewebeschnitte wurden mit der Primäantikörper - Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primäantikörper erfolgte über Nacht in der Kühlkammer bei vier Grad Celsius. Währenddessen wurden die Objektträger in einer Feuchtkammer vor Austrocknung geschützt. Am folgenden Tag wurde die Feuchtkammer auf Raumtemperatur aufgewärmt, der Antikörperpuffer entfernt und die Objektträger fünfmal für je fünf Minuten mit einer Puffersubstanz (Washing Buffer) gewaschen. Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgte mit dem Reagens - Kit Add Imm Press von Vector Labs. Das Kit besteht aus einem polymerisierten Antikörper, dessen konstanter Teil gegen Antikörper der Maus - Spezies gerichtet ist (der in unserer Studie verwendete Antikörper gegen CYP11B2 ist murin). Der Antikörper des Reagens - Kits ist mit Mikropolymeren verbunden, die das Enzym Peroxidase tragen. Die Peroxidase katalysiert die Umwandlung des später hinzugefügten Chromogens Diaminobenzidin. Nach Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Reagens - Kit erfolgten drei weitere Waschschrte mit Washing - Buffer, von jeweils fünfminütiger Dauer. Anschließend wurden die Objektträger genau eine Minute lang mit Diaminobenzidin - Lösung inkubiert und sofort nach Ablauf der Reaktionszeit in phosphatgepufferte Salzlösung getaucht, um die

Reaktion zu beenden. Abschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen.

Eine Gegenfärbung erfolgte mit Harris Hämatoxylin, einer Hämatoxylinfärbung mit Aluminiumkaliumsulfat. Das Protokoll dieser Färbung war folgendes:

- Eine Minute in Harris Hämatoxylin
- Zehn Sekunden in Aqua destillata
- Je fünf und zwei Minuten in Differenzierungslösung
- Waschen mit fließendem Leitungswasser für zehn Sekunden
- Eine Minute in tap water substitute - Lösung
- Vier Minuten in Aqua destillata

Anschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit denselben Konzentrationen und Zeiten wie bei Hydratisierung und schließlich die Klärung in Xylol. Schlussendlich wurden die gefärbten Schnitte mit Permout Mounting Medium (auf Toluolbasis) eingebettet und mit einem Deckblatt abgedeckt. Luftblasen wurden mithilfe einer Pipettenspitze entfernt, und die Objektträger wurden bei Raumtemperatur zum Trocknen ausgelegt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden am Lichtmikroskop Leica DMRB standardisiert von einem einzigen Untersucher qualitativ und quantitativ ausgewertet. Zuerst wurden die gefärbten Areale abhängig von deren Morphologie und Konfiguration bestimmten Klassen zugeordnet, dann die Anzahl der jeweils zu einer Klasse gehörigen Areale gezählt. Dabei wurden zwei Nebennierenanschnitte pro Person ausgewertet und getrennt protokolliert. Die so ausgezählten Werte wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 durch die Anzahl der untersuchten Nebennierenanschnitte geteilt, um einen einzigen, gemittelten Wert für jedes Individuum zu erhalten. Einzelne Schnitte wurden aufgrund schlechter oder unzureichender Färbung aussortiert und andere Schnitte der entsprechenden Person im weiteren Verlauf nochmals gefärbt.

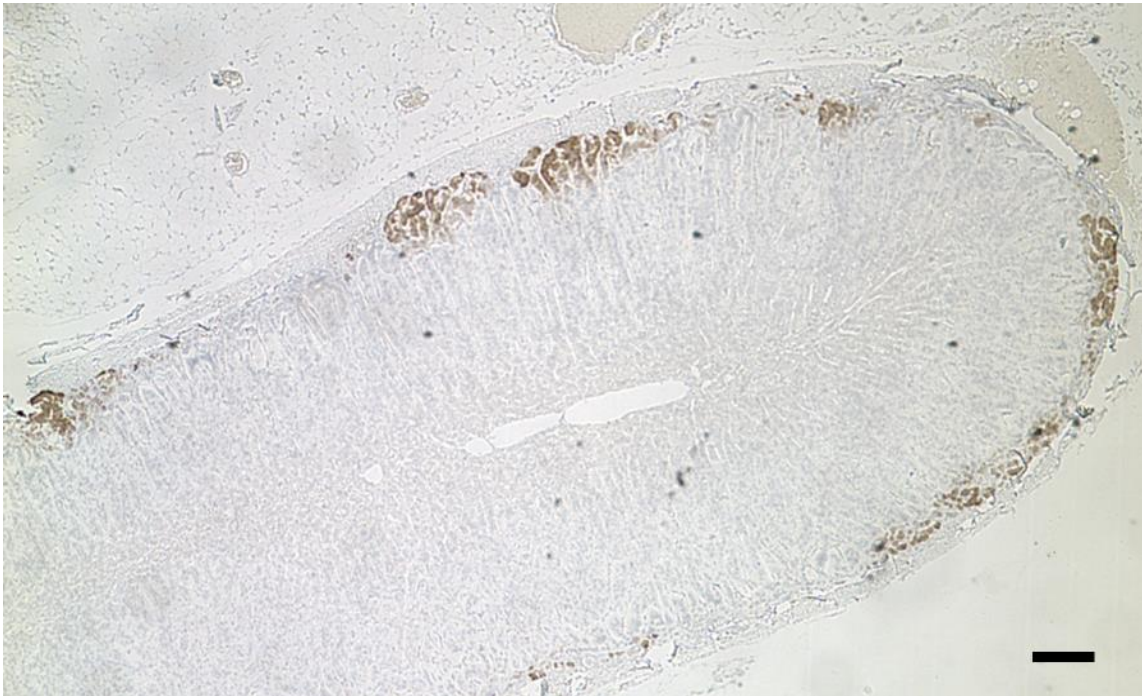


Abbildung 8: Ausschnitt der Nebennierenrinde nach immunhistochemischer Färbung in 2,5 - facher Vergrößerung (Balken entspricht etwa 1 mm)

2.4. Klassifikation der CYP11B2 - Färbung

Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur (24, 63-65) wurde die Stärke der CYP11B2 - Expression in eine vierstufige Klassifikation eingeteilt. Zusätzlich wurden folgende morphologische Formationen unterschieden:

- Noduli (mit oder ohne CYP11B2 - Expression)
- Aldosterone Producing Cell Clusters (APCCs)
- Foci

2.4.1. Noduli

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Noduli als knotenartige Gruppierung von Zellen mit oder ohne CYP11B2 - Expression definiert. Noduli sind oft, aber nicht immer durch eine Kapsel oder Pseudokapsel vom umgebenden Gewebe abgegrenzt und unterbrechen die normale Architektur der Nebennierenrinde. Unter Berücksichtigung der Immunhistochemie wurden sie in die Subgruppen CYP11B2 - exprimierende (positive) und nicht CYP11B2 - exprimierende (negative) Noduli aufgeteilt.

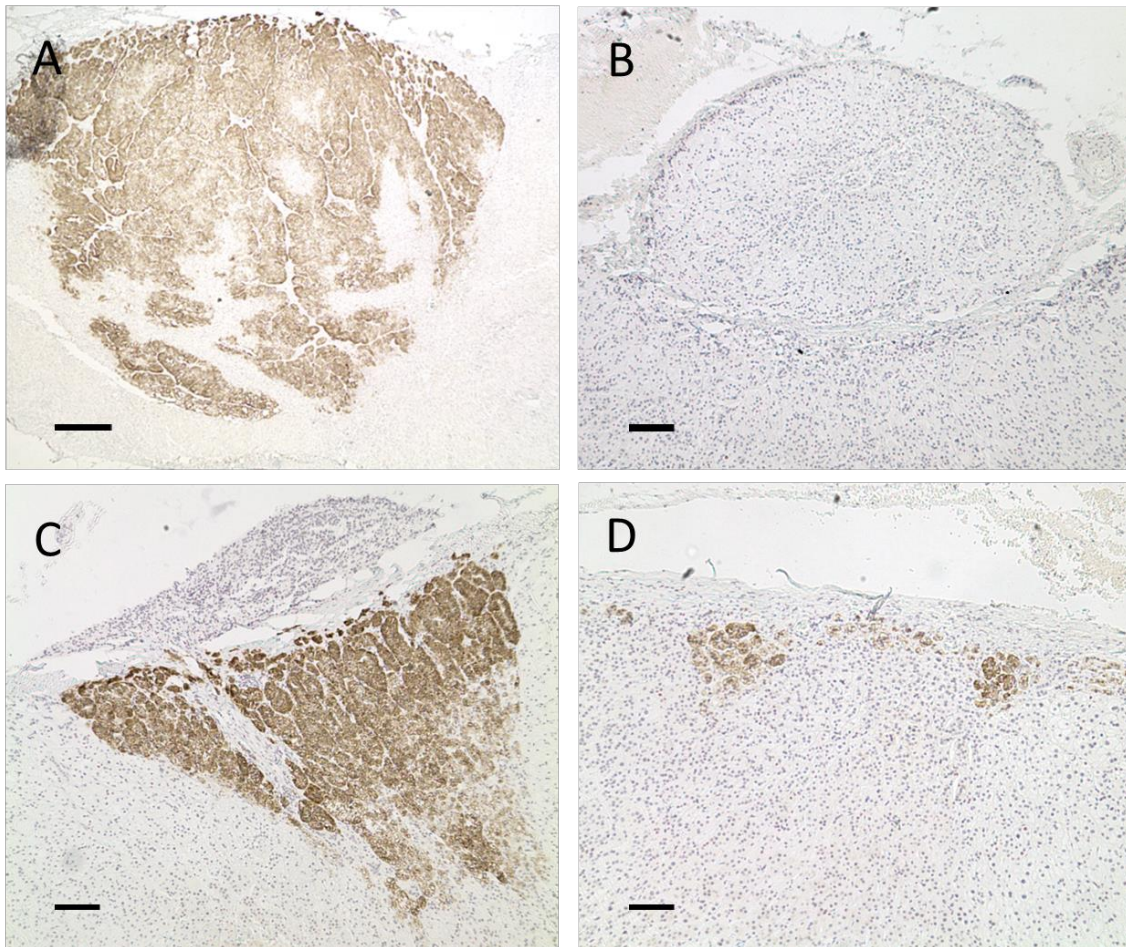


Abbildung 9: A: CYP11B2 - exprimierender Nodulus; B: Nodulus ohne CYP11B2 - Expression; C: APCC; D: Zwei Foci; (Balken entspricht etwa 1 mm in A und 0,5 mm in B, C, D).

2.4.2. Aldosterone producing cell clusters (APCCs)

Als APCCs wurden Zellansammlungen mit intensiver Expression von CYP11B2 und typischer Konfiguration bezeichnet: APCCs sind meist trapezoid - oder keilförmig; die äußeren Zellen der APCCs stehen in Verbindung mit der Nebennierenkapsel und ähneln Zona Glomerulosa - Zellen, während die inneren Zellen sinusoidal oder in Zellsträngen angeordnet sind und Zona Fasciculata - Zellen ähneln. APCCs werden nicht von einer Kapsel umgeben, sind aber klar abgegrenzt von den umgebenden Zellen, die keine CYP11B2 - Expression aufweisen.

2.4.3. Foci

Als Foci wurden fokale Zellansammlungen mit rundlicher Gruppierung und mit Expression des Enzyms CYP11B2 definiert. Die morphologischen Kriterien für die Klassifikation als APCC oder als Nodus durften nicht erfüllt sein. Ebenso durften die Zellen nicht dem normalen,

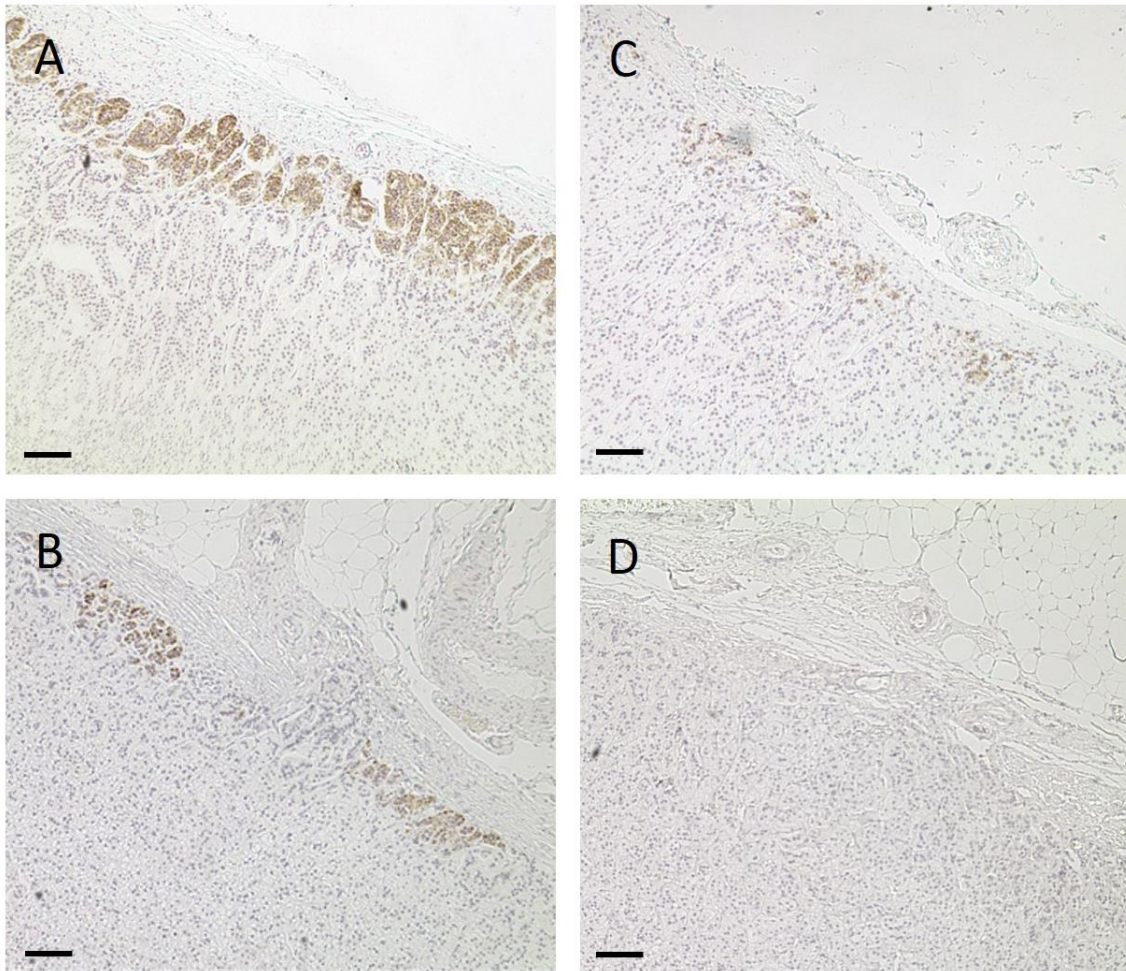


Abbildung 10: Zona Glomerulosa - Klassifikationen (fünffache Vergrößerung; Balken entspricht etwa 0,5 mm)

bogenförmigen Verlauf der Zona Glomerulosa folgen. In jenem Fall wurden die Zellen nicht als Focus, sondern als physiologisch aktive Zona Glomerulosa interpretiert. Für eine genaue Beschreibung der Begrifflichkeiten und der Entstehung der verschiedenen Variablen der hier vorliegenden Klassifikation verweisen wir auf die Einleitung.

2.4.4. Ausprägungsgrad der Zona Glomerulosa

Die Intensität der *CYP11B2* Expression innerhalb der gesamten Zona Glomerulosa wurde in der hier vorliegenden Arbeit in einer vierstufigen Klassifikation erfasst:

- Stufe 1: Kontinuierliche CYP11B2 - Expression in der gesamten Zona Glomerulosa oder in über zwei Dritteln der Zona Glomerulosa mit starker Färbung der Zellen
- Stufe 2: Diskontinuierliche CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa mit nur wenigen bis vereinzelt CYP11B2 - exprimierenden Zellen außerhalb der fokalen Strukturen Foci, APCCs und Noduli
- Stufe 3: Keine CYP11B2 - Expression außerhalb der fokalen Strukturen (Foci, APCCs und Noduli)
- Stufe 4: Kein Nachweis von CYP11B2 - Expression mittels Immunhistochemie in der gesamten Zona Glomerulosa innerhalb des untersuchten Nebennierenanschnittes

2.5. Qualitätssicherung

Zur externen Sicherung der Qualität der Klassifikation wurden repräsentative Bilder verschiedener histomorphologischer Befunde der Arbeitsgruppe von Prof. Maria Christina Zennaro am Paris Cardiovascular Research Centre gesandt. Die vom Pathologen der Arbeitsgruppe Zennaro mitgeteilte Klassifikation stimmte in neun von elf Fällen (82 %) mit der von uns getroffenen Einordnung überein.

2.6. Statistische Auswertung

Die tabellarische Erfassung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2010. Ebenso wurden erste Berechnungen mit diesem Programm durchgeführt (Body - Mass - Index).

Für die statistische Analyse wurden die Daten in SAS (The SAS System 9.2; SAS Institute, Cary North Carolina) übertragen. Folgende statistische Test wurden durchgeführt:

- Für die verhältnisskalierten Variablen (Body - Mass - Index, Alter, Herzgewicht, Anzahl der Foci, APCCs, CYP11B2 - positive und CYP11B2 - negative Noduli sowie Gesamtanzahl der Noduli) wurde eine Korrelation nach Spearman beziehungsweise nach Pearson durchgeführt.
- Für die nominalskalierte Variable Geschlecht wurde erst eine Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend eine Kruskal - Wallis - Testung durchgeführt, da eine Normalverteilung nicht sicher gewährleistet schien.
- Für die ordinalskalierte Variable Ausprägung der Zona Glomerulosa wurde der nicht parametrische Jonckheere - Terpstra - Test durchgeführt.
- Um einen Zusammenhang zwischen den Variablen Geschlecht und Ausprägung der Zona Glomerulosa aufzuspüren, wurde eine Acht - Felder - Tafel aufgestellt und ein Fischer - Test durchgeführt.

Bei allen statistischen Tests wurde ein P - Wert von 0,05 oder kleiner als signifikant angesehen, ein P - Wert kleiner als 0,001 als hochsignifikant.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels SPSS 22 (IBM SPSS Statistics Version 22; IBM Corp., Armonk, New York).

3. Ergebnisse

3.1. Deskriptive Statistik der CYP11B2 - Expression

Die im Rahmen unserer Studie durchgeführten Färbungen zeigten die bereits in der Literatur vorbeschriebene funktionelle Morphologie der humanen Nebenniere. Die Zona Glomerulosa präsentierte sich als diskontinuierlich, mit einzelnen alveolären Gruppen von endokrin aktiven Zellen.

Wir konnten in beinahe allen Nebennieren Aldosteron - produzierende Bereiche nachweisen, die wir nach einer im Methodenteil vorgestellten Klassifikation ordneten.

Folgende Daten konnten gesammelt werden:

	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Alter (Jahre)	59,3	18,9	18	97
Body - Mass - Index (kg/m ²)	26,6	5,5	15,1	49,6
Herzgewicht (g)	468,5	132,9	120	963
APCC (Anzahl pro Anschnitt)	0,70	0,97	0	7,5
Foci (Anzahl pro Anschnitt)	2,46	2,01	0	11
Noduli (Anzahl pro Anschnitt)	1,05	1,16	0	5,5
CYP11B2 positiver Noduli (Anzahl pro Anschnitt)	0,16	0,30	0	1,5
CYP11B negativer Noduli (Anzahl pro Anschnitt)	0,88	1,09	0	5,5

Tabelle 7: Deskriptive Statistik

Insgesamt fanden wir 145 APCCs, 514 Foci und 218 Noduli in den Nebennieren der 209 analysierten Individuen. Dies entsprach je Nebennierenanschnitt einem Durchschnitt von $0,7 \pm 1,0$ APCCs, $2,5 \pm 2,0$ Foci, $1,0 \pm 1,2$ Noduli, davon $0,2 \pm 0,3$ mit und $0,9 \pm 1,1$ ohne Aldosteronproduktion. Das bei der gerichtsmedizinischen Sektion ermittelte Herzgewicht betrug im Mittel $466,6 \pm 136,7$ Gramm, 393 Gramm bei Frauen und 493 Gramm bei Männern. Von den insgesamt 218 Noduli wiesen 34 (15,5 %) eine Expression der Aldosteronsynthese auf, während bei 184 Noduli (84,5 %) keine CYP11B2 - Expression nachgewiesen werden konnte.

Bei 152 Personen (72,7 % der Kohorte) wurde mindestens ein Knoten pro Nebennierenrindenanschnitt gefunden, 57 Individuen (27,3 %) besaßen keinen Nodulus in den betrachteten Schnitten. Die Anzahl Aldosteron - produzierender Noduli war deutlich geringer.

Bei 155 Personen (74,2 %) konnten keine Noduli mit Aldosteronsynthese - Expression nachgewiesen werden. Bei 12 (5,7 %) wurde ein CYP11B2 - exprimierender Nodulus pro Anschnitt gefunden, bei 38 (18,2 %) ein halber Nodulus pro Anschnitt und vier Individuen (2 %) besaßen ein Drittel oder zwei Drittel CYP11B2 - exprimierende Noduli pro Anschnitt. Numerischen „halbe“ oder „drittel“ Noduli entstehen dadurch, dass pro Individuum mindestens zwei Nebennierenanschnitte ausgewertet wurden und die Anzahl der gefundenen Strukturen gemittelt wurde. Innerhalb eines Nebennierenanschnittes wurden maximal 5,5 Noduli ohne CYP11B2 - Expression nachgewiesen. Die höchste Anzahl CYP11B2 - exprimierender Noduli pro Nebennierenanschnitt betrug 1,5.

Bei 86 Individuen (41 %) konnten keine APCCs, bei 18 Individuen (8,6 %) keine Foci nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss besaßen mehr als die Hälfte (59 %) der untersuchten Personen mindestens ein APCC und 191 Personen (91,4 %) mindestens einen Focus. Die maximal gefundene Anzahl von Foci oder APCCs auf einer Nebennierenschnittfläche betrug 7,5 APCCs beziehungsweise 11 Foci.

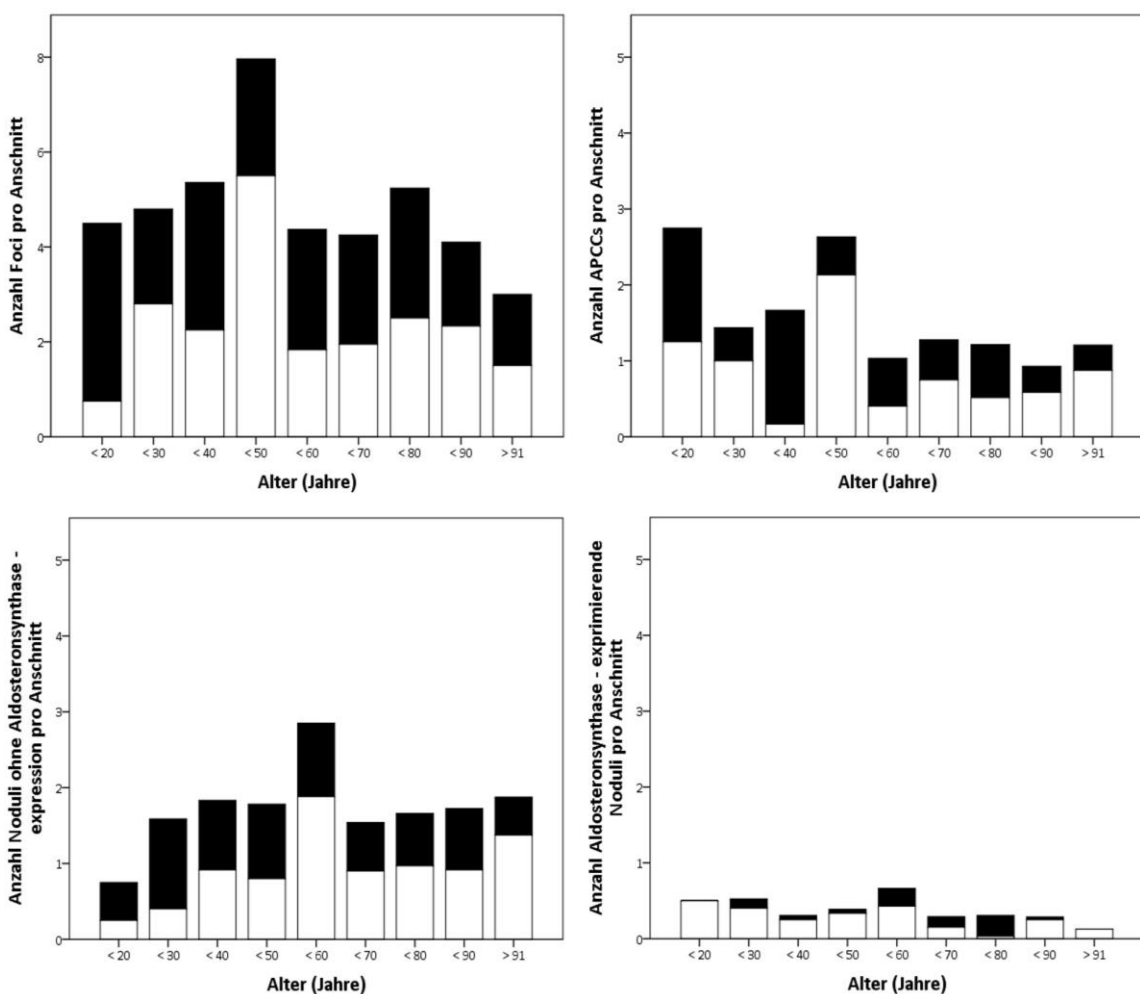


Abbildung 11: Ausprägungsformen der CYP11B2 Expression. Legende: ■ Männer □ Frauen

Bezüglich der verschiedenen Ausprägungsformen der Zona Glomerulosa - Klassifikation fanden sich die in nachfolgender Grafik ersichtlichen Häufigkeiten:

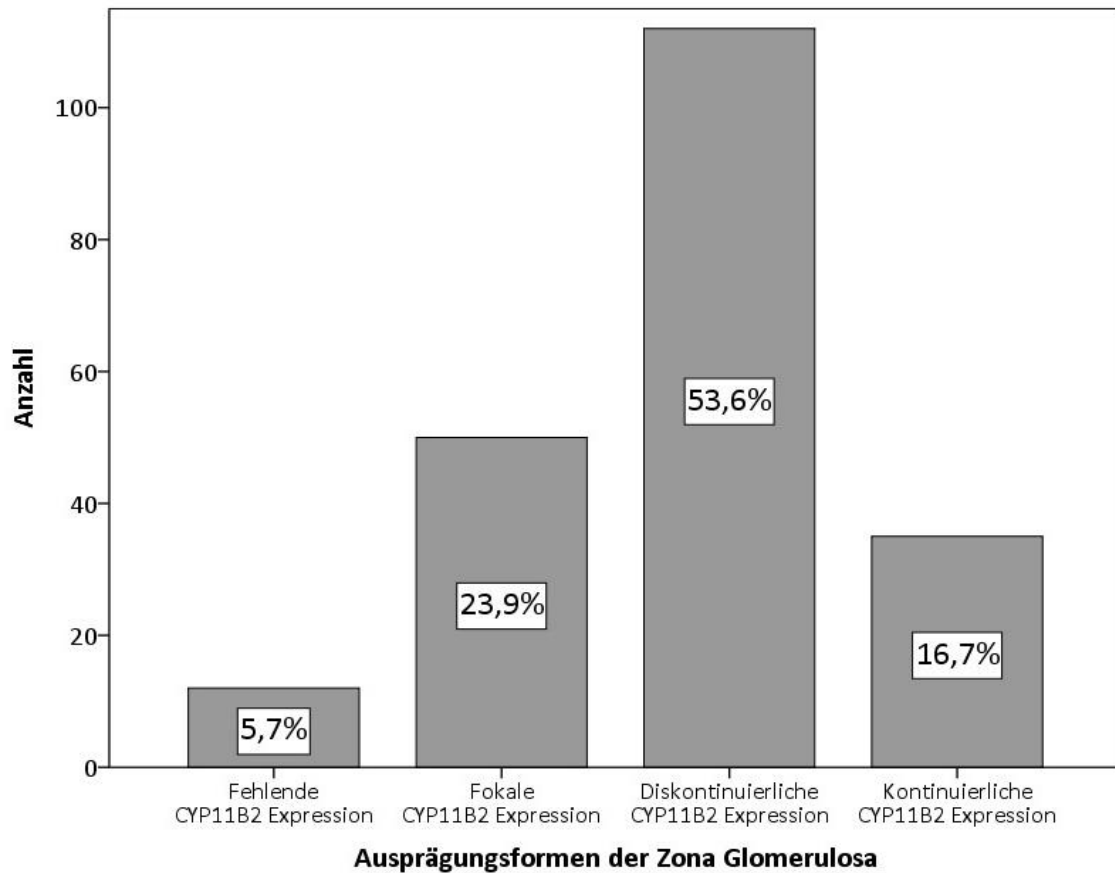


Abbildung 12: Häufigkeiten der Ausprägungsformen der Zona Glomerulosa

Bei gesonderter Betrachtung der verschiedenen Zona Glomerulosa - Klassen fanden sich die folgenden Verteilungen von APCCs, Foci und Noduli sowie die folgenden Durchschnittswerte der Variablen Alter, Body - Mass - Index und Herzgewicht:

		Alter (Jahre)	BMI (kg/ m ²)	Herz- gewicht (g)	APCC (n/A)	Foci (n/A)	Nod. (n/A)	pos. Nod. (n/A)	neg. Nod. (n/A)
Kontinuierliche CYP11B2 Expression	MW	48,2	24,6	421,6	0,9	2,9	0,9	0,1	0,8
	SD	17,9	4,7	120,5	1,6	2,4	0,9	0,3	0,9
Diskontinuierliche CYP11B2 Expression	MW	59,2	27,0	455,4	0,7	3,1	1,1	0,2	0,9
	SD	19,4	5,4	128,2	0,8	1,9	1,1	0,3	1,1
Fokale CYP11B2 Expression	MW	65,9	27,3	512,6	0,6	1,5	1,0	0,1	0,9
	SD	14,5	6,8	152,3	0,7	1,2	1,3	0,3	1,2
Fehlende CYP11B2 Expression	MW	64,9	26,6	502,1	0,02	0,1	1,1	0,0	1,1
	SD	20,1	6,1	144,8	0,1	0,2	1,3	0,0	1,3
Insgesamt	MW	59,3	26,4	466,1	0,7	2,5	1,1	0,2	0,9
	SD	18,9	5,5	136,8	0,9	2,0	1,2	0,3	1,1

Tabelle 8: Verteilung der Variablen auf die Zona Glomerulosa - Klassen. APCC, Foci und Noduli werden als Anzahl pro Anschnitt (n/A) dargestellt.

3.2. Korrelationen

Mittels statistischer Analyse der Daten prüften wir, ob ein Zusammenhang zwischen den immunhistochemisch bestimmten Parametern und den klinischen Charakteristika der untersuchten Personen bestand.

In der folgenden Darstellung unserer Ergebnisse und der anschließenden Diskussion unterscheiden wir der Übersichtlichkeit halber externe von internen Einflussfaktoren auf die Verteilung der Aldosteronsynthese - Expression. Zu den externen Variablen zählen wir Geschlecht, Körpergewicht und - Größe sowie das Herzgewicht. Zu den internen Variablen zählen wir die verschiedenen morphologischen Ausprägungsformen der Nebennierenrinde und speziell der Zona Glomerulosa.

3.2.1. Externe Variablen

3.2.1.1. Geschlecht

Insgesamt wurden 209 Personen, 151 Männer und 58 Frauen, in unsere Studie eingeschlossen. Im Schnitt waren Individuen weiblichen Geschlechts signifikant älter (Durchschnittsalter der Männer 57 Jahre; der Frauen 64 Jahre; P - Wert des Kruskal - Wallis - Test 0,0071), wiesen einen geringeren Body - Mass - Index (durchschnittlicher Body - Mass - Index der Männer 27 kg/m², der Frauen 25 kg/m²; P - Wert des Kruskal - Wallis - Test 0,0075) und ein geringeres Herzgewicht auf (durchschnittlich 493 Gramm bei Männern, 393 Gramm bei Frauen; P - Wert des Kruskal - Wallis - Test <0,001).

Mittels Fischers Exaktem Test wurde der Einfluss des Geschlechtes auf die Aldosteronsynthese - Expression in der Nebenniere untersucht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zona Glomerulosa - Klassifikation und dem Geschlecht gefunden werden (P - Wert 0,2758).

Um eine mögliche Einflussnahme des Geschlechtes auf die verschiedenen immunhistochemischen und morphologischen Parameter der Nebenniere zu erfassen, führten wir einen Kruskal - Wallis - Test durch. Wir fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen in Bezug auf die Anzahl von APCCs, von Foci und von Noduli ohne CYP11B2 - Expression. Allerdings wiesen Frauen signifikant mehr Noduli mit CYP11B2 - Expression im Vergleich zu Männern auf (P - Wert des Kruskal - Wallis - Test 0,0148). Bei 37,9

% der Frauen und nur 21,2 % der Männer wurden ein oder mehrere Aldosteron - produzierende Knoten nachgewiesen.

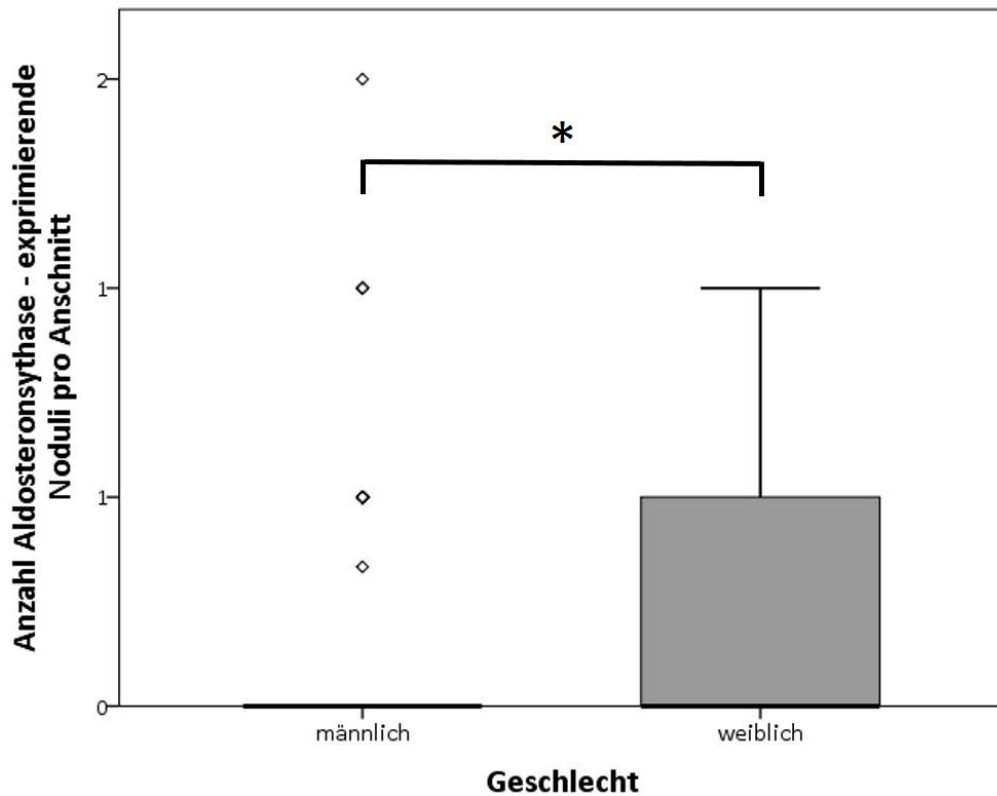


Abbildung 13: Anzahl der Aldosteronsynthese - exprimierenden Noduli in Abhängigkeit vom Geschlecht

Außerdem zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Trend hin zu einer größeren Gesamtzahl an Noduli bei Frauen (P - Wert des Kruskal Wallis Test 0,0815). So wiesen 79,3 % der Frauen und bloß 70,2 % der Männer einen oder mehrere Noduli der Nebennierenrinde auf. Bezüglich der übrigen P - Werte des Kruskal - Wallis - Tests verweisen wir auf die Tabelle im Anhang.

		Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	Herz- gewicht (g)	APCC (n/A)	Foci (n/A)	Nod. (n/A)	pos.Nod. (n/A)	neg.Nod. (n/A)
Männlich	MW SD	57,4 17,7	27,2 5,5	493,9 131,4	0,7 0,9	2,5 2,0	1,0 1,2	0,2 0,3	0,8 1,1
Weiblich	MW SD	64,4 21,3	2,2 5,2	393,6 124,2	0,8 1,0	2,4 2,1	1,2 1,2	0,2 0,3	1,0 1,2
Insgesamt	MW SD	59,3 18,9	26,6 5,5	466,1 136,8	0,7 0,9	2,5 2,0	1,1 1,2	0,2 0,3	0,9 1,1

Tabelle 9: Verteilung der erhobenen Parameter auf Männer und Frauen. APCC, Foci und Noduli werden als Anzahl pro Anschnitt (n/A) dargestellt.

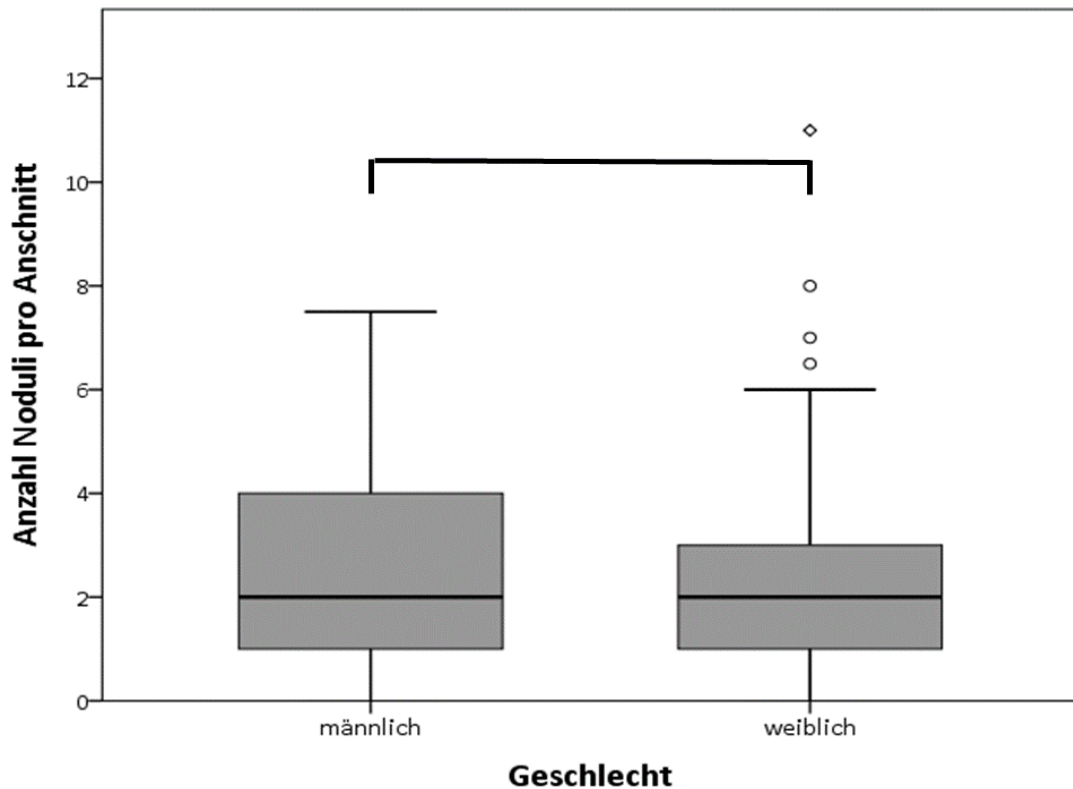


Abbildung 14: Gesamtzahl der Noduli in Abhängigkeit vom Geschlecht

3.2.1.2. Alter

Den Einfluss des Alters auf die unterschiedlichen histomorphologischen Parameter der Nebennierenrinde untersuchten wir mittels Korrelationsanalyse und Jonckheere - Terpstra - Test. Das durchschnittliche Alter unserer Kohorte betrug 59 ± 18 Jahre mit einer Spannweite vom 18. Bis zum 96. Lebensjahr. Hohes Alter ging mit einem höheren Herzgewicht einher (Korrelationskoeffizient nach Pearson: 0,22503; P - Wert: 0,0011), jedoch nicht mit einem gesteigerten Body - Mass - Index (Korrelationskoeffizient nach Pearson: -0,05163; P - Wert: 0,4590).

Im Jonckheere - Terpstra - Test zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausprägungsgrad der Zona Glomerulosa und dem Alter (P - Wert des Jonckheere - Terpstra - Test $<0,0001$). Je höher das Alter der untersuchten Person war, desto schwächer war die Aldosteronsynthese - Expression in deren Zona Glomerulosa. Ferner konnte eine signifikante Abnahme der Anzahl von APCCs mit steigendem Alter nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson -0,18304; P - Wert 0,0080).

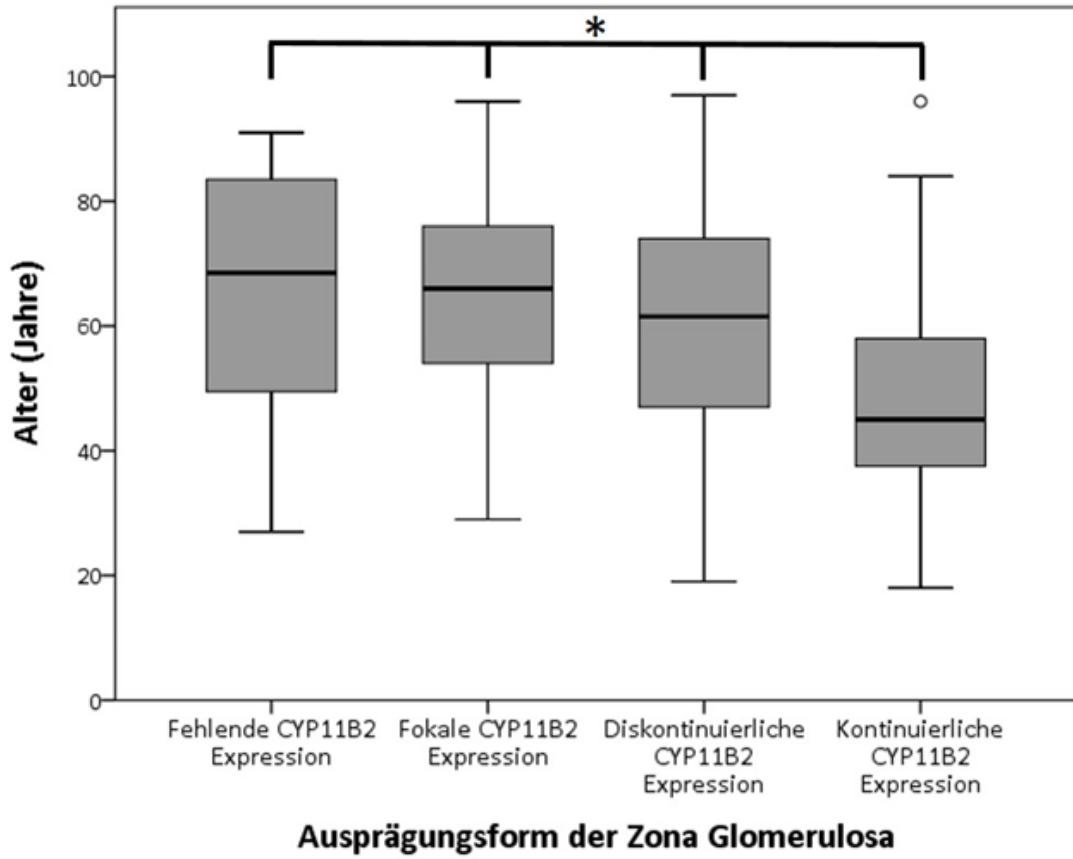


Abbildung 15: Expression von CYP11B2 in der Zona Glomerulosa in Abhängigkeit vom Alter

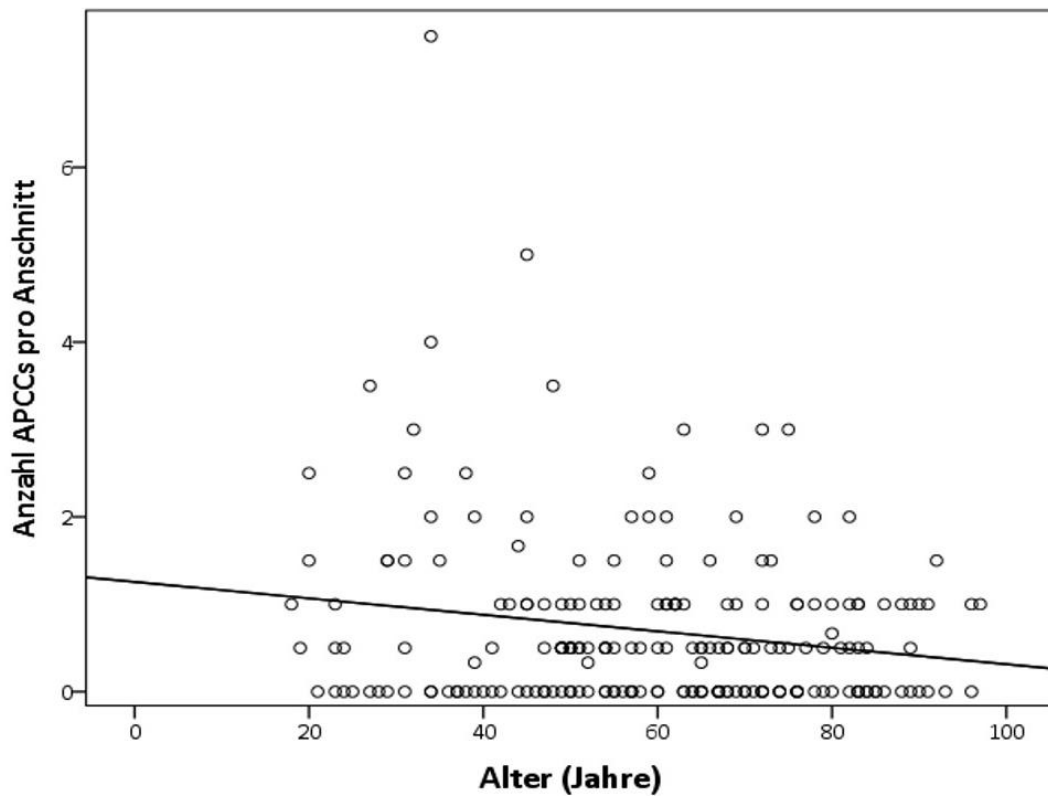


Abbildung 16: Anzahl der APCCs in der Zona Glomerulosa in Abhängigkeit vom Alter

Bei der Analyse der Anzahl von Foci, von Noduli mit und ohne Aldosteronsynthese - Expression und der Gesamtzahl an Noduli konnte ein derartiger Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (bezüglich der Korrelationskoeffizienten und der P - Werte verweisen wir auf die Tabelle im Anhang).

3.2.1.3. Body - Mass - Index und Herzgewicht

Als stellvertretende Variable für Größe und Gewicht der untersuchten Personen wurde für die statistische Analyse der Body - Mass - Index jedes Individuums errechnet. Das Herzgewicht wurde als eigener Parameter analysiert.

Der durchschnittliche Body - Mass - Index der in die Studie eingeschlossenen Personen betrug $26,5 \text{ kg/m}^2$ und liegt knapp außerhalb des Normbereiches ($18 - 25 \text{ kg/m}^2$). Unsere Kohorte ist in dieser Hinsicht repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung in Deutschland. Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes im Jahr 2013 weisen 45,5 % der Deutschen einen Body - Mass - Index im Normbereich auf, 36,7 % haben leichtes Übergewicht mit einem Body - Mass - Index zwischen 25 kg/m^2 und 30 kg/m^2 , während 15,7 % an Adipositas mit einem Body - Mass - Index von über 30 kg/m^2 leiden. Die restlichen 2,0 % weisen ein Untergewicht mit Body - Mass - Index - Werten von unter 15 kg/m^2 auf (76). Der durchschnittliche Body - Mass - Index in Deutschland betrug im Jahre 2013 $25,9 \text{ kg/m}^2$, wobei Frauen im Mittel einen geringeren Body - Mass - Index als Männer aufwiesen (durchschnittlicher Body - Mass - Index von 25 kg/m^2 bei Frauen und von $26,5 \text{ kg/m}^2$ bei Männern) (76). Diese Werte sind beinahe deckungsgleich mit den Ergebnissen unserer Studie.

Das durchschnittliche Herzgewicht unserer Studienpopulation betrug $468,6 \pm 132$ Gramm, lag somit nahe an der Grenze zur Hypertrophie (500 Gramm) und über dem erwarteten Herzgewicht von 320 bis 370 Gramm, welches nach Vanhaebost et al. (77) aus dem Durchschnittsgewicht der Fälle errechnet werden konnte. Diese Diskrepanz könnte auf das fortgeschrittene Alter unserer Kohorte im Vergleich mit der von Vanhaebost et al. (77) untersuchten Patientengruppe zurückgeführt werden. So betrug das Durchschnittsalter in unserer Studie 60 Jahre, in der Publikation von Vanhaebost et al. (77) 39 Jahre. Die statistische Analyse zeigte erwartungsgemäß einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen dem Body - Mass - Index und dem Herzgewicht eines Individuums.

Mittels Jonckheere - Terpstra - Test konnten wir einen signifikanten Einfluss des Body - Mass - Index und des Herzgewichtes auf die Stärke der CYP11B2 - Expression der in der Zona Glomerulosa nachweisen (P - Wert des Jonckheere - Terpstra - Test mit dem Body - Mass -

Index 0,0431; P - Wert des Jonckheere - Terpstra - Test mit dem Herzgewicht $<0,0039$). Je höher der Body - Mass - Index und je schwerer das Herzgewicht einer Person war, desto geringer war die CYP11B2 - Expression ihrer Zona Glomerulosa.

Unsere Studie fand keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Body - Mass - Index beziehungsweise dem Herzgewicht einer Person und der Anzahl von APCCs, Foci, CYP11B2 - negativen oder CYP11B2 - positiven Noduli sowie der Gesamtzahl von Noduli in deren Nebenniere (bezüglich der P - Werte des Kruskal - Wallis - Test und der Korrelationsanalyse verweisen wir auf die Tabelle im Anhang).

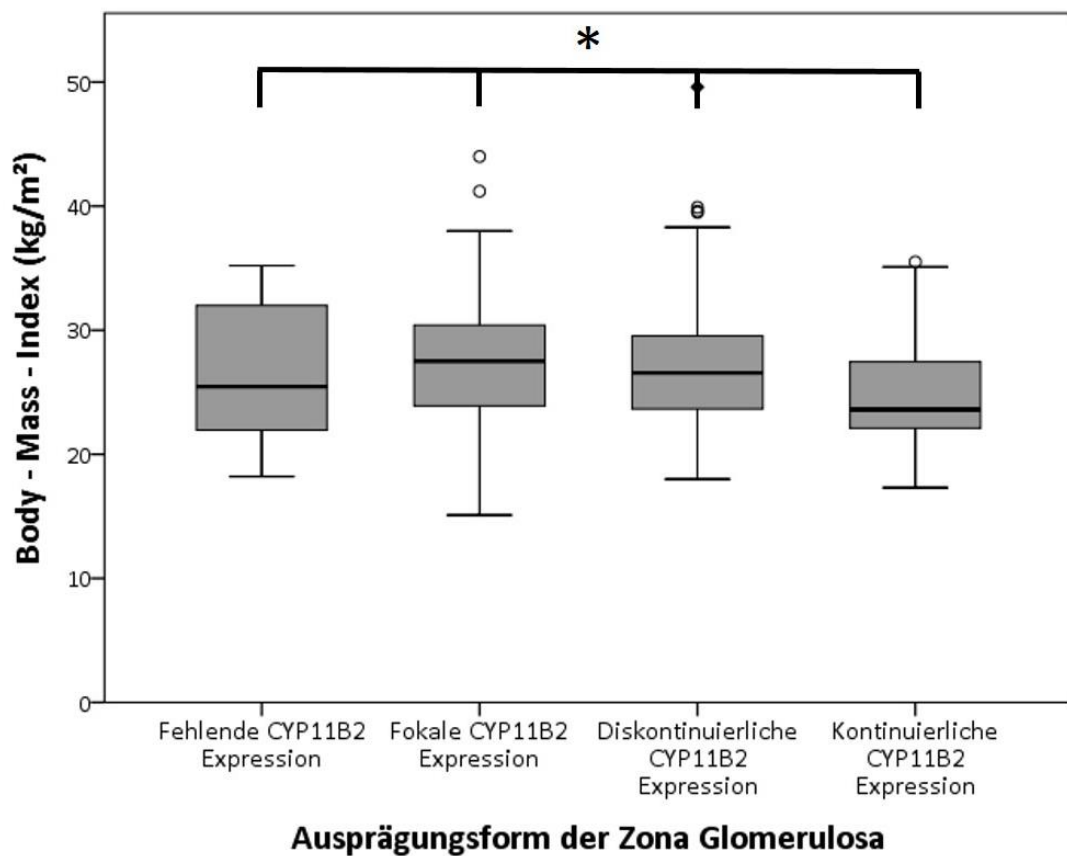


Abbildung 17: CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa in Abhängigkeit vom Body - Mass - Index

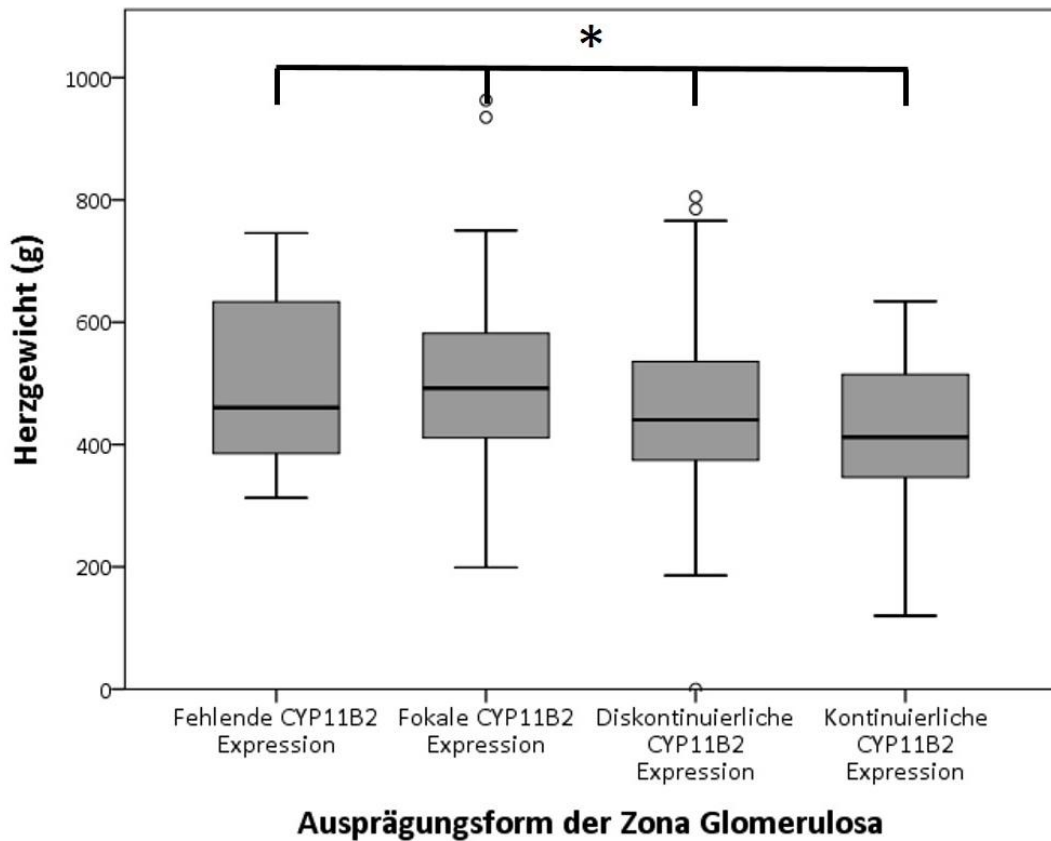


Abbildung 18: CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa in Abhängigkeit vom Herzgewicht

3.2.2. Interne Variablen

3.2.2.1. Die Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa

Den Einfluss verschiedener histomorphologischer und immunhistochemischer Parameter der Nebenniere auf die Intensität der Aldosteronsynthese - Expression in der Zona Glomerulosa analysierten wir mittels Jonckheere - Terpstra - Test.

Wir fanden eine hochsignifikant schwächere CYP11B2 - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa mit zunehmender Anzahl von Foci (P - Wert des Jonckheere - Terpstra - Test <0,0001). Im Gegensatz dazu zeigte das Auftreten von APCCs, von Noduli mit oder ohne Aldosteronsynthese - Expression und die Gesamtzahl der Noduli einer Nebenniere keinen signifikanten Einfluss auf die Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa (Für die P - Werte wird auf die Tabelle im Anhang verwiesen).

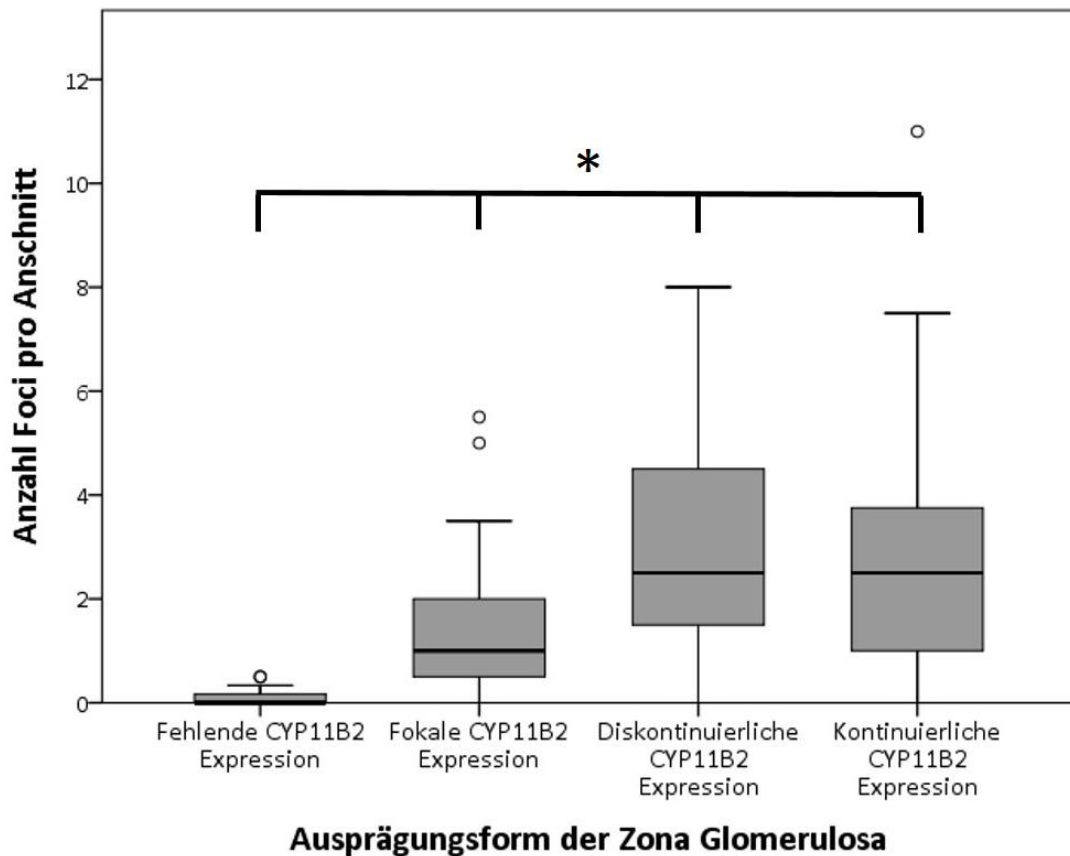


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Foci und der CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa

3.2.2.2. Fokale Expressionsformen der Aldosteronsynthese

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen fokalen Expressionsformen der Aldosteronsynthese in der Nebenniere aufzudecken, korrelierten wir die Variablen APCCs, Foci, Noduli (CYP11B2 - positive, CYP11B2 - negative und Gesamtzahl) untereinander.

Bei dieser Analyse entdeckten wir eine ausgeprägte, positive Korrelation zwischen der Anzahl von APCCs und von Foci (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,432; P - Wert <0,001) und eine schwache, aber signifikante, positive Korrelation zwischen der Zahl an Foci und CYP11B - exprimierenden Noduli (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,14243; P - Wert 0,0397). Außerdem konnten wir einen Trend hin zu einem positiven Zusammenhang zwischen dem Auftreten von APCCs und von CYP11B2 - positiven Noduli nachweisen (Pearson's Korrelationskoeffizient 0,11418; P - Wert <0,0997).

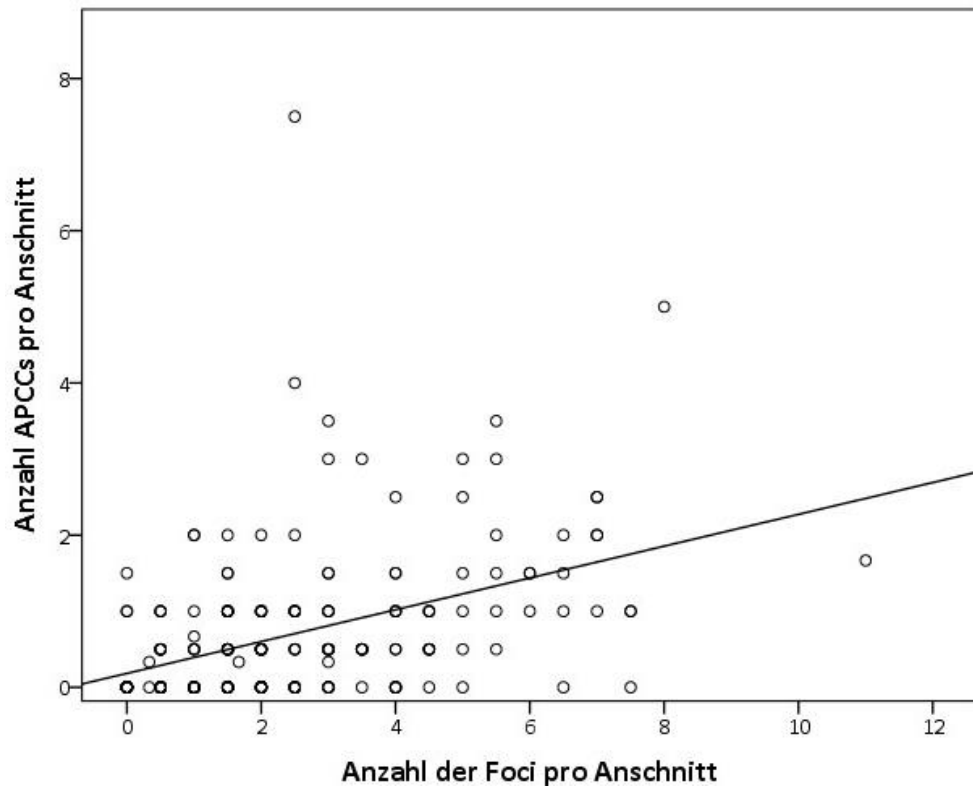


Abbildung 20: Korrelation zwischen der Anzahl an Foci und APCCs

Davon abgesehen konnten wir keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Variablen Anzahl an APCCs, Foci, Noduli mit und ohne CYP11B2 - Expression und der Gesamtzahl von Noduli beschreiben (Für die P - Werte wird auf die Tabelle im Anhang verwiesen).

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend gelangten wir in unserer Studie zu folgenden Erkenntnissen:

1. Die Anzahl CYP11B2 - exprimierender Noduli in Bezug auf die Gesamtzahl der Noduli war gering (15,5 %); die Anzahl der Personen mit CYP11B2 - positiven Noduli betrug 25 % des Untersuchungskollektivs.
2. Mit steigendem Alter sanken sowohl die Expression der Aldosteronsynthase in der Zona Glomerulosa und auch die Anzahl an APCCs, während die restlichen histomorphologischen Parameter unbeeinflusst blieben.
3. Je höher der Body - Mass - Index und je höher das Herzgewicht einer Person war, desto schwächer schien die Aldosteronsynthase - Expression in deren Zona Glomerulosa.
4. Frauen wiesen mehr Aldosteron - produzierende Noduli auf als Männer.
5. Je intensiver die Aldosteronsynthase - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa, desto geringer war die Anzahl an Foci.
6. Die Anzahl der APCCs und Foci korrelierte positiv. Ebenso korrelierte die Anzahl der CYP11B2 - exprimierenden Knoten und der Foci positiv.
7. Für die restlichen Variablen konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge gefunden werden.

4. Diskussion

Das Besondere unserer Studie liegt einerseits in der Verwendung eines neuen, für die Aldosteronsynthase hochspezifischen Antikörpers (24), und andererseits im analysierten Untersuchungskollektiv.

Der gegen CYP11B2 gerichtete Antikörper ermöglichte es, Aussagen über die Morphologie der Zona Glomerulosa zu treffen und indirekte Informationen über deren hormonelle Aktivität zu gewinnen. Zudem konnten wir mikro - und makronoduläre Strukturen der Nebennierenrinde in Bezug auf deren Hormonproduktion untersuchen. Die Darstellung der funktionellen Anatomie der Zona Glomerulosa stellt einen zusätzlichen Informationsgewinn im Vergleich zur Hämatoxylin - Eosin - Färbung dar, da die Hormonproduktion ein von der histomorphologischen Erscheinung der Zellen unabhängiger Faktor zu sein scheint. So decken

sich nach Boulkroun et al. (65) diejenigen Zellen, welche in der Hämatoxylin - Eosin - Färbung als Zona Glomerulosa klassifiziert werden, nicht mit den Zellen, welche Aldosteronsynthase exprimieren.

Andererseits ermöglichte uns die Untersuchung von Nebennieren aus rechtmedizinischen Sektionen, wenn auch mit gewissen Einschränkungen, Aussagen zur Anatomie von Nebennieren in der Normalbevölkerung zu treffen. Da bei keiner der in die Studie eingeschlossenen Personen Pathologien der Nebennieren bekannt waren, nehmen wir an, dass die untersuchten Fälle bezüglich der Nebenniere gesund oder zumindest asymptomatisch sind. Insofern dürften die in dieser Studie erhobenen Daten zur Morphologie der Zona Glomerulosa auf die gesunde Allgemeinbevölkerung übertragbar sein.

Aktuell sind noch zahlreiche Fragen bezüglich der Entstehung Aldosteron - produzierender Adenome, der Rolle der APCCs in gesunden Nebennieren sowie der Zusammenhang zwischen Nodulation und Mutationen offen. Unsere Studie wirft einen Blick auf die physiologische Ausprägungsform der Zona Glomerulosa, welche die Ausgangslage für die Entwicklung eines primären Hyperaldosteronismus darstellt, um die in den in der Einleitung erörterten Studien gewonnenen Erkenntnisse besser einordnen zu können und um die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms zu entschlüsseln.

Die im Ergebnisteil ausführlich dargestellten Erkenntnisse unserer Untersuchungen werden im Folgenden einzeln diskutiert. Anschließend wird versucht, unter Berücksichtigung unserer Forschungsergebnisse und aktueller Publikationen, ein Modell für die Entstehung Aldosteron - produzierender Adenome zu formulieren.

4.1. Häufigkeiten Aldosteron - produzierender und nodulärer Formationen

4.1.1. Grad der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa

Im Rahmen unserer Studie analysierten wir die Intensität der Aldosteronsynthase - Expression in der Zona Glomerulosa und unterschieden dabei verschiedene Ausprägungsformen, die wir in eine vierstufige Klassifikation einteilten. Wir differenzierten zwischen kontinuierlicher, diskontinuierlicher, fokaler und fehlender CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa. In unserem Untersuchungskollektiv war das diskontinuierliche Expressionsmuster der Aldosteronsynthase am häufigsten vertreten und konnte in 54 % (112/209) aller untersuchten Nebennieren nachgewiesen werden. Bei etwa einem Viertel (24 %, 50/209) der Nebennieren

wurde die Zona Glomerulosa Expression als fokal eingestuft, bei 17 % (35/209) als kontinuierlich. Eine fehlende Expression der Aldosteronsynthese in der Zona Glomerulosa wiesen nur eine Minderheit (5 %, 12/209) der untersuchten Organe auf.

Gemäß unseren Ergebnissen ist somit die diskontinuierliche Aldosteronsynthese - Expression das am weitesten verbreitete Expressionsmuster der Zona Glomerulosa in Nebennieren einer asymptomatischen Bevölkerung. Fasst man das diskontinuierliche und das fokale Expressionsmuster, die sich voneinander nur in der Quantität Aldosteron - produzierender Areale unterscheiden, in eine Kategorie zusammen, weisen beinahe 80 % unseres Untersuchungskollektivs eine geringe bis fehlende Expression der Aldosteronsynthese in der Zona Glomerulosa außerhalb fokaler Strukturen auf. Eine kontinuierlich aktivierte Zona Glomerulosa stellt, ebenso wie das völlige Fehlen Aldosteron - produzierender Areale (inklusive Foci, APCCs und Noduli), einen Ausnahmezustand dar.

Unsere Untersuchung stellt jedoch nur eine Momentaufnahme des Zustandes der Zona Glomerulosa kurz vor dem Tod der untersuchten Person dar. Studien an Versuchstieren zeigten eine hohe Plastizität der CYP11B2 - Expression und der Zonierung innerhalb der Nebennierenrinde. So wiesen Tiere, die mit natriumarmer Kost gehalten wurden, eher eine kontinuierliche Expression der Aldosteronsynthese auf. Im Gegensatz dazu exprimierten Tiere, die über die Ernährung einen Salz - Überschuss zu sich nahmen, CYP11B2 nur innerhalb kleiner, diffus unter der Kapsel verstreuter Zellen (24, 78). Eine ähnliche Plastizität kann auch für den Menschen angenommen werden, wobei je nach Salzaufnahme, Wasser - und Mineralhaushalt die Expression der Aldosteronsynthese verstärkt oder vermindert sein könnte.

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse kann gefolgert werden, die Aldosteronproduktion erfolge bei gesunden Personen der westlichen Gesellschaft hauptsächlich in fokalen Strukturen der Nebennierenrinde, wie Foci, APCCs und Aldosteron - produzierenden Noduli, und nur zu geringem Anteil in Zellen, die morphologisch der Zona Glomerulosa zugeordnet werden. Bei Bedarf könnte die Aldosteronproduktion in den Zellen der Zona Glomerulosa aktiviert werden, was zu einer kontinuierlichen Expression der Aldosteronsynthese und zur Zona Glomerulosa - Hyperplasie führen würde. Ebenso könnte die Aldosteronproduktion in der gesamten Nebenniere, auch in fokalen Aldosteron - produzierenden Strukturen, unterdrückt werden. Diese Veränderungen würden der Adaptation des Wasser - und Elektrolythaushaltes auf Verschiebungen der Homöostase dienen.

Zu einer ähnlichen Erkenntnis gelangten Nakamura et al. (67), als sie in immunhistochemischen Untersuchungen (unter Berücksichtigung des McCarty's H - Scoring Systems) keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der Aldosteronsynthese - Expression

zwischen Geweben gesunder Nebennieren und Aldosteron - produzierender Adenome nachweisen konnten. Nakamura et al. (67) vermuteten, dass auch in gesunden Individuen aufgrund der modernen salzreichen Ernährung das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System unterdrückt sei und somit der Stimulus für die Aldosteronproduktion fehle, analog zum negativen Feedbackmechanismus durch Hormonexzess bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus.

4.1.2. Gesamtzahl der Noduli mit und ohne CYP11B2 - Expression

Neben der Analyse der Zona Glomerulosa lag ein besonderes Augenmerk unserer Studie auf der Untersuchung nodulärer Strukturen der Nebennierenrinde. Insgesamt fanden wir in den Nebennieren der 209 in unsere Studie eingeschlossenen Personen 218 Noduli. Davon wiesen 34 eine Aldosteronproduktion im Sinne einer CYP11B2 - Expression auf, während bei den restlichen 184 keine Expression von CYP11B2 gefunden wurde. Prozentuell ausgedrückt wiesen 15,5 % aller von uns identifizierten Noduli eine Aldosteronproduktion auf, während 84,5 % keine CYP11B2 - Expression zeigten und somit als nicht - Aldosteron - produzierend eingestuft wurden. Gemäß unseren Ergebnissen ist somit die Anzahl Aldosteron - produzierender Noduli bei Personen ohne Nebennierenerkrankung gering. Im Gegensatz dazu scheinen Noduli ohne Aldosteronproduktion auch in der gesunden Bevölkerung weit verbreitet zu sein. Insgesamt fanden wir bei 72,8 % der untersuchten Personen (152/209) einen oder mehrere Noduli pro Nebennierenanschnitt und bei 25,8 % unseres Kollektivs (54/209) mindestens einen Nodus mit Aldosteronproduktion. Nur 27,3 % (57/209) wiesen keine Noduli auf, weder mit noch ohne CYP11B2 - Expression.

Die in unserer Studie ermittelte Prävalenz von Noduli deckt sich nicht mit der Prävalenz von Inzidentalomen (in radiologischen Untersuchungen zufällig entdeckte Knoten der Nebenniere), welche laut Studien ungefähr vier Prozent beträgt (43). Diese Diskrepanz kann einerseits durch die geringere Detektionsrate der radiologischen Bildgebung im Vergleich zur hohen Nachweisrate der Autopsie und andererseits durch die Größe der jeweiligen Läsionen der Nebenniere erklärt werden.

Im Gegensatz zu Inzidentalomen sind die von uns als Noduli bezeichneten, mikronodulären Strukturen von kleinerem Durchmesser und daher im Regelfall nicht in der Schnittbildgebung zu erkennen. Die geringe Sensitivität radiologischer Untersuchungen bei der Detektion adrenaler Knoten im Vergleich zur Histopathologie wird durch verschiedene Studien bestätigt. Laut Ono et al. (79) beträgt die Prävalenz Aldosteron - produzierender Knoten, die bei computertomographischen Untersuchungen unentdeckt bleiben, 13 bis 30 %. Monticone et al.

(54) konnten in ihrer Studie bei elf Patienten mit lateralisierendem primären Hyperaldosteronismus, bei denen in der Computer - Tomographie keine Läsionen der Nebennieren erkennbar waren, mittels immunhistochemischer Analysen der Nebennieren in vier Fällen ein singuläres Adenom und in sieben Fällen multiple adrenale Noduli nachweisen.

Autopsiestudien an einem unselektionierten Patientengut konnten kortikale Noduli bei 54 % und Adenome in etwa 5 % der Individuen nachweisen (6, 80). Obwohl in der Autopsie sowohl Adenome als auch kleine multiple Noduli erfasst werden, ist die Sensitivität der makroskopischen Untersuchung der Autopsie geringer als die einer mikroskopischen Analyse, wie sie in unserer Studie durchgeführt wurde. Die höhere Prävalenz von Nebennierenknoten in unserem Patientengut im Vergleich zu Autopsien kann folgendermaßen durch die Untersuchungstechnik erklärt werden: In unserer Studie untersuchten wir alle Nebennieren histologisch und konnten sehr kleine Noduli erkennen, welche in der Autopsie noch nicht erkennbar waren.

Die von uns beschriebene hohe Prävalenz (72,2 %) nodulärer Strukturen in einem asymptomatischen Kollektiv legt die Vermutung nahe, Noduli würden in normalen Nebennieren vorkommen, ohne eine pathologische Bedeutung zu besitzen. Die exakte Ätiologie der Noduli ist noch nicht endgültig geklärt und Gegenstand aktueller Studien. Nebennierenknoten könnten das anatomische Korrelat einer Anpassungsreaktion auf innere oder äußere Reize darstellen. Ebenso könnte die Nodulation im Rahmen der Entwicklung und Alterung der Nebenniere als physiologischer Zustand im Alter auftreten. Eine pathologische Bedeutung einzelner Nebennierenknoten kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Boulkroun et al. (65) beschrieben ein vermehrtes Auftreten mikroskopisch und makroskopisch erkennbarer Knoten in Nebennieren von Patienten mit Aldosteron - produzierendem Adenom im Vergleich zu Organen gesunder Personen. Gemäß Boulkroun et al. (65) könnte dieser Zusammenhang auf eine Rolle dieser Knoten in der Adenomgenese schließen lassen: Noduli bestünden aus vermehrt proliferierenden Zellen, welche im zeitlichen Verlauf Mutationen akkumulierten und somit die Fähigkeit zur autonomen Hormonproduktion akquirieren würden. Andererseits räumten die Autoren ein, die vermehrte Nodulation könnte auch sekundär, als Reaktion auf erhöhte Aldosteronspiegel aufgrund eines bereits bestehenden Aldosteron - produzierenden Adenoms, erfolgen. Abgesehen von der aktuell noch ungeklärten Rolle der Nodulation im Rahmen der Adenomentstehung ist jedoch unumstritten, dass Knoten der Nebenniere sehr häufig auch bei gesunden Menschen auftreten und nicht zwingend eine Pathologie darstellen.

Beinahe 85 % der von uns identifizierten Noduli wiesen keine Aldosteronproduktion auf. Diese Zahlen decken sich mit früheren Erkenntnissen, nach denen die meisten Inzidentalome nicht hormonproduzierend sind (43). Allerdings kann aufgrund unseres Versuchsaufbaus die Produktion anderer Hormone als Aldosteron in den von uns als nicht Aldosteron - produzierende Noduli klassifizierten Nebennierenknoten nicht ausgeschlossen werden. Weitere Hormone, wie beispielsweise Kortisol oder Androgene, waren nicht Gegenstand unserer Untersuchungen.

Die Anzahl der CYP11B2 - exprimierenden Noduli an der Gesamtanzahl der Noduli in unserem Untersuchungsgut war relativ gering: nur 15,5 % aller Noduli, beziehungsweise 34 von 218 Noduli bei insgesamt 209 Personen, wiesen Zeichen einer Aldosteronproduktion auf. Dies entspricht den Angaben der National Institute of Health Consensus Conference von 2002 (56), nach der nur 2 % bis 5 % aller Inzidentalome eine autonome Aldosteronproduktion aufweisen. Die Differenz zwischen den von der National Institute of Health Consensus Conference angegebenen 5 % Aldosteron - produzierender Inzidentalome und den in unserer Studie erfassten 15 % CYP11B2 - exprimierender Noduli kann dadurch erklärt werden, dass CYP11B2 - exprimierende Noduli meist erst ab einer gewissen Größe durch ihre Hormonproduktion klinisch auffällig werden oder in der Bildgebung als Inzidentalome erkannt werden könnten (19). Der Nachweis einer Aldosteronsynthese - Expression in einem Nodulus bedeutet nicht gezwungenermaßen, dass dieser eine autonome Produktion von Aldosteron aufweist, und darf nicht mit der Diagnose eines primären Hyperaldosteronismus gleichgesetzt werden. Allerdings könnten CYP11B2 - exprimierende Noduli subklinische, möglicherweise normokaliämische und normotone Formen eines Aldosteron - produzierenden Adenoms darstellen (19).

Unsere Untersuchungen bestätigen somit die klinischen Beobachtungen an Patienten: Nur wenige Nebennierenknoten beziehungsweise Inzidentalome weisen bei klinisch asymptomatischen Personen eine Hormonproduktion auf. Trotz des insgesamt seltenen Auftretens war die Prävalenz Aldosteron - produzierender Knoten in unserem Kollektiv mit 25,8 % höher als erwartet. Die Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus wird aktuell auf etwa ein bis zehn Prozent der Hypertoniker geschätzt (21, 50). Etwa ein Drittel aller Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus weist ein Aldosteron - produzierendes Adenom auf (18). Insofern kann eine Prävalenz Aldosteron - produzierender Adenome von 0,3 bis 3 % bei Hypertonikern errechnet werden. In Industrienationen wie Deutschland oder den Vereinigten Staaten von Amerika leidet etwa ein Drittel der Bevölkerung an Hypertonie (21). Unter Berücksichtigung dieser Zahlen würden wir in unserem Untersuchungskollektiv eine Prävalenz Aldosteron - produzierender Adenome von 0,1 bis 1 % erwarten. Unsere Beobachtungen

deckten sich jedoch nicht mit diesen Berechnungen. Auch unter der Annahme, dass alle der von uns untersuchten Personen an einer Hypertonie litten, wovon nicht auszugehen ist, übersteigt die von uns gefundene Anzahl an Individuen mit CYP11B2 - exprimierenden Noduli die in unserem Kollektiv erwartete Prävalenz an Aldosteron - produzierenden Knoten.

Der in unserer Studie beobachteten hohen Anzahl Aldosteron - produzierender Knoten einerseits und nodulärer Strukturen der Nebenniere andererseits können verschiedene Ursachen zugrunde liegen: Erstens ist die immunhistochemische Untersuchung sensitiver als die klinische Diagnostik einschließlich Schnittbildgebung und Bestimmung des Aldosteron - Renin - Quotienten. Zweitens ist das Vorhandensein Aldosteron - produzierender Knoten nicht mit der Diagnose eines primären Hyperaldosteronismus gleichzusetzen. Viele der von uns gefundenen Noduli waren von geringer Größe. Die Hormonproduktion eines oder einiger weniger sehr kleiner Knoten könnte nicht ausreichen, um laborchemische Veränderungen oder klinische Symptome im Sinne eines primären Hyperaldosteronismus auszulösen. Ferner könnte die CYP11B2 - Expression einiger weniger Noduli die Hormonproduktion in der restlichen Nebennierenrinde unterdrücken, sodass trotz des Auftretens Aldosteron - produzierender Knoten die Gesamtproduktion des Hormons konstant bliebe. In diesen Fällen wäre der Betroffene trotz autonomer Hormonproduktion klinisch und in Laboruntersuchungen unauffällig.

4.1.3. Gesamtzahl der Foci

Foci, fokale Zellansammlungen Aldosteron - produzierender Zellen, konnten bei 91,4 % (191/209) unseres Untersuchungskollektivs nachgewiesen werden. Nur bei 8,6 % (18/209) der Personen fanden wir keine Foci. Aufgrund der hohen Prävalenz der Foci gehen wir davon aus, dass diese Strukturen einen essentiellen und physiologischen Bestandteil der gesunden Zona Glomerulosa darstellen. Das Fehlen von Foci bei 8,6 % der untersuchten Individuen könnte auf eine komplette Suppression der Aldosteronproduktion in deren Zona Glomerulosa zurückzuführen sein. Diese Suppression könnte reaktiv als Folge einer Verschiebung der Homöostase, beispielsweise durch eine verstärkte Natriumaufnahme oder durch Medikamenteneinnahme, entstehen. Ebenso könnte sie durch einen autonom Aldosteron - produzierenden Knoten verursacht werden, welcher außerhalb der untersuchten Schnittfläche lokalisiert war und daher in der histologischen Untersuchung nicht nachgewiesen wurde.

Mit steigender Anzahl von Foci beobachteten wir eine Abnahme der Intensität der Aldosteronsynthese - Expression innerhalb der restlichen Zona Glomerulosa. Diese Feststellung

deuteten wir als weiteren Hinweis dafür, dass Foci eine physiologische Ausprägungsform der Zona Glomerulosa darstellen. Möglicherweise erfolgt die adrenale Aldosteronproduktion entweder innerhalb von Zellen der kontinuierlich oder diskontinuierlich aktivierten Zona Glomerulosa, oder hingegen in einer Vielzahl kleiner Foci, die in ihrer Gesamtheit ein spezielles Ausprägungsmuster der Zona Glomerulosa darstellen.

4.1.4. Gesamtzahl der APCCs

APCCs konnten wir in den Nebennieren von etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Personen (59 %, 123/209) nachweisen, wobei wir meist ein bis zwei APCCs pro Nebennierenanschnitt fanden. Die maximale Anzahl APCCs in einem einzigen Nebennierenanschnitt betrug in unserem Untersuchungskollektiv sieben APCCs. Bei 41 % (86/209) der Individuen konnten wir keine APCCs nachweisen. Im Durchschnitt identifizierten wir ein APCC pro Nebennierenanschnitt. Im Gegensatz dazu beschrieben Nanba et al. (64) bei gesunden Personen durchschnittlich fünf APCCs pro Nebenniere. Allerdings ist deren Ergebnis, mit einer Fallzahl von nur drei untersuchten Individuen, nicht repräsentativ. Nach Nanba et al. (64) war zudem die Zahl der APCCs in Nebennieren mit Aldosteron - produzierendem Adenom signifikant geringer als in gesunden Organen. Dies deuteten die Autoren als Hinweis für die Supprimierbarkeit der Hormonproduktion in APCCs durch das Aldosteron - produzierende Adenom.

Die Frage nach der Regulation der Hormonproduktion innerhalb von APCCs und insbesondere nach einer möglichen Autonomie dieser Strukturen wurde in verschiedenen Publikationen kontrovers diskutiert. Der mehrfach erbrachte Nachweis von APCCs im peritumoralen Gewebe von Nebennieren mit Aldosteron - produzierendem Adenom wurde als Beweis für die fehlende Regulierbarkeit und Supprimierbarkeit der Hormonproduktion in APCCs aufgefasst (63, 67). Aufgrund des Auftretens der APCCs bei primärem Hyperaldosteronismus trotz supprimiertem Renin - Angiotensin - Aldosteron - System wurde auf eine vom hormonellen Regelkreis entkoppelte, autonome Hormonproduktion in APCCs geschlossen. Autonome Hormonproduktion ist ein Hauptcharakteristikum endokriner Tumoren, unter anderem auch des Aldosteron - produzierenden Adenoms. Insofern wurde der Verdacht geäußert, APCCs seien Vorläuferläsionen von Aldosteron - produzierenden Adenomen (63, 67, 70).

Unser Ergebnis, nach dem 59 % des Untersuchungskollektivs APCCs aufweisen, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Monticone et al. (54), welche in 45 % der von ihnen analysierten Individuen APCCs finden konnten, und mit der Veröffentlichung von Dekkers et al.

(66), die in 51 % der untersuchten Nebennieren APCCs nachweisen konnten. Während unsere Studie Personen ohne bekannte Nebennierenerkrankung untersuchte, analysierten Monticone et al. (54) und Dekker et al. (66) Nebennieren von Patienten mit einem klinisch diagnostizierten unilateralen primären Hyperaldosteronismus. Die ähnliche Prävalenz von APCCs in unserer und in den oben genannten Studien, trotz unterschiedlicher, einmal gesunder und andermal erkrankter Kohorten, stützt die Vermutung, APCCs entstünden unabhängig von Adenomen und seien physiologische Bestandteile der Nebennierenrinde, nicht Vorläuferläsionen von Aldosteron - produzierenden Adenomen.

Im Vergleich zu Knoten und Foci kamen APCCs nur bei etwa der Hälfte der von uns untersuchten Individuen vor. Möglicherweise sind APCCs keine konstant exprimierte Formationen Aldosteron - produzierender Zellen innerhalb der Nebennierenrinde, sondern entstehen erst bei Bedarf oder als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus. Diese These würde eine gewisse Regulation des Auftretens und somit auch der Hormonproduktion von APCCs voraussetzen und stellt die von Nishimoto et al. (63, 70) und Nakamura et al. (67) postulierte Autonomie der APCCs in Frage.

4.1.4.1. Überlegungen zur Bedeutung der APCCs

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Rolle der APCCs, insbesondere deren Bedeutung als Vorläuferläsionen in der Entwicklung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms und deren hormonellen Regulation, noch nicht definitiv geklärt.

Um die Bedeutung der APCCs zu verstehen, müssen folgende Ergebnisse berücksichtigt werden:

- APCCs bestehen aus morphologisch heterogenen Zellen mit charakteristischer Expression von CYP11B2

Bei einer rein morphologischen Untersuchung der Nebenniere mittels Hämatoxylin - Eosin - Färbung sind APCCs nicht identifizierbar. Innerhalb eines APCC befinden sich im kapselnahen Anteil Zellen, die morphologisch denen der Zona Glomerulosa entsprechen, und in den tieferen, marknahen Anteilen Zellen, welche denen der Zona Fasciculata entsprechen (63). Zudem besitzen APCCs keine Kapsel oder Pseudokapsel, sodass eine klare Abgrenzung zur umgebenden Zona Glomerulosa und Zona Fasciculata fehlt. In der immunhistochemischen Färbung sind APCCs durch ihre ausgeprägte Expression der Aldosteronsynthase erkennbar, wobei jene Zellen, die APCCs umgeben, weder CYP11B2 noch CYP11B1 exprimieren (65).

Ähnliche Zellen ohne CYP11B2 - und ohne CYP11B1 - Expression beschrieben Aiba et al. (81) in Nebennieren älterer Patienten. Diese Zellen interpretierten die Autoren als undifferenzierte Progenitorzellen, die sich sowohl zu Aldosteron - produzierenden, CYP11B2 - exprimierenden, als auch zu Kortisol - produzierenden, CYP11B1 - exprimierenden Zellen differenzieren könnten. Möglicherweise entstünden APCCs aus diesen CYP11B2 - und CYP11B1 - negativen Zellen im Rahmen einer Reaktion auf noch nicht bekannte, interne oder externe Stimuli. Warum sich sowohl Anteile der Zona Glomerulosa, als auch daran angrenzende, morphologisch der Zona Fasciculata zugehörige Zellen, zu Aldosteron - produzierenden Zellen umdifferenzieren würden, während die restlichen Areale der Zona Glomerulosa endokrin inaktiv blieben, bleibt unklar.

Die zellulären Ursprünge und Entstehungsmechanismen der APCCs sind umstritten, unter anderem, da die Zellen der APCCs keine einheitliche Morphologie aufweisen. Die Zellen der äußeren Lagen mit Kontakt zur Nebennierenkapsel ähneln den kompakten Zellen der Zona Glomerulosa, während die inneren Zellen der APCCs dasselbe lipidreiche Zytoplasma wie die Zellen der Zona Fasciculata aufweisen. Unter Berücksichtigung der Morphologie scheint die äußere Zellschicht der APCCs sich durch vermehrte Expression von CYP11B2 direkt aus der Zona Glomerulosa zu entwickeln. Die Zellen der inneren Schichten der APCCs hingegen könnten auf zweierlei Art entstehen: Einerseits könnten ursprünglich der Zona Fasciculata zugehörige Zellen Eigenschaften der Zona Glomerulosa, vor allem die Fähigkeit zur Aldosteronproduktion akquirieren. Andererseits könnten Zellen der Zona Glomerulosa eine der Zona Fasciculata ähnliche Struktur entwickeln, möglicherweise da das glatte endoplasmatische Retikulum aufgrund der verstärkten Hormonproduktion ausgebaut wird und die Zellen vermehrt Cholesterin als Ausgangssubstanz für die Steroidhormonsynthese einlagern, und dann in innere Schichten der Nebennierenrinde wandern. Diese Theorie postulierten Boulkroun et al (65), um das Vorherrschen von Zona Fasciculata - ähnlichen Zellen in Aldosteron - produzierenden Adenomen zu erklären.

Ein neues Licht auf die Entstehung der APCCs warf eine Studie von Nishimoto et al. (70), die das Transkriptom von Zellen aus APCCs mit dem Transkriptom von Zona Glomerulosa -, Zona Fasciculata - und Zona Reticularis - Zellen verglich. Zellen aus APCCs und der Zona Glomerulosa wiesen hohe Übereinstimmungen der Genexpression auf. Einzig die Aldosteronsynthese, beziehungsweise das Gen *CYP11B2*, war in APCCs im Vergleich zu normalen Zona Glomerulosa - Zellen überexprimiert. Zahlreiche Gemeinsamkeiten bestanden zwischen der Genexpression von Zellen der APCCs und der Zona Fasciculata, während das Transkriptom der Zona Reticularis große Unterschiede zu dem der APCCs aufwies. Demnach scheinen APCCs aus Zellen der Zona

Glomerulosa zu entstehen, welche aus bisher unbekanntem Gründen vermehrt Aldosteronsynthese exprimieren. Trotz ihres unterschiedlichen histologischen Erscheinungsbildes scheinen die marknahen und kapselnahen Zellen der APCCs einen gemeinsamen Ursprung zu haben (70). Ein APCC ist demnach nicht ein rein funktioneller Zusammenschluss von Zellen unterschiedlicher Genese, sondern eine besondere Organisationsstruktur der Nebenniere mit einem gemeinsamen zellulären Ursprung.

Schließlich muss in Bezug auf die Morphologie der APCCs erwähnt werden, dass diese der physiologischen Anatomie der Nebennierenrinde folgen. APCCs zeigen keinerlei Hinweise auf eine Architekturstörung, auf eine Verdrängung, auf eine vermehrte Vaskularisation, geschweige denn auf eine Invasion des umliegenden Gewebes oder sonstige Zeichen autonomen und unkontrollierten Wachstums, was für eine physiologische Bedeutung der APCCs spricht.

- APCCs tragen Mutationen, die für eine exzessive Hormonproduktion in Aldosteron - produzierenden Adenomen verantwortlich sind

Nishimoto et al. (70) untersuchten APCCs in Nebennieren gesunder Nierenspende auf das Vorkommen von Mutationen, welche mit einem Aldosteron - produzierenden Adenom assoziiert werden. In mehr als einem Drittel (35 %) der APCCs konnten die Autoren pathologische Veränderungen der Gene *ATP1A1*, *ATP2B3* oder *CACNA1D* nachweisen. Die genetischen Veränderungen traten nur im APCC und nicht im umgebenden Gewebe auf. Mutationen des *KCNJ5* - Gens wurden jedoch in keinem APCC gefunden. Viele der von Nishimoto et al. (70) untersuchten Nebennieren wiesen mehrere APCCs auf. In einigen Fällen trug eines der APCCs eine *ATP1A1* - oder eine *CACNA1D* - Mutation, während die restlichen APCCs keine Veränderungen der oben genannten Gene zeigten. In einer Nebenniere fanden Nishimoto et al. (70) sogar zwei APCCs mit zwei unterschiedlichen Mutationen der besagten Gene. Durch den Nachweis unterschiedlicher genetischer Veränderungen in verschiedenen APCCs derselben Nebenniere kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die einzelnen APCCs aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entstehen. In diesem Fall würde dieselbe Mutation in allen APCCs einer Nebenniere auftreten. Die Erkenntnisse von Nishimoto et al. (70) lassen vermuten, dass sich die einzelnen APCCs in einer Nebenniere unabhängig voneinander entwickeln und unterschiedliche somatische Mutationen erwerben, welche jeweils über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels zur vermehrten *CYP11B2* - Expression führen.

Die von Nishimoto et al. (70) gewonnenen Erkenntnisse bekräftigen zudem den Verdacht, APCCs würden Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome darstellen. Folgendes Szenario wäre denkbar: Zellen der Zona Glomerulosa würden Mutationen erwerben, welche eine autonome Hormonproduktion bedingen. Aus den mutierten Zellen entstünden in Folge APCCs. Diese würden im Verlauf weitere, proliferationsfördernde oder immortalisierende Mutationen erwerben und sich zu einem Adenom weiterentwickeln. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob die oben genannten, mit Aldosteron - produzierenden Adenomen assoziierten Mutationen auch die Zellproliferation fördern (27). Möglicherweise führen Mutationen von *CACNA1D* und *ATP1A1* zu einer Steigerung der Aldosteronsynthese - Expression, ohne die Zellteilung oder das Zellwachstum anzuregen. Der Nachweis der Mutationen alleine ist kein Beweis für die Progression der APCCs zu Aldosteron - produzierenden Adenomen. Er erklärt allerdings die Überexpression von *CYP11B2* in ebendiesen Läsionen und untermauert die These einer autonomen Hormonproduktion in APCCs. Da die Überexpression des *CYP11B2* - Gens ein Hauptcharakteristikum der APCCs darstellt, ist das Vorkommen von Mutationen, welche die Hormonproduktion fördern, in APCCs nicht überraschend.

Besondere Aufmerksamkeit verdient das Fehlen von *KCNJ5* - Mutationen in APCCs. *KCNJ5* ist aktuell die am häufigsten nachgewiesene Mutation bei Aldosteron - produzierenden Adenomen und sollte, unter Annahme einer Progression der APCCs zu Adenomen, ebenso häufig in APCCs wie in Adenomen auftreten. Dies traf in der Studie von Nishimoto et al. (70) allerdings nicht zu. Andererseits könnte das Fehlen von *KCNJ5* - Mutationen in APCCs durch eine schnellere Progression der *KCNJ5* - mutierten APCCs zu Adenomen im Vergleich zu andersartig mutierten APCCs bedingt sein. Aufgrund der rascheren Entwicklung der Adenome könnten Vorläuferläsionen nur innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne entdeckt werden, und die betroffenen Patienten würden frühzeitig klinische Symptome des Hyperaldosteronismus entwickeln. Im Gegensatz dazu würden sich *CACNA1D* - oder *ATP1A1* - mutierte APCCs nur sehr langsam zu Aldosteron - produzierenden Adenomen weiterentwickeln, würden als APCCs persistieren oder sich im Laufe der Zeit zurückbilden, weshalb diese Mutationen seltener in Aldosteron - produzierenden Adenomen nachweisbar wären.

Nur ein Drittel der von Nishimoto et al. (70) untersuchten APCCs wiesen eine mit einem primären Hyperaldosteronismus assoziierte Mutation auf. Die restlichen zwei Drittel der APCCs, in denen keine Mutationen gefunden werden konnten, könnten Veränderungen von Genen tragen, deren Bedeutung im Rahmen des primären Hyperaldosteronismus noch nicht bekannt ist und die daher nicht gezielt analysiert wurden. Alternativ könnten sie die Aldosteronsynthese nur vorübergehend überexprimieren, ohne Mutationen aufzuweisen. Eine

temporär verstärkte *CYP11B2* - Expression könnte, reaktiv auf eine Veränderung der inneren Homöostase durch einen epigenetischen Regulationsmechanismus hervorgerufen werden. Unter der Annahme, APCCs entstünden als Anpassungsreaktion der Nebenniere, könnten die von Nishimoto et al. (70) nachgewiesenen Mutationen auch als Zweitereignis interpretiert werden: In einem vorübergehend aktiven APCC könnte es in einigen Zellen zu Spontanmutationen kommen, welche die intensive Hormonproduktion aufrechterhalten würden. Bei manchen Patienten könnten sogar mehrere autonom hormonproduzierende APCCs für die Symptome eines primären Hyperaldosteronismus verantwortlich sein, auch ohne Vorliegen eines Adenoms (66).

Ob APCCs Träger von Mutationen sind, die eine vom Regelkreis des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems entkoppelte Aktivierung der Aldosteronproduktion verursachen, ist allerdings noch umstritten: Fernandez - Rosa et al. (69) konnten die Ergebnisse von Nishimoto et al. (70) nicht bestätigen. Sie konnten in APCCs aus sechs adenomtragenden Nebennieren keine Mutationen der Gene *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP2B3* oder *ATP1A1* nachweisen und folgerten, APCCs seien keine Vorstufen von Aldosteron - produzierenden Adenomen (69).

- APCCs treten in mehr als der Hälfte der von uns untersuchten Sektionsfällen auf

Die Prävalenz von APCCs in der asymptomatischen Durchschnittsbevölkerung liegt gemäß unserer Untersuchung bei 59 %. Das Fehlen von APCCs bei mehr als einem Drittel der untersuchten Individuen sehen wir als Hinweis dafür, dass APCCs im Gegensatz zu Foci keine essentiellen Elemente der Zona Glomerulosa darstellen, sondern infolge spontaner somatischer Mutationen oder als Reaktion auf besondere innere oder äußere Umstände auftreten.

Spezifische äußere oder innere Einflüsse, welche als Auslöser für das Auftreten von APCCs fungieren könnten, sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt. Der Salzgehalt der Ernährung, die Einnahme von Medikamenten, der Kalium - oder Aldosteronspiegel im Plasma und weitere Faktoren mit Auswirkung auf die Aldosteronproduktion in der Zona Glomerulosa, könnten einen Einfluss auf die Bildung von APCCs ausüben. Die Bedeutung dieser Variablen in Bezug auf die APCCs ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausreichend untersucht. Ein Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und den APCCs würde die These bekräftigen, APCCs stellten Regulationsmechanismen zum Erhalt der inneren Homöostase dar. Allerdings spricht das Auftreten von APCCs sowohl bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen als auch bei Patienten ohne bekannte endokrinologische Störungen eher gegen eine Regulation

der hormonellen Aktivität der APCCs durch äußere oder innere Faktoren und für eine autonome Aktivität der APCCs.

4.2. Korrelationen zwischen der Zona Glomerulosa und individuellen Kenndaten

Nach Diskussion der Prävalenzen verschiedener Aldosteron - produzierender Formationen der Zona Glomerulosa und nach Erörterung der daraus resultierenden Schlussfolgerungen werden wir im Folgenden darauf eingehen, wie Alter, Geschlecht, Body - Mass - Index und Herzgewicht das Auftreten dieser Formationen beeinflussen.

4.2.1. Die Bedeutung des Alters

Ein wichtiges Element unserer Analyse war das Alter der untersuchten Personen und dessen Einfluss auf die Expression der Aldosteronsynthese innerhalb der Nebennierenrinde. Wir fanden folgende Zusammenhänge:

- Mit steigendem Alter sinkt die Anzahl Aldosteronsynthese - exprimierender Zellen in der Zona Glomerulosa
- Mit steigendem Alter sinkt die Anzahl von APCCs

Unsere Erkenntnisse decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Entwicklung der humanen Nebennierenrinde im Rahmen des Alterungsprozesses. Gemäß Aiba et al. (81) kommt es im Alter zu einer Involution der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde, wobei die vorwiegend kontinuierliche Zona Glomerulosa - Expression der Kindheit von einer diskontinuierlichen, durch Progenitorzellen unterbrochene CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa im Erwachsenenalter abgelöst wird.

Mittels immunhistochemischer Färbungen von humanen Nebennieren aus unterschiedlichen Altersgruppen beschreiben Aiba et al. (81) folgende Veränderungen der Nebennierenrinden - Zonierung im Alterungsprozess: Kinder und Jugendliche wiesen eine kräftig ausgebildete Zona Fasciculata und eine gut entwickelte Zona Glomerulosa auf, welche sich über beinahe den gesamten Kortextumfang erstreckte. Die Zona Reticularis blieb im Kindesalter unterentwickelt und nahm erst im Laufe der Adoleszenz an Größe zu. Mit Abschluss der Pubertät traten zwischen der Zona Glomerulosa und der Zona Fasciculata vereinzelt erste Progenitor - Zellen

auf. Die Progenitor - Zellen exprimierten 3β - Hydroxysteroidhydroxylase, ein Enzym am Beginn der Steroidhormongeneese, aber kein CYP11B2 und kein CYP11B1, sodass diese Zellen weder der Zona Glomerulosa noch der Zona Fasciculata zugeordnet werden konnten. Im Erwachsenenalter nahm die Anzahl an Progenitorzellen schrittweise zu, bis sich diese ab dem vierzigsten Lebensjahr von der Zona Fasciculata bis zur Kapsel ausbreiten. Einzelne Cluster Aldosteron - produzierender Zellen bleiben jedoch bei allen untersuchten Individuen erhalten. Aiba et al. (81) unterschieden bei Personen hohen Alters zwei mögliche Ausprägungsformen der Zona Glomerulosa. Einige Individuen behielten das diskontinuierliche Zona Glomerulosa - Ausbreitungsmuster des Erwachsenenalters mit einem Vorherrschen von Progenitorzellen. Bei anderen wichen die Progenitorzellen zugunsten von Zellen, die entweder Kortisol oder Aldosteron produzierten. Diese Ausprägungsform der Zona Glomerulosa wurde als Reaktion auf exogenen Stress beziehungsweise als sekundärer Hyperaldosteronismus gewertet, je nachdem, ob Kortisol - oder Aldosteron - produzierende Zellen vorgefunden wurden.

Aiba et al. (81) vermuteten, der Verlust der Zona Glomerulosa zugunsten undifferenzierter Progenitorzellen im Erwachsenenalter sei eine Folge der mangelnden Stimulation des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems durch die moderne Ernährungs - und Lebensweise. Infolge einer natriumreichen und kaliumarmen Diät würde das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System supprimiert und die Aldosteronproduktion gedrosselt. Die Progenitorzellen der adulten Nebennierenrinde würden einen Reservepool darstellen, welcher sich je nach Bedarf zu Zona Fasciculata - oder Zona Glomerulosa - Zellen differenzieren könne (81).

Obwohl Kinder und Jugendliche eine ähnlich salzreiche Diät wie Erwachsene zu sich nehmen, wiesen sie in den Studien von Aiba et al. (81) eine kontinuierliche Zona Glomerulosa - Expression auf. Das Auftreten hoher Aldosteronspiegel im Kindesalter ist bereits bekannt: Neugeborene weisen aufgrund einer niedrigen Expression von Mineralokortikoid - Rezeptoren einen physiologischen Hyperaldosteronismus mit erhöhtem Serum - Aldosteronspiegel auf (82). Im Laufe des Wachstumsprozesses nimmt die Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde ab und die Renin - und Aldosteronkonzentrationen im Blut sinken, um mit Abschluss der Kindheit normale Werte zu erlangen (83). Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens ist unklar, möglicherweise ist die durch verstärkte Aldosteronproduktion bedingte Wasserretention für Wachstumsprozesse erforderlich (81).

Unseren Ergebnissen zufolge nimmt die Anzahl CYP11B2 - exprimierender Zellen in der Nebenniere mit steigendem Alter statistisch signifikant ab. Dies macht sich insbesondere dadurch bemerkbar, dass nicht mehr die gesamte Zirkumferenz der Nebennierenrinde mit Aldosteron - produzierenden Zellen ausgestattet ist, sondern die CYP11B2 - Expression

abschnittsweise oder nur in kleinen fokalen Strukturen nachweisbar ist. Anstelle einer kontinuierlichen Ausprägung der Zona Glomerulosa tritt in der adulten Nebenniere häufig ein diskontinuierliches - fokales Expressionsmuster auf.

Neben einer physiologischen Involution der Zona Glomerulosa im Alter könnten auch exogene Faktoren, insbesondere Medikamente, die von uns beobachtete Abnahme Aldosteron - produzierender Zellen in der Nebennierenrinde verursachen. Die Therapie der arteriellen Hypertonie umfasst auch Arzneimittel, welche das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System beeinflussen. Deren Einnahme könnte eine Zona Glomerulosa - Involution bei Patienten unter antihypertensiver Therapie verursachen. Insbesondere Angiotensin - II - Rezeptor - Antagonisten (Sartane) und ACE - Hemmer führen durch Suppression des Angiotensin - Stimulus zur Verminderung der Aldosteronsynthese - Expression. Die arterielle Hypertonie ist eine der häufigsten Erkrankungen in Zivilisationsländern. Nach Daten der German Health Interview and Examination Survey 2008 - 2011 (DEGS1) (84) leiden etwa ein Drittel aller Erwachsenen in Deutschland an einer arteriellen Hypertonie. Neuhauser et al. (85) untersuchten 7 074 Studienteilnehmer zwischen 18 und 79 Jahren auf das Vorliegen einer Hypertonie und, falls ein erhöhter Blutdruck vorbekannt war, auf die Einnahme einer antihypertensiven Therapie. Als Hypertonie definierten die Autoren Blutdruckwerte über 140 / 90 mmHg oder die Einnahme blutdrucksenkender Medikamente. Neuhauser et al. (85) fanden eine Hypertonie - Prävalenz von 30 % bei Frauen und 33 % bei Männern. 12,7 % der Frauen und 18,1 % der Männer wiesen, unabhängig von der Einnahme antihypertensiver Medikamente, Blutdruckwerte oberhalb des Grenzwertes von 140 / 90 mmHg auf. Global durchgeführte Studien berichteten von einer Hypertonie - Prävalenz von etwa 26 % (86).

Unter Berücksichtigung der ermittelten Prävalenz (84-86) müssen wir annehmen, dass ein nicht unbeachtlicher Anteil unseres Untersuchungskollektivs ebenfalls an einer Hypertonie litt. Aufgrund fehlender klinischer Informationen bei dem Großteil der untersuchten Individuen, können wir keine Aussage darüber treffen, wie viele an einem bereits diagnostizierten Hypertonus litten und wie viele eine blutdrucksenkende Therapie erhielten. Ferner können wir nur Mutmaßungen darüber treffen, wie viele der untersuchten Personen an einem unerkannten Bluthochdruck litten. Somit ist eine Interaktion zwischen einer Medikamenteneinnahme und dem Ausprägungsgrad der Zona Glomerulosa - Expression in unserem Untersuchungskollektiv und in der Normalbevölkerung möglich, und in einem nicht unbeachtlichen Teil der von uns untersuchten Individuen sogar anzunehmen. Die Rolle einer antihypertensiven Therapie mit Einfluss auf das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System in Bezug auf die Entwicklung eines primären Hyperaldosteronismus oder eines Aldosteron -

produzierenden Adenoms kann aufgrund unseres Studienaufbaus nicht klar definiert werden und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Neben den Veränderungen der CYP11B2 - Expression der alternden Zona Glomerulosa fanden wir eine statistisch signifikante Abnahme der Anzahl der APCCs mit dem Alter. Auch Gomez - Sanchez et al. (24) beschrieben eine signifikant höhere Anzahl an APCCs in der Nebenniere eines Kleinkindes als in Nebennieren erwachsener Patienten. Sowohl die Abnahme der Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa als auch die Verminderung der APCCs mit steigendem Alter können im Sinne einer Involution der Zona Glomerulosa, wie sie von Aiba et al. (81) postuliert wird, interpretiert werden. Der Rückgang der APCCs im Alter zeugt von deren Fähigkeit zur Rückbildung und lässt vermuten, APCCs würden, als funktionelle Variante der Zona Glomerulosa, eine gleichgeartete physiologische Entwicklung durchlaufen. Obwohl die von diversen Autoren (63, 67, 70) postulierte autonome Hormonproduktion in APCCs dafür sprechen würde, dass APCCs Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome darstellen, fehlen ihnen wichtige Eigenschaften von Tumorzellen: ungehemmte Proliferation und Immortalisierung. Tumore wachsen ungehemmt, zum Teil mit Verdrängung und Infiltration umgebenden Gewebes, und bilden sich in aller Regel nicht spontan zurück.

Die meisten Tumore entstehen auf der Basis somatischer Mutationen, welche der mutierten Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen verschaffen. Somatische Mutationen entstehen zufällig, wobei Entzündungsvorgänge und Noxen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Mutation erhöhen. Die Mutationen akkumulieren im Laufe des Lebens, wobei mit steigender Anzahl an Mutationen das Risiko des Auftretens einer karzinogenen Mutation und einer malignen Entartung steigt. Vom Auftreten einer maligne entarteten Zelle bis zur Entstehung eines Tumors verstreichen wiederum Monate bis Jahre. Mit zunehmendem Alter erhöht sich sowohl die Wahrscheinlichkeit einer Mutation als auch die Zeitspanne eines Individuums, in der die Tumorbildung erfolgen kann. Daher wird, neben der genetischen Prädisposition, Altern als wichtigster nicht modifizierbarer Risikofaktor für die Entwicklung eines Tumors angesehen (87).

Wären APCCs Vorläufer Aldosteron - produzierender Adenome, würde man eine Zunahme der APCCs im Alter erwarten. Die Anzahl an APCCs in der Nebennierenrinde nimmt jedoch mit steigendem Alter ab. Insofern scheinen APCCs keine Vorläufer von Adenomen, sondern vielmehr eine funktionelle Variante der Zona Glomerulosa zu sein. Möglicherweise stellen APCCs eine Reaktion der Zona Glomerulosa auf einen Stimulus dar, vielleicht auf eine Stimulation der Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems oder auf andere, noch nicht identifizierte Reize. Andernfalls könnten APCCs eine physiologische Erscheinungsform der Zona

Glomerulosa mit spezieller Morphologie darstellen, die vor allem bei jüngeren Menschen auftritt.

Im Gegensatz zu Boulkroun et al. (65) fanden wir keine Zunahme der Anzahl von Nebennierenknoten mit steigendem Alter. Somit können wir deren These, die Nodulation sei Folge des physiologischen Alterungsprozesses der Nebenniere, nicht bestätigen. Möglicherweise entgingen aufgrund der mikroskopischen Betrachtungsweise der Präparate, bei der nur zwei durch Zufall ausgewählte Anschnitte einer Nebenniere betrachtet wurden, einige Knoten unserer Untersuchung, welche bei makroskopischer Untersuchung der gesamten Nebenniere entdeckt worden wären. Das Alter der untersuchten Personen zeigte auch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Anzahl Aldosteron - produzierender Foci.

4.2.2. Korrelation des Body - Mass - Index und des Herzgewichtes mit der CYP11B2 - Expression

Bei unseren Untersuchungen fanden wir einen statistisch signifikanten Einfluss des Body - Mass - Index und des Herzgewichtes auf die Stärke der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa. Je höher der Body - Mass - Index und je höher das Herzgewicht einer Person war, desto schwächer war die CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa.

In Anbetracht der Tatsache, dass Hypertonie und Übergewicht oft mit erhöhten Aldosteronspiegeln einhergehen (88), war die Verminderung der adrenalen Aldosteronsynthese - Expression mit steigendem Body - Mass - Index in unserem Untersuchungskollektiv ein unerwartetes Ergebnis. Mehrere klinische Studien (89-91) wiesen einen positiven Zusammenhang zwischen dem Body - Mass - Index und dem Aldosteronspiegel im Blut nach. Nach Rossi et al. (91) war dieser Zusammenhang allerdings nur bei Patienten mit essentieller Hypertonie und nicht bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus nachweisbar, vermutlich, weil die Produktion von Aldosteron beim primären Hyperaldosteronismus autonom und ohne Regulation durch das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System abläuft. Wenn die in unserem Untersuchungskollektiv beobachtete Verminderung der CYP11B2 - Expression als Hinweis für eine geringere Aldosteronproduktion in den Nebennieren von Personen mit hohem Body - Mass - Index im Vergleich zu Personen mit niedrigem Body - Mass - Index gewertet wird, scheinen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu den oben genannten Studien zu stehen. Allerdings analysierten wir nicht direkt die Aldosteronkonzentration im Blut, sondern untersuchten die CYP11B2 - Expression innerhalb

der Nebenniere als deren Surrogat. Obwohl zahlreiche Studien einen positiven Zusammenhang zwischen dem Grad der Aldosteronsynthese - Expression in der Nebenniere und dem Serum - Aldosteronspiegel nachwiesen (64, 65, 79), könnte dieser Zusammenhang im Falle einer zusätzlich auftretenden, extraadrenalen Hormonproduktion verfälscht werden.

Das Fettgewebe exprimiert lokal Enzyme des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems und ist imstande, Angiotensin II, Glukokortikoide und Sexualsteroiden zu produzieren (92-94). Ob Adipozyten Aldosteron produzieren, ist umstritten. Lamounier - Zepher et al. (95) konnten keine Expression von CYP11B2 - mRNA in Adipozyten nachweisen, während Briones et al. (94) das Vorkommen von CYP11B2 - mRNA in Adipozyten aus humanem Fettgewebe beschrieben. Somit sind, aufgrund der aktuell unklaren Beweislage, zwei Szenarien vorstellbar: Gesetzt den ersten Fall, dass Adipozyten nicht zur Aldosteronproduktion fähig sind, können die erhöhten Aldosteronspiegel bei Individuen mit höherem Body - Mass - Index nicht durch direkte Sekretion durch die Zellen des Fettgewebes bedingt sein. Allenfalls wäre ein indirekter Einfluss der Fettzellen auf die Aldosteronproduktion vorstellbar. Ehrhart-Bornstein et al. (96) und Huby et al. (97) postulierten, Sekretionsprodukte der Adipozyten würden die Zona Glomerulosa zur vermehrten Aldosteronproduktion anregen. Als einer dieser stimulierenden Faktoren wurde Leptin identifiziert (97). Leptin ist ein Zytokin, welches vorwiegend im Fettgewebe gebildet wird und über zentralnervöse Effekte Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt reguliert (98). Zudem scheint Leptin über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels die Expression der Aldosteronsynthese zu erhöhen (97). Unter diesen Voraussetzungen würden wir anstelle der von uns beobachteten Abnahme eine Zunahme der Aldosteronsynthese - Expression in der Zona Glomerulosa mit steigendem Body - Mass - Index erwarten. Die Interpretation unseres Ergebnisses wird durch die Tatsache erschwert, dass die meisten auf diesem Gebiet publizierten Studien Patienten mit starkem Übergewicht oder mit Adipositas untersuchten, während die Individuen unserer Studie normalgewichtig oder nur leicht übergewichtig waren. Möglicherweise entfaltet sich der stimulierende Effekt des Fettgewebes auf die adrenale Aldosteronproduktion erst ab einer gewissen Mindestzahl an Adipozyten und konnte deshalb in unserer Studie nicht nachgewiesen werden.

Unser Ergebnis wäre allerdings mit dem zweiten oben angesprochenen Szenario von Briones et al. (94) besser vereinbar. Für die Abnahme der CYP11B2 - Expression mit steigendem Gewicht könnte eine extraadrenale Aldosteronproduktion verantwortlich sein, die bei hohem Body - Mass - Index zusätzlich zur physiologischen Synthese des Hormons in der Nebenniere aktiviert würde. Der Nachweis der Aldosteronsynthese in Adipozyten gemäß Briones et al. (94) legt die Vermutung nahe, das Fettgewebe würde eigenständig Aldosteron produzieren und womöglich

die erhöhten peripheren Aldosteronspiegel in übergewichtigen Individuen verursachen. Bei hoher Adipozytenmasse könnte das durch die Adipozyten synthetisierte Aldosteron über einen negativen Feedbackmechanismus die adrenale Aldosteronproduktion unterdrücken. Eine Quantifizierung der adipozytären Aldosteronproduktion erfolgte bisher nicht, sodass unklar ist, ob das aus Fettzellen stammende Aldosteron die Aldosteronkonzentration im Blut signifikant verändert oder nur lokal seine Wirkung entfaltet. Adipozyten exprimieren Mineralokortikoid - Rezeptoren, über die Aldosteron sowohl die Differenzierung und Proliferation von Adipozyten unterstützt als auch die Synthese von freien Fettsäuren und die Speicherung von Triglyceriden steuert (97). Über diesen Mechanismus könnte das Fettgewebe über lokal synthetisiertes Aldosteron die eigene Proliferation fördern (97).

Bei der Interpretation unseres Ergebnisses sollte zudem bedacht werden, dass die Menge des resultierenden Produktes einer enzymatischen Reaktion nicht nur durch die Quantität des katalysierenden Enzyms bestimmt wird, sondern auch durch die Menge an vorhandenem Substrat. Stehen vermehrt Substrate zur Verfügung, können diese, gemäß der Michaelis-Menten Kinetik, die Aktivität der Enzyme steigern (99). Dieser Mechanismus könnte, zumindest teilweise, eine verstärkte Aldosteronproduktion trotz geringer CYP11B2 - Expression bei Individuen mit hohem Body - Mass - Index erklären: In Adipozyten würden Steroidhormone und Aldosteron - Präkursoren gebildet, welche als Substrate der Aldosteronsynthese fungieren würden. Durch das erhöhte Substratangebot käme es zu einer Steigerung der Aktivität, nicht aber der Expression der vorhandenen Enzyme und insbesondere von CYP11B2. Die vermehrte Bildung von Aldosteron könnte zu erhöhten Hormonkonzentrationen im Blut und sekundär durch einen negativen Feedbackmechanismus zu einer Hemmung der Aldosteronproduktion führen. Dieser Regulationsmechanismus könnte erhöhte Aldosteronspiegel ohne vermehrte Expression der Aldosteronsynthese erklären.

Schließlich ist bei der Diskussion des von uns gefundenen negativen Zusammenhang zwischen Body - Mass - Index und CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa auf mögliche Confounder hinzuweisen, die Auswirkungen sowohl auf den Body - Mass - Index als auch auf die Aldosteronkonzentration haben, wie Ernährung und Medikamente.

Lebensstil und Diät beeinflussen sowohl den Hormonhaushalt als auch das Gewicht und somit den Body - Mass - Index einer Person. Die moderne westliche Ernährung ist mit einer erhöhten Salzaufnahme verbunden. Dabei spielt das Nachsalzen bei Tisch und das Salzen der Nahrung beim Kochen eine relativ geringe Rolle im Vergleich zur Salzaufnahme über Fastfood und Fertigmahlzeiten, da den meisten industriell gefertigten Speisen eine erhebliche Menge Salz zugesetzt wird (21, 100). In den USA werden etwa 80 % der täglichen Kalorien über den

Verzehr von Fertigprodukten eingenommen (21). Eine zunehmende Nutzung von Take - aways und Fast - food wird auch in Europa, Australien und Südamerika beobachtet (100). Im Jahre 2010 betrug die globale Natriumzufuhr durch die Ernährung etwa vier Gramm pro Tag, das Doppelte des von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlenen täglichen Limits (101). Insbesondere Einwohner Fernostasiens und Osteuropas wiesen einen stark erhöhten Salzkonsum (Durchschnittlich über 4,2 Gramm Natrium pro Tag) auf, dicht gefolgt vom Nahen Osten, Nordafrika und Mitteleuropa (Durchschnittlich 3,9 bis 4,2 Gramm Natrium pro Tag). Am geringsten schien die Natriumaufnahme in Lateinamerika und Südafrika zu sein (Durchschnittlich unter 3,3 Gramm Natrium pro Tag), wobei aus diesen Ländern nur wenige Daten zur Verfügung standen. Westeuropa, Nordamerika und Australien lagen im internationalen Vergleich im Mittelfeld mit einer durchschnittlichen Natriumaufnahme von 3,4 bis 3,8 Gramm pro Tag. Interessanterweise war die Natriumaufnahme bei Männern höher als bei Frauen, aber in verschiedenen Altersklassen relativ konstant (101). In Deutschland betrug die Natriumaufnahme im Jahr 2010 im Durchschnitt 3,54 Gramm pro Tag und war damit deutlich höher als die von der WHO empfohlene Menge. Da wir in unserer Studie Personen aus dem süddeutschen Raum untersuchten, können wir annehmen, dass diese Daten auf unsere Studienpopulation übertragbar sind.

Eine ungesunde Diät ist oft besonders fettreich, kalorienreich und salzhaltig (100, 102). Die vermehrte Aufnahme von Fett und Kalorien führt zu einem Energieüberschuss und sekundär zur Gewichtszunahme. Die exzessive Zufuhr von Natrium hingegen führt zur Retention von Wasser und kann durch den Volumenüberschuss eine Hypertonie begünstigen. Der erhöhte Blutdruck führt dann über einen negativen Feedbackmechanismus zur Suppression des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems und der Aldosteronproduktion. Über diesen Mechanismus könnte eine ungesunde, kalorien - und salzreiche Ernährung einerseits zu Übergewicht führen, und andererseits über negatives Feedback die von uns beobachtete Suppression der adrenalen Aldosteronproduktion bei höherem Body - Mass - Index verursachen.

Schließlich ist auf eine mögliche Verfälschung unserer Ergebnisse durch die Unterdrückung des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems bei Vorliegen einer Medikamenten - Einnahme hinzuweisen. Übergewicht ist häufig mit Hypertonie assoziiert und ein bekannter kardiovaskulärer Risikofaktor (88). Bei einer übergewichtigen Person ist daher im Verhältnis zu Normalgewichtigen die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie eine antihypertensive Therapie einnimmt. Die Therapie des arteriellen Hypertonus beinhaltet häufig Medikamente mit Einfluss auf das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System, die zu einer Suppression der Aldosteronsynthese in der Nebenniere des Betroffenen führen (103).

Denkbar wäre ebenso, dass ein Teil des beobachteten Effekts durch die Variable Alter vermittelt würde. Mit zunehmenden Alter stiegen nämlich sowohl der Body - Mass - Index als auch das Herzgewicht der von uns untersuchten Individuen. Der Zusammenhang des Alters und der Zona Glomerulosa - Involution wurde bereits erörtert.

Analog zu den bisher formulierten Reflexionen kann auch der Zusammenhang zwischen Herzgewicht und verminderter CYP11B2 - Expression auf unterschiedliche Art und Weise interpretiert werden: Einerseits erwartet man bei Menschen mit größerem Body - Mass - Index auch ein höheres Herzgewicht als bei Normal - oder Untergewichtigen. Insofern könnte die Verminderung der Aldosteronsynthese - Expression in der Zona Glomerulosa bei erhöhtem Herzgewicht durch die Mittlervariable Body - Mass - Index erklärt werden.

Andererseits könnte die negative Korrelation zwischen Herzgewicht und CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa auch durch ein negatives hormonelles Feedback bei vorbestehender arterieller Hypertonie erklärt werden. Da wir unselektionierte Personen ohne bekannte Nebennierenerkrankung untersuchten, ist davon auszugehen, dass einige Individuen an einem essentiellen Hypertonus litten, welcher bei einem Drittel der Erwachsenen in Deutschland (85) und deutlich häufiger als der primäre Hyperaldosteronismus auftritt. Bei den Betroffenen würde man als Folge der essentiellen Hypertonie aufgrund eines negativen Rückkoppelungsmechanismus eine Unterdrückung des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems und somit eine indirekte Verminderung der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde erwarten. Aufgrund der erhöhten Nachlast bei arterieller Hypertonie würde man bei einigen Individuen zudem ein erhöhtes Herzgewicht erwarten, welches im Sinne einer reaktiven Hypertrophie des Herzmuskels als Adaptation an die gesteigerte Druckbelastung in der pathologischen Untersuchung erkennbar wäre.

4.2.3. Die Korrelation des Geschlechts mit der adrenalen CYP11B2 - Expression

Die Bedeutung des Geschlechtes in der Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus und des Aldosteron - produzierenden Adenoms wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt kontrovers diskutiert. Aufgrund einer klaren Geschlechtsverteilung der beiden Erscheinungsformen des primären Hyperaldosteronismus, dem Aldosteron - produzierenden Adenom und dem primären Hyperaldosteronismus, scheint das Geschlecht in der Krankheitsentwicklung Bedeutung zu haben. Nach Lu et al. (104) und McNicol et al. (6) tritt der primäre Hyperaldosteronismus insgesamt häufiger bei Männern auf, während Frauen deutlich öfter ein

Aldosteron - produzierendes Adenom aufweisen. Nach Neville et al. (1) beträgt das Geschlechterverhältnis Mann : Frau beim Aldosteron - produzierenden Adenom 1:3.

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit den Angaben der Literatur überein. Wir fanden signifikant mehr Aldosteron - produzierende Noduli bei Personen weiblichen Geschlechts (37,9 % der Frauen und 21,2 % der Männer wiesen einen oder mehrere CYP11B2 - exprimierende Knoten auf). Die Anzahl von Nebennierenknoten ohne nachweisbare Aldosteronproduktion, die Anzahl von Foci und von APCCs unterschied sich hingegen nicht signifikant zwischen Männern und Frauen. Allerdings zeigte sich ein Trend hin zu einer höheren Gesamtanzahl von Noduli bei Frauen ab. In Anbetracht der Tatsache, dass Aldosteron - produzierende Adenome öfters bei Frauen als bei Männern vorkommen, weist das gehäufte Auftreten Aldosteronsynthese - exprimierender Noduli bei Frauen auf eine Bedeutung des weiblichen Geschlechts als Risikofaktor für die Adenomentstehung hin. Der primäre Hyperaldosteronismus weist die höchste Prävalenz zwischen der dritten und der fünften Lebensdekade auf (1, 6). Da das durchschnittliche Alter bei Eintritt der natürlichen Menopause 49 Jahre beträgt (105), entwickeln die meisten Frauen Aldosteron - produzierende Adenome im fruchtbaren Alter. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die hormonellen Schwankungen im Rahmen des weiblichen Zyklus und die erhöhten Konzentrationen an Progesteron und Östrogen von Frauen im Vergleich zu Männern die Entwicklung von Adenomen beeinflussen könnten.

Die kardioprotektive Wirkung weiblicher Sexualhormone wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (106, 107). Östrogene wirken durch Aktivierung von Kalium - Kanälen und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) am Endothel vasodilatatorisch. Im Vergleich zu gleichaltrigen Männern weisen prämenopausale Frauen einen durchschnittlich um 10 mmHg niedrigeren systolischen und um 5 mmHg niedrigeren diastolischen Blutdruck auf (16). Auch das kardiovaskuläre Risiko ist bei Frauen niedriger als bei gleichaltrigen Männern (108). Neben der direkten Wirkung auf das Gefäßsystem beeinflussen Östrogene und deren Derivate ebenfalls das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System (109). Die weiblichen Hormone erhöhen die Konzentration von Angiotensinogen, senken den Spiegel von Renin und von Angiotensin - Converting - Enzym und bewirken eine Downregulation des Angiotensin II - Typ 1 - Rezeptors. Über diese Mechanismen senken sie die Angiotensin II - vermittelte Aldosteronproduktion und die Aldosteron - vermittelte Natriumretention (109). In einer klinischen Studie an Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen stellten Lu et al. (104) fest, dass Frauen, die vor dem 49. Lebensjahr erkrankten, einen niedrigeren Serum - Natriumspiegel und weniger vaskuläre Komplikationen als gleichaltrige Männer aufwiesen.

Nach dem 49. Lebensjahr und für die meisten Frauen somit nach dem Eintritt der Menopause, verschwand diese Diskrepanz zwischen weiblichen und männlichen Patienten.

Zusätzlich zur schützenden Wirkung auf das Gefäßsystem scheinen Östrogen und Progesteron auch einen Einfluss auf die Nebenniere und die Adenomentwicklung zu entwickeln, wobei über den genauen Mechanismus gegenwärtig nur spekuliert werden kann. Eine plausible Erklärung wäre eine Interaktion zwischen dem Mineralokortikoid - Rezeptor und dem Östrogen - (104) oder dem Progesteron - Rezeptor (21). Alle drei Rezeptoren gehören der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren an, wobei Östrogen - Rezeptoren intrazytosolisch (110) und Mineralokortikoid - und Progesteron - Rezeptoren, wie auch Glukokortikoid - Rezeptoren, intranukleär vorkommen (21). Progesteron, welches vor allem in der Lutealphase ausgeschüttet wird, scheint ferner unabhängig vom Renin - Angiotensin - Aldosteron - System die Aldosteronproduktion zu steigern (111).

Montanaro et al. (112) untersuchten die Wirkung von weiblichen Hormonen auf H295R - Zellen. H295R - Zellen sind ein Modell für Tumoren der Nebennierenrinde und weisen eine Angiotensin II - abhängige Aldosteronproduktion auf (113). Östrogene förderten die Proliferation von H295R - Zellen, während Östrogeninhibitoren einen Wachstumsstopp und morphologische Veränderungen im Sinne einer Apoptose bewirkten. Montanaro et al. (112) vermuteten, dass die weiblichen Hormone ihre Wirkung über den Östrogenrezeptor ER - β vermittelten, da dieser in H295R - Zellen vermehrt exprimiert war.

Barzon et al. (114) versuchten die von Montanaro et al. (112) am Zellmodell gewonnenen Erkenntnisse auf die humane Nebenniere zu übertragen, indem sie die Expression von Östrogenrezeptoren in gesunden Nebennieren und in Nebennierenadenomen untersuchten. Die Östrogenwirkung wird in humanen Geweben durch zwei Rezeptoren vermittelt: ER- α und ER- β . ER- α - Rezeptoren vermitteln einen proliferationsfördernden Effekt bei verschiedenen Tumoren, während dem ER- β - Rezeptor die tumorprotektive Wirkung des Östrogens zugeschrieben wird. In gesunden Nebennieren konnten Barzon et al. (114) mittels Immunhistochemie eine Expression des ER- β - Rezeptors in der Zona Glomerulosa und der Zona Fasciculata nachweisen, während die Medulla und die Zona Reticularis den Rezeptor nicht exprimierten. Der ER- α - Rezeptor war in der gesamten Nebenniere nicht nachweisbar. Die Untersuchung von Gewebe aus Adenomen mit verschiedener Hormonproduktion (unter anderem Aldosteron -, Kortisol - und Androgen - produzierende sowie hormonell inaktive Adenome) mittels Western - Blot - Analyse zeigte eine große Heterogenität in der Expression beider Rezeptoren, wobei die Intensität der ER- β - Rezeptor - Expression invers mit der ER- α - Rezeptor - Expression korrelierte. Insgesamt war die Expression von ER- α - Rezeptoren in

adrenalen Adenomen signifikant höher, die von ER- β - Rezeptoren hingegen signifikant geringer als in normalen Nebennieren. Unter Berücksichtigung der Befunde von Montanaro et al. (112), stellten Barzon et al. (114) die These auf, Östrogene würden eine proliferationsfördernde Wirkung auf Nebennierengewebe entfalten und so die Entstehung von Adenomen der Nebenniere begünstigen.

Eine proliferationsfördernde Wirkung der Östrogene auf Nebennierengewebe würde das vermehrte Vorkommen adrenaler Noduli bei Frauen erklären. In unserer Studie fanden wir Nebennierenknoten bei 79,3 % der Frauen, aber nur bei 70,2 % der Männer. Dieser Unterschied war gerade nicht mehr statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu waren CYP11B2 - exprimierende Noduli signifikant häufiger bei Frauen als bei Männern nachweisbar: 37,9 % der Frauen und nur 21,2 % der Männer besaßen einen oder mehrere CYP11B2 - exprimierende Noduli. Unsere Ergebnisse erhärten die These, dass Östrogene die Nodulation der Nebenniere begünstigen könnten. Allerdings würde diese These zwar die größere Anzahl an Noduli ohne CYP11B2 - Expression bei Frauen erklären, nicht jedoch das vermehrte Auftreten von Noduli mit Aldosteronproduktion.

Die höhere Anzahl CYP11B2 - exprimierender Noduli bei Frauen könnte ebenfalls auf die Wirkung weiblicher Geschlechtshormone zurückzuführen sein, welche über ähnliche Mechanismen sowohl Nodulation als auch Hormonproduktion anregen könnten. Die Wirkung von Progesteron auf die Zona Glomerulosa wurde in verschiedenen Studien untersucht: Szmuiłowicz et al. (115) untersuchten den Einfluss des weiblichen Zyklus auf das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System. Gesunde Frauen wiesen in der lutealen Phase des Menstruationszyklus eine höhere Aldosteronkonzentration im Blut und im 24 -Stunden - Urin als in der folliculären Phase auf. Die Renin - und Angiotensin II - Konzentrationen im Blut hingegen waren im gesamten Menstrualzyklus konstant, was auf eine vom Renin - Angiotensin - Aldosteron - System unabhängige Aldosteron - Erhöhung während der Lutealphase hindeutete. Diese Schwankungen der Aldosteronkonzentration waren nur bei Frauen feststellbar, welche sich natriumreich ernährten. Szmuiłowicz et al. (115) vermuteten, dass bei salzarmer Diät das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System und die Aldosteronproduktion bereits maximal stimuliert seien, sodass die hormonellen Schwankungen im Rahmen des weiblichen Zyklus keine zusätzliche Steigerung mehr erreichen könnten. Sowohl Östrogen - als auch Progesteronspiegel sind in der Lutealphase höher als in der folliculären Phase. Um zwischen einer Östrogen - oder einer Progesteron - vermittelten Aktivierung der Aldosteronproduktion zu unterscheiden, behandelten Szmuiłowicz et al. (115) isolierte Zona Glomerulosa - Zellen in vitro mit physiologischen Konzentrationen beider Hormone. Während

die Inkubation mit Östrogenen keinen Effekt erzielte, wiesen die mit Progesteron behandelten Zellen eine 2,8 - fach gesteigerte Aldosteronproduktion auf. Die Autoren nahmen eine direkt stimulierende Wirkung des Progesterons auf die Zona Glomerulosa Zellen an, ohne jedoch den genauen Mechanismus dieser stimulierenden Wirkung zu kennen.

Progesteron ist ein Steroidhormon mit Bindungsaffinität zum Mineralokortikoidrezeptor. Aldosteron und Progesteron konkurrieren demnach um die Mineralokortikoidrezeptoren. Da Progesteron nach der Bindung den Rezeptor im Vergleich zu Aldosteron schwach aktiviert, wird Progesteron als Rezeptor - Antagonist mit partiell agonistischer Wirkung angesehen (116, 117). Aufgrund der hohen Progesteronspiegel werden in der Lutealphase verstärkt Mineralokortikoidrezeptoren durch Progesteron gebunden. Im Vergleich zur folliculären Phase, bei der die Bindung durch Aldosteron überwiegt, resultiert eine schwächere Aktivierung der Mineralokortikoidrezeptoren und der dadurch vermittelten Wirkungen. Möglicherweise ist die höhere Aldosteronkonzentration in der lutealen Phase als Gegenregulation zu interpretieren (115).

Das vermehrte Auftreten Aldosteron - produzierender Noduli bei Frauen in der von uns untersuchten, klinisch asymptomatischen Population könnte auch dadurch erklärt werden, dass aufgrund der protektiven Wirkung der Östrogene Aldosteron - produzierende Adenome bei Frauen sich später klinisch manifestieren als bei Männern. Nach dieser These würde ein Adenom trotz ähnlicher Größe und Hormonproduktion bei Männern bereits Symptome verursachen, während die Wirkung des erhöhten Aldosteronspiegels bei Frauen durch das schützende Östrogen vermindert würde. Da die weiblichen Hormone die Angiotensin II - vermittelte Aldosteronbildung in der Zona Glomerulosa unterdrücken würden, würde trotz autonomer, vom Renin - Angiotensin - Aldosteron - System entkoppelter Hormonproduktion im Adenom die Gesamtaktivität der Aldosteronsynthese im Normbereich liegen. Da unsere Studie an klinisch unauffälligen Individuen durchgeführt wurde, könnte der höhere Anteil an Aldosteron - produzierenden Knoten bei Frauen dadurch erklärt werden, dass Männer mit entsprechenden adrenalen Noduli bereits klinisch auffällig gewesen wären und somit nicht in unserer Studie eingeschlossen worden wären.

4.3. Zusammenhänge innerhalb der Zona Glomerulosa

Schließlich untersuchten wir verschiedene histomorphologische Parameter der Nebennierenrinde auf gegenseitige Wechselwirkungen.

4.3.1. Korrelationen zwischen der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa und Foci

Bei Analyse der histomorphologischen Ausprägungsformen der Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa fanden wir einen bisher nicht beschriebenen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Foci und der CYP11B2 - Expression der Zona Glomerulosa. Im Gegensatz dazu fanden wir keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl von APCCs und dem Grad der Aldosteronsynthese - Expression in der Zona Glomerulosa.

Nebennieren mit kontinuierlich aktivierter Zona Glomerulosa wiesen signifikant weniger Foci als Nebennieren mit partieller oder fokaler CYP11B2 - Expression auf. Foci waren auch bei sehr geringer Aldosteronsynthese - Expression in der Nebennierenrinde nachzuweisen. Die negative Korrelation zwischen Anzahl der Foci und dem Grad der Zona Glomerulosa - Expression in der Nebennierenrinde weist auf eine gegensätzliche Regulation der Foci und der Zona Glomerulosa hin. Möglicherweise liegen in unterschiedlichen Situationen verschiedene CYP11B2 - Expressionsformen vor: Bei Natriummangel, Volumendefizit oder Kaliumüberschuss würde die Aldosteronproduktion in den Nebennieren angeregt werden, was in eine kontinuierliche Expression der Aldosteronsynthese in der gesamten Zona Glomerulosa münden würde. Bei hoher Natriumzufuhr, Hypertonie oder ausreichend hohem peripheren Hormonspiegel würde die Aldosteronproduktion in der Zona Glomerulosa hingegen gedrosselt werden, und eine diskontinuierliche Aldosteronsynthese - Expression würde die kontinuierliche CYP11B2 - Expression ersetzen. Mit zunehmender Suppression der Hormonproduktion würden schließlich nur fokale CYP11B2 - exprimierende Areale in der Nebenniere auftreten, in denen die insgesamt stark gedrosselte Aldosteronproduktion erfolgen würde. Somit würden Foci eine morphologische Sonderform Aldosteronsynthese - exprimierender Zellen der physiologischen Zona Glomerulosa darstellen, die vor allem in Phasen inkompletter Suppression der Aldosteronproduktion auftreten würden. Diese Foci wären zudem die letzte morphologische Erscheinungsform Aldosteron - produzierender Zellen vor der kompletten Stilllegung der Zona Glomerulosa. Situationen mit erhöhtem Aldosteron - Bedarf hingegen würden eine kontinuierliche CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa hervorrufen, sodass die Foci in

der Gesamtheit der hypertrophen Zona Glomerulosa verschwinden würden und nicht mehr als eigene Entitäten nachweisbar wären.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass der negative Zusammenhang zwischen der Anzahl an Foci und der Stärke der Zona Glomerulosa - Expression auch durch die Vorgehensweise bei der Versuchsdurchführung und - Auswertung verstärkt worden sein könnte. Liegt eine kontinuierliche Zona Glomerulosa mit CYP11B2 - Expression entlang des gesamten Umfangs der Nebennierenrinde vor, sind Foci als eigenständige morphologische Bestandteile nur eingeschränkt erkennbar, da die Zellen der Foci denen der konventionellen Zona Glomerulosa ähneln. Eine homogen angefärbte Zona Glomerulosa mit kontinuierlicher Expression der Aldosteronsynthese maskiert eventuell auftretende Foci, sodass diese nicht als Foci gezählt werden, sondern als Teil der Zona Glomerulosa. Dieses methodische Problem könnte, zumindest teilweise, die negative Korrelation zwischen der Anzahl an Foci und der Stärke der CYP11B2 - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa erklären.

Im Gegensatz zu Foci traten APCCs unabhängig vom Grad der CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa auf. Dies könnte als Hinweis für deren autonome, vom hormonellen Regelkreis abgekoppelte Aldosteronproduktion aufgefasst werden. Ferner sind APCCs aufgrund ihrer Morphologie und Größe auch im Falle ausgeprägter CYP11B2 - Expression der angrenzenden Zona Glomerulosa in der immunhistochemischen Färbung leicht als eigenständige, sowohl die Zona Glomerulosa als auch die Zona Fasciculata involvierende Formationen erkennbar.

4.3.2. Korrelationen zwischen APCCs und Foci

Neben den besprochenen Ergebnissen konnten wir einen bisher nicht beschriebenen, statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl von Foci und von APCCs zeigen. Mit zunehmender Anzahl von Foci stieg die Zahl von APCCs. Diese Korrelation kann auf verschiedene Art gedeutet werden:

Erstens könnte dieser Befund auf einem hormonellen Regulationsmechanismus beruhen. Wie bereits erörtert, gehen wir von einem vermehrten Auftreten von Foci in Zuständen partieller oder nahezu vollständiger Unterdrückung des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems aus. Diese Suppression könnte Folge einer exzessiven autonomen Aldosteronproduktion in APCCs sein, wie sie von verschiedenen Autoren vermutet wird (63, 64, 70). Unter dieser Annahme wäre die Unterdrückung der CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa umso stärker, je höher die Anzahl von APCCs in einer Nebenniere wäre. Da bei ausgeprägter Suppression die kontinuierliche CYP11B2 - Expression schrittweise zugunsten einer diskontinuierlichen und

schließlich fokalen Aldosteronproduktion in mehreren einzelnen Foci weicht, könnte das vermehrte Auftreten von Foci bei zahlreichen APCCs durch diesen Mechanismus erklärt werden.

Zweitens könnte der von uns gefundene Zusammenhang zwischen der Anzahl von APCCs und von Foci auf eine gleichsinnige Regulation beider Entitäten durch das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System zurückgeführt werden. Wenn die Expression von CYP11B2 sowohl in Foci als auch in APCCs vom Wasser - und Salzhaushalt des Organismus abhängen würde, würden wir auch einen positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl von APCCs und dem Grad der Aldosteronsynthese - Expression in der gesamten Nebenniere erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall: Die Zahl der APCCs zeigt keinen signifikanten Zusammenhang mit der CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa, die Zahl der Foci sogar einen negativen Zusammenhang.

Drittens könnte die positive Korrelation zwischen Foci und APCCs als Hinweis aufgefasst werden, dass Foci Vorläuferläsionen von APCCs darstellen. Analysen des Transkriptom von Zellen der APCCs und Zellen der Zona Glomerulosa, aus denen auch Foci bestehen, wiesen zahlreiche Übereinstimmungen auf (70). Möglicherweise entstehen aus normalen Zona Glomerulosa - Zellen infolge von Mutationen oder als Reaktion auf exogene oder endogene Reize Foci, die sich im weiteren Verlauf, aufgrund zusätzlicher Stimuli oder dem Auftreten von Mutationen, zu APCCs weiterentwickeln. Ob diese Entwicklung fortschreitet und zur Bildung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms führt, wird in der aktuellen Literatur widersprüchlich diskutiert (69, 70).

4.3.3. Korrelationen zwischen CYP11B2 - exprimierenden Noduli und Foci oder APCCs

Zwischen der Anzahl von Foci und der Anzahl von CYP11B2 - exprimierenden Noduli konnten wir einen schwachen, gerade nicht mehr statistisch signifikanten Zusammenhang nachweisen. Eine ähnliche Beobachtung beschrieben Boulkroun et al. (65): In Nebennieren mit Aldosteron - produzierenden Adenomen fanden sie eine signifikant höhere Anzahl von Megafoci im Vergleich zu Organen ohne Aldosteron - produzierende Adenome. Die Anzahl normaler Foci mit einem Durchmesser unter dreihundert Mikrometern unterschied sich hingegen nicht. Die fehlende Unterscheidung zwischen Foci und Megafoci in unserer Studie könnte unsere im Vergleich zu Boulkroun et al. (65) nur schwache Korrelation zwischen der Anzahl von Foci und CYP11B2 - exprimierenden Noduli erklären. Da die Größe das einzige Kriterium zur Unterscheidung von Foci und Megafoci darstellt und diese beiden Entitäten eine ähnliche Morphologie aufweisen, kann angenommen werden, dass Megafoci aus Foci entstehen.

Aufgrund der positiven Korrelation zwischen Foci und CYP11B2 - positiven Knoten in unserer Studie und zwischen Megafoci und Adenomen bei Boulkroun et al. (65) könnte vermutet werden, dass Aldosteron - produzierende Adenome sich aus diesen Foci und somit indirekt aus Zellen der normalen Zona Glomerulosa entwickeln würden.

Schließlich konnten wir einen statistisch gerade nicht relevanten Zusammenhang zwischen der Anzahl von APCCs und der von Aldosteron - produzierenden Noduli nachweisen. Unter Berücksichtigung der bisherigen Überlegungen könnten APCCs einen Zwischenzustand darstellen, der im Gegensatz zu Foci bereits eine hormonelle Autonomie aufweist, jedoch nicht eine unkontrollierte Proliferation, wie es bei Aldosteron -produzierenden Adenomen der Fall ist.

Abgesehen von den oben erörterten Erkenntnissen konnten wir bei unseren Analysen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge finden. Insbesondere konnten wir keine Korrelation zwischen der Stärke der CYP11B2 - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa und dem Ausprägungsgrad der Nodulation finden. Ebenso konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der Nodulation und der Anzahl von APCCs beziehungsweise von Foci nachweisen.

4.4. Die Pathogenese Aldosteron - produzierender Adenome

Auf die Frage nach den Ursprungszellen Aldosteron - produzierender Adenome kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine definitive Antwort gegeben werden. Aufgrund des Fehles klinischer Angaben und der nicht vorhandenen Möglichkeit der weiteren Verlaufsbeobachtung der untersuchten Personen kann auch unsere Studie die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms nicht endgültig klären.

Aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse ist anzunehmen, Aldosteron - produzierende Adenome entstünden aus Zellen der Zona Glomerulosa (70), wobei unklar ist, ob sie sich unmittelbar aus Foci entwickeln oder als intermediäre Formation im Rahmen ihrer Entstehung die Gestalt von APCCs annehmen. Ein Modell der schrittweisen Tumorgenese, wie es für das kolorektale Karzinom postuliert wird (118), könnte auch für die Genese Aldosteron - produzierender Adenome vorgeschlagen werden. Nach diesem Modell würden innerhalb einer oder mehrerer Zellen der Zona Glomerulosa verschiedene Mutationen auftreten. Diese Mutationen würden der betroffenen Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den restlichen Zellen verschaffen, sodass die Zelle klonal expandieren und unter Verdrängung des benachbarten Gewebes einen Tumor bilden könnte.

Untersuchungen zur Klonalität adrenokortikaler Tumoren bestärken diese Theorie. Die Mehrheit der Nebennierenrinden - Adenome und - Karzinome sind monoklonalen Ursprungs, im Gegensatz zur meist polyklonalen bilateralen makronodulären Nebennierenrinden - Hyperplasie. Polyklonale Adenome treten selten auf (119). Polyklonale Tumore entstehen entweder, wenn mehrere Zellen eine proliferations - und hormonproduktionsfördernde Mutation erfahren und gemeinsam ein Adenom bilden, oder wenn nach der Bildung eines Tumors nur Teile davon Sekundärmutationen akquirieren. Letzteres würde ebenfalls das häufige Auftreten unterschiedlicher Zellgruppen innerhalb eines Aldosteron - produzierenden Adenoms erklären.

Die Morphologie Aldosteron - produzierender Adenome ist vielfältig. Etliche Adenome bestehen primär aus Zellen, die denen der Zona Glomerulosa ähneln; Andere beinhalten vorwiegend helle, lipidbeladene Zellen mit Zona Fasciculata - Morphologie; Manche bestehen wiederum aus beiden Zelltypen. Ebenso ist die Aldosteronsynthase - Expression in den Adenomen nicht homogen verteilt; neben Zellen mit reiner CYP11B2 - oder reiner CYP11B1 - Expression treten Zellen auf, die keines der beiden Enzyme exprimieren (64, 65). Das Vorhandensein einer CYP11B1 - oder CYP11B2 - Expression erlaubt keinen direkten Rückschluss auf die Morphologie der Zellen. Möglicherweise erwerben im Rahmen der Tumorgenese Zellen der Zona Glomerulosa durch genetische Veränderungen die Fähigkeit zur CYP11B1 - Expression und / oder die morphologischen Charakteristika von Zona Fasciculata - Zellen. Als Erklärung für die morphologische Vielfalt argumentierten Boulkroun et al. (65), dass Zellen der Zona Glomerulosa aufgrund einer erhöhten Hormonproduktion und der damit verbundenen vermehrten Cholesterinaufnahme eine für Zellen der Zona Fasciculata charakteristische Morphologie annehmen würden. Eine ähnliche Überlegung könnte für die inneren Zelllagen der APCCs gelten.

4.4.1. Die Bedeutung genetischer Veränderungen

In den letzten Jahren wurden mehrere Gene identifiziert, die bei Aldosteron - produzierenden Adenomen häufig Veränderungen aufweisen: *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1D*. Mutationen dieser Gene erhöhen den intrazellulären Kalziumspiegel und steigern so die Aldosteronproduktion in der Zona Glomerulosa. Die resultierende autonome Hormonproduktion könnte einen Wachstumsreiz für die betroffenen Zellen darstellen, sodass diese unkontrolliert proliferieren und ein Adenom bilden. Allerdings scheint das Auftreten der bisher bekannten Mutationen nicht für die Bildung eines Tumors auszureichen: In

verschiedenen Zellmodellen (HAC15 und HEK293T) induzierten Mutationen von *KCNJ5* eine vermehrte Aldosteronproduktion, allerdings keine Zellproliferation (42, 120). Im Falle von HEK293T Zellen lösten sie infolge einer gestörten intrazellulären Elektrolyt - Homöostase sogar einen vorzeitigen Zelltod aus (22, 42). Möglicherweise sind neben der Mutation, welche zur autonomen Hormonproduktion führt, noch eine oder mehrere weitere proliferationsfördernde Mutationen nötig, um die Bildung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms zu initiieren.

Viele Aldosteron - produzierende Adenome weisen eine intratumorale Heterogenität der Zellmorphologie und Aldosteronproduktion auf. Bei genetischen Untersuchungen von Arealen mit beziehungsweise ohne CYP11B2 - Expression innerhalb eines Aldosteron - produzierenden Adenoms fanden Nanba et al. (121) einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hormonproduktion und Mutationsstatus. Die Hälfte der untersuchten Nebennieren wiesen Mutationen mit anregender Wirkung auf die Aldosteronproduktion nur in CYP11B2 - exprimierenden Arealen auf, nicht im restlichen Adenom oder in der umgebenden Nebennierenrinde. Ein Adenom wies zwei unterschiedliche CYP11B2 - stimulierende Mutationen in zwei verschiedenen Aldosteron - produzierenden Bereichen des Adenoms auf, ohne dass eine davon in Adenom - Arealen ohne CYP11B2 - Expression nachweisbar war. Der fehlende Nachweis der mit Aldosteron - produzierenden Adenomen assoziierten Mutationen in Adenomgewebe ohne CYP11B2 - Expression unterstützt die These, dass diese genetischen Veränderungen zwar für die autonome Hormonproduktion in CYP11B2 - überexprimierenden Zellen verantwortlich seien, jedoch nicht die exzessive Proliferation von Adenomen bedingen würden.

Nanba et al. (121) identifizierten in einem Adenom, das weder in Arealen mit noch ohne Aldosteronsynthese - Expression eine bekannte CYP11B2 - stimulierende Mutation aufwies, eine genetische Veränderung im Wnt / β - Catenin Signalweg. Die Mutation trat im gesamten Adenom, nicht jedoch im umgebenden Nebennierenrindengewebe auf (121). Der Wnt - Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Stammzellregulation und Differenzierung verschiedener Gewebe, unter anderem der Zona Glomerulosa. Zudem steuert er die Zonierung der Nebennierenrinde und stimuliert über indirekte Mechanismen die Aldosteronproduktion (22). Auf ähnliche Weise fördert der Sonic - Hedge - Hog - Signalweg die Proliferation der embryonalen Nebennierenrinde. Veränderungen dieser beiden Signalwege konnten in Nebennieren mit Aldosteron - produzierenden Adenomen nachgewiesen werden (22, 122). Möglicherweise besteht in betroffenen Nebennieren ein hyperproliferativer Zustand, der zur Expression embryonaler Signalwege führt und das Auftreten sekundärer, die Hormonproduktion stimulierender Mutationen begünstigt

(122). Andernfalls könnte die Aktivierung der oben genannten Signalwege eine Folge jener Mutationen sein, welche für die verstärkte Proliferation von Adenomzellen verantwortlich sind.

Aktuell können in etwa fünfzig Prozent der Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen Mutationen der Gene *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1D* nachgewiesen werden (35, 123). Ob die andere Hälfte an noch unbekanntem Mutationen leidet, oder ob weitere Mechanismen bei der Entwicklung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms eine Rolle spielen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

4.4.2. Die Bedeutung der APCCs

Um die Bedeutung der APCCs in der Adenomgenese zu ergründen, untersuchten Nishimoto et al. (70) deren Genexpression. Mutationen jener Gene, die mit Aldosteron - produzierenden Adenomen in Zusammenhang gebracht werden (*KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1D*), konnten die Autoren bei 35 % der APCCs nachweisen. Das Auftreten dieser Mutationen in APCCs würde die Vermutung nahelegen, APCCs seien Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome. Allerdings trugen die APCCs, bei denen Mutationen gefunden wurden, zu 75 % Mutationen des *CACNA1D* - Gens und zu 25 % Mutationen des *ATP1A1* Gens. In keinem APCC trat eine *KCNJ5* - Mutation auf, welche die häufigste bei Aldosteron - produzierenden Adenomen nachgewiesene Mutation darstellt. Unter der Annahme, APCCs seien Präkursoren Aldosteron - produzierender Adenome, sollte diese genetische Veränderung gleich häufig in APCCs und in Adenomen vorzufinden sein. Zwar argumentierten Nishimoto et al. (70), jene APCCs, die eine *KCNJ5* - Mutation tragen, könnten besonders aggressiv wachsen und aufgrund der Weiterentwicklung zum Adenom nur für eine kurze Zeitspanne die Morphologie eines APCCs aufweisen. Durch die rasche Proliferation würden die *KCNJ5* - mutierten APCCs bereits früh durch exzessive Aldosteronproduktion Symptome hervorrufen und wären nur im Ausnahmefall bei der Untersuchung asymptomatischer Personen anzutreffen (70). Dennoch spricht die geringe Häufigkeit der *KCNJ5* - Mutation in APCCs gegen deren Rolle als Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome.

Schließlich muss auf eine potentielle Verfälschung der Ergebnisse genetischer Untersuchungen hingewiesen werden. Möglicherweise war die Fallzahl von Nishimoto et al. (70) mit 23 Patienten zu gering, um eine *KCNJ5* - Mutation in APCCs zu detektieren. Zudem ist die Studienlage bezüglich des Mutationsstatus der APCCs noch nicht eindeutig geklärt. Fernandez - Rosa et al. (69) konnten bei eigenen genetischen Untersuchungen in keinem APCC Mutationen

nachweisen, die mit primärem Hyperaldosteronismus assoziiert werden. Diese Diskrepanz der Ergebnisse sollte in weiteren Studien untersucht werden, und bis dahin müssen auf dem Mutationsstatus der APCCs basierende Hypothesen mit Vorsicht genossen werden.

Das Auftreten von Mutationen in APCCs, welche die Hormonproduktion anregen, ist angesichts deren Überexpression der Aldosteronsynthese und der mehrfach postulierten autonomen hormonellen Aktivität dieser Formationen (63, 64, 67) zu erwarten. Die mit Aldosteron - produzierenden Adenomen assoziierten Mutationen könnten für eine exzessive Hormonproduktion verantwortlich sein, ohne simultan proliferationsfördernd zu wirken. Möglicherweise entstehen APCCs aus Zona Glomerulosa - Zellen, die eine CYP11B2 - stimulierende Mutation erleiden. Nach deren Entstehung könnten APCCs als autonom hormonproduzierende Zellverbände ohne Progressionstendenz fortbestehen. Beim Zusammentreffen sowohl proliferationsfördernder als auch die hormonelle Aktivität stimulierender Mutationen könnten hingegen Aldosteron - produzierende Adenome entstehen. Diese Koinzidenz beider genetischer Veränderungen wäre ein zufälliges Ereignis, das in jeder Nebennierenrindenzelle auftreten könnte, unabhängig davon, ob sie einem Focus, einem APCC oder keinem Zellverbund angehören würde.

Das Auftreten von Mutationen mit stimulierender Wirkung auf die Aldosteronproduktion bei APCCs bestärkt die These, die Hormonproduktion innerhalb von APCCs erfolge autonom vom Renin - Angiotensin - Aldosteron - System, ist jedoch kein Beleg für deren tumoröse Entartung. Bei morphologischer Betrachtung der APCCs fällt auf, dass diese im Gegensatz zu Noduli und Adenomen keine Architekturstörung aufweisen, sondern sich an die anatomische Gliederung der Nebenniere mit den drei morphologischen Zonen halten. APCCs fehlen somit charakteristische Merkmale von Tumoren, wie Invasion, Infiltration oder Verdrängung des umgebenden Gewebes. Einzig die Überexpression von CYP11B2, die durchaus durch eine stimulierende Mutation verursacht werden könnte, unterscheidet Zellen der APCCs von denen der normalen Nebennierenrinde. Zudem wurden CYP11B2 aktivierende Mutationen nur bei etwa einem Drittel der APCCs nachgewiesen (70). Die restlichen APCCs ohne nachweisbare genetische Veränderungen könnten im Gegensatz dazu reaktiv auf innere oder äußere Stimuli entstehen.

Angesichts unseres Studienaufbaus ohne Möglichkeit der Verlaufsbeobachtung und mit nur wenigen klinischen Angaben bleibt die definitive Bestätigung oder Ablehnung dieser Thesen noch offen. Ebenso kann die Frage nach der hormonellen Situation der Nebennierenrinde während der Adenom - Genese nicht beantwortet werden.

4.4.3. Die Bedeutung der Nodulation

Noduläre Formationen der Nebenniere waren bei 72 % unserer Population nachweisbar. Somit scheint die Nodulation bereits aufgrund ihrer Häufigkeit keinen pathologischen Prozess darzustellen. Eine Zunahme der Noduli mit steigendem Alter, wie sie McNicol et al. (6) beschrieben, konnten wir nicht nachweisen.

Neben dem Auftreten proliferationsfördernder Mutationen wurden lokale Zellhyperplasien und - Hypertrophien für die Bildung von Nebennierenknoten verantwortlich gemacht (6, 124). Demnach entstünden Noduli kompensatorisch nach einem Zelluntergang benachbarter Nebennieren - Areale. Im Alter komme es infolge lokaler Infarkte bei arteriosklerotisch veränderten Gefäßen und infolge physiologischer Apoptoseprozesse zum gebietsweisen Untergang von Nebennierenrindenzellen. Folge des regionalen Gewebeschwunds seien eine insgesamt verminderte Hormonproduktion und ein sekundärer Anstieg der ACTH - Konzentration über einen negativen Feedbackmechanismus. ACTH fördere die Proliferation der noch intakten Nebennierenzellen, sodass sich schließlich lokale Atrophien und Areale kompensatorischer Hyperplasie abwechselten würden, was makroskopisch einer multinodulären Nebenniere entspräche (6, 124).

Boulkroun et al. (65) beschrieben eine verstärkte Nodulation und verminderte Vaskularisation in der Zona Glomerulosa von Adenom - tragenden Nebennieren im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ob die Nodulation Folge der lokal erhöhten Aldosteronkonzentration im Sinne eines „Remodeling“ sei oder ob sie einen hyperproliferativen Zustand der Nebennierenrinde darstelle, auf deren Grundlage erst Aldosteron - produzierende Adenome entstünden, konnte nicht geklärt werden.

Genetische Untersuchungen an *KCNJ5* - mutierten Aldosteron - produzierenden Adenomen konnten die Mutation jeweils nur im Adenom, nicht im umgebenden Nebennierenrindengewebe nachweisen (123). An multinodulären Nebennieren mit Aldosteron - produzierenden Adenom zeigten Dekkers et al. (66), dass das Adenom und die sekundären Knoten unterschiedliche Mutationen tragen. Diese beiden Erkenntnisse suggerieren, dass die Nodulation und die Entwicklung genetischer Veränderungen zwei getrennte Ereignisse darstellen. Das Auftreten von Mutationen, die eine exzessive Hormonproduktion fördern, scheint ein sekundäres Ereignis zu sein, welches sich in primär genetisch nicht veränderten Nebennierenknoten ereignet.

Fernades - Rosa et al. (69) verglichen den Mutationsstatus von sekundären Aldosteron - produzierenden Noduli (sogenannte Nebenknotten) mit dem Aldosteron - produzierender

Adenomen. Dabei zeigten die Autoren, dass Haupt- und Nebenknoten oft unterschiedliche genetische Veränderungen trugen. Interessanterweise trugen alle Nebenknoten, in denen eine Mutation nachgewiesen wurde, unabhängig vom Mutationsstatus des Hauptknotens eine *KCNJ5* - Mutation. Angesichts der Tatsache, dass *KCNJ5* - Mutationen die häufigste genetische Veränderung bei Aldosteron - produzierenden Adenomen darstellen, war ein vermehrtes Vorkommen dieser Mutation nicht ungewöhnlich. Allerdings war das Auftreten von *KCNJ5* - Mutationen in Nebenknoten, wenn der Hauptknoten eine *CACNA1D* - oder keine Mutation aufwies, bemerkenswert. Das Vorhandensein verschiedener Mutationen in Haupt - und Nebenknoten lässt vermuten, die bisher bekannten Mutationen bei Aldosteron - produzierenden Adenomen entstünden erst in einer späten Phase der Adenomentstehung. Ebenso bekräftigt das Fehlen einer mit einem Aldosteron - produzierenden Adenom assoziierten Mutation in den Nebenknoten von 70 % der untersuchten Nebennieren die These, dass Nodulation und exzessive Hormonproduktion zwei voneinander unabhängig auftretende Prozesse seien, deren Zusammenkommen Voraussetzung für die Entstehung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms sei. Gemäß dieser These würden in Nebennieren aus bisher unbekanntem Gründen, möglicherweise im Rahmen des Alterungsprozesses oder aufgrund noch nicht bekannter Mutationen, mehrere Noduli entstehen. Nur einzelne dieser Knoten würden im Verlauf weitere Mutationen entwickeln, welche zu autonomer Hormonproduktion und so zu klinischen Symptomen führen würden. Die meisten Noduli würden ohne weitere genetische Veränderungen als asymptomatische Knoten der Nebenniere persistieren, da sie sich ohne Hormonexzess nicht klinisch manifestieren könnten.

Aufgrund der Tatsache, dass Aldosteron - produzierende Adenome auch in Nebennieren ohne Knotenbildung auftreten, dass typische Mutationen auch in Arealen der Nebenniere ohne Nodulation, beispielsweise den APCCs, nachgewiesen wurden (70), und dass genetische Veränderungen nur in einem Bruchteil der Nebenknoten nachgewiesen wurden (69), verwerfen wir die These, Noduli seien eine obligate Vorläuferläsionen für ein Aldosteron - produzierendes Adenom. Unserer Vorstellung nach entwickeln sich Noduli ohne Aldosteronsynthese - Expression nur beim Auftreten weiterer, sekundärer genetischer Veränderungen zu Aldosteron - produzierenden Adenomen. Demgemäß sehen wir keinen direkten Zusammenhang zwischen der Knotenbildung in der Nebennierenrinde und der Entwicklung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms. Noduli mit CYP11B2 - Expression hingegen stehen unter Verdacht, direkte Vorläufer Aldosteron - produzierender Adenome darzustellen. Sie ähneln Aldosteron - produzierenden Adenomen in ihrer Morphologie und in der Überexpression von CYP11B2, sind allerdings von geringerer Größe (37). Aufgrund unseres Studienaufbaus war es nicht möglich, die zeitliche Entwicklung der CYP11B2 - exprimierenden

Noduli zu untersuchen. Möglicherweise zeigen manche Noduli eine Progredienz bis zur Bildung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms. Andere könnten als mikronoduläre, Aldosteron - produzierende Strukturen persistieren, ohne ein Wachstum aufzuweisen. Unter welchen Bedingungen und aus welchen Strukturen die Aldosteronsynthese - exprimierenden Noduli entstünden und wie sich weiter entwickelten, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt. Ebenso kann aktuell keine Aussage über den genauen Verlauf der Entstehung eines Aldosteron - produzierenden Adenoms getroffen werden.

4.4.4. Modell für die Entwicklung Aldosteron - produzierender Adenome auf der Basis unserer Ergebnisse

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen beschrieben wir verschiedene Ausprägungsformen der CYP11B2 - Expression in der humanen Nebenniere, deren Häufigkeiten in einem asymptomatischen Kollektiv und korrelierten die erhobenen histomorphologischen Parameter mit klinischen Kenndaten. Da CYP11B2 das letzte und geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Aldosteronsynthese darstellt, können wir über dessen Expressionsgrad indirekt auf die Aktivierung des Renin - Angiotensin - Aldosteron - System schließen.

Die hier vorliegende Arbeit stellt die bisher größte Studie der CYP11B2 - Expression von Nebennieren aus einem klinisch asymptomatischen Kollektiv dar und konnte wichtige neue Erkenntnisse in Bezug auf die Aldosteronproduktion in der Zona Glomerulosa normaler Nebennieren gewinnen. Unsere Untersuchungen bestätigen, dass die Aldosteronproduktion sowohl in einzelnen Aldosteronsynthese - exprimierenden Strukturen (Foci, APCCs, Noduli) als auch in fokal oder kontinuierlich CYP11B2 - exprimierenden Zellen der Zona Glomerulosa erfolgt, wie in der Literatur bereits beschrieben (63-65). Gemäß unserer Analyse scheint bei klinisch asymptomatischen Individuen eine fokale bis diskontinuierliche Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa zu überwiegen. Zusätzlich zur CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa fanden wir bei beinahe allen Personen Foci, kleine Ansammlungen Aldosteron - produzierender Zellen, während wir APCCs, trapezförmige Gruppierungen CYP11B2 - exprimierender Zellen, nur in etwas mehr als der Hälfte aller Individuen identifizieren konnten.

Wir konnten eine Abnahme der Aldosteronproduktion innerhalb der Zona Glomerulosa und der APCCs mit steigendem Alter nachweisen, was wir auf einen physiologischen Alterungsprozess zurückführten. Ebenso konnten wir eine Abnahme der CYP11B2 - Expression

in der Nebennierenrinde bei steigendem Body - Mass - Index nachweisen, was durch eine Interaktion zwischen der Nebennierenrinde und dem Fettgewebe bedingt sein könnte. Schließlich fanden wir mehr Aldosteron - produzierende Noduli bei Frauen als bei Männern und vermuteten einen Zusammenhang mit dem Hormonstatus beziehungsweise mit den hormonellen Schwankungen im Rahmen des weiblichen Zyklus.

Neben der Beschreibung der funktionellen Anatomie der Zona Glomerulosa im gesunden Menschen beschäftigten wir uns mit der Frage nach der Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus und insbesondere des Aldosteron - produzierenden Adenoms. Unter Einbezug unserer Ergebnisse und der Erkenntnisse der aktuellen Literatur formulieren wir folgendes Modell:

Durch zufällige somatische Mutationen erwerben Zellen der Zona Glomerulosa entweder die Fähigkeit zur autonomen Hormonproduktion oder zur unkontrollierten Proliferation (Immortalisierung). Im ersten Fall entstehen konstitutiv aktive Areale der Zona Glomerulosa, die möglicherweise morphologisch als Foci oder als APCCs erkennbar sind. Die Hormonproduktion innerhalb dieser Areale erfolgt entkoppelt vom hormonellen Regelkreis, führt jedoch nicht obligat zur Entwicklung klinischer Symptome, da die Aldosteronsynthese in der restlichen Nebenniere durch die autonomen Areale unterdrückt werden kann. Die kontinuierlich hormonproduzierenden, aus mutierten Zellen bestehenden Areale können persistieren, sich zurückbilden oder sich weiterentwickeln. Die Mutation, die zur autonomen Hormonproduktion führt, ist unserer Vorstellung nach nicht per se proliferationsfördernd - für das weitere Wachstum sind andere, simultan oder später aufgetretene Mutationen notwendig.

Im Gegensatz dazu entstehen im zweiten Fall - wenn Nebennierenzellen wachstumsfördernde Mutationen tragen - stark proliferierende, expansiv wachsende Zellverbände, die das umgebende Gewebe verdrängen und als Noduli erkennbar sind. Je nach Morphologie der ursprünglich mutierten Zelle entstehen Noduli mit primär Zona Glomerulosa - oder Zona Fasciculata - artigen Zellen. Die Noduli können eine hormonelle Aktivität aufweisen, wenn sie aus hormonproduzierenden Zellen entstehen. Meist sind sie jedoch hormonell inaktiv. Manche der hormonell nicht aktiven Noduli könnten auch reaktiv auf Umbauprozesse der Nebenniere als Folge von lokalen Ischämien oder Atrophien entstehen (65, 124).

In seltenen Fällen kommt es zum Zusammentreffen sowohl proliferationsfördernd oder immortalisierend wirkender Mutationen als auch von genetischen Veränderungen, die eine exzessive Hormonproduktion bedingen. Diese Mutationen können entweder simultan oder sequentiell auftreten, wobei wir von zufallsbedingten, voneinander unabhängigen Ereignissen

ausgehen. In der Folge des Koinzidierens beider Mutationen entstehen autonom hormonproduzierende, proliferierende Zellverbände, sogenannte Aldosteron - produzierende Adenome.

Im Sinne unseres Modells einer schrittweisen Tumorgenese interpretieren wir Aldosteronsynthese - exprimierende Noduli als direkte Vorläuferläsionen von Aldosteron - produzierenden Adenomen. Als solche können sie aus Foci oder Zellen der Zona Glomerulosa entstehen und als Zwischenstufe der Adenomgenese fungieren oder, bei fehlender Progression, benigne Läsionen der Nebenniere darstellen. Noduli der Nebennierenrinde ohne Expression der Aldosteronsynthese stellen möglicherweise autonom proliferierende Zellverbände dar, die potentiell durch sekundär auftretende Mutationen die Fähigkeit zur Aldosteronproduktion akquirieren können. Teilweise kann die Nodulation auch auf einen physiologischen Anpassungsprozess ohne Krankheitswert zurückzuführen sein.

Schlussendlich befassten wir uns mit der umstrittenen Frage der Rolle von APCCs in humanen Nebennieren. APCCs unterscheiden sich morphologisch bis auf die vermehrte CYP11B2 - Expression nicht von Zellen der restlichen Nebennierenrinde und weisen keinerlei Zeichen zellulärer Anomalien, der Invasion oder Verdrängung benachbarter Gewebe auf. Genetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass APCCs aus Zellen der Zona Glomerulosa entstehen und, zumindest in einem Drittel der Fälle, aufgrund genetischer Veränderungen ungekoppelt vom hormonellen Regelkreis Aldosteron produzieren (70). In unserem klinisch unauffälligen Kollektiv war die Prävalenz von APCCs mit 59 % erstaunlich hoch. Aufgrund dieser Tatsachen sehen wir APCCs als physiologische Strukturen an und distanzieren uns von der These, APCCs seien Vorläufer Aldosteron - produzierender Adenome. Ob APCCs aufgrund spontaner, die Hormonproduktion fördernder Mutationen entstehen oder ob sie, zumindest zum Teil, als morphologische Sonderform der Zona Glomerulosa im Rahmen einer Reaktion auf Störungen der Homöostase gebildet werden, steht noch offen. Die Bedeutung der APCCs, aber auch nodulärer Strukturen der Nebennierenrinde gesunder Personen, sollte in weiteren Studien vertieft werden.

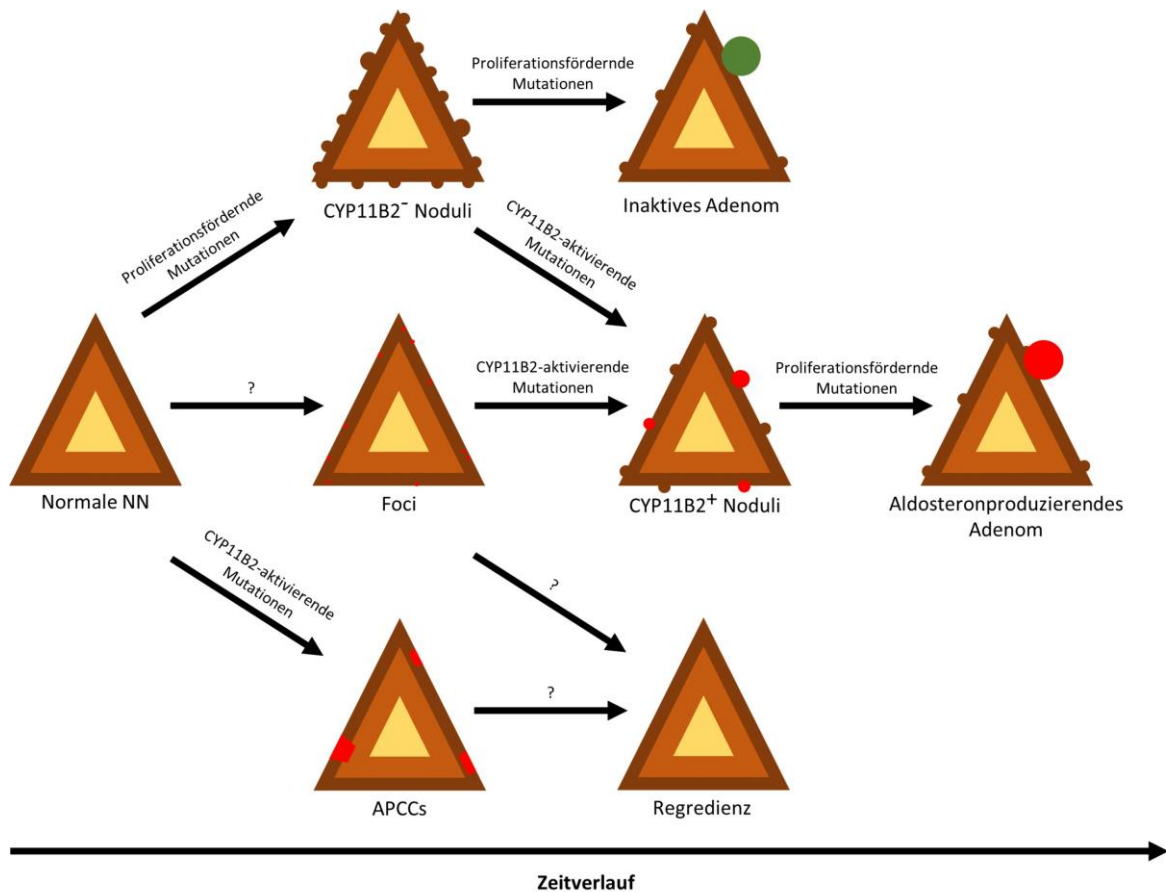


Abbildung 21: Modell zur Entwicklung adrener Adenome

4.5. Einschränkungen

Im Folgenden soll auf einige problematische Aspekte unserer Studie hingewiesen werden.

4.5.1. Externe Validität

Wir analysierten Nebennieren von Personen, welche im Institut für Rechtsmedizin in München seziiert wurden, und versuchten Aussagen über die funktionelle Anatomie der Zona Glomerulosa gesunder Personen zu treffen.

Vor der Verallgemeinerung der Schlussfolgerungen unserer Studie auf die Allgemeinbevölkerung müssen wir die Repräsentativität des untersuchten Kollektivs klären. Die Altersverteilung unseres Kollektivs war ausgeglichen, mit einem besonders großen Anteil

an Personen im mittleren bis hohen Alters, was dem durchschnittlichen Patientengut im klinischen Alltag entspricht. Aufgrund der weitreichenden Altersspanne der analysierten Individuen war es möglich, Aussagen über die CYP11B2 - Expression von der Jugend bis ins hohe Alter zu treffen. Im Gegensatz dazu stellt das unausgeglichene Geschlechterverhältnis unserer Studienpopulation ein Problem dar: 151 Männern (72 %) standen 58 Frauen (28 %) gegenüber, eine Minderheit. Dieser Tatsache wurde durch die statistische Analyse Rechnung getragen; dennoch ist eine mögliche Verzerrung der Daten nicht völlig auszuschließen.

Ein weiteres Problem, sowohl in Bezug auf die Verallgemeinerung unserer Ergebnisse auf die Normalbevölkerung, als auch in Bezug auf deren Interpretation, stellen die in den meisten Fällen fehlenden klinischen Angaben dar. Wir analysierten ein Kollektiv des Rechtsmedizinischen Instituts in München und sahen die in unsere Studie eingeschlossenen Personen bezüglich der Nebennieren als gesund an. Sowohl bei der rechtsmedizinischen Sektion des Gesamtorganismus und der pathologischen Untersuchung der Nebennieren als auch beim Studium der Krankengeschichte, falls diese verfügbar war, konnten bei keinem der eingeschlossenen Individuen Hinweise für eine Nebennierenerkrankung gefunden werden. Diese wäre, wie auch andere endokrinologische Erkrankungen, ein Ausschlusskriterium unserer Studie gewesen. Manche Erkrankungen, wie eine arterielle Hypertonie, konnten jedoch nicht als solche in der Sektion erkannt werden. Dasselbe gilt für systemische Erkrankungen, die unmittelbar oder über Beeinflussung des Hormonhaushaltes oder des Wasser - und Mineralhaushaltes, einen Einfluss auf die Morphologie und Genexpression der Nebennierenrinde haben könnten. Das Fehlen von Blutdruckwerten und der Aldosteronkonzentrationen im Blut hinderte uns daran, bereits klinisch manifeste, aber nicht diagnostizierte Aldosteron - produzierende Adenome von klinisch stummen Aldosteron - produzierenden Knoten der Nebennierenrinde zu unterscheiden. Neben wichtigen klinischen Parametern fehlten auch Angaben bezüglich des Lebensstils und einer Medikamenteneinnahme der untersuchten Personen. Informationen zum Salzkonsum und zur Einnahme von ACE - Hemmern oder Angiotensin - II - Rezeptor - Antagonisten wären von hoher Relevanz, da diese Variablen das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System beeinflussen. Schließlich birgt die Analyse von Organen bereits verstorbener Personen den Nachteil, dass der weitere klinische Verlauf nicht untersucht werden kann. Über ein weiteres Wachstum, eine Stagnation oder sogar eine Regression der entdeckten histomorphologischen Strukturen der Nebennierenrinde kann somit nur spekuliert werden.

4.5.2. *Interne Validität*

Bezüglich der internen Validität und des methodischen Vorgehens sollen folgende Kritikpunkte und Schwierigkeiten erwähnt werden:

Anstatt beide Nebennieren einer Person in toto histologisch zu analysieren, beschränkten wir uns auf je zwei histologische Schnitte pro Organ. Über den Aufbau der Nebenniere außerhalb dieser Schnittflächen, insbesondere über das Auftreten weiterer morphologischer Strukturen können wir daher keine Aussagen treffen. Möglicherweise entgingen uns manche Formationen, möglicherweise kamen zufallsbedingt auf dem betrachteten Schnitt durchschnittlich mehr oder weniger Aldosteron - produzierende Strukturen vor als im umgebenden Gewebe oder im gesamten Organ im Mittel aufzufinden gewesen wären. Allerdings besteht ein Zusammenhang zwischen der Aldosteronproduktion in einem Anschnitt (sowie der Anzahl an Foci, APCCs und Noduli) und der Anzahl dieser Formationen in der gesamten Nebenniere, auch wenn zwangsläufig die Anzahl der CYP11B2 - exprimierenden Strukturen in einem Nebennierenanschnitt nicht exakt der Anzahl in der gesamten Nebenniere entspricht. In Voruntersuchungen zu eigenen immunhistochemischen Untersuchungen wiesen Nanba et al. (64) eine Korrelation zwischen der Anzahl von APCCs in einem Nebennierenanschnitt und der Anzahl von APCCs in drei jeweils im Abstand von 300 Mikrometern hintereinander liegenden Schnitten derselben Nebenniere nach. Da wir in unserer Studie bei jedem Individuum nur einen Anschnitt der Nebenniere betrachteten, sind die erhobenen Ergebnisse innerhalb unseres Kollektivs miteinander vergleichbar.

Bei kritischer Betrachtung unseres methodischen Vorgehens ist weiterhin auf die Bedeutung des Untersuchers hinzuweisen. Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte nach einer semiquantitativen Klassifikation, weshalb ein gewisses Maß an Subjektivität bei der Einordnung der morphologischen Parameter nicht auszuschließen ist. Um dieses Problem möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte rigoros nach einer im Voraus festgelegten Klassifikation und mit minimalem zeitlichem Abstand zwischen dem ersten und dem letzten Schnitt ausgewertet. Der Untersucher war bezüglich der klinischen Daten der untersuchten Personen zum Zeitpunkt der Untersuchung verblindet. Die Klassifikation der Aldosteron - produzierenden Areale der Nebennierenrinde wurde in Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von Prof. Maria Christina Zennaro erstellt, die bereits denselben Antikörper in einer kleinen Patientengruppe eingesetzt hatte. Ebenso erfolgte eine verblindete Gegenkontrolle der Auswertung der Schnitte an einer repräsentativen Stichprobe unserer Nebennierenschnitte durch einen erfahrenen Pathologen derselben Arbeitsgruppe. Bis auf wenige Ausnahmen

gelangte die Arbeitsgruppe Zennaro zu denselben Ergebnissen bei der Klassifikation Aldosteron - produzierender Areale wie unsere Untersuchungen.

Unsere Studie untersuchte die Expression der Aldosteronsynthese und interpretierte diese als indirektes Maß für die Aktivität des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems beziehungsweise für den Aldosteron - Gehalt des Organismus. Allerdings ist eine Expression der Aldosteronsynthese nicht automatisch mit einer Überproduktion von Aldosteron gleichzusetzen und umgekehrt entspricht das Fehlen von CYP11B2 nicht einem peripheren Hormonmangel. Viele Faktoren beeinflussen die Aldosteronproduktion und könnten trotz schwacher CYP11B2 - Expression zu hohen Aldosteronspiegeln führen (79). Beispielsweise könnte eine exzessive Aldosteronproduktion auch durch vermehrte Expression jener stereogenen Enzyme erfolgen, die Reaktionen vor CYP11B2 katalysieren (11).

Allerdings bestätigten zahlreiche Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass aus dem Grad der Aldosteronsynthese - Expression innerhalb der Zona Glomerulosa Rückschlüsse auf den Aldosteron - Gehalt des Organismus gezogen werden können. Diese Voraussetzung ist eine Grundlage für die Interpretation unserer Ergebnisse. Boulkroun et al. (65) erkannten, dass die CYP11B2 - Expression eines Aldosteron - produzierenden Adenoms, multipliziert mit dessen Fläche, positiv mit dem Aldosteronspiegel im 24 - Stunden - Urin korreliert, und die CYP11B2 - Expression negativ mit dem Kaliumgehalt des Blutes korreliert. Nanba et al. (64) wiesen denselben Zusammenhang nach: die Stärke der CYP11B2 - Expression multipliziert mit der Adenom - Fläche korreliert positiv mit der Aldosteron - Renin - Ratio, positiv mit der Aldosteronkonzentration und negativ mit der Kaliumkonzentration im Blut. Ono et al. (79) zeigten, dass bei Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen der McCarty H - Score der CYP11B2 - Expression (Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Zellen multipliziert mit einem Score von eins bis drei je nach Intensität der Anfärbung) multipliziert mit der Tumorfläche in Adenomen positiv mit der Aldosteronkonzentration im Blut und im Urin korreliert. Ebenso fanden Monticone et al. (54) eine positive Korrelation zwischen der Stärke der nach der Adenomgröße adjustierten Aldosteronsynthese - Expression und sowohl der Renin - Angiotensin - Ratio als auch dem Aldosteronspiegel im Blut.

Da verschiedene Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen der Intensität der immunhistochemischen CYP11B2 - Färbung und dem Aldosteronspiegel im Blut nachweisen konnten, nehmen wir an, dass die Verwendung der Immunhistochemie zur Darstellung der Aldosteronsynthese ein zuverlässiger Indikator für den Aldosteronspiegel des Organismus sei.

4.6. Bedeutung unserer Studie

Unserer Studie stellt die größte bislang veröffentlichte Analyse der Aldosteronsynthese - Expression in Nebennieren klinisch unauffälliger Personen dar. Ihre Bedeutung liegt einerseits in der Verwendung eines neuartigen, für die Aldosteronsynthese hochspezifischen Antikörpers, der es ermöglicht, eine gezielte Aussage zur hormonellen Aktivität der Nebenniere zu treffen, und andererseits im untersuchten Kollektiv, welches Individuen ohne bekannte Nebennierenerkrankung umfasst. Bisher publizierte Studien untersuchten die Aldosteronsynthese - Expression der Nebennierenrinde von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus und insbesondere mit Aldosteron - produzierenden Adenomen. Selten wurden Personen ohne bekannte Erkrankung der Nebenniere, meist als Kontrollen, eingeschlossen. In den meisten Studien litten die als gesund bezeichneten Personen an schwerwiegenden Erkrankungen der Niere, die zur Adrenalectomie führten, beispielsweise einem Nierenzellkarzinom. Diese Individuen sind damit nur bedingt repräsentativ für ein gesundes Kollektiv, da ein Einfluss der Grunderkrankung auf den Stoffwechsel und den Hormonhaushalt anzunehmen ist. Unsere Studie hingegen untersuchte Personen, welche aufgrund einer unklaren oder unnatürlichen Todesart in der Rechtsmedizin seziert wurden. Ihre definitive Todesursache war meist kardiovaskulär bedingt oder blieb ungeklärt - zwar ist der Tod durch eine chronische Erkrankung nicht auszuschließen, allerdings dürften keine Erkrankungen mit direkter Auswirkung auf die Nebenniere vorgelegen haben.

Unabhängig von den Charakteristika unseres Untersuchungskollektives soll auf die Größe unserer Studie hingewiesen werden. Bisherige Veröffentlichungen wiesen eine geringe Anzahl eingeschlossener Individuen, sowohl gesunder Kontrollen als auch von Patienten mit Aldosteron - produzierenden Adenomen, auf. Unsere Studie hingegen besitzt mit 209 untersuchten Personen eine ausreichend große Fallzahl, um ihre Ergebnisse auf die Allgemeinbevölkerung übertragen zu können.

4.7. Ausblick

Unsere Studie konnte einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die physiologische Aktivität der Zona Glomerulosa in einer klinisch asymptomatischen Bevölkerung zu charakterisieren. Die Frage nach der Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus und insbesondere des Aldosteron - produzierenden Adenoms bleibt jedoch weiterhin offen und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die fehlende Verfügbarkeit klinischer und laborchemischer Informationen und die fehlende Möglichkeit einer Langzeituntersuchung waren die Hauptprobleme unserer Studie. Da Nebennieren von gesunden Menschen nur äußerst selten für histologische Untersuchungen gewonnen werden können und da im Falle einer Organentnahme die weitere Entwicklung des entnommenen Organs im Organismus nicht mehr untersucht werden kann, müssen Alternativen bedacht werden. Die Entwicklung eines Tiermodells wäre eine Möglichkeit, die Entwicklung der Nebenniere im kontinuierlichen Wachstums - und Alterungsprozess und in Verbindung mit klinischen und laborchemischen Daten, wie dem Blutdruck und dem Aldosteronspiegel, zu analysieren. Ein Tiermodell hätte zudem den Vorteil, dass die Lebens - und Ernährungsweise der Tiere manipuliert und deren Einfluss auf die Expression der Aldosteronsynthese und auf die Entwicklung von Nebennierenknoten analysiert werden kann. Allerdings stellt ein Modellorganismus nur eine vereinfachte Darstellung der Verhältnisse im menschlichen Organismus dar und ermöglicht keine exakte Darstellung, sondern nur eine Approximation der humanen Physiologie.

Die hier vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die morphologische Beschreibung Aldosteron - produzierender Areale der Nebenniere, ohne deren genetischen Hintergrund zu analysieren. Verschiedene Publikationen, deren Ergebnisse in der Diskussion berücksichtigt wurden, untersuchten die Genexpression und das Vorhandensein von Mutationen in Aldosteron - produzierenden Adenomen, APCCs und gesundem Nebennierengewebe. Deren Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich, sodass weitere Studien mit größerer Fallzahl vonnöten sind, um die genetischen Hintergründe bei der Entwicklung von Aldosteron - produzierenden Adenomen zu verstehen.

4.8. Zusammenfassung

Der primäre Hyperaldosteronismus ist die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie. Ihm liegen entweder eine idiopathische Nebennierenrindenhyperplasie oder ein Aldosteron - produzierendes Adenom zugrunde. Asymptomatische Nebennierenknoten unklarer Ätiologie werden häufig bei Patienten gefunden, die aus anderweitigen Gründen eine abdominale Bildgebung erhalten. Die Bedeutung dieser Nebennierenknoten in Bezug auf die Pathogenese des primären Hyperaldosteronismus und insbesondere des Aldosteron - produzierenden Adenoms ist gegenwärtig unklar.

Unserer Studie untersuchte die Nebennieren eines klinisch unauffälligen Kollektives nach dem Auftreten von potentiellen Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Adenome und beschrieb die Verteilung der Aldosteronsynthese - Expression in dieser asymptomatischen Kohorte. Die Aldosteronproduktion bei gesunden Individuen erfolgt in der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde über eine Reihe enzymatischer Reaktionen, an deren Ende die Aldosteronsynthese (CYP11B2) steht. Die immunhistochemische Untersuchung des Expressionsmusters von CYP11B2 ermöglichte uns, indirekt die Aktivität der Aldosteronproduktion in den untersuchten Nebennieren darzustellen und die funktionelle Morphologie der gesunden Zona Glomerulosa zu beschreiben.

Unseren Untersuchungen nach erfolgt die Aldosteronproduktion in Nebennieren klinisch unauffälliger Personen einerseits in den CYP11B2 - exprimierenden Zellen der Zona Glomerulosa, andererseits in einzelnen Aldosteronsynthese - exprimierenden Strukturen, die wir anhand ihrer Morphologie als Foci, APCCs oder Noduli bezeichneten. Physiologischerweise sind nicht alle Zellen der Zona Glomerulosa aktiv an der Aldosteronproduktion beteiligt: 80 % der von uns untersuchten Individuen wiesen eine fokale oder diskontinuierliche Expression der Aldosteronsynthese auf, nur 16 % eine kontinuierliche CYP11B2 - Expression. Letztere interpretierten wir als, möglicherweise temporäre, Überexpression des Enzyms. Analog könnten die 5 %, bei denen keine CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa nachgewiesen werden konnte, eine komplette Suppression der Aldosteronproduktion aufweisen. Aufgrund des Auftretens verschiedener Zustandsformen der Zona Glomerulosa in einem asymptomatischen Kollektiv vermuteten wir, dass die hormonelle Aktivität der Zone dem Einfluss des Wasser - und Elektrolythaushaltes unterliege.

Die Aldosteronsynthese - Expression in der Zona Glomerulosa nahm mit zunehmenden Alter der Personen statistisch signifikant ab, sodass wir die physiologische Involution der Zona Glomerulosa im Alterungsprozess bestätigen. Eine weitere statistisch signifikante Abnahme

der Stärke der Aldosteronsynthese - Expression der Zona Glomerulosa fanden wir mit steigendem Body - Mass - Index. Diese Suppression von CYP11B2 in der Nebennierenrinde könnte durch erhöhte periphere Hormonspiegel bei simultaner extraadrenaler Aldosteronproduktion im viszeralen Fett bei übergewichtigen Personen bedingt sein.

Neben der CYP11B2 - Expression in der Zona Glomerulosa wiesen beinahe alle (91 %) untersuchten Personen Foci auf, während APCCs nur bei etwas mehr als der Hälfte (59 %) auftraten. Aufgrund der hohen Prävalenz der Foci sehen wir diese als physiologische Ausprägungsform der Zona Glomerulosa beim Erwachsenen an. APCCs hingegen scheinen nur unter bestimmten, gegenwärtig noch unbekanntem Umständen aufzutreten. In unserer Untersuchung korrelierten APCCs und Foci positiv miteinander, was auf eine gemeinsame Regulation, vielleicht durch das Renin - Angiotensin - Aldosteron - System, hinweisen würde. Zudem nahm die Zahl von APCCs mit steigendem Alter statistisch signifikant ab, was wir als Hinweis für deren Plastizität und Fähigkeit zur Rückbildung interpretierten. Das relativ häufige Auftreten von APCCs in unserem asymptomatischen Kollektiv, deren Abnahme im Alter und deren Morphologie, die keine Charakteristika tumorösen Wachstums zeigt, ließen uns die These verwerfen, APCCs seien Vorläuferläsionen Aldosteron - produzierender Tumore.

Kleine, noduläre Strukturen der Nebennierenrinde, sogenannte Noduli, waren bei einem Großteil (72 %) unseres Untersuchungskollektivs nachweisbar, Aldosteronsynthese - exprimierende Knoten nur bei einem Viertel. Somit bestätigen wir die aus Studien mit Inzidentalomen gewonnenen Erkenntnisse, dass Nebennierenknoten in der Bevölkerung häufig auftreten, aber nur ein Bruchteil aller Knoten eine Aldosteronproduktion aufweist. Frauen wiesen statistisch signifikant mehr CYP11B2 - exprimierende Noduli auf als Männer, was mit einer sowohl proliferationsfördernden als auch die Hormonproduktion steigernden Wirkung der weiblichen Sexualhormone auf die Nebenniere vereinbar wäre.

Eines der Ziele unserer Untersuchungen war, durch die Beschreibung der funktionellen Anatomie der Aldosteronproduktion gesunder Nebennieren Erkenntnisse über die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms zu gewinnen. Aufgrund unserer Untersuchungen und den Ergebnissen aktueller Publikationen stellen wir die Hypothese auf, gemäß welcher Aldosteron - produzierende Adenome aus Zellen der normalen Zona Glomerulosa oder aus (physiologisch vorkommenden) Foci durch eine Akkumulation von proliferationsfördernden und die Hormonproduktion anregenden Mutationen entstehen. Aldosteron - produzierende Knoten könnten einen klinisch stummen Zwischenschritt in der Adenomgenese darstellen oder sich, in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, spontan Rückbilden ohne jemals pathologische Bedeutung zu erlangen. Die Rolle der APCCs bleibt zum

gegenwärtigen Zeitpunkt unklar. Aufgrund unserer Ergebnisse verdächtigen wir diese Formationen nicht, Vorläuferläsionen des Aldosteron - produzierenden Adenoms darzustellen. Jedoch werden weitere Studien in Zukunft nötig sein, um die Pathogenese des Aldosteron - produzierenden Adenoms und insbesondere die Rolle der APCCs zu klären.

5. Anhang

		Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	Herzgew. (g)	APCC (n/A)	Foci (n/A)	Noduli (n/A)	Pos.Nod. (n/A)	Neg.Nod. (n/A)
Alter (Jahre)	Korr.	1,0000	-0,05163	0,22503	-0,18304	-0,10641	-0,02519	-0,02657	-0,01950
	Sig.		0,4590	0,0011	0,0080	0,1251	0,7173	0,7026	0,7793
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
BMI (kg/m ²)	Korr.	-0,05163	1,0000	0,54179	-0,04109	0,00168	0,00228	-0,03117	0,01109
	Sig.	0,4590		<0,0001	0,5557	0,9808	0,9739	0,6549	0,8737
	N	208	208	208	208	208	208	208	208
Herz- gew. (g)	Korr.	0,22503	0,54179	1,0000	-0,12111	-0,01606	-0,04871	-0,02984	-0,04368
	Sig.	0,0011	<0,0001		0,0807	0,8174	0,4837	0,6679	0,5300
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
APCC (n/A)	Korr.	-0,18304	-0,04109	-0,12111	1,0000	0,43210	-0,01867	0,11418	-0,05161
	Sig.	0,0080	0,5557	0,0807		<0,0001	0,7885	0,0997	0,4580
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
Foci (n/A)	Korr.	-0,10641	0,00168	-0,01606	0,43210	1,0000	-0,06972	0,14243	-0,11391
	Sig.	0,1251	0,9808	0,8174	<0,0001		0,3158	0,0397	0,1005
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
Nod. (n/A)	Korr.	-0,02519	0,00228	-0,04871	-0,01867	-0,06972	1,0000	0,36324	0,96598
	Sig.	0,7173	0,9739	0,4837	0,7885	0,3158		<0,0001	<0,0001
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
Pos. Nod. (n/A)	Korr.	-0,02657	-0,03117	-0,02984	0,11418	0,14243	0,36324	1,0000	0,10992
	Sig.	0,7026	0,6549	0,6679	0,0997	0,0397	<0,0001		0,1131
	N	209	208	209	209	209	209	209	209
Neg. Nod. (n/A)	Korr.	-0,01950	0,01109	-0,04368	-0,05161	-0,11391	0,96598	0,10992	1,0000
	Sig.	0,7793	0,8737	0,5300	0,4580	0,1005	<0,0001	0,1131	
	N	209	208	209	209	209	209	209	209

Tabelle 10: Korrelationskoeffizienten nach Pearson. APCC, Foci und Noduli werden als Anzahl pro Anschnitt (n/A) dargestellt.

		Alter (Jahre)	BMI (kg/m²)	Herzgew. (g)	APCC (n/A)	Foci (n/A)	Noduli (n/A)	Pos.Nod. (n/A)	Neg.Nod. (n/A)
Alter (Jahre)	Korr. Sig. N	1,0000 0,3379 209	-0,06677 0,3379 208	0,19735 0,0042 209	-0,10765 0,1208 209	-0,11189 0,1068 209	-0,03216 0,6438 209	-0,01329 0,8485 209	-0,02660 0,7023 209
BMI (kg/m²)	Korr. Sig. N	-0,06677 0,3379 208	1,0000 0,3379 208	0,49448 <0,0001 208	0,00511 0,9416 208	-0,00338 0,9613 208	-0,02443 0,7261 208	-0,04320 0,5355 208	0,00443 0,9494 208
Herz- gew. (g)	Korr. Sig. N	0,19735 0,0042 209	0,49448 <0,0001 208	1,0000 0,3454 209	-0,06559 0,3454 209	-0,02329 0,7378 209	-0,12764 0,0655 209	-0,06711 0,3343 209	-0,09514 0,1706 209
APCC (n/A)	Korr. Sig. N	-0,10765 0,1208 209	0,00511 0,9416 208	-0,06559 0,3454 209	1,0000 0,3454 209	0,49037 <0,0001 209	0,00968 0,8894 209	0,18048 0,0089 209	-0,05198 0,4548 209
Foci (n/A)	Korr. Sig. N	-0,11189 0,1068 209	-0,00338 0,9613 208	-0,02329 0,7378 209	0,49037 <0,0001 209	1,0000 0,2341 209	-0,08266 0,2341 209	0,16759 0,0153 209	-0,14909 0,0312 209
Nod. (n/A)	Korr. Sig. N	-0,03216 0,6438 209	-0,02443 0,7261 208	-0,12764 0,0655 209	0,00968 0,8894 209	-0,08266 0,2341 209	1,0000 0,37537 209	0,37537 <0,0001 209	0,93107 <0,0001 209
Pos. Nod. (n/A)	Korr. Sig. N	-0,01329 0,8485 209	-0,04320 0,5355 208	-0,06711 0,3343 209	0,11418 0,0997 209	0,16759 0,0153 209	0,37537 <0,0001 209	1,0000 0,1131 209	0,10992 0,1131 209
Neg. Nod. (n/A)	Korr. Sig. N	-0,02660 0,7023 209	0,00443 0,9494 208	-0,09514 0,1706 209	-0,05198 0,4548 209	-0,14909 0,0312 209	0,93107 <0,0001 209	0,10992 0,1131 209	1,0000 209

Tabelle 11: Korrelationskoeffizienten nach Spearman. APCC, Foci und Noduli werden als Anzahl pro Anschnitt (n/A) dargestellt.

		Männlich	Weiblich	Total
Kontinuierliche CYP11B2 Expression	N	26	9	35
	%	12,4	4,4	16,8
Diskontinuierliche CYP11B2 Expression	N	76	36	112
	%	36,4	17,2	53,6
Fokale CYP11B2 Expression	N	41	9	50
	%	19,6	4,3	23,9
Fehlende CYP11B2 Expression	N	8	4	12
	%	3,8	1,9	5,7
Insgesamt	N	151	58	209
	%	72,3	27,7	100

Tabelle 12: Verteilung des Geschlechtes und der Zona Glomerulosa Klassifikation

Variable Geschlecht	F - Wert	P - Wert der ANOVA	X² Wert	P - Wert des Kruskall Wallis
Alter (Jahre)	5,96	0,0155	7,24	0,0071
BMI (kg/m ²)	6,17	0,0138	7,14	0,0075
Herzgewicht (g)	28,94	<0,001	33,39	<0,001
APCC (Anzahl pro Anschnitt)	0,52	0,4735	0,58	0,4470
Foci (Anzahl pro Anschnitt)	0,01	0,9147	0,01	0,9407
Noduli gesamt (Anzahl pro Anschnitt)	2,26	0,1342	3,04	0,0815
Noduli positiv (Anzahl pro Anschnitt)	4,50	0,0350	5,94	0,0148
Noduli negativ (Anzahl pro Anschnitt)	1,03	0,3113	1,26	0,2621

Tabelle 13: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und des Kruskal - Wallis - Test mit der Variablen Geschlecht

Variable Zona Glomerulosa	P - Wert
Alter (Jahre)	<0,001
BMI (kg/m ²)	0,0431
Herzgewicht (g)	0,039
APCC (Anzahl pro Anschnitt)	0,1159
Foci (Anzahl pro Anschnitt)	<0,001
Noduli gesamt (Anzahl pro Anschnitt)	0,9397
Noduli positiv (Anzahl pro Anschnitt)	0,2463
Noduli negativ (Anzahl pro Anschnitt)	0,6270

Tabelle 14: Ergebnisse des Jonckheere -Terpstra - Test mit der Variablen Zona Glomerulosa

Variable Zona Glomerulosa	F - Wert	P - Wert der ANOVA	X ² Wert	P - Wert des Kruskall Wallis
Alter (Jahre)	6,96	0,0002	19,91	0,0002
BMI (kg/m ²)	2,01	0,1139	6,78	0,0791
Herzgewicht (g)	3,85	0,0104	8,59	0,0352
APCC (Anzahl pro Anschnitt)	2,94	0,0344	13,24	0,0042
Foci (Anzahl pro Anschnitt)	16,09	<0,0001	55,17	<0,001
Noduli gesamt (Anzahl pro Anschnitt)	0,12	0,9465	0,36	0,9473
Noduli positiv (Anzahl pro Anschnitt)	1,40	0,2451	5,74	0,1250
Noduli negativ (Anzahl pro Anschnitt)	0,29	0,8304	0,83	0,8421

Tabelle 15: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und des Kruskall - Wallis - Test mit der Variablen Zona Glomerulosa Expression

6. Literaturverzeichnis

1. **Neville, AM, O'Hare, MJ** 1985 Histopathology of the human adrenal cortex. *Clinics in endocrinology and metabolism* 14:791-820.
2. **Duan, K, Mete, O** 2015 Clinicopathologic Correlates of Primary Aldosteronism. *Archives of pathology & laboratory medicine* 139:948-54.
3. **Young, WF.** Netter Collection - Medizinischer Atlas. München: Elsevier, Urban & Fischer.
4. **Melmed, S, Williams, RH.** Williams textbook of endocrinology. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011. XVIII, 1897 S. : p.
5. **Benninghoff, A.** Anatomie - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 16., völlig neu bearb. Aufl ed. München [u.a.]: Urban & Schwarzenberg; 2004. XII, 876 S. : Ill., graph. Darst. p.
6. **McNicol, AM** 2008 Lesions of the adrenal cortex. *Archives of pathology & laboratory medicine* 132:1263-71.
7. **Enberg, U, Volpe, C, Hamberger, B** 2003 New aspects on primary aldosteronism. *Neurochemical research* 28:327-32.
8. **Lalli, E** 2010 Adrenal cortex ontogenesis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 24:853-64.
9. **Ross, IL, Louw, GJ** 2015 Embryological and molecular development of the adrenal glands. *Clinical anatomy (New York, NY)* 28:235-42.
10. **Walczak, EM, Hammer, GD** 2015 Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nature reviews Endocrinology* 11:14-28.
11. **Nakamura, Y, Yamazaki, Y, Konosu-Fukaya, S, Ise, K, Satoh, F, Sasano, H** 2015 Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 153:57-62.
12. **Keegan, CE, Hammer, GD** 2002 Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13:200-8.
13. **Kempna, P, Fluck, CE** 2008 Adrenal gland development and defects. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 22:77-93.
14. **Beuschlein, F** 2013 Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 168:R85-93.
15. **Weiner, ID** 2013 Endocrine and hypertensive disorders of potassium regulation: primary aldosteronism. *Seminars in nephrology* 33:265-76.
16. **Te Riet, L, van Esch, JH, Roks, AJ, van den Meiracker, AH, Danser, AH** 2015 Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation research* 116:960-75.

-
17. **Xanthakis, V, Vasan, RS** 2013 Aldosterone and the risk of hypertension. *Current hypertension reports* 15:102-7.
 18. **Potthoff, SA, Beuschlein, F, Vonend, O** 2012 [Primary hyperaldosteronism--diagnostic and treatment]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 137:2480-4.
 19. **Piaditis, G, Markou, A, Papanastasiou, L, Androulakis, II, Kaltsas, G** 2015 Progress in aldosteronism: a review of the prevalence of primary aldosteronism in pre-hypertension and hypertension. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 172:R191-203.
 20. **Galati, SJ, Hopkins, SM, Cheesman, KC, Zhuk, RA, Levine, AC** 2013 Primary aldosteronism: emerging trends. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24:421-30.
 21. **Funder, JW** 2015 Primary aldosteronism and salt. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467:587-94.
 22. **Boukroun, S, Fernandes-Rosa, FL, Zennaro, MC** 2015 Molecular and Cellular Mechanisms of Aldosterone Producing Adenoma Development. *Frontiers in endocrinology* 6:95.
 23. **Zennaro, MC, Rickard, AJ, Boukroun, S** 2013 Genetics of mineralocorticoid excess: an update for clinicians. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 169:R15-25.
 24. **Gomez-Sanchez, CE, Qi, X, Velarde-Miranda, C, Plonczynski, MW, Parker, CR, Rainey, W, et al.** 2014 Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Molecular and cellular endocrinology* 383:111-7.
 25. **Allolio, B.** *Praktische Endokrinologie*. 2. Aufl. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. XV, 707 S. p.
 26. **Savard, S, Amar, L, Plouin, PF, Steichen, O** 2013 Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension* 62:331-6.
 27. **Zennaro, MC, Boukroun, S, Fernandes-Rosa, F** 2015 An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *The Journal of endocrinology* 224:R63-77.
 28. **Mulatero, P, Monticone, S, Bertello, C, Viola, A, Tizzani, D, Iannaccone, A, et al.** 2013 Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98:4826-33.
 29. **Milliez, P, Girerd, X, Plouin, PF, Blacher, J, Safar, ME, Mourad, JJ** 2005 Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *Journal of the American College of Cardiology* 45:1243-8.
 30. **Stowasser, M, Sharman, J, Leano, R, Gordon, RD, Ward, G, Cowley, D, et al.** 2005 Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:5070-6.
 31. **Conn, JW** 1955 Primary aldosteronism. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 45:661-4.

-
32. **Choi, M, Scholl, UI, Yue, P, Bjorklund, P, Zhao, B, Nelson-Williams, C, et al.** 2011 K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science (New York, NY)* 331:768-72.
 33. **Beuschlein, F, Boulkroun, S, Osswald, A, Wieland, T, Nielsen, HN, Lichtenauer, UD, et al.** 2013 Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nature genetics* 45:440-4, 4e1-2.
 34. **Scholl, UI, Goh, G, Stolting, G, de Oliveira, RC, Choi, M, Overton, JD, et al.** 2013 Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nature genetics* 45:1050-4.
 35. **Fernandes-Rosa, FL, Williams, TA, Riester, A, Steichen, O, Beuschlein, F, Boulkroun, S, et al.** 2014 Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* 64:354-61.
 36. **Riester, A, Reincke, M, Beuschlein, F** 2014 [Primary hyperaldosteronism: boundaries of diagnostics and therapy]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 139:1982-4.
 37. **Gioco, F, Seccia, TM, Gomez-Sanchez, EP, Rossi, GP, Gomez-Sanchez, CE** 2015 Adrenal histopathology in primary aldosteronism: is it time for a change? *Hypertension* 66:724-30.
 38. **Rossi, GP, Bernini, G, Caliumi, C, Desideri, G, Fabris, B, Ferri, C, et al.** 2006 A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology* 48:2293-300.
 39. **Lifton, RP, Dluhy, RG, Powers, M, Rich, GM, Cook, S, Ulick, S, et al.** 1992 A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355:262-5.
 40. **Funder, JW** 2016 Genetic disorders in primary aldosteronism-familial and somatic. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
 41. **Stowasser, M, Gordon, RD, Tunny, TJ, Klemm, SA, Finn, WL, Krek, AL** 1992 Familial hyperaldosteronism type II: five families with a new variety of primary aldosteronism. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 19:319-22.
 42. **Scholl, UI, Nelson-Williams, C, Yue, P, Grekin, R, Wyatt, RJ, Dillon, MJ, et al.** 2012 Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:2533-8.
 43. **Fischer, E, Beuschlein, F** 2013 [Incidentaloma and subclinical disorders of the adrenal gland]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 138:375-80.
 44. **Allolio, B, Fassnacht, M** 2006 Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:2027-37.
 45. **Westerdahl, C, Bergenfelz, A, Isaksson, A, Nerbrand, C, Valdemarsson, S** 2011 Primary aldosteronism among newly diagnosed and untreated hypertensive patients in a Swedish primary care area. *Scandinavian journal of primary health care* 29:57-62.

-
46. **Ribeiro, MJ, Figueiredo Neto, JA, Memoria, EV, Lopes Mde, C, Faria Mdos, S, Salgado Filho, N, et al.** 2009 Prevalence of primary hyperaldosteronism in a systemic arterial hypertension league. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 92:39-45.
47. **Schwartz, GL, Turner, ST** 2005 Screening for primary aldosteronism in essential hypertension: diagnostic accuracy of the ratio of plasma aldosterone concentration to plasma renin activity. *Clinical chemistry* 51:386-94.
48. **Mulatero, P, Stowasser, M, Loh, KC, Fardella, CE, Gordon, RD, Mosso, L, et al.** 2004 Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:1045-50.
49. **Mosso, L, Carvajal, C, Gonzalez, A, Barraza, A, Avila, F, Montero, J, et al.** 2003 Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension* 42:161-5.
50. **Hannemann, A, Bidlingmaier, M, Friedrich, N, Manolopoulou, J, Spyroglou, A, Volzke, H, et al.** 2012 Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 167:7-15.
51. **Funder, JW, Carey, RM, Mantero, F, Murad, MH, Reincke, M, Shibata, H, et al.** 2016 The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101:1889-916.
52. **Sabbadin, C, Fallo, F** 2016 Hyperaldosteronism: Screening and Diagnostic Tests. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*.
53. **Seiler, L, Rump, LC, Schulte-Monting, J, Slawik, M, Borm, K, Pavenstadt, H, et al.** 2004 Diagnosis of primary aldosteronism: value of different screening parameters and influence of antihypertensive medication. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 150:329-37.
54. **Monticone, S, Castellano, I, Versace, K, Lucatello, B, Veglio, F, Gomez-Sanchez, CE, et al.** 2015 Immunohistochemical, genetic and clinical characterization of sporadic aldosterone-producing adenomas. *Molecular and cellular endocrinology* 411:146-54.
55. **Kempers, MJ, Lenders, JW, van Outheusden, L, van der Wilt, GJ, Schultze Kool, LJ, Hermus, AR, et al.** 2009 Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. *Annals of internal medicine* 151:329-37.
56. 2002 NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *NIH consensus and state-of-the-science statements* 19:1-25.
57. **Fischer, E, Hanslik, G, Pallauf, A, Degenhart, C, Linsenmaier, U, Beuschlein, F, et al.** 2012 Prolonged zona glomerulosa insufficiency causing hyperkalemia in primary aldosteronism after adrenalectomy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97:3965-73.
58. **Young, WF, Jr.** 2007 Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *The New England journal of medicine* 356:601-10.

-
59. **Davenport, C, Liew, A, Doherty, B, Win, HH, Misran, H, Hanna, S, et al.** 2011 The prevalence of adrenal incidentaloma in routine clinical practice. *Endocrine* 40:80-3.
60. **Beuschlein, F, Reincke, M** 2006 Adrenocortical tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088:319-34.
61. **Zeiger, MA, Siegelman, SS, Hamrahian, AH** 2011 Medical and surgical evaluation and treatment of adrenal incidentalomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:2004-15.
62. **Rainey, WE** 1999 Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. *Molecular and cellular endocrinology* 151:151-60.
63. **Nishimoto, K, Nakagawa, K, Li, D, Kosaka, T, Oya, M, Mikami, S, et al.** 2010 Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:2296-305.
64. **Nanba, K, Tsuiki, M, Sawai, K, Mukai, K, Nishimoto, K, Usui, T, et al.** 2013 Histopathological diagnosis of primary aldosteronism using CYP11B2 immunohistochemistry. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98:1567-74.
65. **Boukroun, S, Samson-Couterie, B, Dzib, JF, Lefebvre, H, Louiset, E, Amar, L, et al.** 2010 Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism. *Hypertension* 56:885-92.
66. **Dekkers, T, ter Meer, M, Lenders, JW, Hermus, AR, Schultze Kool, L, Langenhuijsen, JF, et al.** 2014 Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: one node is the culprit? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99:E1341-51.
67. **Nakamura, Y, Maekawa, T, Felizola, SJ, Satoh, F, Qi, X, Velarde-Miranda, C, et al.** 2014 Adrenal CYP11B1/2 expression in primary aldosteronism: immunohistochemical analysis using novel monoclonal antibodies. *Molecular and cellular endocrinology* 392:73-9.
68. **Karashima, S, Takeda, Y, Cheng, Y, Yoneda, T, Demura, M, Kometani, M, et al.** 2011 Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to adrenal microadenoma. *Steroids* 76:1363-6.
69. **Fernandes-Rosa, FL, Giscos-Douriez, I, Amar, L, Gomez-Sanchez, CE, Meatchi, T, Boukroun, S, et al.** 2015 Different Somatic Mutations in Multinodular Adrenals With Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension* 66:1014-22.
70. **Nishimoto, K, Tomlins, SA, Kuick, R, Cani, AK, Giordano, TJ, Hovelson, DH, et al.** 2015 Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:E4591-9.
71. **Luy, M** 2009 Unnatural deaths among nuns and monks: is there a biological force behind male external cause mortality? *Journal of biosocial science* 41:831-44.
72. **Islam, MN, Islam, MN** 2003 Pattern of unnatural death in a city mortuary: a 10-year retrospective study. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 5 Suppl 1:S354-6.
73. **Olsson, MO, Bradvik, L, Ojehagen, A, Hakansson, A** 2016 Risk factors for unnatural death: Fatal accidental intoxication, undetermined intent and suicide: Register follow-up in a

criminal justice population with substance use problems. *Drug and alcohol dependence* 162:176-81.

74. **Mulisch, M.** Verfahren der Immunlokalisation -Ein Überblick. Wiesbaden: Springer Fachmedien; 2014.

75. **Lang, G.** Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Wien [u.a.]: Springer; 2013. XXI, 444 S. p.

76. **Bundes, SB-Gd.** Verteilung der Bevölkerung auf Body-Mass-Index-Gruppen in Prozent. [cited 2015 29.05.2015]. Available from: https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_108&OPINDEX=2&HANDLER=XS_ROTATE_ADVANCED&DATACUBE=_XWD_136&D.000=DOWN&D.002=PAGE&D.003=ACROSS&D.470=ACROSS.

77. **Vanhaebost, J, Faouzi, M, Mangin, P, Michaud, K** 2014 New reference tables and user-friendly Internet application for predicted heart weights. *International journal of legal medicine* 128:615-20.

78. **Romero, DG, Yanes, LL, de Rodriguez, AF, Plonczynski, MW, Welsh, BL, Reckelhoff, JF, et al.** 2007 Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* 148:2644-52.

79. **Ono, Y, Nakamura, Y, Maekawa, T, Felizola, SJ, Morimoto, R, Iwakura, Y, et al.** 2014 Different expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase between aldosterone-producing microadenomas and macroadenomas. *Hypertension* 64:438-44.

80. **Reinhard, C, Saeger, W, Schubert, B** 1996 Adrenocortical nodules in post-mortem series. Development, functional significance, and differentiation from adenomas. *General & diagnostic pathology* 141:203-8.

81. **Aiba, M, Fujibayashi, M** 2011 Alteration of subcapsular adrenocortical zonation in humans with aging: the progenitor zone predominates over the previously well-developed zona glomerulosa after 40 years of age. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 59:557-64.

82. **Martinerie, L, Viengchareun, S, Delezoide, AL, Jaubert, F, Sinico, M, Prevot, S, et al.** 2009 Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150:4414-24.

83. **Weidmann, P, De Myttenaere-Bursztein, S, Maxwell, MH, de Lima, J** 1975 Effect on aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney international* 8:325-33.

84. **Adler, C, Schaffrath Rosario, A, Diederichs, C, Neuhauser, HK** 2015 Change in the association of body mass index and systolic blood pressure in Germany - national cross-sectional surveys 1998 and 2008-2011. *BMC public health* 15:705.

85. **Neuhauser, H, Thamm, M, Ellert, U** 2013 [Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56:795-801.

86. **Kearney, PM, Whelton, M, Reynolds, K, Muntner, P, Whelton, PK, He, J** 2005 Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet (London, England)* 365:217-23.

-
87. **Balasubramanian, P, Longo, VD** 2013 Aging, nutrient signaling, hematopoietic senescence, and cancer. *Critical reviews in oncogenesis* 18:559-71.
88. **Flynn, C** 2014 Increased aldosterone: mechanism of hypertension in obesity. *Seminars in nephrology* 34:340-8.
89. **Mule, G, Nardi, E, Cusimano, P, Cottone, S, Seddio, G, Geraci, C, et al.** 2008 Plasma aldosterone and its relationships with left ventricular mass in essential hypertensive patients with the metabolic syndrome. *American journal of hypertension* 21:1055-61.
90. **Goodfriend, TL, Kelley, DE, Goodpaster, BH, Winters, SJ** 1999 Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obesity research* 7:355-62.
91. **Rossi, GP, Belfiore, A, Bernini, G, Fabris, B, Caridi, G, Ferri, C, et al.** 2008 Body mass index predicts plasma aldosterone concentrations in overweight-obese primary hypertensive patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:2566-71.
92. **Massiera, F, Bloch-Faure, M, Ceiler, D, Murakami, K, Fukamizu, A, Gasc, JM, et al.** 2001 Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:2727-9.
93. **Engeli, S, Schling, P, Gorzelniak, K, Boschmann, M, Janke, J, Ailhaud, G, et al.** 2003 The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology* 35:807-25.
94. **Briones, AM, Nguyen Dinh Cat, A, Callera, GE, Yogi, A, Burger, D, He, Y, et al.** 2012 Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension* 59:1069-78.
95. **Lamounier-Zepter, V, Ehrhart-Bornstein, M, Bornstein, SR** 2005 Mineralocorticoid-stimulating activity of adipose tissue. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 19:567-75.
96. **Ehrhart-Bornstein, M, Lamounier-Zepter, V, Schraven, A, Langenbach, J, Willenberg, HS, Barthel, A, et al.** 2003 Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14211-6.
97. **Huby, AC, Antonova, G, Groenendyk, J, Gomez-Sanchez, CE, Bollag, WB, Filosa, JA, et al.** 2015 Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation* 132:2134-45.
98. **Munzberg, H, Morrison, CD** 2015 Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism: clinical and experimental* 64:13-23.
99. **Chen, WW, Niepel, M, Sorger, PK** 2010 Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions. *Genes & development* 24:1861-75.
100. **Jaworowska, A, Blackham, T, Davies, IG, Stevenson, L** 2013 Nutritional challenges and health implications of takeaway and fast food. *Nutrition reviews* 71:310-8.

-
101. **Powles, J, Fahimi, S, Micha, R, Khatibzadeh, S, Shi, P, Ezzati, M, et al.** 2013 Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ open* 3:e003733.
102. **Urban, LE, Roberts, SB, Fierstein, JL, Gary, CE, Lichtenstein, AH** 2014 Sodium, saturated fat, and trans fat content per 1,000 kilocalories: temporal trends in fast-food restaurants, United States, 2000-2013. *Preventing chronic disease* 11:E228.
103. **Atlas, SA, Case, DB, Sealey, JE, Laragh, JH, McKinstry, DN** 1979 Interruption of the renin-angiotensin system in hypertensive patients by captopril induces sustained reduction in aldosterone secretion, potassium retention and natriuresis. *Hypertension* 1:274-80.
104. **Lu, ZH, Zhu, XX, Tang, ZQ, Yang, GQ, Du, J, Wang, XL, et al.** 2013 Female sex hormones are associated with the reduction of serum sodium and hypertension complications in patients with aldosterone-producing adenoma. *Endocrine journal* 60:1261-8.
105. **Schoenaker, DA, Jackson, CA, Rowlands, JV, Mishra, GD** 2014 Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. *International journal of epidemiology* 43:1542-62.
106. **Xue, B, Badaue-Passos, D, Jr., Guo, F, Gomez-Sanchez, CE, Hay, M, Johnson, AK** 2009 Sex differences and central protective effect of 17beta-estradiol in the development of aldosterone/NaCl-induced hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 296:H1577-85.
107. **Doumas, M, Papademetriou, V, Faselis, C, Kokkinos, P** 2013 Gender differences in hypertension: myths and reality. *Current hypertension reports* 15:321-30.
108. **Ladwig, KH, Waller, C** 2014 [Gender-specific aspects of coronary heart disease]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 57:1083-91.
109. **Fischer, M, Baessler, A, Schunkert, H** 2002 Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* 53:672-7.
110. **Katzenellenbogen, BS, Choi, I, Delage-Mourroux, R, Ediger, TR, Martini, PG, Montano, M, et al.** 2000 Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74:279-85.
111. **Mihailidou, AS, Ashton, AW** 2014 Cardiac effects of aldosterone: does gender matter? *Steroids* 91:32-7.
112. **Montanaro, D, Maggiolini, M, Recchia, AG, Sirianni, R, Aquila, S, Barzon, L, et al.** 2005 Antiestrogens upregulate estrogen receptor beta expression and inhibit adrenocortical H295R cell proliferation. *Journal of molecular endocrinology* 35:245-56.
113. **Bird, IM, Hanley, NA, Word, RA, Mathis, JM, McCarthy, JL, Mason, JI, et al.** 1993 Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 133:1555-61.
114. **Barzon, L, Masi, G, Pacenti, M, Trevisan, M, Fallo, F, Remo, A, et al.** 2008 Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 452:181-91.

-
115. **Szmulowicz, ED, Adler, GK, Williams, JS, Green, DE, Yao, TM, Hopkins, PN, et al.** 2006 Relationship between aldosterone and progesterone in the human menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:3981-7.
116. **Quinkler, M, Meyer, B, Bumke-Vogt, C, Grossmann, C, Gruber, U, Oelkers, W, et al.** 2002 Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 146:789-99.
117. **Wambach, G, Higgins, JR** 1978 Antimineralocorticoid action of progesterone in the rat: correlation of the effect on electrolyte excretion and interaction with renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 102:1686-93.
118. **Hanahan, D, Weinberg, RA** 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74.
119. **Beuschlein, F, Reincke, M, Karl, M, Travis, WD, Jaurisch-Hancke, C, Abdelhamid, S, et al.** 1994 Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer research* 54:4927-32.
120. **Oki, K, Plonczynski, MW, Luis Lam, M, Gomez-Sanchez, EP, Gomez-Sanchez, CE** 2012 Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology* 153:1774-82.
121. **Nanba, K, Chen, AX, Omata, K, Vinco, M, Giordano, TJ, Else, T, et al.** 2016 Molecular Heterogeneity in Aldosterone-Producing Adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101:999-1007.
122. **Boukroun, S, Samson-Couterie, B, Golib-Dzib, JF, Amar, L, Plouin, PF, Sibony, M, et al.** 2011 Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology* 152:4753-63.
123. **Boukroun, S, Beuschlein, F, Rossi, GP, Golib-Dzib, JF, Fischer, E, Amar, L, et al.** 2012 Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* 59:592-8.
124. **Hornsby, PJ** 2004 Aging of the human adrenal cortex. *Science of aging knowledge environment* : SAGE KE 2004:re6.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AT ₁ - Rezeptor	Angiotensin II - Rezeptor Typ 1
APCC	Aldosterone producing cell cluster
ARR	Aldosteron - Renin - Ratio
BMI	Body - Mass - Index
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CT	Computer Tomographie
CYP11B1	Zytochrom - P450 - 11B1: 11 β - Hydroxylase
CYP11B2	Zytochrom - P450 - 11B2: Aldosteron - Synthase
DAB	Diaminobenzidin
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA- S	Dehydroepiandrosteron - Sulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen - Diamin - Tetraessigsäure Disodium
ELISA	Enzyme - linked immunosorbent assay
ENaC	Epithelialer Natrium Kanal
Foci	Herdförmige Ansammlungen CYP11B2 exprimierender Zellen
g	Gramm
GRE	Glucocorticoid Responsive Elements
Hg	Hydrogenium
HE	Hämatoxylin - Eosin - Färbung
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HU	Housefield Units
LDL	Low density Lipoproteins
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnet - Resonanz - Tomographie
MW	Mittelwert
Na ⁺ - K ⁺ - ATPase	Natrium - Kalium - ATPase
NIH	National Institute of Health
NN	Nebenniere
Nod.	Nodulus/ i - knotige Struktur/en der Nebennierenrinde
Neg. Nod.	Nicht CYP11B2 exprimierende Noduli (negativ)
NO	Stickstoffmonoxid
PIER	Proteolytisch induziertes Epitope Retrieval
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pos. Nod.	CYP11B2 exprimierende Noduli (positiv)
PBS	phosphate buffered saline - Phosphatgepufferte Salzlösung
RAAS	Renin- Angiotensin - Aldosteron- System
RNA	Ribonukleinsäure
TBS	Tris buffered Saline - gepufferte Salzlösung
Th	Thorakal
TRIS	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
SD	Standartabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
StAR	Stereogenic acute regulatory protein
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
11 β HSD	11 β - Hydroxysteroid - Dehydrogenase Typ 2

8. Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit ergreifen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München anfertigen zu können.

Meine ganz besondere Dankbarkeit gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Felix Beuschlein, für die Überlassung des Themas und für seine außerordentliche Unterstützung. Seine Begeisterung für die endokrinologische Forschung und seine Unterstützung bei methodischen und inhaltlichen Fragen haben mir über schwierige Phasen meiner Doktorarbeit hinweggeholfen. Insbesondere danke ich für die Offenheit gegenüber meinen eigenen Ideen, deren kritischen Analyse, sowie für die zahlreichen Anregungen. Schlussendlich möchte ich mich für den Vorschlag, an einer COST - Short Term Scientific Mission teilzunehmen, und das damit verbundene Vertrauen mir gegenüber, bedanken.

Dr. Markus Penning, Prof. Randolph Penning und den Mitarbeitern der Rechtsmedizin danke ich für die Überlassung der Nebennierenproben. Ich hoffe auf eine zukünftige Zusammenarbeit in Bezug auf die Weiterführung des Projekts sowie bei der Veröffentlichung unserer gemeinsamen Ergebnisse. Prof. Dr. Hans - Helge Müller danke ich für die Ratschläge bezüglich der statistischen Analyse meiner Daten.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Forschungsgruppe von Prof. Beuschlein für das angenehme Klima und die Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen während meiner Zeit im Labor. Insbesondere gilt mein Dank Igor Shapiro und Tarik Bozoglu für die Einführung in die Technik der Immunhistochemie.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Maria Christina Zennaro aus dem Paris Cardiovascular Research Center bedanken, welche mir einen Forschungsaufenthalt in Paris ermöglicht hat und mich bei den Versuchen, auf denen die hier vorliegende Arbeit aufbaut, mit Rat und Tat unterstützt hat.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich immer emotional, finanziell und mit gutem Rat unterstützt haben. Ohne sie hätte ich dies alles nie erreicht. Schlussendlich möchte ich Pierre für seine großartige Unterstützung und sein unendliches Verständnis danken.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Expression der Aldosteron - Synthase in der humanen Nebenniere“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.04.2018

(Ort, Datum)

Katharina Knoll

(Unterschrift)