

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

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung

Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

**Genetische und immunhistologische Marker als  
prognostische Faktoren in  
Aldosteron produzierenden Adenomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Christian Alexander Gebhard**

aus

München

**2018**



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Felix Beuschlein
Mitberichterstatter	PD Dr. Susanna Müller
	PD Dr. Caroline Jung-Sievers
	Prof Dr. Michael Vogeser
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	Dr. Yara Rhayem
Dekan	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung	06.12.2018



*„Primary aldosteronism [...] in its pure state manifests itself in the form of an interesting complex of symptoms and a fascinating abnormality of electrolyte metabolism.“*

– J. W. Conn

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1955 (45)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>xii</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Anatomische und Physiologische Grundlagen</b>	<b>2</b>
1.1 Anatomie und Physiologie der Nebennierenrinde . . . . .	2
1.2 Hormone der Nebennierenrinde . . . . .	3
1.2.1 Funktion der Hormone . . . . .	4
1.2.2 Die Steroidhormonsynthese und deren Regulation . . . . .	5
1.3 Spannungsabhängige Kalziumkanäle $Ca_v1.3$ und $Ca_v3.2$ . . . . .	8
<b>2 Primärer Hyperaldosteronismus</b>	<b>9</b>
2.1 Pathogenese der Aldosteron produzierenden Adenome . . . . .	9
2.2 Klinische und Therapeutische Aspekte des Conn-Syndroms . . . . .	12
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>II Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>4 Einschlusskriterien, Verwendetes Gewebe und Patienten-Daten</b>	<b>16</b>
4.1 Eingeschlossene Patienten . . . . .	16
4.2 Klinische und Biochemische Daten . . . . .	17
4.3 Untersuchtes Nebennierengewebe . . . . .	18
<b>5 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software</b>	<b>20</b>
<b>6 Reagenzien, Kits und Antikörper</b>	<b>22</b>
<b>7 Puffer</b>	<b>25</b>
<b>8 Genotypisierung</b>	<b>26</b>
8.1 DNA Extraktion . . . . .	26
8.2 Vervielfältigung und Aufreinigung . . . . .	27
8.3 Sequenzierung . . . . .	27

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>9</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>30</b>
9.1	Paraffin-Einbettung und Anfertigen der Gewebeschnitte . . . . .	30
9.2	Hämatoxylin–Eosin Färbung . . . . .	31
9.3	Immunhistochemische Färbungen . . . . .	31
9.4	Mikroskopie und Analyse der Proteinexpression . . . . .	34
9.4.1	Fotografie der immunhistochemischen Färbungen . . . . .	35
9.4.2	Semi-Quantitative Analyse der Proteinexpression . . . . .	35
<b>10</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>38</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>11</b>	<b>Charakterisierung der Patienten</b>	<b>41</b>
11.1	Geschlechterverteilung . . . . .	41
11.2	Altersverteilungen . . . . .	41
11.3	Präoperative klinische und laborchemische Parameter . . . . .	45
11.4	Vergleich der Sub-Kohorten . . . . .	46
<b>12</b>	<b>Charakterisierung der Tumoren</b>	<b>47</b>
12.1	Genotyp . . . . .	47
12.2	Histopathologische Charakterisierung . . . . .	47
12.3	Immunhistochemische Charakterisierung der Tumoren . . . . .	51
12.3.1	Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Färbungen	51
12.3.2	Vergleich der Immunhistochemie zwischen Geschlechtern, Genotypen und prädominanter Histomorphologie . . . . .	53
<b>13</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung der Tumoren</b>	<b>58</b>
13.1	Auswirkung der Genetik auf Klinik und Laborwerte . . . . .	58
13.2	Auswirkung der Histopathologie auf Klinik und Laborwerte . . . . .	58
13.3	Auswirkung der Enzym- und Ca <sup>2+</sup> -Kanalexpression auf Klinik und Laborwerte . . . . .	60
<b>14</b>	<b>Therapieerfolg nach Adrenalektomie</b>	<b>63</b>
14.1	Klinische und biochemische Parameter nach Adrenalektomie . . . . .	63
14.2	Definition des Therapieerfolges . . . . .	63
14.3	Verteilung des Therapieerfolges . . . . .	65
14.4	Faktorenanalyse des Therapieerfolges . . . . .	71
14.4.1	Faktoren für den kompletten klinischen Therapieerfolg . . . . .	71
14.4.2	Faktoren für den fehlenden klinischen Therapieerfolg . . . . .	77
14.5	Biochemischer Therapieerfolg . . . . .	77



<b>IV Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>15 Beurteilung der Methoden</b>	<b>79</b>
15.1 Limitationen und Störfaktoren . . . . .	79
15.2 Computergestützte Auswertung der Immunhistochemie . . . . .	81
15.3 Genotypisierung . . . . .	82
15.4 Statistische Auswertung . . . . .	82
<b>16 Beurteilung der Ergebnisse</b>	<b>84</b>
16.1 Epidemiologische Betrachtungen . . . . .	84
16.1.1 Patientenkollektiv . . . . .	84
16.1.2 Mutationsverteilung . . . . .	86
16.2 Histopathologische Betrachtungen . . . . .	88
16.2.1 Tumorwachstum . . . . .	88
16.2.2 Immunhistologie . . . . .	90
16.3 Klinische Betrachtungen . . . . .	93
16.3.1 Funktionelle Charakterisierung . . . . .	93
16.3.2 Therapieerfolg . . . . .	96
<b>17 Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	<b>100</b>
17.1 Schlussfolgerungen . . . . .	100
17.2 Ausblick . . . . .	102
<b>V Anhang</b>	<b>104</b>
<b>A Literatur</b>	<b>105</b>
<b>B Akronyme</b>	<b>123</b>
<b>C Glossar</b>	<b>125</b>
<b>D Danksagung</b>	<b>126</b>
<b>E Veröffentlichungen</b>	<b>127</b>
<b>F Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>129</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über die Anatomie der Nebennierenrinde . . . . .	3
2	Strukturformeln von Cholesterin, Pregnenolon, Aldosteron und Cortisol	4
3	Übersicht über den Steroidhormon-Stoffwechsel . . . . .	5
4	Physiologische Regulation der Aldosteronproduktion in ZG-Zellen . . . . .	7
5	APA Pathogenese . . . . .	10
6	Übersicht über untersuchte Patienten und Gewebe . . . . .	17
7	Automatisierte Analyse der IHC-Färbungen . . . . .	36
8	Verteilung der Geschlechter gesamt und nach Genotyp. . . . .	42
9	Altersverteilung bei ED des Bluthochdrucks . . . . .	43
10	Altersverteilung bei Adrenalektomie . . . . .	44
11	Häufigkeiten der Genotypen in 121 APAs . . . . .	48
12	Verteilung des Tumordurchmessers . . . . .	48
13	Histomorphologie der untersuchten APAs . . . . .	50
14	Exemplarische immunhistochemische Färbungen und Übersicht . . . . .	52
15	Immunhistochemische Expression im Vergleich zwischen den Genotypen	55
16	Immunhistochemische Expression im Vergleich zwischen den Zelltypen	56
17	Korrelation der Aldosteronsynthese-Expression mit dem Tumordurchmesser . . . . .	57
18	Korrelation der PAC mit dem Tumordurchmesser . . . . .	61
19	Korrelation des systolischen Blutdrucks mit dem Tumordurchmesser . . . . .	61
20	Systolischer Blutdruck nach prädominantem Tumor-Zelltyp . . . . .	61
21	Vergleich der notwendigen antihypertensiven Medikation nach prädominantem Zelltyp . . . . .	61
22	Vergleich des Patienten-BMI nach prädominantem Zelltyp . . . . .	61
23	Verteilung des Therapieerfolges . . . . .	66
24	Erkrankungsdauer des Bluthochdrucks nach klinischem und biochemischem Therapieerfolg . . . . .	67
25	Alter bei Adrenalektomie nach klinischem und biochemischem Therapieerfolg . . . . .	68
26	Tumordurchmesser nach biochemischem und klinischem Therapieerfolg	69

# Tabellenverzeichnis

1	Referenzwerte der biochemischen und klinischen Parameter . . . . .	18
2	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	20
3	Chemikalien, Reagenzien und Kits . . . . .	22
4	Verwendete Antikörper . . . . .	24
5	Primer für DNA Amplifikation . . . . .	28
6	PCR Programm . . . . .	29
7	Klassifikation der Intensität der Immunexpression . . . . .	36
8	Altersverteilung der Patienten gesamt und nach Geschlecht . . . . .	42
9	Altersverteilung der Patienten nach Genotyp . . . . .	43
10	Präoperative klinische und biochemische Parameter in der Studien-Ko- horte . . . . .	45
11	Vergleich der Sub-Kohorten . . . . .	46
12	Verteilung des prädominanten Zelltyps zwischen den Geschlechtern. . .	51
13	Verteilung des prädominanten Zelltyps zwischen den Genotypen. . . . .	51
14	Zusammenfassung der Expressionsintensität der immunhistochemischen Färbungen . . . . .	53
15	Korrelationen der immunhistochemischen Färbungen . . . . .	54
16	Präoperative klinische und biochemische Werte nach Genotyp . . . . .	59
17	Korrelation des Tumordurchmessers mit klinischen und biochemischen Parametern . . . . .	60
18	Klinische und biochemische Parameter nach dem prädominanten Tumor- zelltyp . . . . .	60
19	Korrelation klinischer und biochemischer Werte mit IHC-Färbungen . .	62
20	Vergleich klinischer und biochemischer Parameter vor und nach Adren- alektomie . . . . .	64
21	Verteilung des Therapieerfolges nach Geschlecht . . . . .	66
22	Verteilung des Therapieerfolges nach Genotyp . . . . .	68
23	Verteilung des Therapieerfolges nach Zelltyp . . . . .	70
24	Immunhistochemische Färbungen aufgeteilt nach Therapieerfolg . . . . .	70
25	Univariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieerfolg	72
26	Multivariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieer- folg mit präoperativen Daten . . . . .	74
27	Multivariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieer- folg mit prä- und postoperativen Daten . . . . .	76
28	Uni- und multivariate Faktorenanalyse für den ausbleibenden klinischen Therapieerfolg . . . . .	76

# Zusammenfassung

**Hintergrund** Primärer Hyperaldosteronismus ist die häufigste Ursache eines hormonell bedingten Bluthochdrucks. Klinisch kann er in unterschiedlichem Alter und mit unterschiedlichen histopathologischen, klinischen und biochemischen Eigenschaften in Erscheinung treten. Bei vielen Patienten wird die Erkrankung durch ein einzelnes Aldosteron produzierendes Adenom (APA) verursacht.

In den letzten Jahren wurden einige somatische Mutationen identifiziert, die in der Entstehung dieser Adenome involviert sind. Deren detaillierte Pathomechanismen sind jedoch noch nicht komplett entschlüsselt. Zudem zeigen nicht alle Patienten nach einer Adrenaektomie eine komplette Remission des Bluthochdrucks und eine Normalisierung der Hormon- und Elektrolytspiegel im Blut.

**Fragestellung** Ziel der Studie war eine umfassende genetische, histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung von APAs, um die zu Grunde liegende Pathophysiologie besser zu verstehen. Zudem wurden die erhobenen Parameter untersucht, um mögliche Assoziationen zwischen Pathologie, klinischen Befunden und Therapieerfolg zu identifizieren.

**Methoden** In diese Studie wurden 121 Patienten eingeschlossen. DNA aus APA-Gewebe wurde für alle eingeschlossenen Patienten mittels direkter Sanger-Sequenzierung oder *whole exome sequencing* sequenziert. Histomorphologische Eigenschaften der Adenome, wie Zellzusammensetzung und Knotendurchmesser, wurden jeweils auf Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten untersucht oder aus den Berichten der Routine-Pathologie entnommen.

Die Enzyme der Steroidhormonsynthese CYP11B1, CYP11B2, CYP17, HSD3B1, HSD3B2 und die spannungsabhängigen Kalziumkanäle  $Ca_v1.3$  und  $Ca_v3.2$  wurden in aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten immunhistochemisch angefärbt. Hierfür war in Paraffin eingebettetes APA-Gewebe von 64 Patienten verfügbar. Die Intensität der jeweiligen Expression wurde semi-quantitativ mittels H-Score nach McCarty erhoben.

Prospektiv erhobene Daten aus präoperativen und Nachsorgeuntersuchungen wurden dem Deutschen Conn-Register entnommen. Komplette Datensätze waren für 82 Patienten verfügbar. Faktoren für den postoperativen Therapieerfolg wurden mittels multivariater logistischer Regression untersucht.

## Zusammenfassung

**Ergebnisse** 71 der eingeschlossenen Patienten waren männlich, 50 weiblich. Somatische Mutationen in *KCNJ5* waren am häufigsten, gefolgt von *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CTNNB1* und *PRKACA*. In etwa einem Drittel der Adenome wurde keine dieser Mutationen identifiziert.

In der Auswertung konnten wir zwei Patienten-Cluster identifizieren, welche die Extreme des Patientenkollektivs darstellten. Auf der einen Seite war das weibliche Geschlecht mit einem jüngeren Alter bei Erkrankungsbeginn, milderem Bluthochdruck, Mutationen in *KCNJ5* und einem besseren Therapieerfolg assoziiert. Auf der anderen Seite fanden sich Männer, die meist eine längere Krankheitsgeschichte mit therapieresistentem Bluthochdruck aufwiesen, Mutationen in *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1D* trugen und eine insgesamt schlechtere Prognose hatten.

Zudem konnten wir spezifische immunhistochemische Expressionscharakteristika identifizieren, die mit dem Geschlecht, der Tumorgroße und präoperativen Blutwerten von Aldosteron und Renin assoziiert waren.

**Schlussfolgerung** Wir konnten Assoziationen zwischen Geschlecht, Genotyp, Zellzusammensetzung, Tumordurchmesser und Immunexpressionsmustern identifizieren. Zudem fanden wir Determinanten für die postoperative Remission von Bluthochdruck und eine Normalisierung der Hormonlevel und der Kalium-Konzentration im Blut. Die meisten unserer Ergebnisse stimmen entweder mit denen der Literatur überein oder sind, falls nicht zuvor beschrieben, mit dem aktuellen Krankheitsverständnis des primären Hyperaldosteronismus vereinbar.

Diese Studie vereint in dieser Breite erstmals histopathologische und klinische Parameter mit postoperativen Nachsorgedaten und ermöglicht hierdurch tiefere Einblicke in die Pathophysiologie der APAs und in die Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

# **Teil I**

## **Einleitung**

# 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen

Die Nebenniere ist ein im Abdomen liegendes, paariges Drüsenorgan. Je ein Exemplar ist an den Oberpolen der Nieren lokalisiert. Sie besteht aus zwei anatomischen Anteilen, der Nebennierenrinde und dem -mark. Diese sind entwicklungsgeschichtlich unabhängig voneinander entstanden und erfüllen unterschiedliche, essentielle Aufgaben in der Homöostase des Organismus. Während die Rinde embryologisch aus Zölomepithel entsteht und Steroidhormone sezerniert, entwickelt sich das Mark aus der Neuralleiste und produziert Katecholamine (Welsch 2010).

In diesem Kapitel soll ein Überblick über die Anatomie, Physiologie und Hormonsynthese der Nebennierenrinde gegeben werden.

## 1.1 Anatomie und Physiologie der Nebennierenrinde

Die Nebennierenrinde kann in drei Zonen unterteilt werden, welche sich in der Morphologie und der Anordnung der Zellen, sowie deren Funktion unterscheiden. Einen Überblick über die Zonen gibt Abbildung 1.

Unmittelbar unter der Nebennierenkapsel liegt eine schmale Zone aus kleinen, kompakten Zellen, die in Nestern oder Knäueln angeordnet sind. Diese Zone trägt entsprechend den Namen *Zona glomerulosa* (ZG) und produziert Mineralokortikoide. Das Zytoplasma dieser Zellen enthält wenige Lipidtröpfchen, dagegen ist die Mitochondriendichte hoch (Lüllmann-Rauch 2009; Welsch 2010).

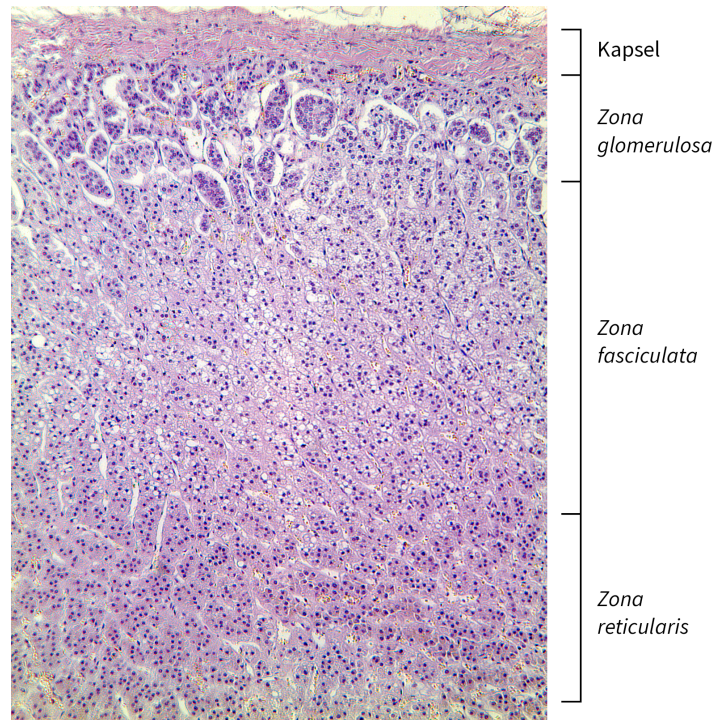
Die darunter gelegene *Zona fasciculata* (ZF) besteht aus größeren Zellen, die reicher an Lipidtröpfchen sind. Die Zellen sind in Bündeln angeordnet, die radiär in Richtung des Markes ziehen. In dieser Zell-Schicht werden insbesondere Glukokortikoide produziert. Diese Zellen besitzen viel glattes Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien, die im Gegensatz zu ZG-Zellen überwiegend vom tubulären Typ sind (Lüllmann-Rauch 2009; Welsch 2010).

Zuinnerst, dem Mark direkt aufliegend, befindet sich die *Zona reticularis* (ZR). Die in vernetzten Strängen angeordneten Zellen sezernieren neben Glukokortikoiden insbesondere Androgene, die in anderen Organen weiter verstoffwechselt werden (Lüllmann-Rauch 2009; Welsch 2010).

Die Nebennieren verfügen über eine ausgeprägte Blutversorgung. Jeweils drei Arterien versorgen eine Nebenniere. Nach Aufzweigung in einen subkapsulären Plexus ziehen die

## 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen

**Abbildung 1: Übersicht über die Anatomie der Nebennierenrinde.** HE-Färbung, 100x Vergrößerung. Eigene Abbildung.



Kapillaren radiär von peripher nach zentral. Sie durchfließen somit zuerst die *ZG*, dann *ZF* und *ZR*. Anschließend fließt das Blut im Nebennierenmark in die abführenden *Vv. suprarenales* (Lüllmann-Rauch 2009; Welsch 2010).

Ebenfalls zentripetal verläuft die zelluläre Regeneration der Nebennierenrinde. In der subkapsulären Schicht befinden sich Stammzellen, welche diese Homöostase der Nebennierenrinde sicherstellen. Einige Autoren fanden Hinweise, dass diese Stammzellen nicht selbst in die jeweiligen Zonen migrieren und sich dort ausdifferenzieren. Stattdessen finde eine zentripetale Wanderung und schrittweise Umdifferenzierung der Zellen von *ZG*-Zellen über *ZF*-, zu *ZR*-Zellen statt (Xing et al. 2015).

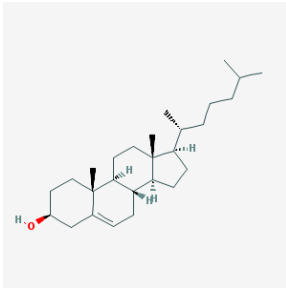
### 1.2 Hormone der Nebennierenrinde

Zu den wichtigsten Vertretern der in der Nebennierenrinde synthetisierten Steroidhormone zählen das Mineralokortikoid Aldosteron, das Glukokortikoid Cortisol, sowie die Androgene Dihydroepiandrosteron (DHEA), Dihydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) und Androstendion. Im Folgenden sollen die Funktion, die Synthese und die Regulation dieser Hormone dargestellt werden. Auf Grund der thematischen Ausrichtung dieser Arbeit werden die Androgene hierbei nicht näher betrachtet.

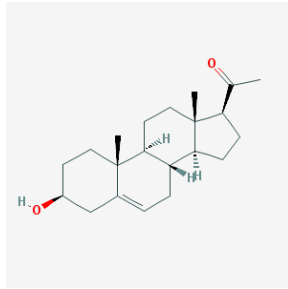


## 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen

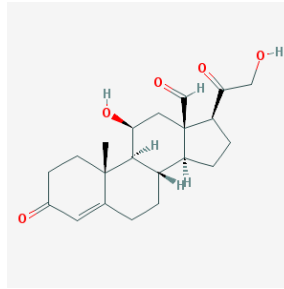
(a) Cholesterin



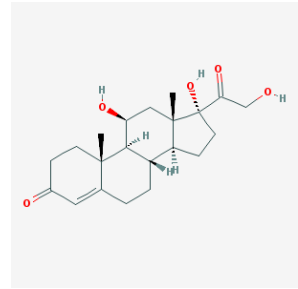
(b) Pregnenolon



(c) Aldosteron



(d) Cortisol



**Abbildung 2: Strukturformeln von Cholesterin, Pregnenolon, Aldosteron und Cortisol.** (a,b) Der erste Schritt der Steroidhormonsynthese besteht aus der Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon. Anschließend verzweigt sich der Stoffwechselweg, je nach Nebennierenrindezone und den darin exprimierten Enzymen. (c,d) Entsprechend der Lokalisation der Schlüsselenzyme CYP11B1 (ZF) und CYP11B2 (ZG) werden dort jeweils Cortisol und Aldosteron produziert.

Die Strukturformeln wurden der „PubChem Compound Database“ (Kim et al. 2016) entnommen (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die jeweiligen CID-Nummern sind: Cholesterin CID=5997, Pregnenolon: CID=8955, Cortisol: CID=5754, Aldosteron: CID=5839. (Alle Strukturformeln wurden am 26.08.2017 abgerufen.)

### 1.2.1 Funktion der Hormone

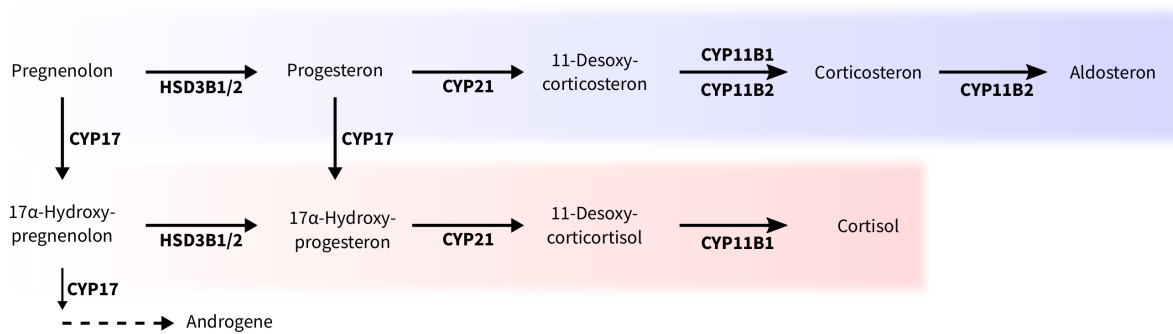
Die Hormone Aldosteron und Cortisol erfüllen zahlreiche Aufgaben, welche für die Homöostase des menschlichen Organismus von zentraler Bedeutung sind.

**Aldosteron** Die wichtigste Wirkung des Aldosterons liegt in der Regulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption in der Niere. Durch Bindung an den Mineralokortikoid-Rezeptor werden im distalen Nephron vermehrt  $\text{Na}^+$ -Kanäle synthetisiert und in die luminal Membran eingebaut. An der basalen Membran der tubulären Zellen werden zudem vermehrt  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen eingebaut. In der Folge werden mehr Natrium-Ionen aus dem Harn resorbiert und Kalium-Ionen in diesen sezerniert. Diese Wirkung ist auch für weitere Epithelzellen im Darm, sowie in Schweiß-, Milch- und Speicheldrüsen beschrieben und dient auch dort der Natrium-Rückresorption (Schmidt et al. 2011).

Auch nicht-epitheliale Gewebe können von Aldosteron beeinflusst werden. So fördert Aldosteron die Bindegewebsbildung im Herzen und kann zu einem kardiovaskulären Remodelling beitragen. Im Gehirn soll Aldosteron zudem den Salzappetit fördern, um so eine erhöhte Natrium-Zufuhr zu erreichen (Schmidt et al. 2011).

**Cortisol** Das Glukokortikoid Cortisol bewirkt im Allgemeinen eine Erhöhung des Blutglukosespiegels und stellt somit dem gesamten Organismus Energie bereit. Dies wird unter anderem über eine gesteigerte Lipolyse, eine gesteigerte Glukose-Resorption im

## 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen



**Abbildung 3: Übersicht über den Steroidhormon-Stoffwechsel.** Vereinfachte Darstellung des Stoffwechselweges der Steroidhormonsynthese. Aus dem gemeinsamen Substrat Pregnenolon entstehen in ZG (blau) und ZF (rot) die jeweiligen Steroidhormone Aldosteron bzw. Cortisol. Die Enzyme, die den jeweiligen Schritt katalysieren sind neben den Pfeilen angegeben. Die enzymatischen Reaktionen von CYP17, HSD3B1/HSD3B2 und CYP21 verlaufen am Endoplasmatischen Retikulum. CYP11B1 und CYP11B2 sind in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Schema erstellt nach Miller et al. (2011), Rassow et al. (2012).

Verdauungstrakt und eine Reduktion des muskulären Zuckerverbrauchs gewährleistet (Schmidt et al. 2011).

Neben dem Energiestoffwechsel spielt Cortisol zudem eine Rolle in der Reaktion auf Stress und im Knochenhaushalt. Ein weiteres wichtiges Feld ist die immunmodulatorische Wirkung des Cortisols und die Wirkung auf die Blutgerinnung und Wundheilung (Schmidt et al. 2011).

### 1.2.2 Die Steroidhormonsynthese und deren Regulation

Am Anfang der Steroidhormonsynthese steht die gemeinsame Grundsubstanz Cholesterin (Abbildung 2a). Über ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Enzyme führt der Stoffwechselweg zu den diversen Endprodukten. Diese werden im Wesentlichen durch systemische Regelkreise moduliert.

In einem ersten, noch gemeinsamen Schritt aller Steroidhormone wird Cholesterin mittels des Transporters *Steroid acute regulatory Protein* (StAR) an die innere mitochondriale Membran befördert. Dort erfolgt unter anderem die Abtrennung der Seitenkette des Cholesterins durch die Cholesterin-Desmolase, wodurch Pregnenolon (Abbildung 2b) entsteht. Dieses wird je nach NNR-Zone durch die jeweils exprimierten Enzyme weiter verarbeitet (Rassow et al. 2012). Einen Überblick über die verschiedenen Stoffwechselwege gibt Abbildung 3.

Die unterschiedliche Expression der Enzyme in den jeweiligen NNR-Zonen ist ausschlaggebend für die Synthese der jeweiligen Endprodukte. CYP11B1 und CYP17 werden insbesondere in der ZF exprimiert, weshalb in dieser Zone überwiegend Cortisol pro-

## 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen

duziert wird (Gomez-Sanchez et al. 2014; Nakamura et al. 2014). Demgegenüber wird CYP11B2 in der ZG exprimiert, wodurch hier überwiegend Aldosteron produziert wird (Gomez-Sanchez et al. 2014; Nakamura et al. 2014; Nishimoto et al. 2017).

Das Cytochrom CYP17 und die 3 $\beta$ -HSD sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, während die Schlüsselenzyme CYP11B1 und CYP11B2 in der mitochondrialen Membran exprimiert werden (Miller et al. 2011).

**Zona glomerulosa** In der ZG wird Pregnenolon durch die 3 $\beta$ -HSD zu Progesteron und anschließend durch die 21 $\beta$ -Hydroxylase zu 11-Desoxycorticosteron verstoffwechselt. Die folgenden drei Reaktionsschritte über Corticosteron und 18-Hydroxyprogesteron zum Aldosteron werden alle durch das CYP11B2 bewerkstelligt (Miller et al. 2011; Rassow et al. 2012; Schmidt et al. 2011).

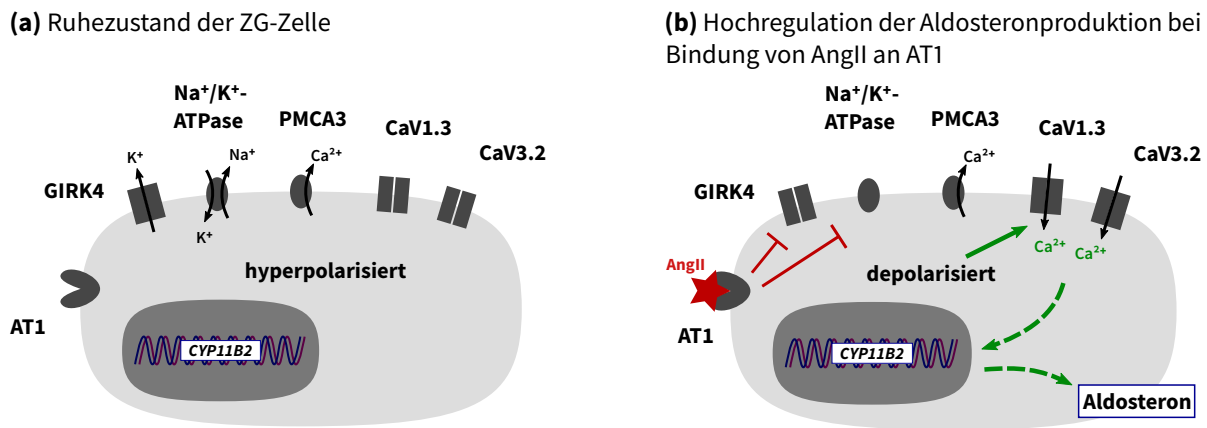
Die zwei Hauptmechanismen zur Regulation der Aldosteronproduktion sind das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die extrazelluläre Kaliumkonzentration (Rassow et al. 2012). Außerdem wurde eine weniger ausgeprägte Aldosteronstimulation durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) beschrieben (Bandulik 2017; Gallo-Payet et al. 2017; Kaplan et al. 1962; MacKenzie et al. 2017; Ruggiero et al. 2016; Spät et al. 2004).

Das RAAS stimuliert eine Aldosteronausschüttung bei einem Blutdruckabfall oder Natriummangel, um den Elektrolythaushalt und das Extrazellulärvolumen wieder zu normalisieren (Schmidt et al. 2011).

Fällt der Blutdruck, oder sinkt durch einen Natriummangel das Extrazellulärvolumen, so schütten Epitheloidzellen im juxtaglomerulären Apparat der Niere Renin aus. Diese Protease setzt das im Blutplasma befindliche Angiotensinogen zu Angiotensin I (AngI) um. Dieses wird wiederum durch das Angiotensin I Konversionsenzym, engl. „angiotensin converting enzyme“ (ACE) zu Angiotensin II (AngII) umgewandelt (Schmidt et al. 2011).

Zellen der ZG weisen physiologisch ein hyperpolarisiertes Membranpotenzial auf. Dieses wird insbesondere durch Kaliumkanäle der Task-Familie und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufrecht erhalten (vgl. Schema in Abbildung 4). Bindet AngII an den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1), so blockiert dieser die Kaliumkanäle und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Schmidt et al. 2011). Alternativ kann eine Depolarisation direkt über eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration ausgelöst werden, da hierdurch der Ausstrom über die Kaliumkanäle verlangsamt wird. Durch die Depolarisierung öffnen sich spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Bandulik 2017; Schmidt et al. 2011). Der aktivierte AT1 induziert zudem direkt eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem Endoplasmatisches Retikulum (ER). Die erhöhte

## 1 Anatomische und Physiologische Grundlagen



**Abbildung 4: Physiologische Regulation der Aldosteronproduktion in ZG-Zellen.** Hier sind schematische Zellen (hellgraue, ovale Fläche) und Zellkerne (dunkelgraue, ovale Fläche) abgebildet. (a) Zellen der ZG sind im Ruhezustand hyperpolarisiert. Dieses Potential wird insbesondere durch den Kaliumkanal GIRK4 und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhalten. (b) Durch Bindung von AngII wird eine Hyperpolarisation der ZG-Zelle ausgelöst. Hierdurch werden die spannungsabhängigen Kalziumkanäle aktiviert und Kalzium kann in die Zelle einströmen. Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Signalkaskade wird die Transkription des CYP11B2-Gens gesteigert und somit die Aldosteronproduktion hoch reguliert.

intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist schließlich durch Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Signalkaskade der Stimulus für eine erhöhte Transkription von CYP11B2 (Bandulik 2017; Schmidt et al. 2011).

Aldosteron wird als Steroidhormon nicht in Vesikeln gespeichert, sondern kann nach der Synthese frei durch Zellmembranen diffundieren. Die ausgeschüttete Aldosteronmenge hängt somit direkt von der Enzymaktivität der Aldosteronsynthase ab (Bandulik 2017; Schmidt et al. 2011).

**Zona fasciculata** In der ZF zweigt der Stoffwechselweg durch die Präsenz der CYP17 vom oben beschriebenen Weg ab. Die CYP17 hydroxyliert sowohl Pregnenolon, als auch Progesteron zu 17-Hydroxypregnenolon bzw. 17-Hydroxyprogesteron (Rassow et al. 2012). Im Anschluss hydroxyliert die  $21\beta$ -Hydroxylase letzteres zu 11-Desoxycortisol. In einem letzten Schritt führt die Hydroxylierung durch das CYP11B1 zu Cortisol (Rassow et al. 2012).

Die Regulation der Cortisolproduktion erfolgt durch den hypothalamisch-hypophysären Regelkreis. Das aus dem Hypothalamus sezernierte Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) bewirkt die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse. ACTH induziert unter anderem die relevanten Zytochrome der Steroidhormonsynthese, wodurch die Synthese von Cortisol in kurzer Zeit hoch reguliert werden kann (Miller et al. 2011; Rassow et al. 2012; Schmidt et al. 2011).

### 1.3 Spannungsabhängige Kalziumkanäle $Ca_v1.3$ und $Ca_v3.2$

Kalziumkanäle, welche durch Veränderungen im Membranpotenzial aktiviert werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in einer Vielzahl von Geweben. Beim Menschen sind zehn unterschiedliche spannungsabhängige Kalziumkanäle beschrieben worden, welche jeweils unterschiedliche Untereinheiten und elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen. Im Folgenden sollen die Kanäle  $Ca_v1.3$  und  $Ca_v3.2$  herausgegriffen werden, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

**$Ca_v1.3$**  Dieser Kanal zählt zur elektrophysiologischen Gruppe der L-Typ-Kanäle. Dies bedeutet, dass diese Kanäle im aktiven Zustand einen hohen Ionenfluss aufweisen und nur langsam inaktiviert werden (Catterall 2011). Zur Aktivierung werden jedoch relativ hohe Spannungsunterschiede benötigt.  $Ca_v1.3$  steuert unter anderem die Sekretion von Katecholaminen, die kardiale Rhythmusgenerierung und die Signaltransduktion in Haarzellen des Gehörorgans (Catterall 2011).

In der Nebennierenrinde ist  $Ca_v1.3$  insbesondere in der ZG exprimiert (Daniil et al. 2016; Scholl et al. 2013a). Neben der kürzlich beschriebenen Rolle in der Pathogenese von Aldosteron produzierenden Adenomen (vgl. Abschnitt 2.1) sind Mutationen des  $Ca_v1.3$  in diverse neurologische Erkrankungen involviert, wie etwa Autismus und angeborener Taubheit (Baig et al. 2011; Pinggera et al. 2015).

**$Ca_v3.2$**  Dieser Kanal zählt zu den T-Typ-Kanälen. Diese werden bereits bei negativeren Potentialen aktiviert, weisen jedoch eine kurze Aktivität und geringe Stromflüsse auf. Durch diese Eigenschaften eignen sie sich für die repetitive oder rhythmische Auslösung von Aktionspotenzialen (Catterall 2011).

In der Nebenniere bewirkt  $Ca_v3.2$  Membran-Potential-Oszillationen in ZG-Zellen (Hu et al. 2012). Keimbahnmutationen in diesem Kanal können zu Absence-Epilepsien (Catterall 2011) oder zur Entstehung von primärem Hyperaldosteronismus führen (vgl. Abschnitt 2.1).

## 2 Primärer Hyperaldosteronismus

Primärer Hyperaldosteronismus, engl. „primary aldosteronism“ (PA) ist eine Erkrankung, die durch Bluthochdruck und eine übermäßige, vom RAAS entkoppelte, Aldostero-nausschüttung aus den Nebennieren charakterisiert ist. Auch wenn die exakten Prävalenzen nicht einfach zu erheben sind, so stellt die Erkrankung eine der häufigsten Formen der sekundären Hypertonie dar.

Seit der Erstbeschreibung durch J. W. Conn im Jahre 1955 bis etwa zur Jahrtausendwende galt der PA als eine seltene Ursache arterieller Hypertonie (Conn 1955; Kaplan 1967). In den vergangenen 25 Jahren wurden diagnostische Methoden und Kriterien verbessert und deutlich höhere Prävalenzen festgestellt. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse internationaler Studien aus den Jahren 1993 – 2014 fand eine hohe Variabilität der Prävalenz, sowohl in der primären Krankenversorgung (3,2 – 12,7% aller hypertensiven Patienten), als auch in spezialisierten Zentren (1,0 – 29,8%) (Käyser et al. 2016). Neueste Zahlen einer prospektiven Studie fand unter 1672 hypertensiven Patienten in der hausärztlichen Versorgung 99 (5,9%) mit primärem Hyperaldosteronismus (Monticone et al. 2017). Insgesamt lässt sich somit feststellen, dass der PA eine der häufigsten Ursachen sekundärer Hypertonie darstellt.

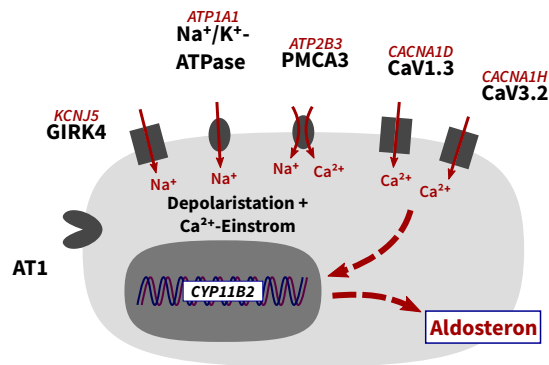
Die exzessive Aldosteronproduktion in PA entsteht in circa 90% der Fälle entweder durch ein unilaterales Aldosteron produzierendes Adenom (APA) oder eine bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde (Buffolo et al. 2017; Monticone et al. 2017). Weitaus seltener sind die unilaterale Hyperplasie, so wie familiäre Formen des PA. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich sporadische APAs untersucht. Aus diesem Grund wird im Folgenden der Fokus auf diese gelegt.

### 2.1 Pathogenese der Aldosteron produzierenden Adenome

In den vergangenen Jahren sind durch die Verfügbarkeit von *Next Generation Sequencing* einige Gene identifiziert worden, welche oft in sporadischen APAs mutiert sind. Diese Mutationen führen nach gängiger Meinung entweder direkt über vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom oder indirekt durch eine übermäßige Depolarisation der Zellmembran zu einer autonomen Aldosteronproduktion in den betroffenen Zellen. Zu diesen Genen zählen *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1H*.

## 2 Primärer Hyperaldosteronismus

**Abbildung 5: APA Pathogenese.** Zu den einzelnen Kanälen und Pumpen sind die jeweils kodierenden Gene in Rot aufgeführt. Alle in dieser Zeichnung aufgeführten Mutationen sind für sich stehend ausreichend, um PA auszulösen. Hier wurden sie in einer Schemazeichnung zusammengefasst. Die detaillierte Pathologie der jeweiligen Mutationen ist im Text in Abschnitt 2.1 beschrieben. Unterschieden wird eine indirekte von einer direkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung. Durch pathologischen  $\text{Na}^+$ -Einstrom wird eine übermäßige Depolarisation ausgelöst, welche sekundär die spannungsabhängigen Kalziumkanäle aktiviert. Mutationen in *ATP2B3*, *CACNA1D* und *CACNA1H* führen direkt zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Analog zu Abbildung 4 führt die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer gesteigerten Aldosteronproduktion. In diesem Fall ist die Produktion autonom und von jeglicher Regulation entkoppelt. Nach Beuschlein (2013) und Stafford et al. (2017)



Im Folgenden werden die einzelnen Mutationen genauer betrachtet, ein Überblick über die betroffenen Proteine und deren Auswirkung findet sich in Abbildung 5.

**KCNJ5** Dieses Gen codiert für den Kaliumkanal *G Protein-Coupled Inwardly-Rectifying Potassium Channel 4* (GIRK4), welcher einer größeren Gruppe von Kanälen mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften angehört. Unter physiologischen Bedingungen dient er der Stabilisierung des Membranpotenzials. Mutationen in *KCNJ5* wurden erstmalig von Choi et al. (2011) beschrieben. Dieses Gen ist mit Abstand am häufigsten in APAs als mutiert gefunden worden (Fernandes-Rosa et al. 2014). Zu den häufigsten Mutationen zählen die Varianten p.Gly151Arg und p.Leu168Arg (Zennaro et al. 2015). Weitere somatische Mutationen wurden seit der Erstbeschreibung identifiziert, ebenso wie Keimbahnmutationen, welche als Familiärer Hyperaldosteronismus Typ III bezeichnet werden. Eine Zusammenfassung der bisher identifizierten Mutationen findet sich in Bandulik (2017).

All diese Mutationen liegen im oder in der Nähe des Selektivitätsfilters des Kanals. Durch Inaktivierung des Selektivitätsfilters können nicht mehr nur  $\text{K}^+$ -Ionen den Kanal passieren, sondern auch  $\text{Na}^+$  kann vermehrt in die Zelle einströmen und diese depolarisieren (Choi et al. 2011). Durch diese Depolarisation wird die weitere Kaskade mittels spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle angestoßen und die Aldosteronproduktion von der Regulierung durch das RAAS entkoppelt.

## 2 Primärer Hyperaldosteronismus

**CACNA1D und CACNA1H** *CACNA1D* codiert für den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal  $\text{Ca}_v1.3$ , *CACNA1H* für  $\text{Ca}_v3.2$ . In Abschnitt 1.3 sind die physiologischen Rollen dieser Kanäle beschrieben. Mutationen in *CACNA1D* wurden erstmals von Scholl et al. (2013a) und Azizan et al. (2013), beschrieben, in *CACNA1H* von Scholl et al. (2015b) und Daniil et al. (2016).

Mutationen in *CACNA1D* führen zu einer verfrühten Aktivierung bei niedrigeren Potentialen und zu einer verlängerten Öffnung des Kanals. In der Summe ergibt sich dadurch ein deutlich vermehrter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und verstärkte Initiation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade (Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013a).

Auch die von Scholl et al. (2015b) beschriebene *CACNA1H*-Mutation führt zu einer Öffnung bei hyperpolarisierten Potentialen und zu einer verlängerten Kanalöffnung. Analog zu  $\text{Ca}_v1.3$  erfolgt somit durch die mutierten  $\text{Ca}_v3.2$ -Kanäle ein verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit konsekutiv verstärkter Aldosteron-Produktion.

**ATP1A1** Dieses Gen wurde in APAs erstmals im Jahr 2013 beschrieben (Azizan et al. 2013; Beuschlein et al. 2013). Es codiert die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die unter Verbrauch von ATP Natrium aus der Zelle und Kalium in die Zelle hinein pumpt. Mutationen in diesem Gen führen einerseits zu einem Verlust der Pumpfunktion und einer Depolarisation der Zelle (Beuschlein et al. 2013; Williams et al. 2013). Es wurde andererseits gezeigt, dass Mutationen dieser Pumpe zu einem Protonen-Leck führen, welches ebenso zu einer Hochregulation der Aldosteron-Produktion beiträgt (Stindl et al. 2015). Keimbahnmutationen in diesem Gen sind bisher nicht beschrieben worden. Fernandes-Rosa et al. (2014) werten dies als Hinweis, dass ein Embryo mit dieser Mutation nicht lebensfähig sei.

**ATP2B3** Dieses Gen codiert für die „plasma membrane calcium ATPase 3“ (PMCA3), welche die zelluläre Ca-Homöostase aufrecht erhält (Leva et al. 2008). Unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) wird  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen Protonen aus der Zelle gepumpt (Stafford et al. 2017). Keimbahnmutationen in diesem Gen führen zur sog. „X-linked congenital cerebellar ataxia“ (Zanni et al. 2012) und weiteren neurologischen Syndromen (Calì et al. 2015).

Beuschlein et. al. fanden somatische Mutationen in *ATP2B3* in APAs (Beuschlein et al. 2013). Diese führen zu einem Verlust der Pumpfunktion und einem unkontrollierten  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Tauber et al. 2016). Die Folge ist eine gesteigerte Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings und eine übermäßige Aldosteron-Produktion.



**CTNNB1** Das Signalprotein  $\beta$ -Catenin wird durch *CTNNB1* codiert. Es ist Teil des WNT-Signalwegs, wobei  $\beta$ -Catenin als intranukleärer Transmitter die Translation zahlreicher Gene induziert (El Wakil et al. 2011). Der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung (Anastas et al. 2013). Für das Wachstum und die Entwicklung der Nebennierenrinde sind ebenso wesentliche Mechanismen von dieser Signalkaskade abhängig (El Wakil et al. 2011; Tissier et al. 2005). Zudem soll  $\beta$ -Catenin über nukleäre Rezeptoren die Synthese von CYP11B2 induzieren und die AngII-abhängige Aldosteronproduktion fördern (Berthon et al. 2014).

Gain-of-Function Mutationen in *CTNNB1* wurden bereits in unterschiedlichen Tumorgeweben identifiziert (Kim et al. 2008). Mutationen in APAs wurden wiederholt – jedoch bisher nur in geringer Anzahl – beschrieben (Åkerström et al. 2016; Azizan et al. 2013; Scholl et al. 2013a; Shaikh et al. 2015; Tissier et al. 2005).

## 2.2 Klinische und Therapeutische Aspekte des Conn-Syndroms

Patienten mit Conn-Syndrom weisen als Kernsymptom eine oft therapieresistente arterielle Hypertonie auf. In einigen Fällen bewirkt der Aldosteron-Exzess eine symptomatische Hypokaliämie mit Begleitsymptomen wie etwa Muskelschwäche oder EKG-Veränderungen. In den aktuellen Leitlinien der Endocrine Society wird der Anteil der hypokaliämischen Patienten mit 9 – 37% angegeben (Funder et al. 2016a).

Der diagnostische Algorithmus entspricht einem mehrstufigen Prozess. Nach den Richtlinien der Endocrine Society (Funder et al. 2016a) wird ein initiales Screening gefährdeter Patienten empfohlen. Dies schließt unter anderem Patienten mit ausgeprägt hohem Bluthochdruck oder einer Therapieresistenz trotz drei oder mehr Antihypertensiva ein. Das Screening erfolgt mittels einfacher Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ). Fällt dieser pathologisch aus, so erfolgt in der Regel ein Bestätigungstest.

Hierfür werden je nach Zentrum unterschiedliche Tests angewandt. In der Conn-Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München wird hierfür ein Kochsalz-Belastungstest durchgeführt. Physiologischerweise reagiert der Organismus auf das infundierte NaCl mit einer Suppression der Aldosteronausschüttung. Liegt eine autonome Aldosteronproduktion vor, so kann diese nicht adäquat unterdrückt werden. Fällt dieser Test pathologisch aus, so gilt ein PA als gesichert.

## *2 Primärer Hyperaldosteronismus*

In Hinblick auf die Therapie ist entscheidend, ob eine unilaterale oder bilaterale Aldosteronüberproduktion vorliegt. Dies kann mittels eines Nebennierenvenenkatheters untersucht werden, mit dem die Aldosteronausschüttung der beiden Nebennieren miteinander verglichen werden kann. Zeigt sich hierbei eine eindeutige Lateralisation der Aldosteronausschüttung und ggf. eine kontralaterale Suppression, so liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine unilaterale Erkrankung vor. In Ergänzung hierzu kann eine Bildgebung mittels Computertomographie (CT) Aufschluss über Knoten in den Nebennieren geben.

Im Falle einer bilateralen Aldosteronproduktion sind Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten (MRA) wie etwa Spironolacton Mittel der Wahl. Hierdurch lassen sich die zahlreichen Wirkungen der überschüssigen Aldosteronproduktion wirksam antagonisieren. Da es sich jedoch nicht um eine kausale Therapie handelt, müssen die MRA in der Regel lebenslang eingenommen werden.

Erhärtet sich dagegen der Verdacht auf eine einseitige Erkrankung, so bietet sich eine unilaterale Adrenalectomie an. Durch Entfernen der Aldosteronquelle kann eine dauerhafte Heilung erzielt werden. Oft normalisieren sich Blutdruck und Blutwerte.

### 3 Ziele der Arbeit

Das Verständnis der APA-Pathogenese hat sich in den letzten Jahren schnell erweitert. Auf Basis kürzlich identifizierter Mutationen wurden inzwischen weithin anerkannte Modelle der exzessiven und unregulierten Aldosteronproduktion etabliert.

Allerdings haben die neuen Erkenntnisse neue Fragen aufgeworfen. So ist beispielsweise nicht abschließend geklärt ob die pathologische Zelldepolarisation und die direkte Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweges lediglich die Aldosteron-Produktion fördern, oder auch in die Zellproliferation involviert sind, die sich morphologisch als Adenom zeigt. Zudem zeigen sich zwischen den APA-Patienten Unterschiede etwa in der klinischen Präsentation oder der APA-Morphologie. Bei weitem nicht alle Patienten sind nach Adrenalektomie vollständig geheilt.

Ziel dieser Arbeit war die genetische und histopathologische Charakterisierung einer Kohorte von 121 APAs, um einerseits die Auswirkung der Mutationen auf die Histopathologie und enzymatische Aktivität der Steroidhormonsynthese zu untersuchen. Des Weiteren sollte in einer funktionellen Charakterisierung die Auswirkung der genetischen und histopathologischen Faktoren auf das klinische und laborchemische Erscheinungsbild evaluiert werden. Schlussendlich wurden sämtliche erhobenen Parameter als mögliche Faktoren für den Therapieerfolg nach Adrenalektomie untersucht.

Mittels der Charakterisierung auf mehreren Ebenen und der Integration dieser unterschiedlichen Aspekte sollte ein vertieftes Verständnis über die Mechanismen der APA-Entstehung und den Krankheitsverlauf gewonnen werden.

## **Teil II**

# **Material und Methoden**

## 4 Einschlusskriterien, Verwendetes Gewebe und Patienten-Daten

Diese Arbeit untersucht APAs von 121 Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus. Diagnosestellung, Subtyp-Differenzierung und postoperative Kontrolluntersuchungen erfolgten in der Endokrinologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München. Die hierbei erhobenen klinischen Daten wurden standardisiert in die Datenbank des Deutschen Conn-Registers<sup>1</sup> eingespeist. Aus diesem Register wurden die klinischen Daten für die vorliegende Arbeit entnommen.

Das Nebennierengewebe operierter Patienten wurde routinemäßig durch das pathologische Institut der Klinik auf Dignität, Lokalisation und Morphologie der Raumforderung untersucht.

### 4.1 Eingeschlossene Patienten

Die Auswahl der in die Studie eingeschlossenen Gewebe wurde auf Grundlage der klinischen und biochemischen Diagnose, sowie der Pathologie-Berichte zu den bei der Operation (OP) gesammelten Präparaten getroffen.

Eingeschlossen wurden Patienten mit der klinischen Diagnose eines primären Hyperaldosteronismus, die histopathologisch ein Adenom der Nebennierenrinde aufwiesen, welches mit der klinischen Diagnose vereinbar war.

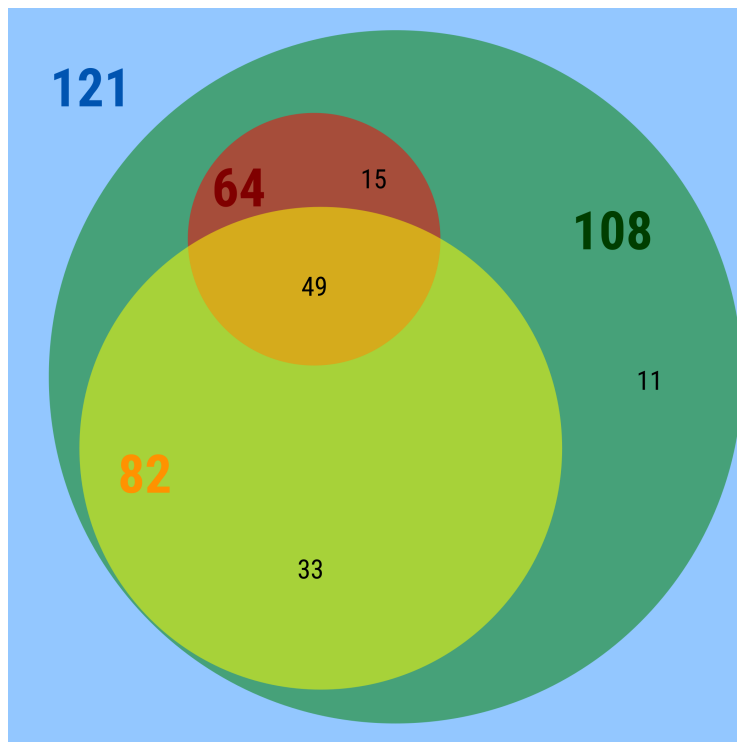
Conn-Patienten mit lediglich mikro- oder makronodulärer Hyperplasie der Nebennierenrinde ohne erkennbaren primären Knoten wurden ausgeschlossen. Einen Überblick über die Zahl der Patienten und die für diese Arbeit verfügbaren klinischen, molekularbiologischen und histopathologischen Datensätze gibt Abbildung 6.

Die eingeschlossenen Patienten wurden im Zeitraum von November 2005 bis März 2015 in der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und Thoraxchirurgie des Klinikums der Universität München operiert.

Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung der entnommenen Tumoren.

---

<sup>1</sup><http://www.conn-register.de/>



**Abbildung 6: Übersicht über untersuchte Patienten und Gewebe.** Von allen 121 untersuchten APAs wurde der Genotyp bestimmt (blaues Rechteck). Von 108 Patienten lagen präoperative klinische und biochemische Daten vor (grüner Kreis). Für 82 Patienten lagen zudem postoperative Daten vor (gelber Kreis). IHC-Färbungen wurden auf Schnitten von 64 APAs durchgeführt (roter Kreis). Die Patientenanzahl in den Gruppen sind in der Farbe der korrespondierenden Kreise angegeben. Da die Sub-Kohorten nicht komplett überlappen, sind die Schnittmengen in schwarzen Ziffern angegeben. Die Flächen sind nicht proportional.

## 4.2 Klinische und Biochemische Daten

Grundlage für die Auswertung klinischer und biochemischer Daten in dieser Arbeit war die Datenbank des Deutschen Conn-Registers. Dieses wurde 2006 in München gegründet und erfasste Daten bis 2007 zunächst retrospektiv. Ab dem Jahr 2008 wurden Patienten prospektiv eingeschlossen.

Patienten mit therapieresistenter Hypertonie und Verdacht auf Primären Hyperaldosteronismus unterliefen eine leitliniengerechte Diagnostik in der Endokrिनologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV. Das diagnostische Vorgehen entsprach den Richtlinien der *Endocrine Society*<sup>2</sup> (Funder et al. 2016a). Die Patientendaten wurden präoperativ, so wie in jährlichen Nachfolgeuntersuchungen, anhand eines standardisierten Fragebogens und Protokolls erhoben.

Zu den in dieser Arbeit eingeschlossenen Daten gehörten klinische Parameter wie systolischer Blutdruck ( $RR_{\text{sys}}$ ), diastolischer Blutdruck ( $RR_{\text{dia}}$ ), benötigte antihypertensive Medikamente (aHTM) gemessen als definierte Tagesdosen, engl. „defined daily doses“ (DDD) und Laborparameter wie Plasma Aldosteron-Konzentration, engl. „plasma aldosterone concentration“ (PAC), Renin, ARQ und Kalium-Konzentration im Serum ( $K_s^+$ ). Im Rahmen der Visiten in der Conn-Ambulanz wurde der Blutdruck in Form von jeweils drei

<sup>2</sup><http://www.endocrine.org/>

#### 4 Einschlusskriterien, Verwendetes Gewebe und Patienten-Daten

**Tabelle 1: Referenzwerte der biochemischen und klinischen Parameter.** Die Labor-Referenzwerte entsprechen denen des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München (Stand 02/2017) und des Endokrinologischen Labors der Medizinische Klinik und Poliklinik IV (Stand 12/2016). Die Blutdruckwerte entsprechen den Richtlinien der „European Society for Hypertension“ und der „European Society of Cardiology“ von 2013 (Mancia et al. 2013)

Parameter	Referenzwerte
PAC [ng / L]	< 236 ‡
Renin [mU / L]	2,8 – 39,9 ‡
ARQ [ng / mU]	≤ 12
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol / L]	3,5 – 5,0
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	< 140
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	< 90

‡ Referenzwerte bei liegenden Probanden

Messungen am linken und rechten Arm erhoben. In dieser Arbeit wurde der Mittelwert aus den jeweils zweiten und dritten Messungen beider Seiten zur Analyse verwendet. Der K<sub>s</sub><sup>+</sup>-Wert vor Adrenalektomie war definiert als der niedrigste Wert, der im Rahmen der Erkrankung beim Patienten auffällig war. Einzelne Daten, die zum Zeitpunkt des Datenbankauszuges noch nicht vorlagen, wurden für die vorliegende Arbeit nachträglich anhand der Patientenakten aus dem elektronischen Archivsystem ergänzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Labor-Referenzwerte entsprachen denen des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München (Stand 02/2017) und des Endokrinologischen Labors der Medizinische Klinik und Poliklinik IV (Stand 12/2016). Diese Werte sind in Tabelle 1 angegeben.

Von den 121 in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten lagen zum Zeitpunkt der Auswertung bei 108 Patienten präoperative Daten vor. Bei 82 Patienten waren sowohl prä-, als auch postoperative Daten vorhanden. Bei wenigen Patienten fehlten einzelne Daten. Diese wurden daher von den jeweiligen Analysen ausgeschlossen.

### 4.3 Untersuchtes Nebennierengewebe

Nach der OP erfolgte die Routine-Befundung durch das Pathologische Institut der Klinik. Im Anschluss wurden dem Endokrinologischen Forschungslabor repräsentative Abschnitte der OP-Präparate übergeben. Davon wurden Teile bei -80°C konserviert, die bei allen 121 Patienten für die Genotypisierung der Adenome verwendet werden konnten. Sofern ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden zudem Teile in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in Paraffin eingebettet. Bei 74 von 121 Patienten lag für histologische und immunhistochemische Untersuchungen geeignetes, in Paraffin eingebettetes Gewe-

#### *4 Einschlusskriterien, Verwendetes Gewebe und Patienten-Daten*

be vor. Von diesen zeigten 10 keine positive CYP11B2-Färbung des Adenoms in der IHC, weshalb nicht von einer Aldosteron-Produktion des untersuchten Knotens ausgegangen werden konnte. Die verbleibenden 64 Gewebe wurden für die histopathologischen und immunhistochemischen Analysen ausgewählt.

Für eine Schnittmenge von 49 Patienten lagen sowohl prä- als auch postoperative Daten, sowie Gewebe für molekularbiologische, histologische und immunhistochemische Analysen vor.



## 5 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Zur Durchführung der Studie wurden die in Tabelle 2 alphabetisch aufgelisteten Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet. Die Patientendaten wurden zusammen mit den erhobenen klinischen und histopathologischen Daten in einer „Microsoft Access 2013“ (Microsoft Corporation, Redmond, USA) Datenbank gesammelt und verwaltet.

Die Steuerung des Mikroskops, sowie das Aufnehmen der histologischen Bilder erfolgte mithilfe der Steuerungssoftware „SPOT Basic“ (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights (MI), USA, Version 4.0.9). Die immunhistochemischen Bilder wurden in das Bildverarbeitungsprogramm „ImageJ“ (Schneider et al. 2012, Version 1.49p) geladen und mithilfe des Plug-ins „IHC Profiler“ (Varghese et al. 2014) ausgewertet. Die für die Auswertung verwendete Statistik-Software ist in Kapitel 10 aufgeführt.

**Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien.** Alphabetische Auflistung der Geräte und Verbrauchsmaterialien, die zur Durchführung dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät oder Artikel [Referenz]	Hersteller
Abzugshaube <i>CaptairFlex</i> [M391]	Erlab, Val de Reuil cedex, Frankreich
Deckgläser <i>Menzel-Gläser #1</i> , 24x55mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
DNA und RNA Aufreinigungssystem <i>Maxwell 16</i>	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Druckkochtopf <i>Silit Sicomatic-S</i>	WMF AG, Gieslingen/Steige, Deutschland
Einbettkassetten <i>Histosette I</i> [M491-11]	Simport, Beloeil, Kanada
Einbettkassetten <i>Rotilabo® Macro</i> [EE16.1]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fettstift <i>Pap Pen Immunostaining pen</i> [MKP-2]	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C) <i>Hera freeze</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Gewebedisruptor <i>TissueLyser LT</i>	QIAGEN, Düsseldorf, Deutschland
Gewebeeinbettautomat <i>Spin Tissue Processor</i> [STP120]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA (ehem.: Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland)
Gewebeeinbettstation [EC350]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA (ehem.: Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland)

Fortgesetzt auf nächster Seite

## 5 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Software

**Tabelle 2** – Fortsetzung von vorangehender Seite

Gerät oder Artikel [Referenz]	Hersteller
Heizofen	Memmert GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Heizofen	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Kochplatte [CT-1810]	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, Deutschland
Kühlschrank (+4°C) <i>ProfiLine</i>	Liebherr International Deutschland GmbH, Deutschland
Magnetrührer <i>RH D-KT/C safety control</i>	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop <i>DMRB</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop-Kamera <i>SPOT Insight QE Model 4.2</i>	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights (MI), USA
Objektträger <i>Superfrost® Plus</i> [#J1800AMNZ]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
pH-Meter [pH530]	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Pipetten <i>Pipetman</i> 200µL und 1000µL	Gilson, Inc., Middleton (WI), USA
Pipetten 0.1-2.5µL, 2-20µL, 10-100µL, 200-1000µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage Typ [440-45] und Typ [770]	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
qPCR System [Mx3000P]	Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA
Rotationsmikrotom [HM-335E]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA (ehem.: Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland)
Spektrophotometer <i>NanoDrop 1000</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (Ehemals: PEQLAB GmbH)
Thermocycler <i>Primus 25 advanced®</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (Ehemals: PEQLAB GmbH)
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer <i>Vortex-Genie</i> [K-550-GE]	Scientific Industries Inc., Bohemia (NY), USA
Warmwasserbecken [SB80]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA (ehem.: Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland)
Wipptisch <i>Rocky® 3D</i> [RT-3D]	Frübel Labortechnik, Wasserberg, Deutschland
Zentrifuge [5424R]	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 6 Reagenzien, Kits und Antikörper

Für die molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen wurden zahlreiche Reagenzien und Kits verwendet, die in Tabelle 3 in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt sind. Tabelle 4 listet die verwendeten primären Antikörper auf, die in der IHC zur Anwendung kamen.

**Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Kits.** Alphabetische Auflistung der Chemikalien, Reagenzien und Kits, die zur Durchführung dieser Arbeit verwendet wurden.

Name [Referenz]	Hersteller
Aq. bidest.	H. Kerndl GmbH, Weissenfeld, Deutschland
Citrat [X863.2]	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse [K5007]	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Eosin Y Lösung, wässrig [HT110232]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Ethanol 100% (99% + 1% Petrolether)	SAV LP GmbH, Flintsbach, Deutschland
Ethanol 96%, 80% and 70%	CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland
EDTA [11280]	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
GoTaq® DNA Polymerase [M300]	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Harris Hämatoxylin, modifizierte Lösung [HHS32]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
HCl 12N (Salzsäure 37%, rauchend), [100317]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Histoplast, Paraffin zur Gewebeeinbettung [6774060]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Magnesiumsulphat-heptahydrat [P027.1]	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalun Lösung [A.0884]	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol [8045]	J.T. Baker®, Deventer, Niederlande
Menschliches AB Serum, gepoolt (Life Technologies™) [34005100]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit [AS1290]	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit [AS1280]	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) [1.064.041.000]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulphat (SDS) [L4509]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Natriumhydrogencarbonat [106.329]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

## 6 Reagenzien, Kits und Antikörper

**Tabelle 3** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Name [Referenz]</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumhydroxid Pellets [106.498]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
PBS Tabletten (Gibco™/ Life Technologies™) [18912-014]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Permount™ Eindeckmedium [SP15-100]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Pierce™ Immunostain Enhancer (Life Technologies™) [46644]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Polink DS-MR-Hu C1 Kit [DS201C-6]	GBI Labs, Bothell (WA), USA
SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten [D4168]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
SsoFast™ EvaGreen® Supermix [1725200]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-dihydrat [106.448]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Trizma® base [T6066]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Tween® 20 [P1379]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Vectashield [H-1200]	Vector (Biozol germany)
Vectastain Elite ABC Kit [PK-6100]	Vector Laboratories Inc., Burlingame (CA), USA
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% [107209]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System [A928]	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylol [33817]	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA

## 6 Reagenzien, Kits und Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper.** Auflistung der zur Durchführung dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Sofern nicht anders angegeben, bezieht sich die Angabe des Antigens auf humane Antigene.

Antigen	Ursprungs-Spezies, Klonalität	Verdünnungsfaktor	Verdünnungspuffer	Referenz und Hersteller
CYP11B1	Ratte, monoklonal	1/50	Pierce® Immuno-stain Enhancer	hCYP11B1-80-7-5 8/21/2013; Gomez-Sanchez et al. (2014) <sup>‡</sup>
CYP11B2	Maus, monoklonal	1/200	20% Menschliches AB Serum in PBS	Clone 17 exhaustion 5/15/2012; Gomez-Sanchez et al. (2014) <sup>‡</sup>
CYP17	Kaninchen, monoklonal	1/200	PBS	March 2014 pool 14C (new); Gomez-Sanchez <sup>‡</sup>
HSD3B1	Maus, monoklonal	1/300	20% Menschliches AB Serum in PBS	H00003283-M01 (clone 3C11-D4); Abnova, Taipei City, Taiwan
HSD3B2	Kaninchen, polyklonal	1/200	20% Menschliches AB Serum in PBS	ab154385; Abcam, Cambridge, UK
Ca <sub>v</sub> 1.3	Kaninchen, polyklonal	1/400	20% Menschliches AB Serum in PBS	ACC-005; Alomone labs, Jerusalem, Israel
Ca <sub>v</sub> 3.2	Kaninchen, polyklonal	1/400	20% Menschliches AB Serum in PBS	ACC-025; Alomone labs, Jerusalem, Israel
Ratten-IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	1/2500	Pierce® Immuno-stain Enhancer	#31470; Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA

<sup>‡</sup> Zur Verfügung gestellt von Prof. Celso E. Gomez-Sanchez; Endocrine Section, G.V. (Sonny) Montgomery VA Medical Center und University of Mississippi Medical Center, Jackson (MS), USA

## 7 Puffer

In den IHC-Protokollen wurden Tris-Ethylendiamintetraessigsäure, engl. „Ethylenediaminetetraacetic acid“ (EDTA)-Puffer und Natriumcitrat-Puffer zur Antigen-Demaskierung verwendet. Zur Zwischenreinigung der Gewebeschnitte wurde Tris-gepufferte Salzlösung, engl. „tris-buffered saline“ (TBST) verwendet. Zum immunhistochemischen Anfärben der Gewebeschnitte wurde Peroxidase-Substratlösung verwendet. Die zur Herstellung verwendeten Reagenzien sind in Kapitel 6 aufgeführt. Im Folgenden sind die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer aufgeführt.

**PBS-Puffer** Für 500mL Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. „phosphat buffered saline“ (PBS) wurde auf einem Magnetrührer eine vorgefertigte PBS-Tablette in 500mL Aq. bidest. aufgelöst.

**TBST pH 7,5 10x Konzentrat** Für 1L Konzentrat wurden in 800mL Aq. bidest. 60,5g Trizma Base und 87,5g NaCl aufgelöst. Mit 12N HCl wurde der pH auf 7,5 eingestellt. Abschließend wurden 5mL Tween 20 hinzugefügt und der Puffer mit Aq. bidest. auf 1L Zielvolumen gebracht. Die Lagerung erfolgte bei +4°C.

**Citrat-Puffer pH 6,0** Für 1L Puffer wurden 2,94g Natriumcitrat in 950mL Aq. bidest. gelöst. Mit 1N HCl wurde der pH auf 6,0 eingestellt. Abschließend wurden 500µL Tween 20 zugegeben und das Volumen mit Aq. bidest. bis 1000mL aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei +4°C.

**Tris-EDTA pH9.0 10x Konzentrat** Für 500mL Konzentrat wurden 6,05g Trizma Base und 1,85g EDTA in 300mL Aq. bidest. gelöst. Mit NaOH wurde der pH auf 9,0 eingestellt. Abschließend wurden 2,5mL Tween 20 zugegeben und das Volumen mit Aq. bidest. auf 500mL aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei +4°C.

**SIGMAFAST™ Peroxidase-Substratlösung** Diese Lösung wurde frisch vor jeder Anwendung zubereitet. Hierfür wurde eine Tablette 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) mit einer Tablette Harnstoff-Wasserstoffperoxid in ein Eppendorf-Gefäß mit 1mL Aq. bidest. gegeben. Die Mischung wurde auf dem Vortexmischer bis zur vollständigen Auflösung der Tabletten gemischt.

## 8 Genotypisierung

Alle untersuchten Gewebe wurden mit direkter Sequenzierung der Desoxyribonukleinsäure, engl. „Deoxyribonucleic acid“ (DNA) nach Sanger oder mittels Exom-Sequenzierung auf die in sporadischen APAs bekannten somatischen Mutationen untersucht. Die DNA wurde aus den bei -80°C gelagerten Tumorgeweben extrahiert. Nach Amplifikation der relevanten Genregionen wurden Proben zur Sequenzierung an Eurofins / MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) gesandt.

### 8.1 DNA Extraktion

Zum Schutz der DNA wurden die Gewebeproben außerhalb des Gefrierschranks (-80°C) ausschließlich auf Trockeneis gelagert. Die Entnahme von Gewebestücken erfolgte auf einem bei -20°C gekühlten Schneidbrett. Die Tumorproben wurden zunächst lysiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit von Promega. Die Prozedur orientierte sich dabei am Protokoll des Herstellers.

In ein 2mL Eppendorf-Gefäß wurde neben der Tumor-Probe 150µL Lysepuffer (aus dem Kit), 150µL Inkubationspuffer und eine Stahlkugel gegeben. Nach Einsetzen des Eppendorf-Gefäßes in den Disruptor „TissueLyser LT“ wurde die Probe bei 50 Oszillationen pro Sekunde 2 Minuten lang lysiert. Anschließend wurden 20µL Proteinase K, sowie 2µL RNase hinzugefügt, die Mixtur mit einem Vortex-Mischer vermischt und kurz auf einer Tischzentrifuge gedreht.

Das Eppendorf-Gefäß wurde dann in einen Thermomixer 25-30 Minuten bei 90°C und 900 Umdrehungen/Minute inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Reaktionskassetten für den Maxwell® entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und auf den Kassettenträger gesteckt. Nach Abschluss der Inkubation wurde das Eppendorf-Gefäß in einer Zentrifuge bei 16.000 Umdrehungen/Minute 3 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Fraktion wurde mit einer Pipette in ein weiteres Eppendorf-Gefäß mit 250µL Lysepuffer transferiert und durch wiederholtes Aufziehen mit diesem vermischt. Diese Mixtur wurde anschließend in die vorgesehene Vertiefung in der Reaktionskassette übertragen. Der Kassettenträger wurde in das Maxwell® 16 Gerät gesetzt und das Protokoll „DNA“ mit der Methode „Blood“ gewählt.

Nach Abschluss des Programms wurde im NanoDrop die DNA-Konzentration photometrisch gemessen.

## 8.2 Vervielfältigung und Aufreinigung

Die extrahierte DNA wurde auf Mutationen in den Genen *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CTNNA1* und *PRKACA* untersucht. Die entsprechenden Genomabschnitte wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion, engl. „polymerase chain reaction“ (PCR) vervielfältigt und zur Sequenzierung an Eurofins / MWG Biotech geschickt.

Für die PCR wurde die GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase verwendet. Die extrahierte DNA wurde zunächst auf eine Konzentration von 50ng/μL verdünnt. Ein PCR Ansatz setzte sich aus 1μL DNA Matrix, 5μL 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Puffer, 0,5μL dNTPs, je 1μL upstream und downstream Primer, 0,2μL GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase und 16,3μL nukleasefreiem Wasser zusammen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das Touchdown PCR Programm ist in Tabelle 6 dargestellt.

Nach der Amplifikation wurden die Produkte per Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde das *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* von Promega entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

## 8.3 Sequenzierung

Die direkte Sequenzierung nach Sanger wurde bei Eurofins / MWG-Biotech durchgeführt. Für die Exom-Sequenzierung wurden Proben an das Institut für Humangenetik des Helmholtz Zentrums München<sup>1</sup> gesandt. Die aufgereinigte DNA wurde für den Transport zusammen mit den jeweiligen Primern auf Trockeneis gelagert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Referenzgenen des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>2</sup> verglichen.

---

<sup>1</sup>Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH); Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg; <https://www.helmholtz-muenchen.de>

<sup>2</sup>National Center for Biotechnology Information; U.S. National Library of Medicine; 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



## 8 Genotypisierung

**Tabelle 5: Primer für DNA Amplifikation.** In dieser Tabelle wurden die in der PCR verwendeten Primer zur Amplifikation der untersuchten Gene aufgelistet. Die Annealing Temperatur lag für alle Primer bei 58°C.

Gen	Exon	Richtung	Sequenz
<i>ATP1A1</i>	4	Fwd	TATATTGCCTTGTAAGTGCTGG
		Rev	GAAGTGGGAGACAAAGACGG
	8	Fwd	CGTGGCTTCCTTCAGGTTAG
		Rev	AGAGTGTAACATTCGTGCAAGC
<i>ATP2B3</i>	8	Fwd	TTCTTCCCTCTTCCTGTCCC
		Rev	TTCTTACCCAGTTTCCGAG
<i>CACNA1D</i>	8a	Fwd	TTGAATTGCCCTGGGTGTAT
		Rev	AATGTCTGGCAACCCCTCTT
	8b	Fwd	AGCTGCAACTGGGGCTC
		Rev	GCAGCTAGGAGACACGCAG
	14/15	Fwd	GTCCTGCATGGGTGTTCTGA
		Rev	ACGAAGTGCTTTTCGGGGAA
	16	Fwd	TAACACTTGGGACGGTCAC
		Rev	CCATGATCCACAAAGCAGC
	28	Fwd	CCAATCTACAACCACCGCGT
		Rev	GACCAAGGGACAGAAGCCAA
<i>CTNNB1</i>		Fwd	AAAATCCAGCGTGACAATGG
		Rev	TGTGGCAAGTTCTGCATCATC
		Fwd	GATTTGATGGAGTTGGACATGG
		Rev	TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG
<i>KCNJ5</i>		Fwd	GCTTCATTTGGTGGCTCATT
		Rev	GAGATGACTGCGTTGTTGGA
<i>PRKACA</i>	6-7	Fwd	GTTTCTGACGGCTGGACTG
		Rev	AGTCCACGGCCTTGTTGTAG

## 8 Genotypisierung

**Tabelle 6: PCR Programm.** Nach einer initialen Denaturierung folgten 8 Zyklen des Touchdown-Ansatzes zur Erhöhung der Spezifität. Anschließend durchlief die PCR 25 Zyklen zur Amplifikation und wurde mit einer finalen Extension abgeschlossen.

‡ In jedem Zyklus des Touchdown wurde die Annealing-Temperatur um je 1°C gesenkt.

Vorgang	Zyklen	Schritte in jedem Zyklus	Temperatur & Dauer
Initiale Denaturierung	1		95°C, 2min
Touchdown	8	Denaturierung	95°C, 15s
		Annealing	65-58°C‡, 15s
		Extension	72°C, 30s
Amplifikation	25	Denaturierung	95°C, 15s
		Annealing	58°C, 15s
		Extension	72°C, 30s
Finale Extension	1		72°C, 5min

## 9 Histologische Untersuchungen

Die Tumoren wurden für die histologischen Untersuchungen in Paraffin eingebettet. Aus jedem Paraffinblock wurden aufeinanderfolgende Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht.

Je Schnittserie wurden der erste und letzte Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Auf den dazwischen liegenden Schnitten wurden mittels IHC jeweils die Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP17, HSD3B1 und HSD3B2, sowie die Kalzium-Kanäle  $Ca_v1.3$  und  $Ca_v3.2$  angefärbt.

Die Färbungen wurden unter einem Lichtmikroskop begutachtet und fotografiert. Die IHC-Färbungen wurden anschließend semi-quantitativ ausgewertet.

### 9.1 Paraffin-Einbettung und Anfertigen der Gewebeschnitte

Das für die Einbettung bestimmte Tumorgewebe wurde unmittelbar nach Erhalt über 24 Stunden in einer 4%igen PFA-Lösung fixiert. Als Vorbereitung auf die Einbettung wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt, wobei es jeweils zwei Stunden in 30%, 50% und 70%-igem Ethanol verweilte.

Die Tumoren wurden dann in Einbettkassetten platziert und für die automatisierte Dehydratation und Paraffinisierung in den Spin Tissue Processor STP120 gegeben. Hierbei durchliefen die Adenome in Tauchbecken folgende Schritte: 70% Ethanol zwei mal eine Stunde und einmal zwei Stunden, 96% Ethanol zweimal zwei Stunden, 100% Ethanol dreimal zwei Stunden, Xylol zweimal zwei Stunden und erhitztes, flüssiges Paraffin zweimal zwei Stunden. An der Einbettstation EC350 wurden die Tumoren in Paraffinblöcke eingebettet.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden Serien aufeinanderfolgender Schnitte von 5µm Dicke angefertigt. Diese wurden in einem Warmwasserbecken bei 39°C geglättet und auf Objektträger appliziert. Anschließend wurden die Schnitte in einem Heizofen bei +37°C über Nacht getrocknet.

## 9.2 Hämatoxylin–Eosin Färbung

Von jedem Tumor wurden Schnitte am Anfang und Ende der jeweiligen Schnittserie ausgewählt und mit HE gefärbt. Diese dienten einerseits der histologischen Gewebedifferenzierung und Bestimmung der morphologischen Zusammensetzung der Adenome. Andererseits ermöglichten sie die Auswahl geeigneter benachbarter Schnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen.

Die Objektträger wurden zur Deparaffinisierung zunächst zweimal drei Minuten in Xylol gebadet. Anschließend durchliefen sie eine absteigende Ethanolreihe. Sie wurden je zweimal drei Minuten in 100% und 96% Ethanol getaucht und drei Minuten in Aq. bidest. gewaschen. Für die Kernfärbung wurden die Objektträger 4 Sekunden in Harris Hämatoxylin getaucht. Das überschüssige Hämatoxylin wurde fünf Sekunden in Aq. bidest. und 60 Sekunden unter langsam fließendem Leitungswasser abgewaschen.

Die wässrige Eosin Y Lösung wurde mit 0,5mL reiner Essigsäure in 100mL Eosin Y Lösung angesäuert. Die Gewebeschnitte wurden zehn Sekunden in dieser Lösung gefärbt, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurden. Die einzelnen Schritte dieser Alkoholreihe waren zweimal 30 Sekunden 96% Ethanol, zweimal 30 Sekunden 100% Ethanol und zweimal 30 Sekunden Xylol. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit „Permount“ und 55x24mm Deckgläsern eingedeckt und bei Raumtemperatur zum Trocknen unter der Abzugshaube belassen.

## 9.3 Immunhistochemische Färbungen

Die IHC dient der gezielten farblichen Markierung eines spezifischen Antigens, um dessen Lokalisation und Ausprägungsdichte in einem Gewebeschnitt darzustellen. Für diese Anfärbung sind drei fundamentale Schritte notwendig.

In einem ersten Schritt werden sogenannte primäre Antikörper (AK) auf das Gewebe gegeben, welche ausschließlich an das zu bestimmende Antigen binden. Diese Antikörper wurden in einer anderen Spezies gewonnen, als das zu untersuchende Gewebe. Da in dieser Studie menschliches Gewebe untersucht wurde, stammten die verwendeten primären AK aus Kaninchen, Ratten oder Mäusen. Überschüssige, nicht gebundene AK werden abschließend entfernt. Die genauen Bezeichnungen und Referenzen der verwendeten AK finden sich in Tabelle 4.

In einem zweiten Schritt werden sekundäre AK aufgetragen. Diese binden spezifisch den nicht-variablen Teil der Immunglobuline (Ig) derjenigen Spezies, in welcher die pri-

## 9 Histologische Untersuchungen

mären AK gewonnen wurden. Zudem tragen die sekundären AK ein Enzym, welches später den Farbstoff umsetzen wird. Überschüssige sekundäre AK werden abschließend entfernt.

Als dritter, abschließender Schritt wird ein Farbstoffsubstrat zugegeben. An Stellen der erfolgreichen Bindung von primärem und sekundärem AK wird das Substrat zu einem Farbstoff umgesetzt, der sich lokal an das Gewebe bindet. Nach Entfernen des überschüssigen Substrates verbleibt somit eine spezifische, lokalisierte Färbung.

Die in dieser Studie durchgeführten Färbeprotokolle sind im Folgenden aufgeführt. Sie wichen für einige Antigene im Detail voneinander ab. An den jeweiligen Stellen wird auf die Unterschiede eingegangen.

**Deparaffinisierung** Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zur Deparaffinisierung zweimal zehn Minuten in Xylol getaucht. Jeder Schritt der anschließenden Alkoholreihe dauerte drei Minuten: 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol. Die Objektträger wurden daraufhin eine Minute lang in Aq. bidest. auf einem Wipptisch gewaschen.

**Hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung** Die bei der Formalin-Fixierung maskierten Antigene mussten zunächst der Färbung zugänglich gemacht werden. Für diese Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger in speziellen Puffern in einem Druckkochtopf gekocht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Protokollschritte angewendet.

Färbungen von CYP11B1, CYP11B2 und CYP17 benötigten eine Kochdauer von 45 Minuten in einfach konzentriertem Tris-EDTA Puffer bei pH 9,0. Der Puffer wurde vor jeder Anwendung frisch aus dem 10x Konzentrat gewonnen. Die Demaskierung der Antigene HSD3B1, HSD3B2, Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2 erforderte 30 minütiges Kochen in Citratpuffer bei pH 6,0.

Nach 20 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Objektträger aus dem Demaskierungs-Puffer genommen und auf einem Wipptisch dreimal fünf Minuten in TBST-Puffer gewaschen.

**Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität** Um eine unspezifische Färbung der Gewebe zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase gehemmt. Dies erfolgte durch Überdecken der Gewebeschnitte mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol über 10 Minuten. Die Objektträger lagen dabei in einer dunklen Feuchtekammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut auf einem Wipptisch dreimal fünf Minuten in TBST-Puffer gewaschen.

**Blocken unspezifischer Epitope** Durch Inkubation der Gewebeschnitte mit einem Serum-Puffer wurde die unspezifische Bindung der primären AK zusätzlich unterdrückt. Dieser Puffer wurde vor jeder Anwendung stets neu gemischt. Bei Färbungen von CYP11-B1 setzte er sich aus 10% Ziegenserum und 10% gepooltem menschlichem AB Serum in PBS zusammen. Bei allen übrigen hier durchgeführten Färbungen wurde 20% menschliches AB Serum in PBS verwendet.

Je nach Größe der Gewebeschnitte wurde mit einer Pipette 50-150µL dieses Block-Puffers aufgetragen und die Objektträger eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Befanden sich mehrere Gewebeschnitte auf einem Objektträger, die unterschiedlich angefärbt werden sollten, so wurden diese vor dem Auftragen des Block-Puffers einzeln mit einem Fettstift umrandet. Dies verhinderte in den späteren Schritten das Zusammenfließen und Vermischen der unterschiedlichen primären und sekundären AK-Lösungen.

**Primäre Antikörper** Die Primären AK wurden in verschiedenen Puffern verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungspuffer sind neben den Verdünnungsfaktoren in Tabelle 4 angegeben. Die AK wurden unmittelbar vor der Applikation verdünnt und die Lösungen während des gesamten Schrittes auf Eis gelagert. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Puffer ohne AK auf die Kontroll-Gewebe appliziert.

Die Objektträger wurden aus der Feuchtekammer genommen und der überschüssige Block-Puffer lediglich abgekippt. Der verbleibende Rest verhinderte das Austrocknen der Gewebeschnitte bis zur Applikation der AK. Je nach Größe der Gewebeschnitte wurden 50-100µL der primären AK-Lösung aufgetragen. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur 60 Minuten in einer dunklen Feuchtekammer inkubiert.

Anschließend wurde die überschüssige AK-Lösung von den Gewebeschnitten gekippt und die Objektträger dreimal fünf Minuten in TBST auf einem Wipptisch gewaschen.

**Sekundäre Antikörper** Je nach Ursprungs-Spezies der primären AK kamen zur Detektion zwei unterschiedliche Systeme zum Einsatz. In beiden Fällen waren die sekundären AK mit Meerrettichperoxidase, engl. „horseradish peroxidase“ (HRP) konjugiert, um eine Farbreaktion mit DAB zu ermöglichen.

Für primäre AK aus der Maus oder dem Kaninchen wurde das „DAKO EnVision™ Detection System“ verwendet, welches die anwendungsbereiten *Lösungen A, B* und *C* enthielt. Nachdem *Lösung A*, welche die sekundären AK enthielt, auf die Schnitte aufge-

## 9 Histologische Untersuchungen

tragen war, wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 30 Minuten in einer dunklen Feuchtekammer inkubiert.

Primäre AK aus der Ratte hingegen, welche allein bei der CYP11B1-Färbung zur Anwendung kamen, wurden mittels sekundärem anti-Ratten-IgG von Thermo Fisher Scientific detektiert. Dieser wurde zunächst 1/2500 in Pierce® Immunostain Enhancer verdünnt und anschließend auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug in diesem Fall bei Raumtemperatur 45 Minuten in einer dunklen Feuchtekammer.

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Objektträger dreimal fünf Minuten in TBST auf einem Wipptisch gewaschen.

**Peroxidase-Substratreaktion** Dieser Schritt wurde in einer dunklen Arbeitsumgebung durchgeführt. Für die Farbreaktion des „DAKO EnVision™ Detection Systems“ wurde *Lösung C* 1/50 in *Lösung B* verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Nach drei Minuten wurde die Farbreaktion gestoppt, indem die Objektträger 5 Minuten auf einem Wipptisch in Leitungswasser gewaschen wurden.

Als Peroxidase Substrat für die CYP11B1-Färbungen wurde das „SIGMAFAST™ DAB System“ verwendet, welches entsprechend Kapitel 7 vorbereitet wurde. Die Farbreaktion wurde hier nach 15 Minuten gestoppt und die Objektträger 5 Minuten auf einem Wipptisch in Leitungswasser gewaschen.

**Kernfärbung und Eindecken** Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden alle Objektträger zehn Sekunden in Aq. bidest. und anschließend drei Minuten in Mayer's Hämalaun getaucht. Das überschüssige Hämalaun wurde unter langsam fließendem Leitungswasser abgewaschen. Um eine intensivere Blaufärbung zu erhalten, wurden die Objektträger anschließend zwei Minuten in PBS auf einem Wipptisch gewaschen.

Nach einem Bad von zehn Sekunden in 100% Ethanol wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten lang in einem Ofen bei 56°C getrocknet. Mit „Permount“ und 55x24mm Deckgläsern wurden die Objektträger abschließend eingedeckt.

### 9.4 Mikroskopie und Analyse der Proteinexpression

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Die Struktur der Adenome, sowie die Verteilung der APA-typischen Zelltypen wurde in HE-Färbungen begutachtet. Für die spätere Auswertung der Proteinexpression wurden mit einer Mikroskop-Kamera Bilder der IHC-Färbungen aufgenommen.

### 9.4.1 Fotografie der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der IHC-Färbungen wurden von jeder Färbung in jedem Adenom fünf repräsentative Ausschnitte bei 400-facher Vergrößerung fotografiert. Die Aufnahme der Fotografien erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit einem Leica DMRB Mikroskop. Hierfür wurden stets identische Einstellungen für Mikroskop und Kamera gewählt.

Am Mikroskop wurde eine Lichtstärke von „7,5“ und eine Apertur von „3“ eingestellt. Der Graufilter wurde nicht eingelegt.

Über die „SPOT Basic“ Software nahm die Kamera die Bilder mit einer Belichtungszeit von 61,559ms auf. Die Werte *Gain* und *Gamma* wurden jeweils auf „1“ gesetzt. Die automatische Farbkorrektur wurde abgeschaltet. Auf jedem Objektträger wurde vor den Aufnahmen ein Weißabgleich über einer gewebefreien Fläche durchgeführt.

### 9.4.2 Semi-Quantitative Analyse der Proteinexpression

Die Intensität der Proteinexpression wurde semi-quantitativ mittels H-Score erhoben, welcher im Folgenden erläutert wird. Die Auswertung der IHC-Färbungen erfolgte dabei computergestützt.

**H-Score** Die histologische Punktzahl, engl. „histological score“ (H-Score) nach Budwit-Novotny und McCarty (Budwit-Novotny et al. 1986) dient der semi-quantitativen Beurteilung der Proteinexpression in einem Gewebeschnitt. In ihn fließen sowohl die Anzahl der gefärbten Zellen im Gewebe, als auch die Intensität der Färbung ein.

Hierfür wird durch einen Betrachter die Intensität  $i$  der immunhistochemischen Färbung in 500 Zellen bewertet. Die Einteilung der Zellen erfolgt in die Kategorien  $i = 0$  (keine spezifische Färbung),  $i = 1$  (schwache Färbung, aber eindeutig von Negativkontrolle abweichend),  $i = 2$  (deutliche Färbung) und  $i = 3$  (starke Färbung). Der H-Score berechnet sich als

$$\text{H-Score} = \sum_{i=1}^3 P_i \cdot (i + 1)$$

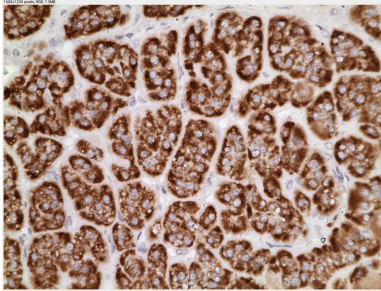
wobei  $P_i$  dem Prozentsatz der Zellen mit der jeweiligen Intensität entspricht. Es ergibt sich somit eine mögliche Punkteskala von 0 – 400.

**Automatisierte Auswertung** In dieser Studie wurde die Auswertung automatisiert durchgeführt. Hierfür wurde die Software „ImageJ“ (Schneider et al. 2012) mit dem Plug-in

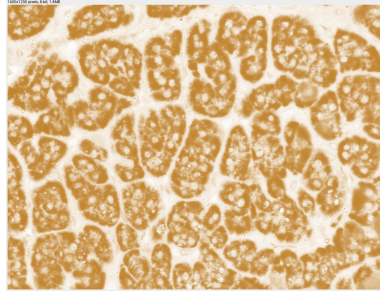


## 9 Histologische Untersuchungen

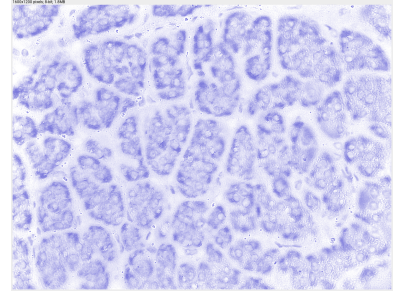
**(a)** Natives Originalbild



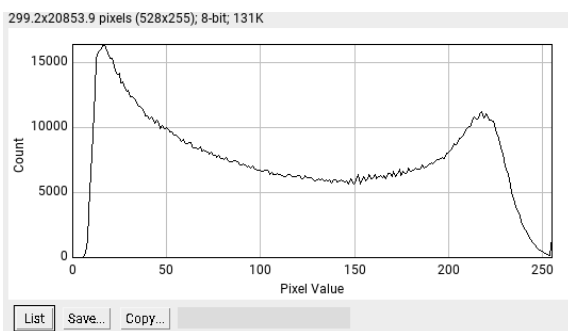
**(b)** DAB-Anteil isoliert



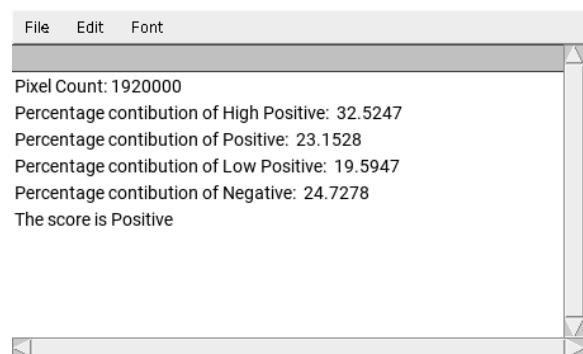
**(c)** Hämalaun-Anteil isoliert



**(d)** Histogramm der Färbeintensität



**(e)** Protokoll-Datei mit prozentualer Verteilung der Intensität in den vier Klassen



**Abbildung 7: Automatisierte Analyse der IHC-Färbungen.** Die Abbildungen zeigen die Arbeitsschritte der automatisierten Analyse der immunhistochemischen Färbungen in Form von exemplarischen Bildschirmfotos. **(a)** Das Originalbild (eigene Aufnahme) eines mit DAB gefärbten Gewebeschnittes wurde in das „ImageJ“-Plug-in „IHC Profiler“ geladen. **(b,c)** Durch Farbdekonvolution wurden die Farbvektoren von DAB und Hämatoxylin isoliert. **(d)** Anschließend analysierte „IHC Profiler“ die Helligkeitswerte jedes Pixels im DAB-Anteil und trug diese in einem Histogramm auf. **(e)** Die Protokoll-Datei gab die prozentuale Verteilung der Pixel auf die Intensitäts-Kategorien aus, welche in Tabelle 7 spezifiziert sind.

**Tabelle 7: Klassifikation der Intensität der Immunexpression.** Je nach berechnetem Pixel-Wert durch das Plug-in „IHC Profiler“, wurde der jeweilige Bildpunkt einer Intensitäts-Kategorie zugeteilt. Ein niedriger Pixel-Wert entsprach einer höheren Färbeintensität.

Pixel-Wertebereich	Intensität	Kategorie <i>i</i>
181–235	keine spezifische Färbung	0
121–180	schwache Färbung	1
61–120	deutliche Färbung	2
0–60	starke Färbung	3

## 9 Histologische Untersuchungen

„IHC Profiler“ (Varghese et al. 2014) verwendet. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Arbeitsschritte mit dem „IHC Profiler“.

Die fünf repräsentativen Bilder jeder Färbung eines Adenoms wurden nacheinander in „ImageJ“ geladen. Jedes Bild wurde mit dem „IHC Profiler“ im Modus für zytoplasmatische Färbungen bewertet („Cytoplasmic Stained Image“). Als Farbvektor wurde „H DAB“ gewählt.

Mit diesen Einstellungen wird das Farbspektrum der DAB Färbung mittels Dekonvolution isoliert und deren Intensität in jedem Bildpunkt gemessen. Jeder Pixel erhält einen Wert zwischen 0 (dunkelste mögliche Färbung) und 255 (leichteste mögliche/keine Färbung). Tabelle 7 listet die Intensitäts-Intervalle und die zugehörige H-Score-Kategorie auf.

„IHC Profiler“ gibt in einer Protokoll-Datei die prozentuale Verteilung aller Pixel des analysierten Bildes auf die vier Kategorien aus. Diese Prozentwerte wurden zur Ermittlung des H-Scores in die oben genannte Formel eingesetzt.  $P_i$  entspricht hierbei jedoch nicht der Verteilung der Zellen, sondern dem Anteil der Bildpunkte in der jeweiligen Kategorie  $i$ .

Auf diese Weise wurde für jedes der fünf Bilder eines Adenoms ein H-Score berechnet. Der Mittelwert dieser fünf Bilder wurde als repräsentativer Wert für die Immunoexpression der Färbung in einem Adenom verwendet.

## 10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software „R“ (R Core Team 2015, Version 3.3.1) und den Erweiterungs-Paketen „reshape2“ (Wickham 2007, Version 1.4.1), „gmodels“ (Warnes et al. 2015, Version 2.16.2), „Hmisc“ (Harrell Jr. et al. 2016, Version 4.0-2) und „psych“ (Revelle 2016, Version 1.6.4). Diagramme und Schemazeichnungen wurden ebenfalls mit „R“ und den Paketen „gplots“ (Warnes et al. 2016, Version 3.0.1), „ggplot2“ (Wickham 2009, Version 2.1.0), sowie mit der Software „Inkscape“ (Albert et al. 2015, Version 0.91) erstellt.

Messwerte wurden mittels Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung untersucht. Normalverteilte Messwerte wurden im Folgenden durch den Mittelwert (MW) und die Standardabweichung, engl. „standard deviation“ (SD) in der Form „MW  $\pm$  SD“ angegeben. Konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, so wurde der Median und der Interquartilenabstand (IQA) in der Form „Median (IQA)“ angegeben. Korrelationen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman  $\rho_s$  berechnet.

Zur Testung nominalskaliertter Merkmale kamen je nach Stichprobengröße der  $\chi^2$ -Test oder der Exakte Test nach Fisher zum Einsatz.

Zwei Gruppen von intervallskalierten Variablen wurden bei Normalverteilung mit dem t-Test verglichen, ansonsten mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung eine Varianzanalyse, engl. „Analysis of Variance“ (ANOVA) und bei nicht-normal verteilten Werten die Rangsummen mittels Kruskal-Wallis-Test getestet. Kam es hierbei zu signifikanten Abweichungen der Mittelwerte oder Rangsummen, folgte eine paarweise Testung der Gruppen mittels t-Test oder Mann-Whitney-U-Test. Bei multipler, paarweiser Testung eines Merkmals oder mehrerer Untergruppen miteinander wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt.

$p$ -Werte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf 3 gültige Ziffern oder maximal 4 Nachkommastellen gerundet. Werte kleiner als 0,0001 wurden als  $p < 0,0001$  angegeben.

Zur Untersuchung der Prädiktoren für den Therapieerfolg wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, welche hier in kurzer Form erläutert werden soll.<sup>1</sup> Hierbei wird der Einfluss von Prädiktorvariablen  $x_1, \dots, x_n$  auf eine Zielvariable  $y$  untersucht. Die binomiale Zielvariable  $y$  kann die Werte 0 und 1 annehmen.  $p$  sei die Wahrscheinlichkeit

---

<sup>1</sup>Für Details sei auf Standardwerke der Statistik verwiesen.

## 10 Statistische Auswertung

( $P$ ), dass  $y$  den Wert 1 annimmt, es gilt also:

$$p = P(y = 1) \quad (1)$$

Hieraus ergibt sich die Quote, engl. *Odds*, als

$$\text{Odds} = \frac{p}{1-p} \quad (2)$$

Die logistische Regressionsfunktion stellt sich dann als linearer Zusammenhang zwischen dem Logit, dem natürlichen Logarithmus der *Odds* und den Prädiktorvariablen  $x_i$  mit den jeweiligen Koeffizienten  $\beta_i$  dar:

$$\text{Logit} = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n \quad (3)$$

Durch Exponentierung erhält man Gleichung 4. Nach Umstellung wie in Gleichung 5 ergeben sich die *Odds* eines Ereignisses in Gleichung 6 als Produkt der Faktoren  $(e^{\beta_i})^{x_i}$ .

$$\frac{p}{1-p} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + [\dots] + \beta_n x_n} \quad (4)$$

$$\frac{p}{1-p} = e^{\beta_0} \cdot e^{\beta_1 \cdot x_1} \cdot [\dots] \cdot e^{\beta_n \cdot x_n} \quad (5)$$

$$\frac{p}{1-p} = e^{\beta_0} \cdot (e^{\beta_1})^{x_1} \cdot [\dots] \cdot (e^{\beta_n})^{x_n} \quad (6)$$

Aus diesem Produkt geht hervor, dass für jede Erhöhung einer Prädiktorvariable  $x_i$  um eine Einheit die *Odds* mit dem Effektkoeffizienten  $e^{\beta_i}$  multipliziert werden. Da es sich hierbei um eine Multiplikation handelt, werden die Effektkoeffizienten auch als Risikofaktoren bezeichnet.

In anderen Worten werden die *Odds* durch die Risikofaktoren zu den ursprünglichen *Odds* in ein Verhältnis gesetzt, es ergibt sich also ein Quotenverhältnis, engl. „Odds ratio“ (OR). In Abschnitt 14.4 wurden diese OR für die jeweiligen Risikofaktoren angegeben.

# **Teil III**

## **Ergebnisse**

# 11 Charakterisierung der Patienten

In diese Studie wurden 121 Patienten eingeschlossen, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben sind. Neben der Geschlechter- und Altersverteilung wurden klinische und biochemische Parameter vor der OP beschrieben. Dazu wird an einigen Stellen Bezug auf den Genotyp der untersuchten APAs genommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Verteilung der Genotypen selbst nicht vorgezogen, sondern findet sich in Abschnitt 12.1.

## 11.1 Geschlechterverteilung

Die 121 Patienten teilten sich in 50 Frauen (41, 3%) und 71 Männer (58, 7%). Die Verteilung der Geschlechter ist in Abbildung 8a abgebildet.

Nach Fishers Exaktem Test wich die beobachtete Verteilung der Geschlechter über die Genotypen stark von den erwarteten Häufigkeiten ab ( $p < 0,0001$ ). Wie in Abbildung 8b ersichtlich ist, waren in den meisten Genotyp-Gruppen mehrheitlich Männer betroffen. Mutationen in *KCNJ5* fanden sich jedoch häufiger bei weiblichen Patienten. Ebenso waren beide Patienten mit *PRKACA*-Mutation weiblich.

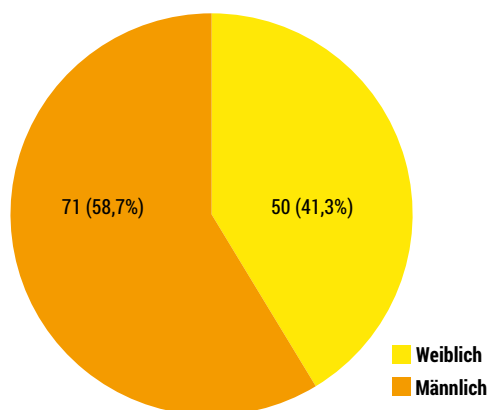
## 11.2 Altersverteilungen

Bei den Patienten wurde das Alter bei Erstdiagnose (ED) des Bluthochdruck (BHD), sowie das Alter zum Zeitpunkt der unilateralen Adrenalektomie erhoben. Die Differenz zwischen diesen Zeitpunkten stellte die Dauer des Bluthochdrucks vor Operation dar. Alle drei Größen wurden im Folgenden genauer betrachtet.

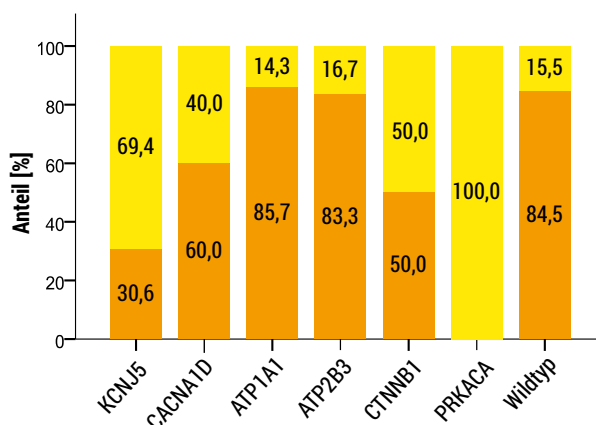
Für vier OP-Präparate waren lediglich grundlegende Daten wie Geschlecht und Geburtsdatum verfügbar. Ein exaktes OP-Datum war weder aus der Labor- noch aus der Klinik-Datenbank eruierbar. Das Alter bei Adrenalektomie konnte daher lediglich bei 117 Patienten analysiert werden. Bei einem weiteren Patienten war kein Alter bei Erstdiagnose des BHD erhoben worden. Entsprechend konnte bei insgesamt fünf Patienten weder das Alter bei Erstdiagnose, noch die Erkrankungsdauer des BHD untersucht werden.

## 11 Charakterisierung der Patienten

(a) Gesamte Kohorte



(b) Aufteilung nach Genotypen



**Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter gesamt und nach Genotyp.** (a) Unter den 121 eingeschlossenen Patienten befanden sich 50 Frauen (41,3%) sowie 71 Männer (58,7%). (b) Die Verteilung der Geschlechter über die Genotypen ist voneinander nicht unabhängig ( $p < 0,0001$ ). Mutationen in *KCNJ5* und *PRKACA* fanden sich überwiegend in APAs weiblicher Patienten. *CTNNB1*-Mutationen waren gleich verteilt. Mutationen in *CACNA1D*, den ATPasen, sowie in Wildtyp APAs fanden sich häufiger in APAs männlicher Patienten. ( $n = 121$ )

Die Werte der übrigen Kohorte sind im Folgenden beschrieben. Darstellungen der Alterswerte finden sich in Abbildung 9 und Abbildung 10. Altersvergleiche zwischen Geschlechtern und Genotypen finden sich in Tabelle 8 und Tabelle 9 respektive.

**Alter bei Erstdiagnose des Bluthochdrucks** Das Alter der Patienten bei ED des Bluthochdrucks erstreckte sich von 15 bis 68 Jahre. Es konnte von einer Normalverteilung um den MW 39,7 Jahre mit einer SD von 9,6 Jahren ausgegangen werden. Abbildung 9a

**Tabelle 8: Altersverteilung der Patienten gesamt und nach Geschlecht.**

In dieser Tabelle wurden die Altersverteilungen bei ED des Bluthochdrucks sowie zum Zeitpunkt der OP aufgeführt. Zudem ist die Dauer der Erkrankung an Bluthochdruck von ED bis OP angegeben. Die Werte wurden zudem zwischen den Geschlechtern verglichen. Hierbei zeigte sich, dass bei Frauen der BHD früher diagnostiziert wurde und ebenso die Adrenalektomie früher durchgeführt wurde. Die Werte sind als Median (IQA) beziehungsweise Mittelwert  $\pm$  SD angegeben.

Alter	Gesamt [Jahre]	Nach Geschlecht [Jahre]		
		weiblich	männlich	p
ED	39,7 $\pm$ 9,6	36,9 $\pm$ 8,0	41,6 $\pm$ 10,2	<b>0,0060</b>
Adrenalektomie	51 (17)	45 (17)	55,5 (13,3)	<b>0,0002</b>
Dauer BHD	9,5 (13,3)	8,5 (12,3)	11 (16)	0,0748

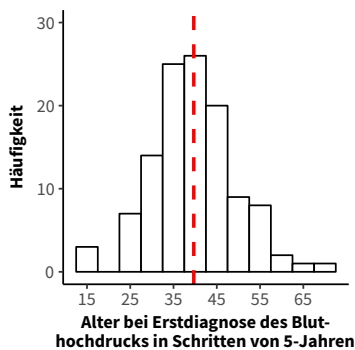
## 11 Charakterisierung der Patienten

**Tabelle 9: Altersverteilung der Patienten nach Genotyp.** In dieser Tabelle wurden die Altersverteilungen bei ED des Bluthochdrucks sowie zum Zeitpunkt der OP aufgeführt. Zudem ist die Dauer der Erkrankung an Bluthochdruck von ED bis OP angegeben. Die Werte wurden zudem zwischen den Genotypen der APAs verglichen. Vergleiche über alle Gruppen hinweg zeigten signifikante Abweichungen der Rangsummen (rechte Spalte) beim Alter bei Adrenalectomie. Anschließende paarweise Vergleiche ergaben, dass Patienten mit einer Mutation in *KCNJ5* deutlich früher operiert wurden, als Patienten ohne nachgewiesene Mutation im APA. Die Werte sind als Median (IQA) beziehungsweise Mittelwert  $\pm$  SD angegeben. Die p-Werte in der rechten Spalte wurden mittels ANOVA bzw. Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

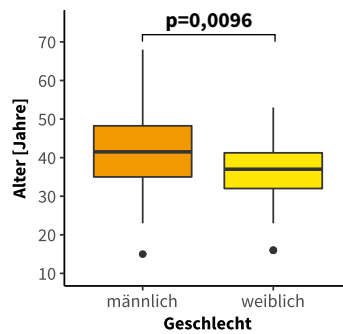
Alter	Gesamt [Jahre]	Nach Genotyp [Jahre]							p
		<i>KCNJ5</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CTN-NB1</i>	<i>PRK-ACA</i>	Wildtyp	
ED	39,7 $\pm$ 9,6	38,3 $\pm$ 7,5	36 $\pm$ 8,0	42,3 $\pm$ 8,8	40,8 $\pm$ 7,0	30,5 $\pm$ 10,6	33 $\pm$ 1,4	42,1 $\pm$ 11,8	0,220
Adrenalectomie	51 (17)	47 (15,5) ‡	49 (16)	56,5 (14,3)	55 (5,8)	44 (17)	41,5 (9,5)	58 (17) ‡	<b>0,0197</b>
Dauer BHD	9,5 (13,3)	6 (12,5)	12,5 (7,5)	4,5 (13,8)	12,5 (6)	13,5 (9,5)	8,5 (8,5)	11 (16,3)	0,340

‡ – In paarweisen Vergleichen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen *KCNJ5*-mutierten und Wildtyp APAs ( $p = 0,0097$ ).

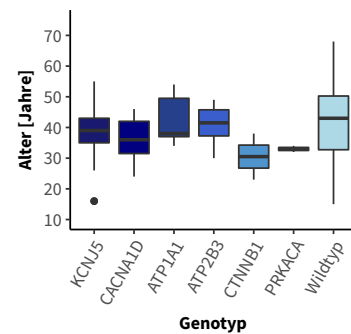
**(a)** Altersverteilung aller Patienten



**(b)** Vergleich weiblicher und männlicher Patienten



**(c)** Vergleich der Genotypen

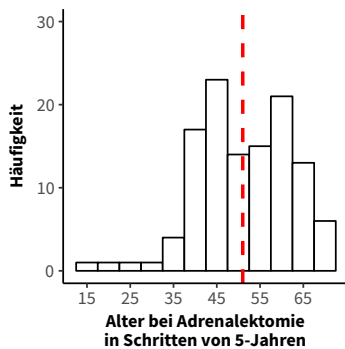


**Abbildung 9: Altersverteilung bei ED des Bluthochdrucks.** (a) Das Alter der Patienten bei ED des Bluthochdrucks lag normalverteilt um den MW 39,7 Jahre (rote Markierung) mit einer SD von 9,6 Jahren. (b) Frauen waren mit  $36,9 \pm 8,0$  Jahren signifikant jünger als Männer mit  $41,6 \pm 10,2$  Jahren ( $p = 0,0096$ ). (c) Das mittlere Alter bei ED schwankte zwar zwischen den Genotypen, die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

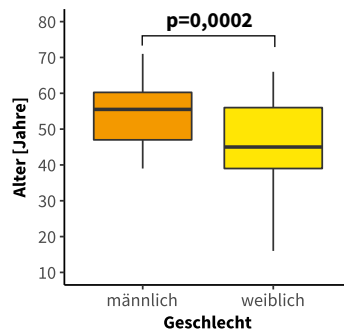


## 11 Charakterisierung der Patienten

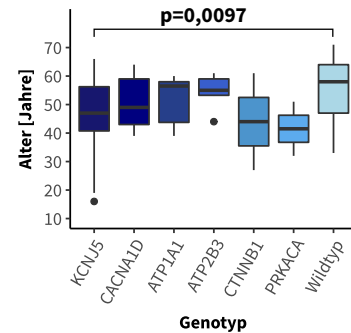
**(a)** Altersverteilung aller Patienten



**(b)** Vergleich weiblicher und männlicher Patienten



**(c)** Vergleich der Genotypen



**Abbildung 10: Altersverteilung bei Adrenalektomie.** **(a)** Das Alter der Patienten bei Adrenalektomie war nicht normalverteilt. Der Median lag bei 51 (IQA 17) Jahren (rote Markierung). **(b)** Frauen waren mit 45 (IQA 17) Jahren signifikant jünger als Männer mit 55,5 (IQA 13,3) Jahren ( $p = 0,0002$ ). **(c)** Alle Genotypen unterschieden sich in den Rangsummen ( $p = 0,0197$ ). Das Adrenalektomie-Alter der Patienten mit *KCNJ5*-Mutation war signifikant niedriger, als bei Wildtyp-APAs ( $p = 0,0097$ ).

zeigt die Altersverteilung in 5-Jahresschritten. Frauen waren mit  $36,9 \pm 8,0$  Jahren signifikant jünger als Männer mit  $41,6 \pm 10,2$  ( $p = 0,0096$ , Abbildung 9b). Beim Vergleich der Genotypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten ( $p = 0,220$ , Abbildung 9c).

**Alter bei Adrenalektomie** Das Alter zum Zeitpunkt der Adrenalektomie variierte zwischen 16 und 71 Jahren und war nicht normalverteilt. Der Median lag bei 51 (IQA 17) Jahren. Abbildung 10a zeigt die Verteilung in 5-Jahresschritten. Auch für die Adrenalektomie lag der Median bei Frauen mit 45 (IQA 17) Jahren signifikant früher, als bei Männern mit 55,5 (IQA 13,3) Jahren ( $p = 0,0002$ , Abbildung 10b). Ein Vergleich aller Genotypen zeigte eine signifikante Abweichung der Rangsummen ( $p = 0,0197$ ). In einer anschließenden paarweisen Testung zeigte sich, dass Patienten mit einer *KCNJ5*-Mutation signifikant früher operiert wurden, als Patienten ohne somatische Mutation (Wildtyp) ( $p = 0,0097$ , Abbildung 10c).

**Erkrankungsdauer des Bluthochdrucks** Die Dauer des Bluthochdrucks vor der Operation bewegte sich zwischen 0 und 44 Jahren. Die Erkrankungsdauer war nicht normalverteilt und betrug im Median 9,5 (IQA 13,3) Jahre. Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen Frauen und Männern, noch zwischen den Genotypen.

## 11 Charakterisierung der Patienten

**Tabelle 10: Präoperative klinische und biochemische Parameter in der Studien-Kohorte.** Es sind die medianen Werte der gesamten Kohorte und nach Geschlechtern getrennt angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern fanden sich bei der Renin-Konzentration, dem ARQ, dem  $RR_{sys}$ , der Menge an aHTM und dem BMI. Die Werte sind als Median (IQA) beziehungsweise Mittelwert  $\pm$  SD angegeben. Die jeweiligen Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.

Parameter	n aus 108	Gesamte Kohorte	Nach Geschlecht		
			weiblich	männlich	p-Wert
PAC [ng / L]	108	253,5 (287,75)	266 (225)	241 (301)	0,342
Renin [mU / L]	108	3,8 (5,45)	2,7 (4,3)	4,3 (5,5)	<b>0,0421</b>
ARQ [ng / mU]	108	67,04 (122,95)	102 (137,3)	48,7 (83,5)	<b>0,0428</b>
$K_s^+$ [mmol / L]	99	2,8 (0,6)	2,8 (0,4)	2,8 (0,6)	0,955
$RR_{sys}$ [mmHg]	108	148,4 (23,6)	144,0 (17,8)	155,3 (28,3)	<b>0,0041</b>
$RR_{dia}$ [mmHg]	108	104,7 $\pm$ 15,8	103,7 $\pm$ 18,4	105,4 $\pm$ 13,7	0,597
aHTM [DDD]	86	3,00 (3,17)	2 (2,36)	4 (3,50)	<b>0,0117</b>
LI	104	13,8 (30,1)	17,0 (35,1)	13,6 (25,3)	0,662
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	86	27,9 (7,3)	25,5 (6,3)	29,6 (5,8)	<b>0,0003</b>

### 11.3 Präoperative klinische und laborchemische Parameter

Bei 108 der eingeschlossenen Patienten lagen präoperative klinische und biochemische Daten vor. Diese wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Dort finden sich zudem die medianen Werte im Vergleich zwischen den Geschlechtern. Die Auswirkung des Genotyps auf die präoperativen klinischen und biochemischen Werte wurde im Abschnitt 13.1 über die funktionelle Charakterisierung der Tumoren untersucht.

Im Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte sich, dass Frauen im Median einen höheren PAC-Spiegel aufwiesen ( $p = 0,342$ ) und zugleich signifikant niedrigere Renin-Werte hatten ( $p = 0,0421$ ). Hieraus resultierten im Median etwa doppelt so hohe ARQ-Werte, wie bei Männern ( $p = 0,0428$ ). Ein weiterer, deutlicher Unterschied zeigte sich beim  $RR_{sys}$ . Hier wiesen männliche Patienten signifikant höhere Werte auf, als Frauen ( $p = 0,0068$ ). Die Menge der täglich benötigten aHTM, gemessen in DDD lag bei Frauen signifikant niedriger, als bei Männern ( $p = 0,0117$ ). Ebenso wiesen Frauen einen signifikant niedrigeren Körpermassenindex, engl. „body mass index“ (BMI) auf ( $p = 0,0003$ ).

## 11.4 Vergleich der Sub-Kohorten

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben ergaben sich hinsichtlich der verfügbaren Daten Sub-Kohorten, die für die einzelnen Fragestellungen zur Auswertung herangezogen wurden. Diese Sub-Kohorten wiesen zur gesamten Kohorte keine signifikanten Abweichungen bei der Alters- und Geschlechterverteilung auf.

Ebenfalls die klinischen Parameter, welche für die spätere Faktorenanalyse des Therapieerfolges relevant waren, unterschieden sich nicht signifikant voneinander zwischen den beiden Sub-Kohorten. Die jeweiligen Charakteristika der Kohorte und der Sub-Kohorten sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11: Vergleich der Sub-Kohorten.** Die Patienten der beiden Sub-Kohorten, die für einige der Auswertungen herangezogen wurden, wichen in ihren Grundeigenschaften wie Alter und Geschlechterverteilung nicht signifikant von den Werten der gesamten Kohorte ab. In den klinischen Parametern, die für die spätere Faktorenanalyse relevant sind, wichen die beiden Sub-Kohorten nicht signifikant voneinander ab. Die Altersangaben und klinischen Parameter sind als Median angegeben.

Parameter	Gesamte Kohorte	Klinische Daten komplett	Klinische und IHC-Daten komplett
n	121	82	49
Alter bei ED [Jahre]	39,0	39,0	39,0
Alter bei Adrenalektomie [Jahre]	51,0	52,0	51,0
Anteil männlicher Patienten [%]	58,7	54,9	57,1
RR <sub>sys</sub> [mmHg]		145,75	145,75
RR <sub>dia</sub> [mmHg]		105,50	105,50
ARQ [ng/mU]		68,32	75,83
aHTM [DDD]		3,00	3,00
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]		27,93	28,34
Genotyp			
<i>KCNJ5</i> [%]	40,5	43,9	42,9
<i>CACNA1D</i> [%]	8,3	6,1	8,2
<i>ATP1A1</i> [%]	5,8	4,9	8,2
<i>ATP2B3</i> [%]	5,0	2,4	4,1
<i>CTNNB1</i> [%]	1,7	1,2	2,0
<i>PRKACA</i> [%]	1,7	2,4	4,1
Wildtyp [%]	37,2	39,0	30,6

## 12 Charakterisierung der Tumoren

Die Charakterisierung der Tumoren schloss die Genotypisierung, die histopathologische Untersuchung und die immunhistochemische Expressionsanalyse ein. Diese drei Punkte werden in diesem Kapitel besprochen.

### 12.1 Genotyp

Am häufigsten fanden sich somatische Mutationen im Gen *KCNJ5*, das in 49 Adenomen betroffen war (40, 5%). 10 Adenome (8, 3%) bargen somatische Mutationen in *CACNA1D*, 7 Adenome (5, 8%) in *ATP1A1*, 6 Adenome (5, 0%) in *ATP2B3*, sowie jeweils zwei Adenome (1, 7%) in *CTNNB1* und *PRKACA*. In 45 Adenomen (37, 2%) fanden sich keine Mutationen in den bisher beschriebenen Genen. Diese werden in dieser Arbeit als Wildtyp bezeichnet. Abbildung 11 zeigt die Verteilung der Genotypen.

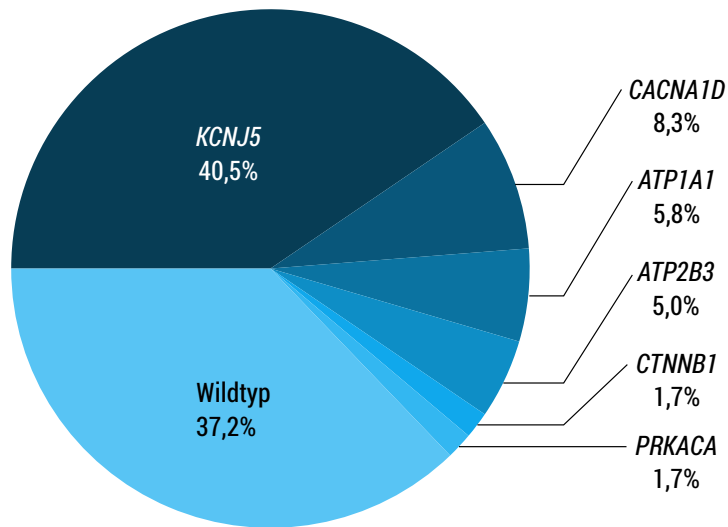
Ein APA wies sowohl eine Mutation in *CACNA1D*, als auch in *CTNNB1* auf. Zum Beginn der Studiendurchführung zählte die *CTNNB1*-Mutation nicht zu den bekannten somatischen Mutationen, welche in die Aldosteron-Regulierung und die Pathogenese der APA-Entstehung eingreifen. Aus diesem Grund wurde die *CACNA1D*-Mutation als ausschlaggebend betrachtet und das betreffende Gewebe dieser Genotyp-Gruppe zugeordnet. Für die beiden APAs, welche ausschließlich Mutationen in *CTNNB1* aufwiesen, wurde eine eigene Gruppe gebildet.

Obwohl Männer insgesamt häufiger von APAs betroffen waren, fanden sich *KCNJ5*- und *PRKACA*-mutierte Adenome häufiger bei weiblichen Patienten. Die Verteilung der Geschlechter über die Genotypen kann – wie in Abschnitt 11.1 bereits erwähnt – als nicht unabhängig voneinander angenommen werden ( $p < 0,0001$ ). Die Verteilung der Geschlechter auf die jeweiligen Genotypen zeigt Abbildung 8b.

### 12.2 Histopathologische Charakterisierung

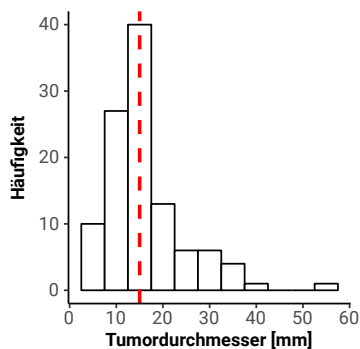
In der histopathologischen Charakterisierung wurden die Tumorgöße und die zelluläre Zusammensetzung der Adenome untersucht.

## 12 Charakterisierung der Tumoren

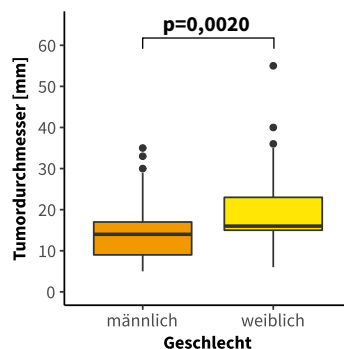


**Abbildung 11: Häufigkeiten der Genotypen in 121 APAs.** Nahezu zwei Drittel der Gewebe wiesen somatische Mutationen auf. Das Gen *KCNJ5* war mit 40,5% am häufigsten betroffen. Dem folgten *CACNA1D* (8,3%), *ATP1A1* (5,8%), *ATP2B3* (5,0%), *CTNNB1* (1,7%) und *PRKACA* (1,7%). 37,2% der Gewebe wiesen keine Mutation in den untersuchten Genen auf.

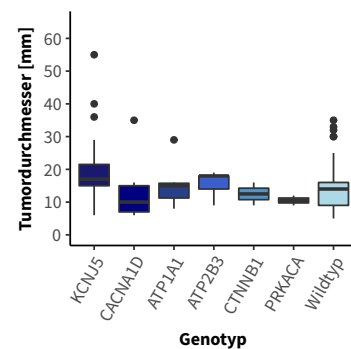
**(a) Häufigkeitsverteilung des Tumordurchmessers**



**(b) Vergleich weiblicher und männlicher Patienten**



**(c) Vergleich der Genotypen**



**Abbildung 12: Verteilung des Tumordurchmessers.** (a) Häufigkeitsverteilung des Tumordurchmessers aus 108 Geweben. Die rote Linie gibt den Median von 15 mm an. (b) Die Tumorgöße war bei Frauen signifikant größer als bei Männern ( $p = 0,0020$ ). (c) Die Verteilung der Tumorgöße nach Genotypen aufgespalten zeigt eine Schwankung zwischen den Gruppen. Nach Kruskal-Wallis weichen die Rangsummen signifikant voneinander ab ( $p = 0,0169$ ). In paarweisen Testungen zeigte sich lediglich ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen *KCNJ5*-mutierten Adenomen und Wildtyp-Adenomen ( $p = 0,0567$ ).

## 12 Charakterisierung der Tumoren

**Tumorgröße** Bei 108 Patienten konnte dem Pathologiebericht eine Angabe über den Durchmesser des Adenoms entnommen werden. Die Spanne der Durchmesser reichte von 5 mm bis 55 mm. Der Median lag bei 15 mm mit einem IQA von 8 mm. Abbildung 12 zeigt die Verteilung der Tumordurchmesser in der gesamten Kohorte und im Vergleich zwischen den Geschlechtern und Genotypen.

Weibliche Patienten hatten mit 16 (IQA 8) mm Durchmesser signifikant größere Tumoren, als männliche Patienten mit 14 (IQA 8) mm ( $p = 0,0020$ ). Zwischen den Genotypen zeigten sich signifikante Unterschiede der Rangsummen ( $p = 0,0169$ ). In paarweisen Testungen zeigte sich ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen *KCNJ5*-mutierten Adenomen und Wildtyp-Adenomen ( $p = 0,0567$ ).

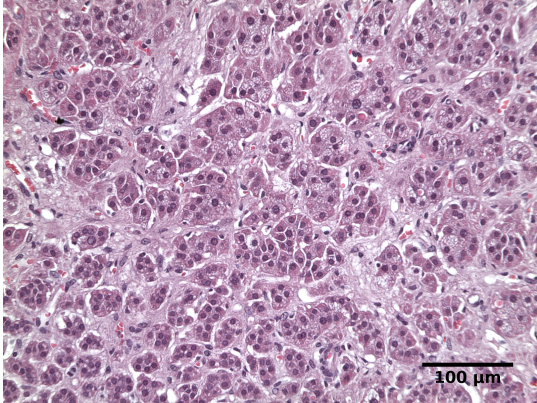
**Histomorphologie** Mithilfe der HE-Färbungen wurde die histomorphologische Zusammensetzung der Adenome analysiert. Gewebe, deren Zusammensetzung unter mikroskopischer Betrachtung zu mehr als 75% aus *ZF*-ähnlichen Zellen bestanden, wurden in die Kategorie „AZF“ eingeteilt. Analog wurden Gewebe mit mehr als 75% *ZG*-ähnlichen Zellen als „AZG“ klassifiziert. Alle übrigen Gewebe mit annähernd gleichen Anteilen der beiden Zelltypen wurden als „ABZ“ bezeichnet.

Bei 78 Geweben ließ sich die Histomorphologie auf diese Weise eindeutig klassifizieren. Davon waren 12 in der Gruppe AZG, 21 in der Gruppe AZF und 38 Gewebe in der Gruppe ABZ. Einen Überblick über die Zelltypen sowie die Verteilung der Adenome gibt Abbildung 13.

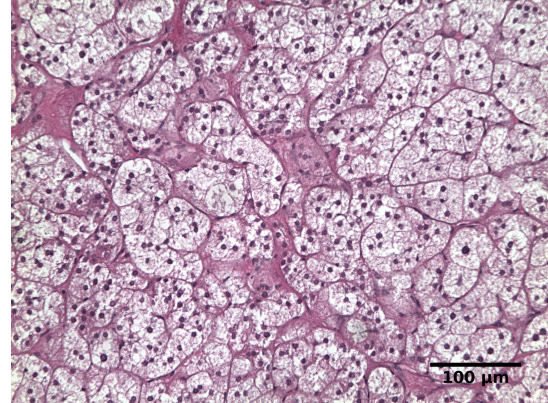
Sowohl das Geschlecht der Patienten, als auch der zugrundeliegende Genotyp schießen einen Einfluss auf die Histomorphologie zu haben. Beim Vergleich der Verteilung des prädominanten Zelltyps zwischen den Geschlechtern und zwischen den Genotypen wichen die beobachteten Häufigkeiten signifikant von den erwarteten ab ( $p = 0,0020$  und  $p = 0,0008$  respektive). Die Verteilungen sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 zu finden.

## 12 Charakterisierung der Tumoren

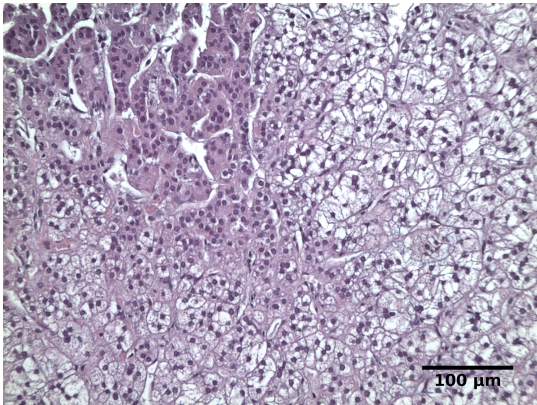
**(a)** Adenom mit überwiegend *Zona glomerulosa*-ähnlichen Zellen (AZG).



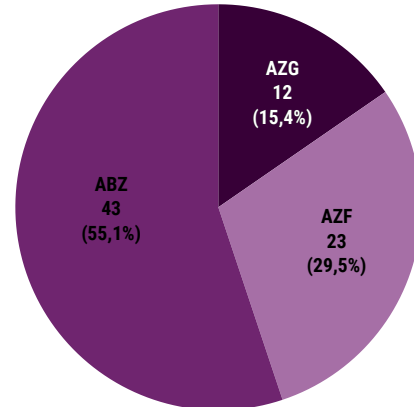
**(b)** Adenom mit überwiegend *Zona fasciculata*-ähnlichen Zellen (AZF).



**(c)** Adenom mit vergleichbaren Anteilen an *Zona glomerulosa*- und *Zona fasciculata*-ähnlichen Zellen (ABZ).



**(d)** Häufigkeiten der Kategorien.



**Abbildung 13: Histomorphologie der untersuchten APAs.** (a)-(c) Die untersuchten Adenome ließen sich anhand ihrer histomorphologischen Eigenschaften in drei Gruppen einteilen, die hier exemplarisch abgebildet sind. HE-Färbung, 200x Vergrößerung. Eigene Aufnahmen. (d) Häufigkeiten der jeweiligen Histomorphologie in 78 Adenomen.

## 12 Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 12: Verteilung des prädominanten Zelltyps zwischen den Geschlechtern.** Die beobachtete Verteilung wich signifikant von der erwarteten ab ( $p = 0,0020$ ). Die meisten APAs wiesen gemischte Zellmorphologien auf. Überwiegend *Zona fasciculata*-ähnliche Zellen wurden häufiger in APAs weiblicher Patienten ausgeprägt, *Zona glomerulosa*-ähnliche Zellen bei männlichen Patienten.

Geschlecht	Prädominanter Zelltyp		
	ABZ	AZF	AZG
weiblich	14	15	1
männlich	29	8	11

**Tabelle 13: Verteilung des prädominanten Zelltyps zwischen den Genotypen.** Die beobachtete Verteilung wich signifikant von der erwarteten ab ( $p = 0,0008$ ). Auffällig ist, dass APAs mit Mutation in *KCNJ5* überwiegend *Zona fasciculata*-ähnliche Zellen aufwiesen, sowie APAs mit Mutation in *CACNA1D* überwiegend *Zona glomerulosa*-ähnliche Zellen.

Genotyp	Prädominanter Zelltyp		
	ABZ	AZF	AZG
<i>ATP1A1</i>	3	0	2
<i>ATP2B3</i>	3	1	1
<i>CACNA1D</i>	2	0	4
<i>CTNNB1</i>	1	0	1
<i>KCNJ5</i>	13	15	0
<i>PRKACA</i>	2	0	0
Wildtyp	19	7	4

### 12.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Tumoren

Exemplarische Färbungen aller Enzyme und Kalziumkanäle sind in Abbildung 14 dargestellt. Einen Überblick über die Intensitäten der sieben Färbungen in den 64 Geweben geben Tabelle 14 und Abbildung 14h. Die H-Score-Werte waren lediglich in den Färbungen von  $Ca_v3.2$  und HSD3B2 normalverteilt.

Im Folgenden wurden zunächst mögliche Assoziationen zwischen den Färbungen analysiert. Anschließend wurde die Verteilung der Immunoexpression zwischen Geschlechtern, Genotypen und histomorphologischen Kategorien verglichen.

#### 12.3.1 Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Färbungen

Alle in dieser Arbeit untersuchten Enzyme sind in den Steroidhormon-Stoffwechsel eingebunden. Daher wurden die Intensitäten der Immunoexpression untereinander auf Korrelationen hin untersucht. Zudem wurde untersucht, ob die Expression der Kalziumkanäle mit denen der Enzyme korrelierten.





## 12 Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 14: Zusammenfassung der Expressionsintensität der immunhistochemischen Färbungen.** Die nebenstehenden Färbungen wurden auf 64 APAs durchgeführt.

Färbung	H-Score				
	Minimum	Median	Mittelwert	Maximum	IQA
CYP11B1	0	2,6	10,1	66,5	12,4
CYP11B2	0,3	154,4	130,1	274,5	154,9
CYP17	0,2	35,4	68,6	278,4	74,0
HSD3B1	0	23,6	46,4	269,2	47,2
HSD3B2	47,8	187,6	186,6	303,1	76,9
Ca <sub>v</sub> 1.3	13,9	100,8	115,6	254,3	118,3
Ca <sub>v</sub> 3.2	16,8	136,3	140,4	277,7	95,5

Es fanden sich hierbei zahlreiche Korrelationen zwischen den Enzymen und den Kanälen, von denen diejenigen im Folgenden aufgeführt sind, welche statistische Signifikanz erreichten. In Tabelle 15 sind neben diesen auch die nicht signifikanten Korrelationen aufgelistet.

CYP11B1 korrelierte positiv mit CYP17 ( $p = 0,0338$ ), HSD3B1 ( $p < 0,0001$ ) und Ca<sub>v</sub>1.3 ( $p = 0,0010$ ). HSD3B1 korrelierte außerdem positiv mit Ca<sub>v</sub>1.3 ( $p = 0,0033$ ) und Ca<sub>v</sub>3.2 ( $p = 0,0008$ ). CYP11B2 korrelierte positiv mit HSD3B2 ( $p = 0,0348$ ) und mit Ca<sub>v</sub>1.3 ( $p = 0,0075$ ).

### 12.3.2 Vergleich der Immunhistochemie zwischen Geschlechtern, Genotypen und prädominanter Histomorphologie

Im Vergleich der einzelnen immunhistochemischen Färbungen zwischen Geschlechtern, Genotypen und der Histomorphologie zeigten sich einige Auffälligkeiten, die im Folgenden im Detail beschrieben werden.

**Vergleich zwischen den Geschlechtern** Der mediane H-Score von CYP17 lag bei Frauen bei 63,3 (IQA 108,5). Männer zeigten hingegen eine niedrigere Expression mit 26 (IQA 65,7). Dieser Unterschied war mit  $p = 0,0403$  signifikant. Keine der anderen hier untersuchten Färbungen zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

**Vergleich zwischen den Genotypen** Zwischen den Genotypen zeigten sich tendenzielle Unterschiede, die in Abbildung 15 dargestellt sind. Für Ca<sub>v</sub>1.3 ergab sich eine signifikante

## 12 Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 15: Korrelationen der immunhistochemischen Färbungen.** Auf Grund der nicht-normalen Verteilung der meisten Färbungen wurde der Rangkorrelationskoeffizient  $\rho_s$  nach Spearman berechnet. Die p-Werte wurden nach Bonferroni korrigiert.

Färbung	CYP11B1	CYP11B2	CYP17	HSD3B1	HSD3B2	Ca <sub>v</sub> 1.3	Ca <sub>v</sub> 3.2
CYP11B1	-	0,101 (p=1,00)	<b>0,386</b> <b>(p=0,0338)</b>	<b>0,616</b> <b>(p&lt;0,0001)</b>	-0,0656 (p=1,00)	<b>0,486</b> <b>(p=0,0010)</b>	0,191 (p=1,00)
CYP11B2		-	-0,0936 (p=1,00)	0,249 (p=1,00)	<b>0,386</b> <b>(p=0,0348)</b>	<b>0,432</b> <b>(p=0,0075)</b>	0,238 (p=1,00)
CYP17			-	0,313 (p=0,245)	-0,106 (p=1,00)	0,194 (p=1,00)	0,339 (p=0,128)
HSD3B1				-	0,241 (p=1,00)	<b>0,455</b> <b>(p=0,0033)</b>	<b>0,491</b> <b>(p=0,0008)</b>
HSD3B2					-	-0,0684 (p=1,00)	0,237 (p=1,00)
Ca <sub>v</sub> 1.3						-	0,204 (p=100)
Ca <sub>v</sub> 3.2							-

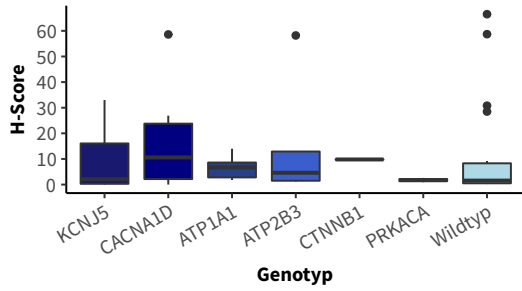
Abweichung der Rangsummen ( $p = 0,0158$ ), paarweise Testungen fanden jedoch keine signifikanten Unterschiede. In den übrigen Färbungen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

**Vergleich zwischen den Zelltypen** Zwischen den Zelltypen zeigten sich signifikante Unterschiede in den Färbungen von CYP11B1, CYP11B2, HSD3B1, Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2. Es fanden sich keine Unterschiede bei HSD3B2 und CYP17. Eine Übersicht gibt Abbildung 16.

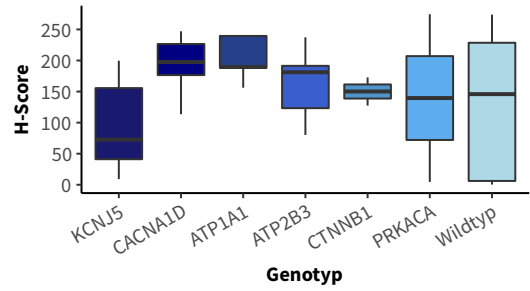
Die Färbungen wurden in paarweisen Vergleichen untersucht. CYP11B1 wurde in ABZs stärker exprimiert, als in AZFs ( $p = 0,0393$ ). CYP11B2 wurde in AZGs stärker exprimiert, als in AZFs ( $p = 0,0097$ ) und als in ABZs ( $p = 0,0001$ ). HSD3B1 wurde in AZFs schwächer ausgeprägt, als in ABZs ( $p = 0,0199$ ). Ca<sub>v</sub>1.3 wurde in AZFs schwächer ausgeprägt, als in ABZs ( $p = 0,0002$ ) und als in AZGs ( $p = 0,0015$ ). Ca<sub>v</sub>3.2 wurde in ABZs stärker exprimiert, als in AZFs ( $p = 0,0243$ ).

## 12 Charakterisierung der Tumoren

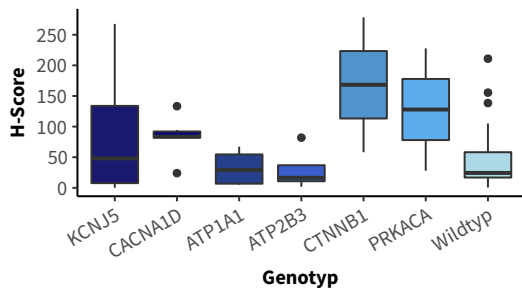
(a) CYP11B1



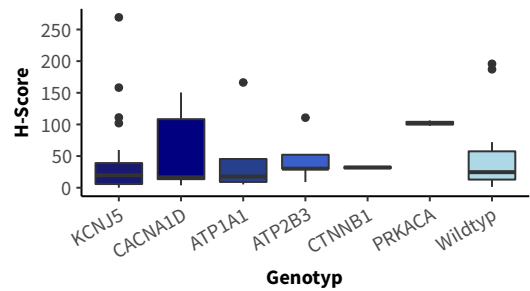
(b) CYP11B2



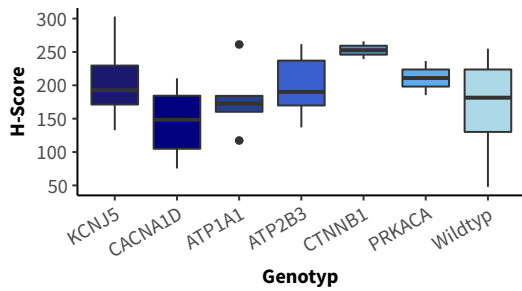
(c) CYP17



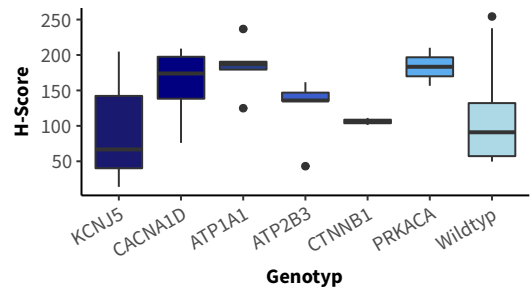
(d) HSD3B1



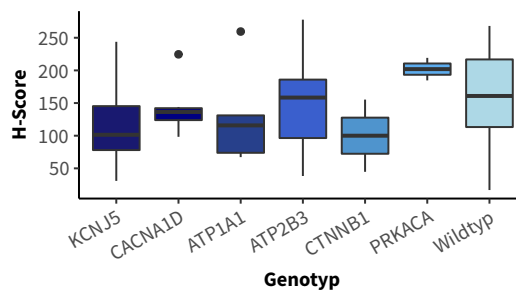
(e) HSD3B2



(f) Ca<sub>v</sub>1.3



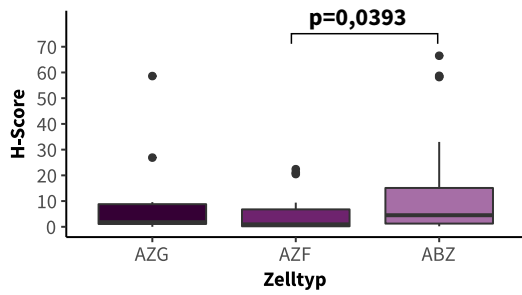
(g) Ca<sub>v</sub>3.2



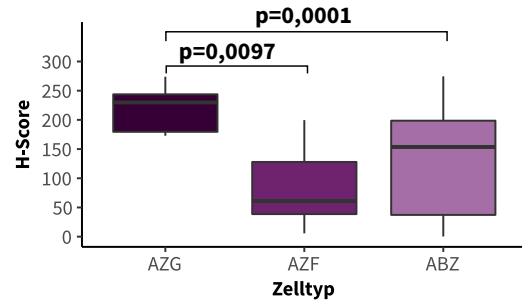
**Abbildung 15: Immunhistochemische Expression von CYP11B1, CYP11B2, CYP17, HSD3B1, HSD3B2, Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2 im Vergleich zwischen den Genotypen.** Zwar zeigen sich tendenzielle Unterschiede in der Expression, jedoch erreichen sie keine statistische Signifikanz. (n = 64)

## 12 Charakterisierung der Tumoren

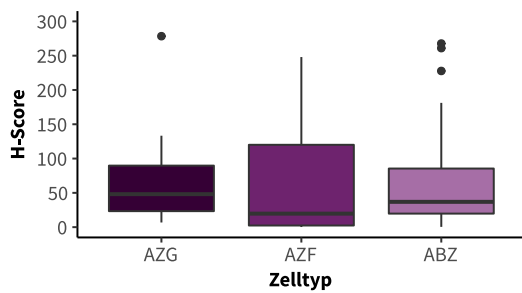
(a) CYP11B1



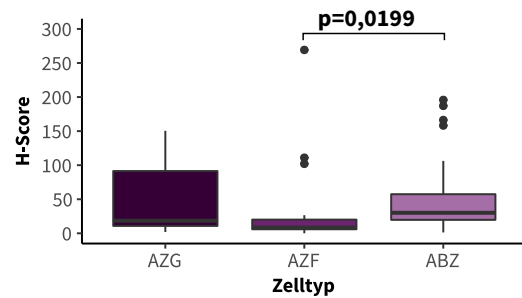
(b) CYP11B2



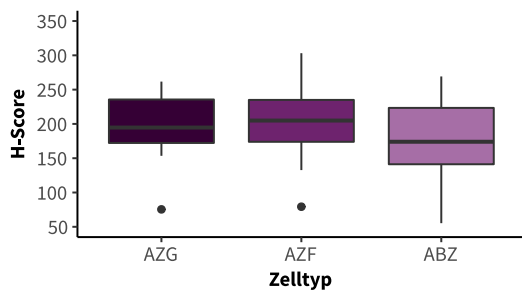
(c) CYP17



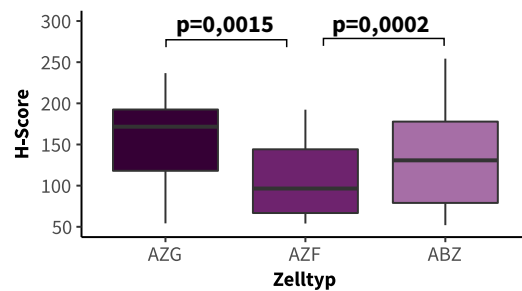
(d) HSD3B1



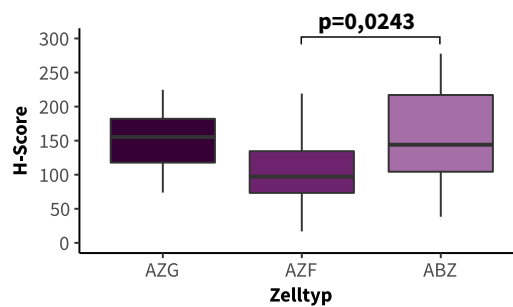
(e) HSD3B2



(f) Ca<sub>v</sub>1.3

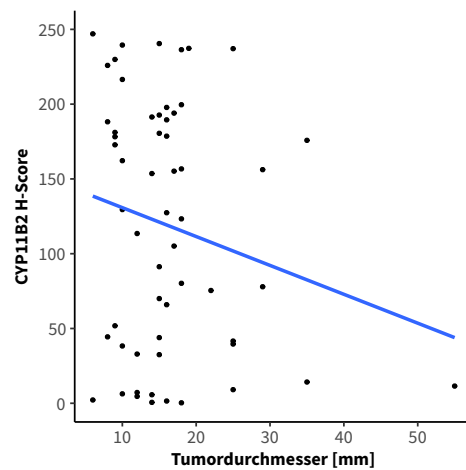


(g) Ca<sub>v</sub>3.2



**Abbildung 16: Immunhistochemische Expression von CYP11B1, CYP11B2, CYP17, HSD3B1, HSD3B2, Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2 im Vergleich zwischen den Zelltypen.** Signifikante Unterschiede sind in den Graphen und in Abschnitt 12.3.2 angegeben. (n = 64)

## 12 Charakterisierung der Tumoren



**Abbildung 17: Korrelation der Aldosteronsynthese-Expression mit dem Tumordurchmesser.** Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der TumorgroÙe und den H-Scores der CYP11B2 ( $\rho_s = -0,326$ ,  $p = 0,0270$ ). ( $n = 46$ )

**Korrelation mit der TumorgroÙe** Die GröÙe der Adenome korrelierte negativ mit der Immunoexpression der CYP11B2. GröÙere Tumoren wiesen somit niedrigere H-Scores auf ( $\rho_s = -0,326$ ,  $p = 0,0270$ ). In Abbildung 17 ist dies dargestellt. Die übrigen Enzyme und Kalziumkanäle zeigten keine signifikanten Korrelationen mit dem Adenomdurchmesser.

## 13 Funktionelle Charakterisierung der Tumoren

In der funktionellen Charakterisierung wurde untersucht, ob der Genotyp, histopathologische Eigenschaften und immunhistochemische Expressionsmuster in den Tumoren mit klinischen oder biochemischen Parametern vor der Operation korrelierten und diese möglicherweise erklären können.

### 13.1 Auswirkung der Genetik auf Klinik und Laborwerte

Vergleicht man die klinischen und biochemischen Parameter zwischen den Genotypen zeigen sich auffällige Abweichungen der Rangsummen (Kruskal-Wallis) bei  $K_s^+$  ( $p = 0,0429$ ), PAC ( $p = 0,0164$ ) und dem ARQ ( $p = 0,0206$ ). Tabelle 16 zeigt eine Auflistung der untersuchten Parameter und Werte nach Genotypen aufgeteilt.

Die mediane  $K_s^+$  war bei Mutationen in *ATP1A1* und *ATP2B3* am niedrigsten und am höchsten bei Mutationen in *CACNA1D* und *CTNNB1*. Der Median der PAC war am höchsten bei Mutationen in *ATP1A1* und *ATP2B3* und am niedrigsten in der Wildtyp-Gruppe. Der mediane ARQ war deutlich erhöht bei Mutationen in *ATP2B3* und am niedrigsten bei Mutationen in *CACNA1D*. Für keinen dieser drei Parameter fanden sich jedoch signifikante Unterschiede in paarweisen Vergleichen zwischen den einzelnen Genotypen.

### 13.2 Auswirkung der Histopathologie auf Klinik und Laborwerte

Zunächst wurde analysiert, ob die Tumorgröße mit einem klinischen oder biochemischen Parameter vor der OP korrelierte. Die Korrelationskoeffizienten und zugehörigen  $p$ -Werte finden sich in Tabelle 17. Lediglich die PAC und der  $RR_{\text{sys}}$  korrelierten signifikant mit der Tumorgröße. Größere Tumoren waren hierbei mit höheren Aldosteronspiegeln im Blut und niedrigeren  $RR_{\text{sys}}$ -Werten assoziiert. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt.

Zudem wurden die klinischen und biochemischen Parameter je nach prädominantem Zelltyp der APAs betrachtet. Die medianen Werte finden sich in Tabelle 18. Aus dieser gehen auch die  $p$ -Werte des Kruskal-Wallis-Tests für jeden Parameter hervor.  $RR_{\text{sys}}$ ,

### 13 Funktionelle Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 16: Präoperative klinische und biochemische Werte nach Genotyp.** Sofern nicht anders angegeben gilt n = 108. Die Werte sind als Median (IQA) angegeben. Die Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.

<b>Parameter</b>	<b>ATP1A1</b>	<b>ATP2B3</b>	<b>CACNA1D</b>	<b>CTNNB1</b>	<b>KCNJ5</b>	<b>PRKACA</b>	<b>Wildtyp</b>
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	155 (25,4)	168 (19,2)	143 (21,8)	153,5 (36,5)	144,1 (22,3)	143,6 (4,1)	151,8 (26)
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	97,9 (4,9)	104,9 (18,6)	99 (20,0)	97,8 (11,8)	106,1 (20,2)	107,6 (5,9)	111 (21,3)
aHTM [DDD] (n=86)	5,50 (6,63)	2,0 (2,38)	4,5 (3,00)	2,50 (0,00)	2,00 (2,67)	3,84 (1,84)	3,00 (3,17)
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol / l] (n=99)	2,6 (0,45)	2,45 (0,175)	2,9 (0,300)	3,15 (0,650)	2,80 (0,500)	2,70 (0,400)	2,90 (0,4)
Renin [mU / L]	4,3 (7,3)	2,55 (6,4)	6,3 (6,6)	11,1 (7,5)	3,4 (4,5)	12,4 (10,4)	4,3 (5,2)
PAC [ng / L]	726 (541)	1110,5 (1548,8)	234,0 (41,4)	241,5 (168,5)	275,5 (212,25)	364 (108)	188 (196,0)
ARQ [ng / mU]	127,2 (133,6)	518,8 (391,9)	33,0 (106,6)	199,7 (85,8)	82,5 (123,4)	123,6 (112,4)	45,0 (58,0)
LI	12,2 (32,9)	30,9 (51,7)	6,7 (25,5)	6,6 (3,8)	16,1 (36,5)	15,7 (8,5)	11,9 (15,4)
BMI	29,38 (6,48)	33,03 (3,55)	29,57 (6,22)	28,34 (0,00)	26,81 (7,38)	31,40 (5,89)	29,67 (7,03)



### 13 Funktionelle Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 17: Korrelation des Tumordurchmessers mit klinischen und biochemischen Parametern.**

Parameter	$\rho_s$	p-Wert
RR <sub>sys</sub>	-0,199	<b>0,0468</b>
RR <sub>dia</sub>	-0,125	0,214
aHTM [DDD]	-0,113	0,322
K <sub>s</sub> <sup>+</sup>	-0,104	0,325
PAC	0,255	<b>0,0105</b>
Renin	0,0153	0,880
ARQ	0,110	0,275
LI	-0,0078	0,937
BMI	-0,0514	0,659

**Tabelle 18: Klinische und biochemische Parameter nach dem prädominanten Tumorzelltyp.** Die Werte sind als Median (IQA) angegeben. Die Referenzwerte finden sich in Tabelle 1

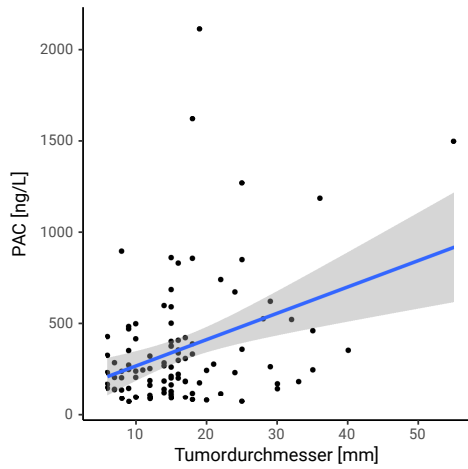
Parameter	AZG	AZF	ABZ	p-Wert
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	163,4 (18,8)	147,3 (31,0)	144,3 (21,0)	<b>0,0469</b>
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	111,3 (19,3)	105,5 (20,5)	98,8 (19,0)	0,180
aHTM [DDD]	3,75 (1,38)	2,00 (1,95)	3,00 (3,25)	<b>0,0337</b>
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol / L]	2,9 (0,53)	2,8 (0,50)	2,8 (0,50)	0,855
PAC [ng / L]	211,0 (274,3)	310,9 (295,0)	242,0 (271,0)	0,492
Renin [mU / L]	3,2 (2,5)	4,0 (5,1)	3,3 (6,8)	0,708
ARQ [ng / mU]	127,8 (120,7)	69,5 (129,1)	54,3 (136,7)	0,340
LI	11,7 (18,2)	11,7 (44,6)	13,4 (20,7)	0,613
BMI	29,5 (4,9)	25,5 (6,2)	29,6 (5,3)	<b>0,0070</b>

aHTM und BMI zeigten sich unterschiedlich im Vergleich zwischen Patienten mit unterschiedlichem prädominanten Zelltyp. Patienten der AZG-Gruppe zeigten präoperativ die höchsten systolischen Blutdruckwerte. Im paarweisen Vergleich erreichte diese Tendenz jedoch keine statistische Signifikanz. Siehe hierzu Abbildung 20. Paarweise Vergleiche der aHTM zeigten hingegen keine statistische Signifikanz. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz der AZF-Gruppe zu niedrigeren DDD, als in der AZG-Gruppe ( $p = 0,0967$ ) sowie zur ABZ-Gruppe ( $p = 0,0729$ ). Der BMI lag in der Gruppe ABZ signifikant höher, als in der Gruppe AZF ( $p = 0,0087$ ). Die AZF-Gruppe wies zudem tendenziell niedrigere BMIs auf, als die AZG-Gruppe ( $p = 0,0757$ ).

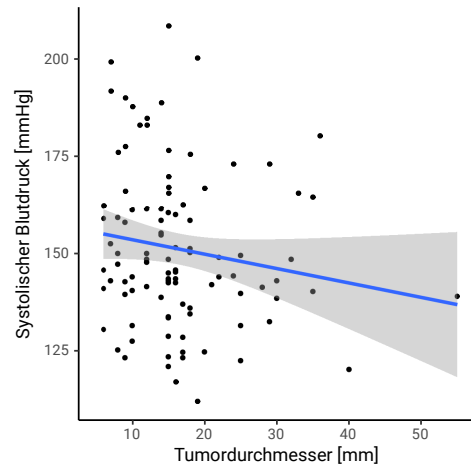
### 13.3 Auswirkung der Enzym- und Ca<sup>2+</sup>-Kanalexpression auf Klinik und Laborwerte

Um die Auswirkung der IHC auf klinische und laborchemische Parameter zu untersuchen wurde nach Korrelationen zwischen diesen Werten gesucht. Die Korrelationsmatrix ist in

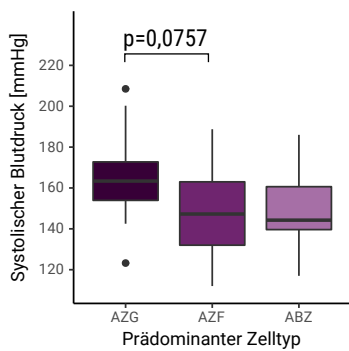
### 13 Funktionelle Charakterisierung der Tumoren



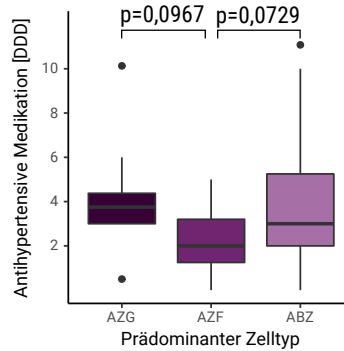
**Abbildung 18: Korrelation der PAC mit dem Tumordurchmesser.** Die PAC korrelierte positiv mit dem Tumordurchmesser ( $\rho_s=0,255$ ,  $p=0,0105$ ). Die Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.



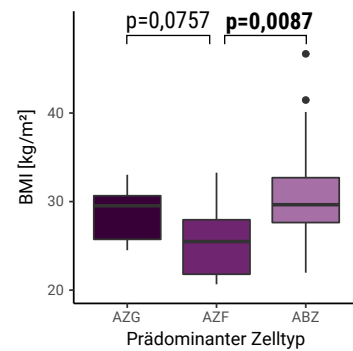
**Abbildung 19: Korrelation des systolischen Blutdrucks mit dem Tumordurchmesser.** Der systolische Blutdruck korrelierte negativ mit dem Tumordurchmesser ( $\rho_s=-0,199$ ,  $p=0,0468$ ). Die Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.



**Abbildung 20: Systolischer Blutdruck nach prädominantem Tumor-Zelltyp.**



**Abbildung 21: Vergleich der notwendigen antihypertensiven Medikation nach prädominantem Zelltyp.**



**Abbildung 22: Vergleich des Patienten-BMI nach prädominantem Zelltyp.**

### 13 Funktionelle Charakterisierung der Tumoren

**Tabelle 19: Korrelation klinischer und biochemischer Werte mit IHC-Färbungen.** Die Werte sind als  $\rho_s$  (p-Wert) angegeben. Es wurden lediglich p-Werte  $<0,05$  angegeben.

Parameter	CYP11B1	CYP11B2	CYP17	HSD3B1	HSD3B2	Ca <sub>v</sub> 1.3	Ca <sub>v</sub> 3.2
RR <sub>sys</sub>	-0,2208	0,1256	-0,2796	-0,1346	-0,2428	0,1284	-0,1945
RR <sub>dia</sub>	<b>-0,4132 (0,0317)</b>	-0,0171	-0,2123	-0,1498	-0,1319	-0,1507	-0,1776
DDD	-0,0090	0,0681	-0,0501	-0,0608	-0,1712	0,2988	0,0797
K <sub>s</sub> <sup>+</sup>	0,2232	-0,1662	0,2879	0,0251	-0,2578	-0,0324	0,0725
PAC	-0,1011	0,1245	<b>-0,3287 (0,0211)</b>	0,0262	0,2674	0,1251	-0,1227
Renin	-0,1165	-0,2458	-0,1861	-0,2779	-0,116	<b>-0,3234 (0,0234)</b>	-0,185
ARQ	-0,0231	0,2538	-0,1017	0,1825	<b>0,3129 (0,0286)</b>	0,2301	0,0385
LI	-0,1669	-0,0229	<b>-0,2957 (0,0486)</b>	-0,2673	0,0004	-0,175	-0,1052
BMI	-0,2504	0,0126	-0,2352	-0,1966	-0,1788	-0,0397	-0,0709

Tabelle 19 angegeben. Höhere CYP11B1-Expression korrelierte mit niedrigeren präoperativen RR<sub>dia</sub>-Werten ( $\rho_s = -0,4897$ ,  $p = 0,0322$ ). Höhere CYP17-Expression korrelierte mit einer niedrigeren PAC ( $\rho_s = -0,3287$ ,  $p = 0,0211$ ) und mit einem niedrigeren LI ( $\rho_s = -0,2957$ ,  $p = 0,0486$ ). Höhere HSD3B2-Expression korrelierte mit einem höheren ARQ ( $\rho_s = 0,3129$ ,  $p = 0,0286$ ). Höhere Ca<sub>v</sub>1.3-Expression korrelierte mit einer niedrigeren Renin-Konzentration ( $\rho_s = -0,3234$ ,  $p = 0,0234$ ). Die übrigen Färbungen zeigten keine signifikanten Korrelationen mit präoperativen Parametern.

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

Nach der Adrenalektomie wurden die Patienten in regelmäßigen Visiten verlaufskontrolliert. Dabei wurden die gleichen Parameter erhoben, wie in den präoperativen Visiten. In diesem Kapitel wurde zunächst die Entwicklung der Parameter nach der Operation untersucht. Anschließend wurde der Therapieerfolg klassifiziert und dessen Verteilung unter den Patienten analysiert. Abschließend wurden die klinischen, biochemischen, molekulargenetischen und histopathologischen Parameter auf ihre Güte als Prognosefaktoren des Therapieerfolges evaluiert.

### 14.1 Entwicklung klinischer und biochemischer Parameter nach Adrenalektomie

Bei 82 Patienten konnten die prä- und postoperativen Daten verglichen werden. Die im Folgenden analysierten Daten wurden 12 (IQA 6) Monate nach der Adrenalektomie erhoben.

Die sieben untersuchten Parameter sind in Tabelle 20 aufgeführt. Für alle Werte ließ sich nach der Adrenalektomie eine Entwicklung des Medians in Richtung der Normwerte feststellen. So sanken bei den klinischen Parametern der systolische und diastolische Blutdruck und die aHTM. Biochemisch sank die PAC, während die Renin-Konzentration stieg. Entsprechend sank der ARQ. Die  $K_s^+$  stieg an. Die festgestellten Veränderungen waren dabei für alle Werte hoch signifikant.

### 14.2 Definition des Therapieerfolges

In einem internationalen Konsensus wurden einheitliche Kriterien für den Therapieerfolg der unilateralen Adrenalektomie festgelegt (Williams et al. 2017). Hierbei wurden klinischer Therapieerfolg (kTE) und biochemischer Therapieerfolg (bTE) getrennt betrachtet. Der jeweilige Erfolg wurde hierbei in drei Kategorien stratifiziert: „kompletter“, „partieller“ und „ausbleibender“ Therapieerfolg. Entsprechend dieser Kriterien wurden in dieser Arbeit die folgenden sechs Gruppen definiert. Die hierzu herangezogenen Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 20: Vergleich klinischer und biochemischer Parameter vor und nach Adrenalektomie.** Aus n = 82. Die Werte wurden als Median (IQA) angegeben. Die Referenzwerte finden sich in Tabelle 1.

Parameter	Vor Adrenalektomie	Nach Adrenalektomie	p-Wert
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	145,8 (26,5)	136 (23,9)	< 0,0001
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	105,5 (22,3)	96,4 (19,1)	< 0,0001
DDD	3 (3,23)	0,84 (2,56)	< 0,0001
PAC [ng/L]	244 (287)	52 (48,5)	< 0,0001
Renin [mU/L]	3,3 (4,9)	15 (16,2)	< 0,0001
ARR [ng/mU]	68,3 (132,9)	4,1 (5,9)	< 0,0001
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol/L]	2,8 (0,6)	4,2 (0,4)	< 0,0001

Der Bedarf an antihypertensiver Medikation wurde anhand der DDD an verschriebenen antihypertensiven Pharmaka bestimmt. Ein erniedrigter oder erhöhter Bedarf nach Adrenalektomie bestand, wenn der Unterschied zum Vorwert > 0,5 DDD betrug.

**Kompletter kTE** Der komplette kTE definiert sich als Normalisierung des Blutdrucks nach den Richtlinien der „European Society for Hypertension“ und der „European Society of Cardiology“ von 2013 (Mancia et al. 2013). Dies entspricht in einem ambulanten Setting einem Blutdruck von weniger als 140 / 90 mmHg. Zudem durfte kein weiterer Bedarf nach antihypertensiver Medikation bestehen.

**Partieller kTE** Dies wurde als deutlich gesunkener oder gleichbleibender Blutdruck bei reduzierter antihypertensiver Medikation definiert, oder als deutlich gesunkener Blutdruck bei gleichbleibender antihypertensiver Medikation. Der Blutdruck galt dann als deutlich gesunken, wenn der RR<sub>sys</sub> im Verlauf um mind. 20 mmHg gesunken war und der RR<sub>dia</sub> um mehr als 10 mmHg.

**Ausbleibender kTE** Wurde keine Veränderung, oder gar eine Erhöhung des Blutdrucks bei gleichbleibender oder gesteigerter DDD festgestellt, so wurde der kTE als ausbleibend definiert.

**Kompletter bTE** Eine komplette biochemische Heilung erforderte nach der Operation einen normalisierten K<sub>s</sub><sup>+</sup>-Wert, so wie einen normalen ARQ. Bei weiterhin erhöhtem ARQ musste eine erfolgreiche Unterdrückung der Aldosteron Produktion in einem postoperativen Kochsalzbelastungstest auf Werte < 5 ng/dL nachgewiesen werden.

**Partieller bTE** Der partielle bTE definiert sich als normalisierter  $K_s^+$ -Wert bei entweder einer Reduktion der PAC um  $\geq 50\%$ , oder einer Unterdrückung der Aldosteron Produktion in einem Kochsalzbelastungstest auf 5 – 10 ng/dL.

**Ausbleibender bTE** Persistierte die Hypokaliämie postoperativ oder lag ein pathologischer ARQ mit ausbleibender Aldosteron-Unterdrückung in einem anschließendem Kochsalzbelastungstest vor, so wurde von einem Ausbleiben des Therapieerfolges ausgegangen.

### 14.3 Verteilung des Therapieerfolges

Für 82 Patienten konnte aus prä- und postoperativen Daten ein Therapieerfolg klassifiziert werden. Anhand der zuvor beschriebenen Einteilung des Therapieerfolges ergab sich die in Abbildung 23 dargestellte Verteilung. kTE und bTE unterschieden sich dabei deutlich voneinander.

Während klinisch lediglich 22 % der Patienten als komplett geheilt bezeichnet werden konnten, so beträgt dieser Anteil beim bTE 92,7 %. Ebenso war der Anteil mit ausbleibendem Therapieerfolg in klinischer Hinsicht größer, als in biochemischer. Dennoch konnte bei mehr als der Hälfte der Patienten zumindest ein partieller kTE festgestellt werden.

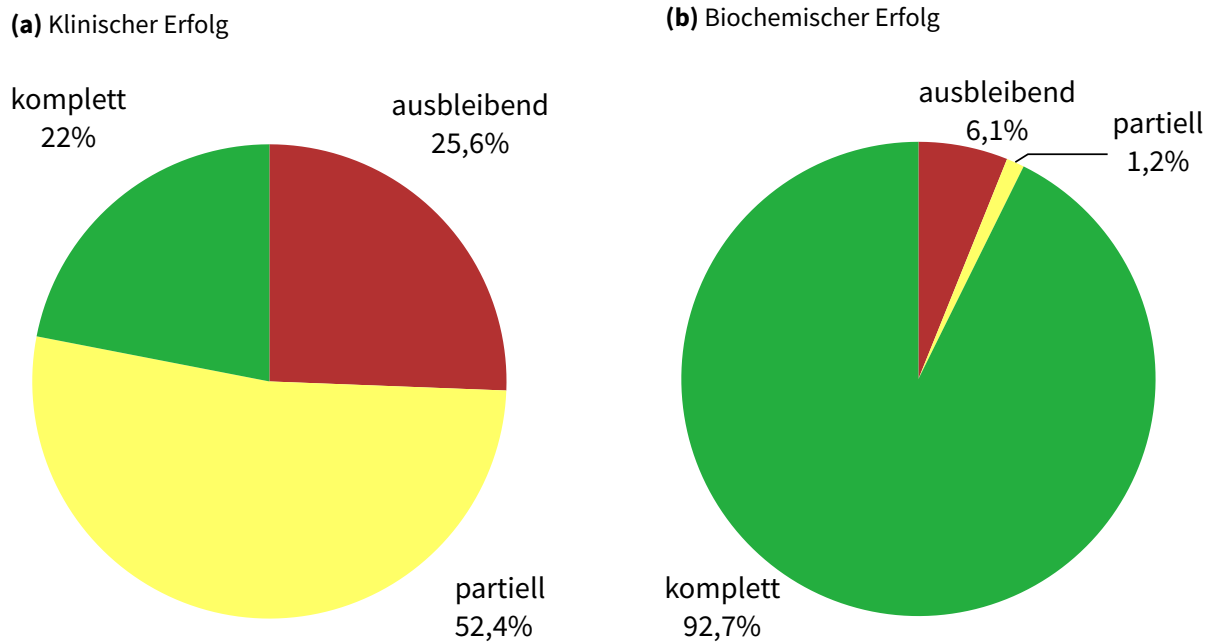
Im Folgenden wurden sowohl klinischer, als auch biochemischer Therapieerfolg in Relation zu Geschlecht, Erkrankungsdauer der arteriellen Hypertonie, Alter bei Adrenalektomie, zugrunde liegendem Genotyp, Tumorgröße, prädominantem Zelltyp in der Tumorhistologie, sowie den immunhistochemischen Färbungen gesetzt.

**Geschlecht** Tabelle 21 zeigt die beobachteten klinischen und biochemischen Therapieerfolge aufgeteilt nach dem Geschlecht. Hier zeigt sich, dass ein kompletter kTE häufiger bei weiblichen Patienten beobachtet wurde. Männliche Patienten präsentierten überwiegend einen partiellen oder ausbleibenden kTE. Die beobachtete Verteilung wich dabei signifikant von der erwarteten Häufigkeit ab ( $p = 0,0266$ ).

Im bTE zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung zwischen Männern und Frauen ( $p = 0,811$ ).

**Erkrankungsdauer** Im Vergleich der Erkrankungsdauer des BHDs zeigten sich signifikante Unterschiede in den Rangsummen der drei Kategorien des kTE ( $p = 0,0423$ ).

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie



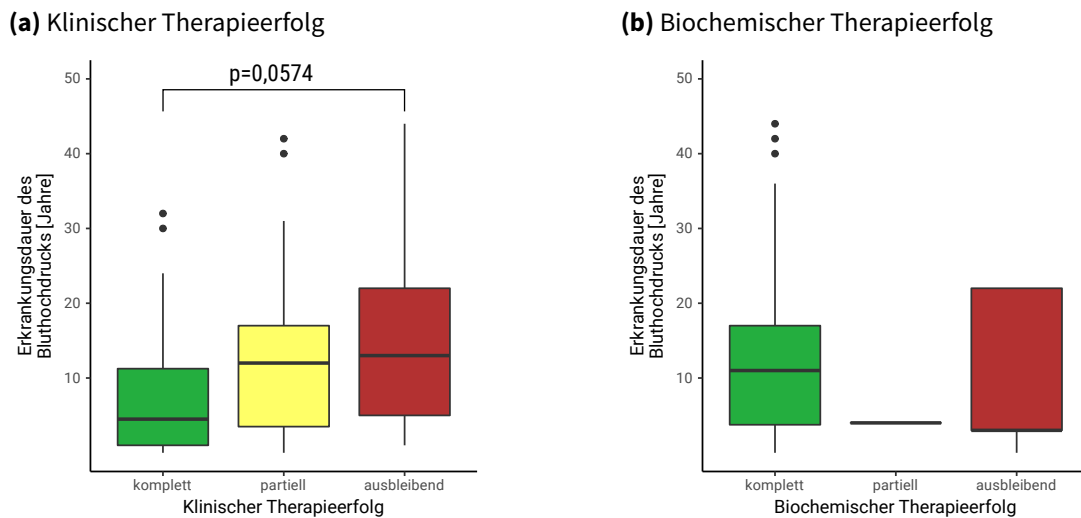
**Abbildung 23: Verteilung des Therapieerfolges.** Es sind die Anteile der jeweiligen Kategorien für den klinischen und biochemischen Therapieerfolg unter n=82 Patienten angegeben.

**Tabelle 21: Verteilung des Therapieerfolges nach Geschlecht.**

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Verteilung des klinischen Therapieerfolges zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Männer wiesen deutlich häufiger einen ausbleibenden und seltener einen kompletten kTE. Im bTE zeigten sich keine relevanten Unterschiede.

Therapieerfolg	Geschlecht [n]		Exakter Test nach Fisher	
	weiblich (n = 38)	männlich (n = 45)		
klinisch	komplett	12	6	<b>p=0,0266</b>
	partiell	20	23	
	ausbleibend	5	16	
biochemisch	komplett	34	42	p=0,811
	partiell	1	0	
	ausbleibend	2	3	

## 14 Therapieerfolg nach Adrenaektomie



**Abbildung 24: Erkrankungsdauer des Bluthochdrucks nach klinischem und biochemischem Therapieerfolg.**

Hierbei fanden sich bei Patienten mit komplettem kTE häufiger eine kürzere Erkrankungsdauer, als bei Patienten mit ausbleibendem kTE. Dieser Unterschied verpasste die statistische Signifikanz nur marginal ( $p = 0,0574$ ). Beim bTE fand sich kein Unterschied zwischen den Kategorien.

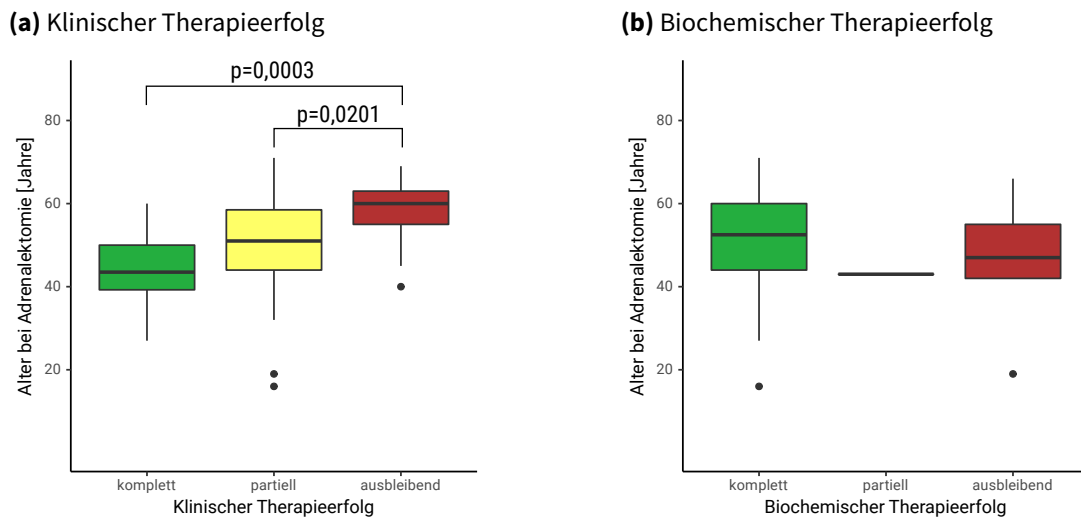
**Alter bei Adrenaektomie** Zum Zeitpunkt der Adrenaektomie waren Patienten mit komplettem kTE mit 43,5 (IQA 10,8) Jahren signifikant jünger, als Patienten mit ausbleibendem kTE mit 60,0 (IQA 8,0) Jahren ( $p = 0,0003$ ). Ebenso waren Patienten mit partiellem kTE mit 51,0 (IQA 14,5) Jahren signifikant jünger, als Patienten mit ausbleibendem kTE ( $p = 0,0201$ ). Die Unterschiede sind in Abbildung 25 abgebildet. In Bezug auf den bTE zeigten sich keine Unterschiede.

**Genotyp** Der Vergleich der Genotypen in Bezug auf den Therapieerfolg zeigte insbesondere Unterschiede zwischen den Genotypen *KCNJ5* und Wildtyp. Aus Tabelle 22 geht hervor, dass in der Gruppe *KCNJ5* 12 von 36 Patienten einen kompletten kTE aufwiesen, entgegen nur 3 aus 32 Patienten der Wildtyp-Gruppe. Über alle Genotypen hinweg wich die beobachtete Verteilung des Therapieerfolges nicht signifikant von den erwarteten Häufigkeiten ab ( $p = 0,105$ ).

Beim bTE zeigten alle Patienten der Gruppen *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D*, *CTNNA1* und *PRKACA* einen kompletten Therapieerfolg. Die sechs Patienten mit partiellem und



## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie



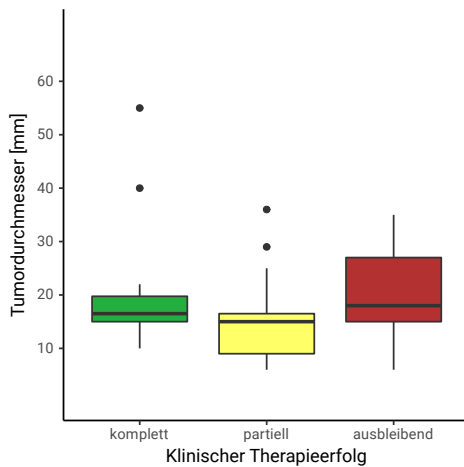
**Abbildung 25: Alter bei Adrenalektomie nach klinischem und biochemischem Therapieerfolg.** Patienten mit ausbleibendem kTE waren zum Zeitpunkt der Adrenalektomie signifikant älter, als Patienten mit partiellem ( $p = 0,0201$ ) sowie mit komplettem ( $p = 0,0003$ ) kTE.

**Tabelle 22: Verteilung des Therapieerfolges nach Genotyp.** Bei n=82 Patienten.

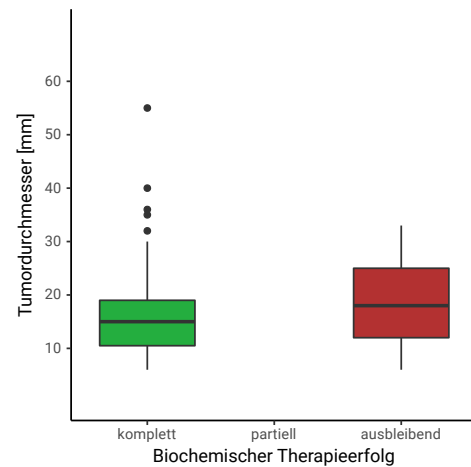
Therapieerfolg	Genotyp [n]							Exakter Test nach Fisher
	ATP1A1	ATP2B3	CACNA1D	CTNNB1	KCNJ5	PRKACA	Wildtyp	
klinisch								
komplett	1	1	0	1	12	0	3	p = 0,105
partiell	2	0	3	0	18	2	18	
ausbleibend	1	1	2	0	6	0	11	
biochemisch								
komplett	4	2	5	1	33	2	29	p = 0,944
partiell	0	0	0	0	0	0	1	
ausbleibend	0	0	0	0	3	0	2	

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

(a) Klinischer Therapieerfolg



(b) Biochemischer Therapieerfolg



**Abbildung 26: Tumordurchmesser nach biochemischem und klinischem Therapieerfolg.** In paarweisen Vergleichen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Tumordurchmessers.

ausbleibendem bTE trugen Mutationen in *KCNJ5* und Wildtyp (vgl. Tabelle 22). Insgesamt zeigte sich der bTE über die Genotypen statistisch nicht auffällig.

**Tumordurchmesser** Der Tumordurchmesser zeigte zwar signifikante Unterschiede der Rangsummen zwischen den Gruppen des kTE ( $p = 0,0219$ ), jedoch ergab sich in paarweisen Testungen keine statistische Signifikanz. Beim bTE zeigten sich keine deutlichen Unterschiede. Die Tumordurchmesser sind in Abbildung 26 abgebildet.

**Zelltyp** Tabelle 23 zeigt die Verteilung des Therapieerfolges über die morphologisch prädominanten Zelltypen in den untersuchten APAs. Die Verteilungen des kTE und bTE wichen nicht statistisch signifikant von den erwarteten Häufigkeiten ab ( $p = 0,517$  und  $p = 1$  respektive).

**Immunhistochemie** Bei Vergleich der immunhistochemischen Färbungen zwischen den jeweiligen Kategorien des Therapieerfolges sind kaum Unterschiede zu finden. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 24 aufgeführt.

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 23: Verteilung des Therapieerfolges nach Zelltyp.** Bei n=62 Patienten.

Therapieerfolg	Zelltyp [n]			Exakter Test nach Fisher
	AZG (n = 9)	AZF (n = 18)	ABZ (n = 35)	
klinisch				
komplett	2	4	5	p = 0,517
partiell	6	7	19	
ausbleibend	1	7	11	
biochemisch				
komplett	9	17	32	p = 1
partiell	0	0	0	
ausbleibend	0	1	3	

**Tabelle 24: Immunhistochemische Färbungen aufgeteilt nach Therapieerfolg.** Bei n=49 Patienten. Keine der Färbungen zeigte signifikanten Abweichungen der Rangsummen zwischen den Unterschiedlichen Therapieerfolgs-Gruppen. Die Werte sind als Median (IQA) angegeben. In der Gruppe des partiellen bTE waren keine Gewebeprobe für Färbungen vorhanden.

Antigen	H-Score nach Klinischem Therapieerfolg				H-Score nach Biochemischem Therapieerfolg		
	komplett	partiell	ausbleibend	p-Wert	komplett	ausbleibend	p-Wert
CYP11B1	1,2 (9,2)	1,8 (8,8)	2,8 (20,65)	0,690	2,3 (14,625)	1,1 (2,2)	0,327
CYP11B2	162,2 (155,7)	91,3 (158)	153,6 (151,9)	0,961	154,4 (157,375)	32,9 (113,65)	0,565
CYP17	54,6 (37,7)	33,8 (62,8)	26 (123,1)	0,979	36,95 (85,325)	17,6 (11,65)	0,269
HSD3B1	29,8 (55,4)	19 (52)	30,2 (49,05)	0,910	23,7 (53,85)	21,7 (94,95)	0,786
HSD3B2	199,3 (71,7)	185,3 (54,5)	172,8 (90,6)	0,248	185,5 (74,525)	216,8 (43)	0,518
Ca <sub>v</sub> 1.3	101,2 (136,3)	100,3 (118,1)	96,3 (108,55)	0,966	100,75 (120,725)	72,5 (57,15)	0,460
Ca <sub>v</sub> 3.2	131,7 (114,2)	131,1 (90,6)	148,4 (114,45)	0,643	133,9 (97,1)	137,8 (65,75)	0,518

## 14.4 Faktorenanalyse des Therapieerfolges

Für die Faktorenanalyse wurden die drei Kategorien des Therapieerfolges zunächst auf binäre Zielvariablen abgebildet. Mittels logistischer Regression wurde anschließend die Auswirkung von Patienten- und Tumoreigenschaften auf diese Zielvariablen untersucht.

Die binären Variablen „kompletter kTE“, „kompletter bTE“, „ausbleibender kTE“ und „ausbleibender bTE“ können jeweils nur die Werte 0 und 1 annehmen. Patienten auf welche die im Variablennamen steckende Bedingung zutraf, wurde der Wert 1 zugeteilt, allen anderen Patienten hingegen der Wert 0. Somit erhielten 18 Patienten den Wert 1 für „kompletter kTE“ und 64 den Wert 0. Für „kompletter bTE“ erhielten 76 den Wert 1 und 6 den Wert 0. 21 Patienten wurde bei „ausbleibender kTE“ der Wert 1 zugewiesen, 61 der Wert 0. Bei „ausbleibender bTE“ erhielten 5 den Wert 1 und 77 den Wert 0.

Zu den untersuchten Patienteneigenschaften zählten das Geschlecht der Patienten, das Alter bei Operation, das Alter bei ED des BHDs, die Erkrankungsdauer des BHDs, sowie die präoperativen Werte von  $RR_{sys}$ ,  $RR_{dia}$ ,  $K_s^+$ , PAC, Renin im Serum, ARQ, LI, BMI und die Menge antihypertensiver Medikamente in DDD. Zu den untersuchten Tumoreigenschaften zählten der Genotyp, der Tumordurchmesser, der prädominante Zelltyp des APA und die einzelnen immunhistochemischen Färbungen. Diese Faktoren wurden zuerst univariat untersucht.

Dem folgte eine multivariate Analyse, in der eine schrittweise Modellentwicklung durchgeführt wurde. In Unterabschnitt 14.4.1 sind alle Schritte exemplarisch aufgeführt. In den übrigen Abschnitten dieses Kapitels wurden der Übersichtlichkeit halber lediglich die statistisch signifikanten Faktoren und Modelle aufgeführt.

Da sich keiner der untersuchten Einflussfaktoren signifikant auf den kompletten oder ausbleibenden bTE auswirkte, werden die entsprechenden Analysen hier nicht aufgeführt.

### 14.4.1 Faktoren für den kompletten klinischen Therapieerfolg

Von 82 Patienten zeigten 18 einen kompletten kTE. In diesem Abschnitt wurden die zuvor genannten Faktoren als mögliche Prognosefaktoren für den kompletten kTE untersucht. In einer univariaten Analyse wurden die Faktoren zunächst für sich stehend untersucht. Die hierbei auffälligen Faktoren wurden dann ausgewählt, um eine multivariate Analyse durchzuführen.

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Univariate Analyse** In der univariaten Analyse waren von den präoperativen Parametern die Faktoren Geschlecht ( $p = 0,0428$ ), Alter bei Adrenalektomie ( $p = 0,0147$ ),  $RR_{\text{sys}}$  vor der Operation ( $p = 0,0358$ ), der ARQ ( $p = 0,0459$ ) und die Menge der benötigten aHTM ( $p = 0,016$ ) deutliche Prädiktoren für den kompletten kTE. Hierbei begünstigte das Weibliche Geschlecht, ein niedrigeres Alter bei Adrenalektomie, ein niedrigerer  $RR_{\text{sys}}$ , ein höherer ARQ und ein geringerer Bedarf an aHTM jeweils für sich stehend den kompletten kTE.

Unter den postoperativ erhobenen Faktoren zeigten sich das Vorliegen einer *KCNJ5* Mutation ( $p = 0,0160$ ) und eine stärkere Immunoexpression der HSD3B2 ( $p = 0,0499$ ) als begünstigende Faktoren für den kompletten kTE, während der Genotyp Wildtyp ( $p = 0,0367$ ) die Odds hierfür verringerte. Tabelle 25 zeigt die genauen Ergebnisse dieser und aller anderen Faktoren.

**Tabelle 25: Univariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieerfolg.** Es sind alle untersuchten Einflussfaktoren aufgelistet. Zudem ist angegeben, wie viele Patienten in die jeweilige Analyse eingeschlossen wurden und wie viele davon einen kompletten kTE aufwiesen. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden fett hervorgehoben. Die Genotypen wurden jeweils einzeln gegen alle übrigen Genotypen verglichen. Auf Grund der geringen Fallzahl in den Gruppen einiger Faktoren war eine statistische Analyse teils nicht möglich. Dies wurde als „keine Analyse“ angegeben. Das Vorliegen des männlichen Geschlechts entspricht lediglich der Umkehrung des Weiblichen Geschlechtes. Die OR entsprechen also also  $\frac{1}{OR}$  des weiblichen Geschlechtes. Der Übersicht halber wurde dies nicht als eigener Faktor angegeben.

Einflussfaktor	Analysierte Fälle von 82	kTE komplett	OR	KI	p-Wert
Weibliches Geschlecht	82	18	3,12	1,07 – 9,97	<b>0,0428</b>
Alter bei ED des BHDs	82	18	0,98	0,92 – 1,03	0,368
Alter bei Adrenalektomie	82	18	0,94	0,89 – 0,99	<b>0,0147</b>
Erkrankungsdauer des BHDs	82	18	0,95	0,89 – 1	0,0782
$RR_{\text{sys}}$	82	18	0,97	0,93 – 1	<b>0,0358</b>
$RR_{\text{dia}}$	82	18	0,98	0,95 – 1,02	0,334
$K_s^+$	77	17	1,03	0,28 – 3,85	0,966
PAC	82	18	1,0009	0,9996 – 1,0021	0,1625
Renin	82	18	0,9	0,74 – 1	0,179
ARQ	82	18	1,0029	1,0000 – 1,0059	<b>0,0459</b>

Fortgesetzt auf nächster Seite

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 25** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Einflussfaktor</b>	<b>Analysierte Fälle von 82</b>	<b>kTE komplett</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>	<b>p-Wert</b>
LI	78	17	1	0,99 – 1,01	0,716
BMI	82	18	0,91	0,8 – 1,01	0,103
aHTM [DDD]	82	18	0,68	0,48 – 0,9	<b>0,016</b>
<i>ATP1A1</i>	82	18	1,2	0,06 – 10,04	0,880
<i>ATP2B3</i>	82	18		<i>keine Analyse</i>	
<i>CACNA1D</i>	82	18		<i>keine Analyse</i>	
<i>CTNNB1</i>	82	18		<i>keine Analyse</i>	
<i>KCNJ5</i>	82	18	3,33	1,14 – 10,68	<b>0,0324</b>
<i>PRKACA</i>	82	18		<i>keine Analyse</i>	
Wildtyp	82	18	0,24	0,05 – 0,82	<b>0,0367</b>
Tumordurchmesser	76	18	1,04	0,98 – 1,1	0,1789
AZG	62	11	1,4	0,19 – 7,02	0,705
AZF	62	11	1,51	0,35 – 5,84	0,556
ABZ	62	11	0,58	0,15 – 2,18	0,421
CYP11B1	49	8	0,97	0,87 – 1,02	0,385
CYP11B2	49	8	1	0,99 – 1,01	0,471
CYP17	49	8	0,99	0,97 – 1	0,267
HSD3B1	49	8	1	0,98 – 1,02	0,84
HSD3B2	49	8	1,02	1 – 1,05	<b>0,0499</b>
Ca <sub>v</sub> 1.3	49	8	1	0,98 – 1,01	0,461
Ca <sub>v</sub> 3.2	49	8	0,99	0,98 – 1,01	0,443

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 26: Multivariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieerfolg mit präoperativen Daten.** Für die multivariate Analyse wurden die stärksten Prädiktoren aus der univariaten Analyse ausgewählt. In einem ersten Schritt wurden alle Kombinationen aus je zwei dieser Prädiktoren miteinander verglichen. Anschließend sind zwei Modelle aus je 3 Faktoren aufgeführt. Die übrigen Kombinationen aus 3, so wie Modelle aus 4 und 5 Faktoren zeigten eine deutliche gegenseitige Abschwächung der Prädiktoren und wurden der Übersicht halber nicht aufgeführt. Die einzelnen Kombinationen sind jeweils durch horizontale Linien getrennt. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden fett hervorgehoben. Jede Analyse wurde mit n=82 Patienten durchgeführt, von denen 18 einen kompletten kTE aufwiesen.

<b>Einflussfaktor</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>	<b>p-Wert</b>
Weibliches Geschlecht	2,27	0,73 – 7,61	0,164
RR <sub>sys</sub>	0,97 pro [mmHg]	0,94 – 1,00	0,105
Weibliches Geschlecht	2,12	0,65 – 7,26	0,218
Alter bei Adrenalektomie	0,95 pro [Jahr]	0,90 – 1,00	0,0620
Weibliches Geschlecht	2,27	0,73 – 7,56	0,164
aHTM	0,71 pro [DDD]	0,50 – 0,95	<b>0,0389</b>
Weibliches Geschlecht	2,82	0,94 – 9,22	0,0710
ARQ	1,0026 pro [ng/mU]	0,9996 – 1,0057	0,0784
Alter bei Adrenalektomie	0,95 pro [Jahr]	0,90 – 1,0	<b>0,0402</b>
RR <sub>sys</sub>	0,97 pro [mmHg]	0,94 – 1,0	0,0912
Alter bei Adrenalektomie	0,94 pro [Jahr]	0,88 – 0,98	<b>0,0131</b>
ARQ	1,0033 [ng/mU]	1,0003 – 1,0064	<b>0,0296</b>
Alter bei Adrenalektomie	0,94 pro [Jahr]	0,89 – 0,99	<b>0,0190</b>
aHTM	0,69 pro [DDD]	0,49 – 0,91	<b>0,0187</b>
RR <sub>sys</sub>	0,96 pro [mmHg]	0,92 – 0,99	<b>0,0149</b>
ARQ	1,0043 [ng/mU]	1,0009 – 1,0082	<b>0,0179</b>
RR <sub>sys</sub>	0,98 pro [mmHg]	0,94 – 1,01	0,165
aHTM	0,72 pro [DDD]	0,50 – 0,98	0,0529
aHTM	0,6512 pro [DDD]	0,4495 – 0,8731	0,0106
ARQ	1,0039 pro [ng/mU]	1,0006 – 1,0075	0,0230

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 26** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Einflussfaktor</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>	<b>p-Wert</b>
ARQ	1,0043 pro [ng/mU]	1,0008 – 1,0081	<b>0,0172</b>
Alter bei Adrenalektomie	0,93 pro [Jahr]	0,88 – 0,99	<b>0,0168</b>
aHTM	0,66 pro [DDD]	0,46 – 0,89	<b>0,0125</b>
ARQ	1,0043 pro [ng/mU]	1,0009 – 1,0082	<b>0,0163</b>
Alter bei Adrenalektomie	0,95 pro [Jahr]	0,90 – 1,00	<b>0,0471</b>
RR <sub>sys</sub>	0,96 pro [DDD]	0,92 – 1,00	<b>0,0438</b>

**Multivariate Analyse unter Berücksichtigung ausschließlich präoperativer Daten** In der multivariaten Analyse für die Zielvariable „kompletter kTE“ wurde schrittweise die Anzahl der kombinierten Faktoren erhöht.

Jeder in der univariaten Analyse auffällige Faktor wurde nacheinander mit allen anderen untersuchten Faktoren aus Tabelle 25 kombiniert. Für jede dieser Kombinationen aus zwei Parametern wurde dann eine multivariate logistische Regression auf den Zielparameter durchgeführt. Keine dieser Kombinationen hob jedoch einen zuvor nicht signifikanten Faktor auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  an. In Tabelle 26 wurden daher lediglich die Kombinationen der fünf auffälligen Faktoren der univariaten Analyse aufgeführt.

Die Faktoren RR<sub>sys</sub> und das Geschlecht wirkten sich in den Kombinationen mit anderen Faktoren schwächend aus. Hier musste also von einer deutlichen Kollinearität mit den übrigen Faktoren ausgegangen werden. Nach Vergleichen der Modelle mit zwei kombinierten Faktoren wurden die hierbei deutlichsten Kandidaten für Modelle aus 3 Faktoren ausgewählt.

Insgesamt zeigte sich ein Modell als am geeignetsten, welches den ARQ, das Alter bei Adrenalektomie und die benötigten aHTM einschloss.

**Multivariate Analyse unter Hinzunahme postoperativer Daten** Die nach der OP erhobenen Parameter des Genotyps und der IHC wurden auf die Fähigkeit untersucht, nach der Adrenalektomie die vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für den kompletten kTE zu präzisieren. Das im vorangehenden Abschnitt ausgewählte präoperative Modell aus den Parametern ARQ, Alter bei Adrenalektomie und dem Bedarf an aHTM wurde nacheinan-



## 14 Therapieerfolg nach Adrenalektomie

**Tabelle 27: Multivariate Faktorenanalyse für den kompletten klinischen Therapieerfolg mit prä- und postoperativen Daten.** Ergänzend zu Tabelle 26 wurden postoperativ erhobene Gewebeeigenschaften, so wie der APA-Genotyp und die immunohistochemischen Färbungen als Faktoren für den Therapieerfolg ausgewertet. Hierfür wurden das beste präoperative Modell für den kompletten kTE (bestehend aus ARQ, Alter bei Adrenalektomie und der Bedarf an aHTM, s. Tabelle 26) mit den stärksten postoperativen Faktoren der univariaten Analyse kombiniert. Sofern nicht anders angegeben wurde die Analyse mit n=82 Patienten durchgeführt, von denen 18 einen kompletten kTE aufwiesen.

<b>Einflussfaktor</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>	<b>p-Wert</b>
ARQ	1,0041 pro [ng/mU]	1,0006 – 1,0080	<b>0,0257</b>
Alter bei Adrenalektomie	0,94 pro [Jahr]	0,88 – 0,99	<b>0,0333</b>
aHTM	0,67 pro [DDD]	0,46 – 0,91	<b>0,0202</b>
<i>KCNJ5</i>	1,31	0,34 – 4,93	0,689
ARQ	1,0038 pro [ng/mU]	1,0002 – 1,0077	<b>0,0430</b>
Alter bei Adrenalektomie	0,94 pro [Jahr]	0,89 – 1,00	0,0526
aHTM	0,66 pro [DDD]	0,46 – 0,89	<b>0,0132</b>
Wildtyp	0,43	0,08 – 1,81	0,271
ARQ ‡	1,0052 pro [ng/mU]	1,0005 – 1,0110	<b>0,0392</b>
Alter bei Adrenalektomie ‡	0,97 pro [Jahr]	0,89 – 1,05	0,416
aHTM ‡	0,70 pro [DDD]	0,39 – 1,09	0,172
HSD3B2 ‡	1,02 pro H-Score-Einheit	1,00 – 1,05	0,137

‡ Analyse mit n=49 Patienten und zugehörigem APA-Gewebe, von denen 8 einen kompletten kTE aufwiesen.

**Tabelle 28: Uni- und multivariate Faktorenanalyse für den ausbleibenden klinischen Therapieerfolg.** Es wurden lediglich die Faktoren aufgeführt, welche in der univariaten Analyse eine statistische Signifikanz von  $p < 0,05$  aufwiesen. Im Anschluss wurden diese in die multivariate Analyse eingeschlossen. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden fett hervorgehoben.

<b>Einflussfaktor</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>	<b>p-Wert</b>
Weibliches Geschlecht	0,28	0,08 – 0,82	<b>0,0277</b>
Alter bei Adrenalektomie	1,11 pro [Jahr]	1,04 – 1,19	<b>0,0017</b>
Weibliches Geschlecht	0,43	0,12 – 1,38	0,168
Alter bei Adrenalektomie	1,10 pro [Jahr]	1,03 – 1,18	<b>0,0048</b>

der mit den in der univariaten Analyse auffälligen Genotypen *KCNJ5* und Wildtyp sowie dem H-Score der HSD3B2 kombiniert.

Wie in Tabelle 27 aufgelistet, wirkte sich keiner dieser postoperativen Parameter positiv auf die Aussagekraft des Modells aus.

### 14.4.2 Faktoren für den fehlenden klinischen Therapieerfolg

Analog zur Analyse hinsichtlich des kompletten kTE wurde untersucht, welche Parameter das Ausbleiben des kTE zuverlässig vorhersagen konnten. Der Übersichtlichkeit halber wurden in der folgenden uni- und multivariaten Analyse lediglich die statistisch signifikanten Parameter aufgeführt.

In der univariaten Analyse zeigten sich das Geschlecht und das Alter bei Adrenalektomie als einzige signifikante Faktoren. Weibliche Patienten trugen ein verringertes Risiko für das Ausbleiben des kTE ( $p = 0,0277$ ), während mit zunehmendem Alter bei Adrenalektomie das Risiko hierfür anstieg ( $p = 0,0017$ ). Die exakten Werte finden sich in Tabelle 28.

Die Kombination der beiden Faktoren ergab eine gegenseitige Abschwächung der Auswirkung und der Signifikanz, was auf eine Kollinearität dieser Faktoren hindeutete. Dies geht ebenfalls aus Tabelle 28 hervor.

## 14.5 Biochemischer Therapieerfolg

Der komplette bTE zeichnete sich durch einen hohen Prozentsatz unter den Patienten aus. Vergleiche hierzu Abschnitt 14.3. Folglich ergaben sich nur geringe Fallzahlen in den Gruppen des partiellen und ausbleibenden bTE. Regressionsanalysen für sowohl den kompletten, als auch den ausbleibenden bTE erbrachten somit keine aussagekräftigen Modelle für die Vorhersage des Therapieerfolges und wurden daher an dieser Stelle nicht näher aufgeführt.

# **Teil IV**

## **Diskussion**

## 15 Beurteilung der Methoden

In diesem Abschnitt werden zunächst die Limitationen der Studie und mögliche Störfaktoren bei der Durchführung betrachtet. Anschließend wird auf einzelne Aspekte der Datenerhebung und der Auswertung eingegangen.

### 15.1 Limitationen und Störfaktoren

Limitationen finden sich insbesondere in der Kohortengröße und dem verwendeten Gewebe. Zudem wird die Zytoplasma- und Mitochondriendichte als möglicher Störfaktor betrachtet.

**Kohortengröße** Die Patientenzahl in der gesamten Kohorte weist mit 121 Patienten eine gute Stärke auf. Ebenso sind die verfügbaren klinischen Daten für 82 Patienten und die untersuchten 64 Gewebe eine solide Datenbasis. Die Schnittmenge zwischen Geweben und klinischen Daten ist mit  $n=49$  jedoch begrenzt.

Die verschiedenen Kohorten-Ausschnitte sind zueinander jedoch vergleichbar. So ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der für den Therapieerfolg relevanten Daten wie Geschlechterverteilung, Alter,  $RR_{sys}$ , ARQ, aHTM, BMI und die Verteilung der Genotypen (vgl. Tabelle 11).

Somit ergaben sich insbesondere Limitationen in Hinblick auf die statistische Power der multivariaten Faktorenanalyse. Eine Verzerrung der Ergebnisse durch einen Selektions-Bias in den Sub-Kohorten ist jedoch unwahrscheinlich.

**Verwendetes Gewebe** Die untersuchten Gewebeproben sind Ausschnitte aus den Pathologie-Präparaten. Durch den befundenden Pathologen wurde dem endokrinologischen Forschungslabor ein morphologisch repräsentativer Ausschnitt des Knotens zur Verfügung gestellt. Die Auswahl wurde ohne Färbung der Aldosteron-Synthase durchgeführt. Hieraus erwachsen zwei mögliche Probleme. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der morphologisch dominante Knoten nicht, oder nicht ausschließlich, die Ursache des PA ist. Zum anderen könnte bei korrekter Knoten-Wahl ein morphologisch repräsentativer Ausschnitt funktionell und molekulargenetisch nicht repräsentativ sein, wie in Abschnitt 15.3 näher beschrieben wird.

Gleichzeitig konnte mit dem vorhandenen Gewebe nicht untersucht werden, ob zusätzlich zum APA noch etwa ein aktiver Aldosteron produzierender Zellhaufen, engl. „aldosterone producing cell cluster“ (APCC) vorhanden war.

Einzelne Knoten können wie in Abschnitt 12.2 beschrieben, beide typischen Zelltypen in verschiedenen Mengenverhältnissen ausprägen. Besonders kleine Tumorauschnitte könnten somit ein nicht repräsentatives Bild für den jeweiligen Tumor geben.

In der vorliegenden Arbeit wird an einigen Stellen auf die Studie von Williams et al. (2017) verwiesen. Diese schließt als Multicenter-Studie auch Patienten aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München ein. Die „Münchner Kohorte“ in Tracy Williams Studie ist dabei nicht deckungsgleich mit der in der vorliegenden: In der vorliegenden Arbeit wurde von den Patienten ausgegangen, von welchen Gewebe für Sequenzierung und Histologische Untersuchungen verfügbar war. Sekundär wurden die klinischen Daten aus dem Conn-Register erhoben. Betrachtet man jedoch die Verteilung des Therapieerfolges, so sieht man eine hohe Übereinstimmung der beiden Kohorten.

**Zytoplasma- und Mitochondriendichte** Betrachtet man die morphologischen Eigenschaften der untersuchten APAs, so weisen die ZG-ähnlichen Zellen in der HE-Färbung ein stärker angefärbtes Zytoplasma auf, als ZF-ähnliche Zellen. Wie in Abschnitt 12.3.2 beschrieben, schwankt die Ausprägung der steroidogenen Enzyme zwischen den Zelltypen. Hierauf wird in Kapitel 16 genauer eingegangen. Es fällt jedoch auf, dass die meisten der Enzyme und Kalziumkanäle in AZF am schwächsten ausgeprägt sind und speziell CYP11B2 in AZG am stärksten exprimiert wurde.

Die Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 sind in der Membran von Mitochondrien lokalisiert. Die Intensität der Ausprägung dieser Enzyme ist somit auch von der Mitochondriendichte im Zytoplasma abhängig.

Die Schwankungen der Expression könnten somit von beiden Faktoren abhängen. Für die enzymatische Syntheseleistung der APAs ist jedoch die absolute Dichte der Enzyme relevant. Aus diesem Grund wurde auf eine Relativierung zur Zytoplasma- und Mitochondriendichte verzichtet.

**Histomorphologie** Die Bestimmung des dominanten Zelltyps wie in Abschnitt 12.2 ist relativ approximativ. Spezielle Techniken wie etwa ein *Tissue-Microarray* (TMA) könnten hier exaktere Ergebnisse liefern. Allerdings war diese Technik im Rahmen dieser Arbeit nicht verfügbar. Die hier durchgeführte Zuteilung zu „überwiegend ZG“ bzw. „überwiegend ZF“ lässt indessen eine orientierende Auswertung zu.

## 15.2 Computergestützte Auswertung der Immunhistochemie

Um eine objektive, unvoreingenommene Bewertung der immunhistologischen Färbungen zu erhalten, wurde eine computergestützte Auswertung durchgeführt. Das hierfür verwendete Programm „IHC-Profiler“ bewertete die Färbung anhand der Lichtdurchlässigkeit der einzelnen Pixel in einem fotografierten Hauptgesichtsfeld, engl. „high-power field“ (HPF).

Varghese et al. (2014) entwickelten das Programm, um Färbungen mit DAB zu bewerten, ohne dass hierfür spezielle Vorarbeiten nötig sind. Wie in Unterabschnitt 9.4.2 beschrieben, rechnet der Algorithmus automatisiert den Hämatoxylin-Anteil aus dem Bild heraus. Die anschließende Dichtemessung erfolgt somit lediglich für die DAB-Färbung. Diese Methode erlaubt eine gezielte semi-quantitative Beurteilung der Expressionsstärke der angefärbten Antigene.

Die Methode ist abhängig von der Qualität der aufgenommenen mikroskopischen Bilder. Schwankungen in Belichtung und Weißabgleich können zu systematischen Fehlern führen. Dies wurde in dieser Arbeit durch standardisierte Aufnahmebedingungen und einen eigenen Weißabgleich für jeden Objektträger verhindert.

Zudem wertet der „IHC-Profiler“ große Gefäßanschnitte, Nekroseareale oder Bindegewebssepten, welche kein DAB gebunden haben, fälschlicherweise als nicht gefärbte Pixel. Ein menschlicher Betrachter würde diese richtigerweise von der Zählung ausnehmen. Varghese et al. (2014) beschreiben, dass sich dieser Ungenauigkeit effektiv begegnen lässt, indem beim Aufnehmen der Fotos die gewählten HPFs möglichst wenige solcher störender Strukturen enthalten. Werde hierauf geachtet, habe die Software eine hohe Übereinstimmung des Scoring-Ergebnisses mit geübten Pathologen. Die Autoren haben hierfür das Programm gegen den Goldstandard, also die Auswertung zweier unabhängiger, erfahrener Pathologen verglichen. Sie fanden hierbei eine Übereinstimmung in 88,6% der Gewebe. (Varghese et al. 2014)

In ebendieser Vergleichsstudie wurde beschrieben, dass in 383 von 1703 der Gewebe (22,4%) keine Übereinstimmung zwischen den beiden menschlichen Untersuchern bestand. Diese Interobserver-Variabilität (IOV) ist ein Problem, das in wechselnder Ausprägung auch für andere immunhistochemische Färbungen vorbeschrieben ist (Gavrielides et al. 2011; Lacroix-Triki et al. 2006; Thomson et al. 2001). Somit ist der Goldstandard selbst nicht fehlerfrei.

Die computergestützte Auswertung mittels „IHC-Profiler“ ermöglicht somit bei gutem Bildmaterial eine zuverlässige und objektive semi-quantitative Bewertung. Diese Methode besitzt eine gute Reliabilität und ist nicht für eine IOV anfällig.

### 15.3 Genotypisierung

In Abschnitt 15.1 wurde beschrieben, dass lediglich Anteile aus dem morphologisch dominanten Knoten der Nebenniere von der Pathologie weitergegeben wurde. Ergebnisse von Dekkers et al. (2014) weisen darauf hin, dass das Adenom-Wachstum und die Aldosteronproduktion durch unterschiedliche Mechanismen bedingt sein könnten. Außerdem fänden sich APA-typische Mutationen auch in multinodulären Nebennieren (Dekkers et al. 2014), so wie in APCCs und mikronodulärer oder diffus hyperplastischer Nebennierenrinde (Yamazaki et al. 2017). Der morphologisch dominante Knoten muss somit nicht zwangsläufig ein APA und somit die Ursache für einen unilateralen PA sein.

In den vergangenen Jahren wurde zudem wiederholt gezeigt, dass unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Knoten der gleichen Nebenniere auftreten können (Dekkers et al. 2014; Fernandes-Rosa et al. 2015; Omata et al. 2017). Wurde durch den Pathologen also korrekterweise ein APA für Forschungszwecke weiter gegeben, so könnte dieser nicht als einziger Knoten eine relevante, somatische Mutation tragen.

Nanba et al. (2016) beschrieben zudem einen Fall, in dem ein APA in verschiedenen Bereichen gleichzeitig somatische Mutationen in ATP2B3 und KCNJ5 enthielt. Durch Sequenzierung von Tumormaterial aus lediglich einem Tumorauschnitt könnte somit eine möglicherweise existente weitere Mutation übersehen werden. Dies ist jedoch ein bisher selten beschriebenes Phänomen und hat daher vermutlich wenig Einfluss auf diese Studie.

### 15.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Methoden, welche in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, sind in Kapitel 10 beschrieben. In der explorativen Auswertung wurden einige verschiedene Daten wie klinische oder experimentelle Parameter miteinander verglichen. Zudem wurden Vergleiche zwischen Genotypen, Geschlechtern oder etwa histomorphologischen Kategorien angestellt. Solche Subgruppen-Analysen oder multiple Testungen bergen die Gefahr von zufälligen Assoziationen und Korrelationen, also Fehlern 1. Art.

## 15 Beurteilung der Methoden

Manche Autoren empfehlen für multiple Testungen statistische Korrekturen des  $p$ -Wertes, wie etwa die Bonferroni-Korrektur, um den gemeinsamen Fehler 1. Art aller durchgeführter Analysen auf einem gemeinsamen Niveau von  $\alpha < 0,05$  zu halten (Bender et al. 2001; Koch et al. 1996; Sankoh et al. 1997; Thompson 1998).

Andere wiederum argumentieren, dass dies bei einer explorativen Datenanalyse hinderlich sei. Der Fehler 2. Art werde dadurch größer und auf diese Weise würden tatsächliche Zusammenhänge teils nicht erkannt werden (Perneger 1998; Rothman 1990; Savitz et al. 1995; Savitz et al. 1998).

Wiederum andere geben Empfehlungen, wann eine Korrektur anzuwenden ist (Armstrong 2014; Proschan et al. 2000; Streiner et al. 2011). Die Empfehlungen weichen jedoch in Details voneinander ab und lassen sich nicht zwangsläufig auf jeden Anwendungsfall übertragen.

Da in dieser Arbeit viele unterschiedliche Hypothesen getestet wurden, mit teils getrennten Datensätzen und kausal nicht zusammenhängenden Fragestellungen, wurde hier ein Mittelweg gewählt. In einem ersten Schritt wurde ohne Korrektur explorativ nach Zusammenhängen gesucht. Wichen dabei Varianzen oder Rangsummen eines Parameters in  $n > 2$  Subgruppen signifikant voneinander ab, wurden für diesen Parameter paarweise Vergleiche der einzelnen Subgruppen angeschlossen. In diesen paarweisen Vergleichen kam die Bonferroni-Korrektur zur Anwendung, um den Fehler 1. Art auf einem moderaten Niveau zu halten. Die Ergebnisse beider Stufen sind gegebenenfalls in Teil III angegeben und werden entsprechend in Kapitel 16 diskutiert.



## 16 Beurteilung der Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die einzelnen Ergebnisse aus Teil III diskutiert. Während einige Ergebnisse mit der Literatur übereinstimmen, zeigen sich an manchen Stellen Abweichungen und Besonderheiten. Im Folgenden werden zunächst die Patienten der Kohorte betrachtet. Anschließend werden die Ergebnisse der Tumor-Charakterisierung besprochen inklusive Genotypisierung, Histomorphologie und Immunhistochemie. Die letzten beiden Abschnitte behandeln die funktionelle Charakterisierung und den Therapieerfolg.

### 16.1 Epidemiologische Betrachtungen

Epidemiologisch interessant zeigten sich im Patientenkollektiv die Geschlechter- und Altersverteilungen, die Prävalenz der Hypokaliämie und die Unterschiede präoperativer Parameter zwischen den Geschlechtern. Neben diesem wird im folgenden Abschnitt auch die Verteilung der Mutationen im Vergleich zur Literatur betrachtet.

#### 16.1.1 Patientenkollektiv

Die Studienkohorte dieser Arbeit deckt sich hinsichtlich Geschlechter- und Altersverteilung mit internationalen Vergleichskohorten, wie nachstehend dargelegt werden soll.

**Geschlechterverteilung** In dieser Studienkohorte fanden sich unter den 121 Patienten 50 Frauen (41, 3%) und 71 Männer (58, 7%).

In einer kürzlich veröffentlichten Multicenter-Studie, die 12 Zentren aus Australien, Europa, Japan und den USA einschloss, fanden sich unter 705 Patienten mit unilateralem primärem Hyperaldosteronismus 44, 1% Frauen (Williams et al. 2017). Je nach Zentrum schwankte dieser Anteil zwischen 24 – 60%.

Zwar unterscheiden Williams et al. (2017) nicht explizit zwischen APA und unilateraler adrenokortikaler Hyperplasie. Die Geschlechterverteilung in der vorliegenden Arbeit lag jedoch im Mittelfeld der internationalen Vergleichskohorten.

**Altersverteilung** Ähnlich verhielt es sich mit dem Alter bei Adrenalektomie. Die von Williams et al. (2017) beschriebenen 705 Patienten stellten sich mit  $50,8 \pm 10,9$  Jahren

zur Adrenalektomie vor. Die in dieser Arbeit vorliegenden Patienten waren zu diesem Zeitpunkt im Median 51 (IQA 17) Jahre alt.

**Anteil hypokaliämischer Patienten in der Kohorte** Für 99 Patienten lagen die niedrigsten registrierten Kaliumwerte vor Substitution vor. Von diesen zeigten 96 eine Hypokaliämie. Der Anteil lag also bei  $96/99 \approx 97,0\%$ . Selbst unter der hypothetischen Annahme, dass alle übrigen Patienten, für die keine Werte vorlagen, normokaliäm waren, läge der Anteil bei mindestens  $96/121 = 79,3\%$ .

In der Literatur ist der Anteil der PA-Patienten mit Hypokaliämie zwischen 9 und 37% angegeben (Mulatero et al. 2004; Rossi et al. 2006). Betrachtet man lediglich APAs, so wurde von Rossi et al. (2006) ein Anteil von 48% beschrieben.

Eine kürzliche Metaanalyse von Käyser et al. (2016) unterschied zwischen Zentren der primären Versorgung und spezialisierten Zentren. Hier zeigten sich jeweils Prävalenzen von 0 – 37,5% und 0 – 67% respektive. Spezialisierte Zentren, wie es auch die Conn-Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der LMU München ist, weisen somit tendenziell höhere Prävalenzen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem nicht die Punktprävalenz der Hypokaliämie bei Aufnahme oder erster Untersuchung in der Ambulanz herangezogen. Stattdessen wurde in der jeweiligen Patientenhistorie der niedrigste registrierte  $K_s^+$ -Wert ohne  $K^+$ -Substitution gewählt (vgl. Abschnitt 4.2). Dies kann den Unterschied zu den oben beschriebenen, niedrigeren Zahlen erklären.

**Geschlechterunterschiede präoperativer Parameter** Es fiel auf, dass es signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten bei ARQ, Renin,  $RR_{sys}$ , DDD und BMI gab (s. hierzu Tabelle 10 in Abschnitt 11.3). Bei gleicher PAC zeigten Frauen ein niedrigeres Renin. Infolgedessen wiesen sie im Mittel einen höheren ARQ auf. Des Weiteren hatten weibliche Patienten einen niedrigeren systolischen Blutdruck, obwohl sie einen deutlich geringeren medianen Bedarf an antihypertensiven Medikamenten hatten. Außerdem wiesen Frauen einen um etwa 4 Punkte niedrigeren BMI auf.

Diese Geschlechtsunterschiede sind für die spätere Faktorenanalyse von Relevanz. In Abschnitt 14.4 zeigen sich einige dieser Parameter als relevante Prädiktoren für den Therapieerfolg. Die Bedeutung des Geschlechts hierbei wird näher in Kapitel 17 erörtert.

### 16.1.2 Mutationsverteilung

In der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte fanden sich in 62,8% der APAs somatische Mutationen in APA-typischen Genen. Fernandes-Rosa et al. (2014) beschrieben in einer Multicenter Studie mit 474 APAs eine insgesamt Prävalenz von somatischen Mutationen in 54,2% der APAs. Je nach Zentrum schwankte der Anteil jedoch von 27,2% – 66,6% (Fernandes-Rosa et al. 2014).

**KCNJ5** *KCNJ5* ist mit 40,5% in dieser Kohorte das Gen, welches am häufigsten von somatischen Mutationen betroffen war. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten.

In westlichen Populationen wurden bislang Häufigkeiten von 31–47% (Åkerström et al. 2012; Arnesen et al. 2013; Boulkroun et al. 2012; Dekkers et al. 2014; Monticone et al. 2012; Scholl et al. 2013b; Williams et al. 2013) beschrieben. In der bisher größten beschriebenen europäischen Multicenter-Kohorte mit 474 Patienten findet sich eine Prävalenz von *KCNJ5*-Mutationen von 38,0% (Fernandes-Rosa et al. 2014).

In zahlreichen asiatischen Kohorten zeigten sich *KCNJ5*-Mutationen häufiger. Hier reichten die Anteile von 65,2 – 76,8% (Hong et al. 2016; Taguchi et al. 2012; Wang et al. 2015; Wu et al. 2015; Zheng et al. 2015). Die Gründe für die höhere Prävalenz in asiatischen Kohorten sind nicht endgültig geklärt. Eine Metaanalyse von Lenzini et al. (2015) erbrachte keine eindeutigen Hinweise auf ethnische oder kulturelle Ursachen. Als mögliche Faktoren wurden jedoch Unterschiede in den Protokollen der Patienten-Selektion oder Unterschiede in der mittleren NaCl-Einfuhr genannt (Lenzini et al. 2015).

Insbesondere Frauen waren von *KCNJ5*-Mutationen betroffen. Diese Assoziation wurde bereits kurz nach Identifikation des Gens von Azizan et al. (2012) beschrieben und später in verschiedenen Kohorten bestätigt (Åkerström et al. 2015; Fernandes-Rosa et al. 2014; Scholl et al. 2015a). Vor wenigen Jahren fassten Williams et al. (2015) die Prävalenz an *KCNJ5*-Mutationen in westlichen und asiatischen Kohorten zusammen. Hierbei ergaben sich 73% Frauen in westlichen Populationen und 58% Frauen bei asiatischen Populationen. Lenzini et al. (2015) bezogen sich teilweise auf die gleichen Studien und fanden eine weltweite Prävalenz von 69% Frauen in 725 *KCNJ5*-APAs. Aktuelle Vergleiche asiatischer mit westlichen Kohorten zeigen einen Unterschied in der Häufigkeit weiblicher Patienten und können die Assoziation der Mutation zu Frauen nicht für asiatische Kohorten nachweisen (Okamura et al. 2017).

Mutationen in *KCNJ5* wurden im Vergleich zu anderen Mutationen oder Wildtyp-APAs wiederholt bei jüngeren Patienten beschrieben (Åkerström et al. 2015; Fernandes-Rosa et

al. 2014; Lenzini et al. 2015; Okamura et al. 2017). In der Kohorte der vorliegenden Arbeit waren die Patienten mit *KCNJ5*-Mutationen im Median nicht die jüngsten. Zwar lag der Median der *KCNJ5*- Gruppe bei ED unterhalb des Kohorten-Medians, jedoch wurde der PA in den *CACNA1D*- und *CTNNB1*-Gruppen noch früher diagnostiziert. Patienten mit Mutationen in *ATP1A1*, *ATP2B3* und Wildtyp-Genotyp waren im Median bei ED älter.

**ATP1A1 und ATP2B3** Wie in Abschnitt 12.1 beschrieben, liegt der Anteil der Mutationen in *ATP1A1* bzw. *ATP2B3* bei 5,8% und 5,0%. In der bisher größten europäischen Kohorte fanden sich in 5,3% (0 – 9,5%) der APAs Mutationen in *ATP1A1* und in 1,7% (0 – 4,3%) in *ATP2B3* (Fernandes-Rosa et al. 2014).

Für die Unterschiede in den Prävalenzen gibt es auf Grund der geringen Fallzahl und der geringen Abweichungen noch keine eindeutigen Erklärungen. Fernandes-Rosa et al. (2014) halten unspezifische Unterschiede der Kohorten bei Geschlechtern, Alter und anderen klinischen Eigenschaften für am ehesten ursächlich.

**CACNA1D und CACNA1H** In der vorliegenden Arbeit fand sich in 8,3% der Adenome eine Mutation in *CACNA1D*. In der europäischen Vergleichskohorte von Fernandes-Rosa et al. (2014) lag der Anteil bei 9,3% (0 – 13,6%). Es zeigt sich also eine sehr ähnliche Häufigkeit.

Scholl et al. (2015b) beschrieben eine Keimbahnmutation im *CACNA1H*-Gen (*CACNA1H*<sup>M1549V</sup>). Keines der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Adenome wies diese Mutation auf. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die von Scholl beschriebene Mutation mit einem *Early-Onset* Hyperaldosteronismus bis zum 10. Lebensjahr assoziiert war. Der Jüngste Patient in unserer Kohorte war mit 16 Jahren deutlich über dieser Altersgrenze.

**CTNNB1 und ARMC5** In unserer Kohorte fanden sich insgesamt drei Adenomen (2,5%) Mutationen im *CTNNB1*-Gen, wobei nur in Zweien (1,7%) eine solitäre *CTNNB1*-Mutation vorlag. In der Literatur sind in anderen Kohorten Häufigkeiten von 2,1–5,1% beschrieben. (Åkerström et al. 2016; Scholl et al. 2015a; Wu et al. 2017).

Zwei der drei Adenome mit einer Mutation in *CTNNB1* fanden sich bei Frauen. Diese Häufung bei weiblichen Patienten deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Scholl et al. 2015a; Teo et al. 2015; Wu et al. 2017). Ein Mausmodell von Berthon et al. (2010) zeigte zudem, dass adrenokortikale Tumoren mit *CTNNB1*-Mutation in weiblichen Nagern deutlich aggressivere Phänotypen entwickelten, als bei männlichen Tieren.

**PRKACA** Mutationen im *PRKACA*-Gen wurden bisher überwiegend bei Patienten mit Cushing-Syndrom beschrieben (Beuschlein et al. 2014; Carney et al. 2015; Lodish et al. 2015; Sato et al. 2014). Wie von Rhayem et al. (2016) beschrieben, finden sich vereinzelt auch Mutationen dieses Gens in APAs.

Die zwei in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten mit *PRKACA*-Mutation sind in Rhayem et al. (2016) eingehend untersucht worden.

Einer der Patienten in der *PRKACA*-Gruppe trug zudem eine Keimbahnmutation im *ARMC5*-Gen, welche nach *in-silico* Analyse jedoch als benigne eingestuft wurde (Rhayem et al. 2016). Aus diesem Grund wurde diese Mutation in Abschnitt 12.1 nicht aufgeführt. Wie  $\beta$ -Catenin gehört *ARMC5* zur Familie der Armadillo-repeat-containing Proteine. Die Funktion von *ARMC5* ist noch nicht endgültig erforscht. Es gibt jedoch Hinweise, die eine Rolle als Tumor-suppressor-Gen nahelegen (Assié et al. 2013). Bisher waren *ARMC5*-Mutationen in Cushing-Adenomen beschrieben worden (Assié et al. 2013; Faucz et al. 2014). Zilbermint et al. (2015) und Mulatero et al. (2016) haben Keimbahn-Genvariationen in verschiedenen Lokalisationen des *ARMC5*-Gens auch in APAs nachgewiesen. Diese schienen jedoch nur in einem Teil der Fälle eine Auswirkung auf die Proteinfunktion zu zeigen (Zilbermint et al. 2015).

## 16.2 Histopathologische Betrachtungen

Auf Zellebene sollen sowohl das Tumorwachstum, als auch die Immunhistologie diskutiert werden.

### 16.2.1 Tumorwachstum

Beim Tumorwachstum zeigten sich sowohl die Tumorgöße, als auch die morphologische Zusammensetzung der Tumoren interessant.

**Tumorgöße** In dieser Arbeit wiesen die größten Tumoren Mutationen in *KCNJ5* auf. Wie in Abbildung 12c erkennbar, liegt der Großteil der *KCNJ5*-mutierten Adenome beim Durchmesser über den Werten der übrigen Gruppen. In der statistischen Auswertung zeigte sich jedoch – möglicherweise auf Grund der geringen Fallzahl in einigen Genotyp-Gruppen – nur ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen *KCNJ5*-mutierten APAs und Wildtyp APAs.

Azizan et al. (2012) zeigten in ihrer Kohorte, dass *KCNJ5*-mutierte APAs signifikant größer waren, als Wildtyp APAs. „Wildtyp“ schloss in Azizans Arbeit jedoch alle APAs ein, die keine *KCNJ5*-Mutation trugen. Auch nach Entdeckung der weiteren typischen Mutationen, wurde wiederholt gezeigt, dass *KCNJ5*-mutierte APAs größer sind als alle übrigen Mutationsgruppen (Åkerström et al. 2015; Kitamoto et al. 2016; Scholl et al. 2015a; Tan et al. 2017).

Umgekehrt fiel die Gruppe der *CACNA1D*-mutierten APAs auf. Diese sind oft kleiner als 1 cm, teils sogar  $\leq 0,5$  cm groß (Azizan et al. 2013). Auch in der hier vorliegenden Arbeit wies diese Gruppe neben *PRKACA*-mutierten APAs die im Median kleinsten Durchmesser auf. Wiederholt wurden *CACNA1D*-mutierte APAs im direkten Vergleich mit *KCNJ5* (Fernandes-Rosa et al. 2014; Scholl et al. 2013a) und mit Wildtyp APAs (Fernandes-Rosa et al. 2014) als signifikant kleiner beschrieben. In einer japanischen Studie waren *CACNA1D*-mutierte APAs jedoch nicht kleiner als Wildtyp APAs (Kitamoto et al. 2016). Diese Eigenschaft *CACNA1D*-mutierter APAs erweist sich als Problem bei der Diagnostik. Adenome dieser Gruppe werden in bildgebenden Verfahren auf Grund der geringen Größe oft übersehen (Azizan et al. 2013; Monticone et al. 2015). Analog hierzu fand eine japanische Studie, die eben solche in der Bildgebung unsichtbaren Knoten sequenzierte, unter 26 CPY11B2-positiven Knoten 17 (65,4%) mit einer *CACNA1D*-Mutation (Yamazaki et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den Adenomen männlicher und weiblicher Patienten gefunden. Abbildung 12b zeigt, dass weibliche Patienten zu größeren Tumoren neigen, als männliche Patienten. In der Literatur findet sich hierzu keine Erklärung. Ein Zusammenhang mit der Assoziation von weiblichen Patienten und Mutationen in *KCNJ5* liegt nahe und wird in Kapitel 17 näher besprochen.

**Histomorphologie** In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein starker Einfluss von Patientengeschlecht und Mutationsstatus auf die Histomorphologie. *KCNJ5*-mutierte Adenome setzten sich überwiegend aus *ZF*-ähnlichen Zellen zusammen, *CACNA1D* aus *ZG*-ähnlichen Zellen. *ZF*-ähnliche Zellen überwogen in Adenomen weiblicher Patienten, während beinahe alle *AZGs* in männlichen Patienten zu finden waren.

Insgesamt betrachtet überwiegen Adenome mit *ZF*-ähnlichen Zellen (Monticone et al. 2015). Im Vergleich der Genotypen zeichnet sich in der Literatur ein ähnliches Bild zur hier untersuchten Kohorte ab. *KCNJ5*-mutierte APAs wurden oft mit einer Dominanz an *ZF*-ähnlichen Zellen assoziiert (Azizan et al. 2012; Monticone et al. 2015; Scholl et al.

2015a). ZG-ähnliche Zellen fanden sich demgegenüber vermehrt in Adenomen mit Mutationen in *CACNA1D* (Azizan et al. 2013; Monticone et al. 2015) und in *ATP1A1* (Azizan et al. 2013). Eine Assoziation von ZG-ähnlichen Zellen und ATPasen fanden auch Kitamoto et al. (2016). Die vier in Kitamotos Studie untersuchten APAs mit *CACNA1D*-Mutation zeigten jedoch – konträr zu den bisher beschriebenen, größeren Kohorten – überwiegend ZF-ähnliche Zellen.

Eine Assoziation von Geschlecht und Zelltyp ist in der Literatur nicht explizit besprochen. Wie bei der Tumorgröße liegt ein Zusammenhang mit der Assoziation von weiblichen Patienten und Mutationen in *KCNJ5* nahe und wird in Kapitel 17 näher besprochen.

### 16.2.2 Immunhistologie

In diesem Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der Färbungen der Enzyme der Steroidhormonsynthese betrachtet. Im Anschluss werden die Ergebnisse der IHC der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle diskutiert.

**Enzyme der Steroidhormonsynthese** Die Immunoexpression der Aldosteronsynthese zeigte über alle APAs hinweg eine heterogene Immunexpression mit einer breiten Streuung der Intensität. CYP11B1 hingegen war kaum bis gar nicht exprimiert mit einem eher flächig-diffusem Expressionsmuster (s. hierzu Abschnitt 12.3). Ähnliche Ergebnisse wurden von Nakamura et al. (2014) und Konosu-Fukaya et al. (2015) beschrieben.

Wie in Unterabschnitt 12.3.2 beschrieben, war die Expressionsintensität der Aldosteronsynthese höher in kleineren Knoten und in APAs mit überwiegend ZG-ähnlichen Zellen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Monticone et al. (2015), die in einer umgekehrten Herangehensweise in Adenomen mit starker Immunoexpression von CYP11B2 meist ZG-ähnliche Zellen fanden. Dabei handelte es sich meist um kleinere Adenome mit Mutationen in *ATP1A1*, *ATP2B3* oder *CACNA1D* (Monticone et al. 2015). AZF-Adenome zeigten dort im Vergleich zu AZG-Adenomen zudem häufiger eine *KCNJ5*-Mutation, eine stärkere CYP11B1-Expression und eine schwächere CYP11B2-Expression (Monticone et al. 2015). In Abbildung 16 der vorliegenden Arbeit ist erkenntlich, dass diese Unterschiede nicht für CYP11B1, jedoch für CYP11B2 repliziert werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich, wie in Unterabschnitt 12.3.2 beschrieben, keine signifikanten Unterschiede der Immunoexpression zwischen den Genotypen. Bei Vergleichen der Immunoexpression der Aldosteronsynthese zwischen Adenomen unterschiedlichen Genotyps fanden Kitamoto et al. (2016) in einer Fallstudie, dass alle vier

*ATP2B3*-mutierte APAs eine ausgeprägtere CYP11B2-Reaktivität zeigten, als ein *ATP1A1*-mutiertes Adenom. Eine zuverlässige Quantifizierung der Immunoexpression gestaltet sich auf Grund der geringen Fallzahl dieser Genotypen insgesamt jedoch als schwierig.

Dies gilt nicht nur für die in dieser Arbeit durchgeführte Immunhistochemie. Vergleiche der relativen mRNA-Expression zeigten unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse. Okamura et al. (2017) fand in einer japanischen Kohorte eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der Aldosteronsynthese in *KCNJ5*-mutierten Adenomen verglichen mit nicht-*KCNJ5*-mutierten Adenomen. Geht man von einer positiven Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression in der Immunhistochemie aus, so würde dies den oben beschriebenen Ergebnissen widersprechen, in denen *KCNJ5*-mutierte Adenome mit vorwiegend *ZF*-ähnlichen Zellen eine relativ schwächere Expression der Aldosteronsynthese aufwiesen (vgl. Abbildung 15b). In einer großen europäischen Kohorte fand Fernandes-Rosa et al. (2014) jedoch keine Unterschiede in den mRNA-Expressionen von CYP11B1 und CYP11B2 zwischen Adenomen der Genotypen *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* und Wildtyp. Außerdem wurde wiederholt kein Unterschied der mRNA-Expression von CYP11B1 und CYP11B2 zwischen *ZF*- und *ZG*-ähnlichen Zellen gefunden (Fallo et al. 2002; Fernandes-Rosa et al. 2014). Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die vorhandene Literatur insofern, dass Aussagen zur Charakterisierung der Genotypen über die Immunoexpression der Schlüsselhormone der Steroidhormonsynthese schwierig zu treffen sind.

In der vorliegenden Studie war CYP17 bei Frauen signifikant stärker exprimiert, was bisher in der Literatur nicht vorbeschrieben ist. In der Literatur fanden sich jedoch Expressionsstudien für CYP17 im Bezug auf das Vorhandensein einer *KCNJ5*-Mutation. Auf Grund der Assoziation von weiblichem Geschlecht zu Mutationen in *KCNJ5*, sollen diese Studien hier stellvertretend aufgeführt werden. Oki et al. (2012) fanden in Zellkulturen von *KCNJ5*-mutierten HAC15-Zellen eine reduzierte mRNA-Expression von CYP17 im Vergleich zur Kontrolle. Dem entgegenstehend beschrieben Tan et al. (2017), dass CYP17 in *KCNJ5*-mutierten Adenomen stärker exprimiert ist, als in Kontrollen. Die Studienlage ist somit nicht definitiv geklärt und lässt keine Rückschlüsse auf die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zu. Eine Erklärung könnte jedoch in der Histomorphologie der APAs liegen: Sowohl CYP11B1, als auch CYP17 und HSD3B2 sind physiologisch in der *ZF* exprimiert (Doi et al. 2014; Gomez-Sanchez et al. 2014; Konosu-Fukaya et al. 2015). Die positive Korrelation zwischen CYP11B1 und CYP17 in den hier untersuchten APAs entspricht somit physiologischen Verhältnissen und wurde auch von Konosu-Fukaya et al. (2015)



beschrieben. Die Assoziation von weiblichem Geschlecht mit der AZF-Morphologie (vgl. Tabelle 12) könnte somit die stärkere Expression von CYP17 erklären.

Konosu-Fukaya beschrieb ebenso eine starke positive Korrelation von HSD3B1 und CYP11B2 in APAs (Konosu-Fukaya et al. 2015). Diese Korrelation konnte in der vorliegenden Studie so nicht nachvollzogen werden. Verwoert et al. (2015) fanden mittels mRNA-Expressionsanalysen ebenfalls keine Korrelation von HSD3B1 und CYP11B2 in APAs. In der ZG gesunder Nebennieren findet sich physiologischerweise eine Kolo-kalisierung von HSD3B1 und CYP11B2 (Doi et al. 2014).

Während manche Autoren von beiden  $3\beta$ -HSD Isoformen eine Hochregulierung in APAs fanden (Wu et al. 2013), beschrieb Doi jedoch, dass in APAs eine deutliche Abschwächung der HSD3B1-Expression zu finden sei, während die Isoform HSD3B2 in den Adenomzellen dominiere (Doi et al. 2014). Eine Hochregulierung der HSD3B2 in APAs wurde mittels mRNA-Expressionsanalysen auch von Bassett et al. (2005) beschrieben. Diese Isoform scheint somit in der pathologisch erhöhten Aldosteron-Produktion in APAs eine bedeutende Rolle zu spielen. In Übereinstimmung hiermit zeigte sich die in der vorliegenden Arbeit gefundene positive Korrelation der CYP11B2 mit HSD3B2.

Zweifellos spielen die Isoformen der  $3\beta$ -HSD eine bedeutende Rolle in der Hormonproduktion sowohl in der physiologischen Nebennierenrinde (NNR), als auch in APAs. Die bisherigen Studien ergeben jedoch kein einheitliches Bild der Expressionsanalysen.

**Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2** In den letzten Jahren ist die Bedeutung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle für die physiologische Regulation der Aldosteronproduktion und der APA Pathogenese zunehmend entschlüsselt worden (Barrett et al. 2016). Sie sind physiologischerweise vornehmlich in der ZG exprimiert (Felizola et al. 2014). Ein Vergleich von Ca<sub>v</sub>1.3 und Ca<sub>v</sub>3.2 zwischen APAs und gesunden Nebennierenrinden zeigte jedoch keinen Unterschied in der Intensität der Immunoexpression (Felizola et al. 2014).

Für Ca<sub>v</sub>1.3 ist in Zellkulturen nachgewiesen, dass die Kanäle bei Vorliegen einer Mutation die Aldosteronproduktion steigern können (Xie et al. 2016). Spezifische Hemmung der mutierten Kanäle revidierte diese Steigerung wieder (Xie et al. 2016). Dies stützt die in Tabelle 15 beschriebene deutliche positive Korrelation der Immunexpressionen von CYP11B2 und Ca<sub>v</sub>1.3. Ca<sub>v</sub>3.2 war dagegen in der vorliegenden Studie nicht mit CYP11B2 korreliert.

Eine Expressionsanalyse von Felizola et al. (2014) zeigte jedoch eine positive Korrelation der mRNA-Expression von beiden Kanälen mit CYP11B2. Zudem können somatische und Keimbahnmutationen beider Kalziumkanäle ursächlich für PA sein (Azizan et al.

2013; Daniil et al. 2016; Scholl et al. 2013a; Scholl et al. 2015b). Auch wenn  $Ca_v3.2$  in der hier vorliegenden Arbeit nicht signifikant mit der Expression der Aldosteronsynthese korrelierte, so scheint er dennoch eine relevante Rolle in der Aldosteronproduktion und -regulation zu spielen, wie die von Scholl und Kollegen beschriebene Keimbahnmutation in *CACNA1H* zeigt (Scholl et al. 2015b).

Felizola et al. (2014) fanden eine Assoziation von höherer  $Ca_v3.2$ -Expression mit *KCNJ5*-Mutationen. Die Expression von  $Ca_v3.2$  unterschied sich in der vorliegenden Studie nicht zwischen den Genotypen. Stattdessen konnten bei der Expression von  $Ca_v1.3$  signifikante Unterschiede der Rangsummen im Vergleich aller Genotypen identifiziert werden.

## 16.3 Klinische Betrachtungen

Von einem klinischen Standpunkt aus wurden die funktionelle Charakterisierung der Tumoren und der Therapieerfolg betrachtet.

### 16.3.1 Funktionelle Charakterisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die gewebespezifischen Eigenschaften mit klinischen und biochemischen Parametern zu korrelieren und daraus die pathologische Funktion der Tumoren im Organismus abzuleiten. Hierbei wurden die drei Aspekte Genotyp, Histopathologie und Immunhistochemie betrachtet.

**Genotyp** In Abschnitt 13.1 wurde gezeigt, dass keiner der untersuchten klinischen und biochemischen Parameter signifikante Unterschiede in paarweisen Vergleichen der Genotypgruppen zeigte. Zumindest in Kruskal-Wallis-Tests zeigten sich signifikante Abweichungen der Rangsummen bei Kalium, PAC und ARQ. In der Betrachtung der Werte fällt jedoch auf, dass höhere PAC-Werte in den Genotypen *ATP1A1* und *ATP2B3* mit den niedrigsten Kaliumwerten einhergehen (s. hierzu Tabelle 16).

Auch Analysen anderer Arbeitsgruppen fanden keine Assoziation von PAC und Genotyp (Åkerström et al. 2015; Fernandes-Rosa et al. 2014). Fernandes-Rosa fand ebenso keine Assoziation des Genotyps mit der Reninaktivität, ARQ und den aHTM (Fernandes-Rosa et al. 2014). Kürzlich beschrieben Okamura et al. (2017), dass die PAC bei Patienten mit *KCNJ5*-mutierten Adenomen höher und das Kalium niedriger ist, als bei Patienten mit APAs ohne *KCNJ5*-Mutation. In der vorliegenden Studie ist dies jedoch nicht nachvollziehbar. Die mediane PAC lag in der *KCNJ5*-Gruppe im Mittelfeld der gesamten Kohorte.

Die Ergebnisse der Kruskal-Wallis Analyse weisen darauf hin, dass es funktionelle Unterschiede der diversen Genotypen geben kann. Wie an anderer Stelle bereits besprochen erwiesen sich zuverlässige statistische Auswertungen bei der geringen Fallzahl mancher Genotypen jedoch als schwierig.

In der vorliegenden Studie waren die benötigten DDDs antihypertensiver Medikamente in den Gruppen *ATP1A1* und *CACNA1D* am höchsten. Zu demselben Ergebnis kamen ebenfalls Tan et al. (2017). Auch wenn der Blutdruck in diesen beiden Gruppen nicht höher ist, als in den übrigen, so scheinen die höheren DDDs auf eine therapieresistentere Form des PA hinzuweisen.

**Histopathologie** In Abschnitt 13.2 wurde gezeigt, dass klinische und biochemische Parameter mit der Tumorgöße und der APA-Zellmorphologie korrelierten.

Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit größeren Tumoren eine höhere PAC und einen niedrigeren systolischen Blutdruck aufwiesen. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit Resultaten von Giacchetti et al. (2009). Diese fanden höhere PAC-Werte bei Patienten deren Adenome <20mm groß waren im Vergleich zu Patienten mit größeren Adenomen.

Tumoren mit vorwiegend ZG-ähnlichen Zellen fanden sich in Patienten mit höherem systolischen Blutdruck. Da AZGs tendenziell kleinere Adenome sind, passt dies zu der indirekten Korrelation zwischen Tumorgöße und systolischem Blutdruck. Ebenso benötigten AZGs präoperativ annähernd signifikant mehr DDDs antihypertensiver Medikamente, als AZF-Adenome. Dies passt zum Fund in *CACNA1D*- und *ATP1A1*-mutierten Adenomen, die überwiegend ZG-ähnliche Zellen trugen und deutlich mehr DDDs benötigten. Dieser Cluster scheint also zu besonders therapieresistentem Bluthochdruck zu führen.

Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied fand sich beim BMI, der in der AZF-Gruppe deutlich niedriger lag, als bei Patienten mit andersartigen Adenomen. Hier lässt sich schwer ein direkter kausaler Zusammenhalt finden. Auch in der Literatur finden sich hierzu keine Hinweise. Zieht man jedoch in Betracht, dass AZF-Adenome häufiger eine *KCNJ5*-Mutation trugen und diese vorwiegend unter weiblichen Patienten zu finden waren, so passt dies zum niedrigeren BMI bei den weiblichen Patienten der Kohorte.

**Immunhistochemie** Die Immunoexpression der Enzyme der Steroidhormonsynthese und der Kalziumkanäle wurde zur Operationalisierung der jeweiligen Proteinexpression herangezogen. Es fanden sich hierbei einige Korrelationen, die im Folgenden besprochen werden.

In der vorliegenden Studie wurde jeweils eine positive Korrelation zwischen CYP11B2-H-Scores mit PAC ( $\rho_s = 0,1245$ ) bzw. mit dem ARQ ( $\rho_s = 0,2538$ ) gefunden. Beide Korrelationen erreichten jedoch nicht eine statistische Signifikanz von  $p < 0,05$ . In einer ähnlichen Studie von Nakamura et. al. fanden sich ebenfalls keine signifikanten Korrelationen zwischen der Immunoexpression von CYP11B1, CYP11B2 und HSD3B2 bezüglich Tumorgroße, PAC und Reninaktivität (Nakamura et al. 2014).

Einige Autoren fanden eine positive Korrelation zwischen dem Produkt „CYP11B2-Immunoexpression  $\times$  Tumolvolumen“ und dem Aldosteronlevel in entweder Blutplasma (Monticone et al. 2015; Nanba et al. 2013), in 24h-Urin (Boulkroun et al. 2010) oder beiden Parametern (Ono et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen Tumordurchmesser und PAC ( $\rho_s = 0,255$ ,  $p = 0,0105$ ). Bei Multiplikation von CYP11B2-H-Score und Tumordurchmesser bzw. -volumen könnte somit nicht sicher geschlossen werden, ob tatsächlich das Produkt „CYP11B2-Immunoexpression  $\times$  Tumolvolumen“ mit der PAC korreliert, oder ob dies ausschließlich auf das Tumolvolumen zurückzuführen wäre. Aus diesem Grund wurde auf diese Volumenkorrektur verzichtet.

Eine stärkere Expression der CYP11B1 ging mit einem niedrigeren diastolischen Blutdruck einher. Monticone et al. (2015) fanden ebenfalls annähernd signifikant ( $p = 0,1$ ) niedrigere diastolische Blutdrücke in Patienten mit CYP11B1-positiven Adenomen und signifikant niedrigere systolische Blutdrücke.

Die Expression der CYP17 korrelierte negativ mit der PAC und dem LI. Dieser Fund erscheint nachvollziehbar, zumal eine höhere CYP17-Expression typischerweise nicht in Aldosteron produzierenden ZG-Zellen stattfindet und somit auch in APAs oft keine oder nur eine schwache Expression beschrieben wurde (Sakuma et al. 2013; Sasano 1994).

HSD3B2 korrelierte positiv mit dem ARQ. In der Literatur fand sich diesbezüglich bislang eine weitere Studie von Nakamura et. al., die jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen HSD3B2-Immunoexpression und PAC oder Renin fanden. In Unterabschnitt 16.2.2 wurde dargelegt, dass HSD3B2 eine bedeutende Rolle in der autonomen Aldosteronproduktion in APAs spielen kann. Eine Korrelation der Expression mit dem ARQ erscheint somit folgerichtig.

Wie weiter oben bereits beschrieben, scheint der Kanal  $Ca_v1.3$  eine bedeutende Rolle für die Regulation der Steroidhormonsynthese zu spielen (s. Unterabschnitt 16.2.2). In der funktionellen Charakterisierung fand sich jedoch lediglich eine signifikante negative Korrelation der  $Ca_v1.3$ -Expression mit der Reninkonzentration. Diese Korrelation erscheint nachvollziehbar, wenn man wie zuvor bereits beschrieben von einer Stimulation

der Aldosteronproduktion durch eine höhere  $Ca_v1.3$ -Aktivität ausgeht. Eine Herabregulation des Renins wäre somit eine konkordante Erscheinung. Felizola et al. (2014) fanden eine positive Korrelation der  $Ca_v3.2$  mRNA-Expression mit der PAC. In der vorliegenden Studie ließ sich dies für die Immunoexpression jedoch nicht nachvollziehen.

### 16.3.2 Therapieerfolg

Ziel der Faktorenanalyse in Abschnitt 14.4 war einerseits, mögliche präoperative Prädiktoren zu finden, die den Therapieerfolg bereits vor der Operation vorhersagen können. Andere Arbeitsgruppen sind dieser Fragestellung bereits nachgegangen, worauf weiter unten genauer eingegangen wird. Andererseits sollte in dieser Arbeit eine postoperative Charakterisierung der Tumoren hinzukommen, um auch mögliche Histologische und genetische Determinanten des Therapieerfolges zu finden. Diese ermöglichen selbstverständlich keine präoperative Vorhersage des Therapieerfolges, jedoch könnten sie Einblicke in neue Aspekte der APA-Pathophysiologie geben und gegebenenfalls Ansatzpunkte für neue Therapien und Diagnostik liefern.

**Präoperative Prädiktoren des Therapieerfolges** Seit vielen Jahren wird bereits versucht, Prädiktoren zu finden, die den kompletten Therapieerfolg nach Adrenalektomie zuverlässig vorhersagen können. Dabei gibt es mindestens 7 Parameter, die häufig publiziert wurden und in unterschiedlichen Kombinationen in der jeweiligen Studienkohorte signifikant mit einem kompletten Therapieerfolg assoziiert waren.

Zu diesen Parametern zählen jüngeres Alter bei Adrenalektomie (Citton et al. 2015; Pang et al. 2007; Steichen et al. 2012; Williams et al. 2017), eine kürzere Erkrankungsdauer (Citton et al. 2015; Giacchetti et al. 2009; Rossi et al. 2008b; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2013), weibliches Geschlecht (Citton et al. 2015; Pang et al. 2007; Steichen et al. 2012; Williams et al. 2017), ein geringerer präoperativer Bedarf an antihypertensiver Medikation (Citton et al. 2015; Pang et al. 2007; Wang et al. 2012; Williams et al. 2017), besseres Ansprechen auf Spironolacton (Wang et al. 2012), vaskuläres Remodelling gemessen als Media/Lumen-Quotient (Rossi et al. 2008b), niedrigere PAC (Kim et al. 2010; Zhang et al. 2013) und niedrigerer diastolischer Blutdruck (Citton et al. 2015).

Im Jahre 2008 entwickelten Zarnegar und Kollegen den „Aldosteronoma Resolution Score“, welcher mithilfe von vier Parametern eine präzise Vorhersage der Heilungschancen des Bluthochdrucks ermöglichen sollte (Zarnegar et al. 2008). Diese vier Parameter sind die Anzahl antihypertensiver Medikamente vor der OP, der BMI, die Erkrankungsdauer des Bluthochdrucks und das weibliche Geschlecht. Dieser Score ist in Kohorten

aus Japan (Utsumi et al. 2012), Nordamerika (Aronova et al. 2014; Worth et al. 2015) und Frankreich (Pasquier et al. 2017) evaluiert und dessen Aussagekraft größtenteils repliziert worden.

Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse in diesen Studien können in drei zentralen Punkten liegen. Erstens limitierte die teils kleine Kohortengröße die statistische Aussagekraft einiger Studien. Zweitens gibt es, wie in Abschnitt 16.1 beschrieben, teils große regionale Unterschiede in der Zusammensetzung der Kohorten. Drittens wurden die Studien auf Grundlage individueller Definitionen und Klassifikationen des Therapieerfolges ausgewertet. Bei den Vergleichen der Ergebnisse der vorliegenden Studie wird daher größeres Augenmerk auf die „Primary Aldosteronism Surgery Outcome“ (PASO)-Studie von Williams et al. (2017) gelegt, da hier die gleichen Klassifikationen zur Anwendung kamen.

In der univariaten Analyse für den kompletten klinischen Therapieerfolg fanden sich fünf präoperative und zwei postoperative, signifikante Determinanten. Unter den präoperativen gab es eine Übereinstimmung der Vorliegenden Arbeit mit der PASO-Studie in Hinblick auf das Alter bei Adrenalektomie, die DDD an antihypertensiver Medikation, das Vorliegen des weiblichen Geschlechts und den systolischen Blutdruck. Letzterer war jedoch in beiden Studien in der multivariaten Analyse nicht signifikant. Alle diese Parameter wurden bereits häufig beschrieben und stimmen mit den eingangs beschriebenen Studien überein. Im Nächsten Abschnitt soll auf die Unterschiede eingegangen werden.

Die Analyse des fehlenden klinischen Therapieerfolges erbrachte analoge, umgekehrte Ergebnisse. Eine erhöhte OR für den fehlenden Therapieerfolg fand sich bei höherem Alter und männlichem Geschlecht. Insofern bestärken sich die Regressionsmodelle gegenseitig.

**Bedeutung des Aldosterons für den Therapieerfolg** Ein Unterschied zur PASO-Studie findet sich in der Bedeutung des ARQ. Williams et al. (2017) fanden keine Assoziation von PAC oder ARQ mit dem Therapieerfolg. Kim et al. (2010) und Zhang et al. (2013) fanden eine Assoziation zwischen einer niedrigeren präoperativen PAC und der Heilung des Bluthochdrucks. Die vorliegende Arbeit kommt zu keiner signifikanten Aussage bezüglich der PAC und dem kompletten kTE (OR = 1,0009, 95% CI = 0,9996–1,0021,  $p = 0,1625$ ). Allerdings scheint ein höherer ARQ den kompletten klinischen Therapieerfolg zu begünstigen. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse sind nicht einfach zu erklären.

In der Studie von Kim können bei einer geringen Fallzahl von  $n = 27$  zufällige Effekte den Unterschied zur vorliegenden Studie erklären. Bei der relativ hohen Fallzahl von

Zhang et al. (2013) von  $n = 376$  müssen andere Faktoren relevant sein. So unterscheidet sich Zhangs Kohorte von der vorliegenden Arbeit durch ein jüngeres Patientenkollektiv ( $45,53 \pm 10,56$  dort vs. 51 (IQA 17) Jahre hier), ein etwa inverses Verhältnis weiblicher und männlicher Patienten (etwa 36,4% männlich dort vs. 58% männlich hier) und einen deutlich unterschiedlichen BMI ( $24,12 \pm 1,64$  dort vs. 27,9 (IQA 7,3) hier). Dass der BMI Einfluss auf die PAC nehmen kann, haben Rossi et al. (2008a) beschrieben. Alter und Geschlecht sind selbst Determinanten des Therapieerfolges und beeinflussen die Verteilung und Auswertung dessen deutlich. Insofern widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie zwar zwei Studien der Literatur. Jedoch können die Unterschiede mit deutlichen Unterschieden in der Kohortenzusammensetzung erklärt werden.

**Gewebespezifische Determinanten des Therapieerfolges** Postoperativ erhobene histopathologische oder genetische Determinanten, die den Therapieerfolg beeinflussen sind bisher kaum beschrieben. Bislang wurden dahingehend Genvariationen in *CYP11B2* (Wang et al. 2012), das Vorliegen eines klar identifizierbaren APAs im Gegensatz zu diffuser Hyperplasie (Hennings et al. 2010; Wang et al. 2012), das Vorliegen einer *KCNJ5*-Mutation (Arnesen et al. 2013) und die Größe der Nebenniere (Pang et al. 2007) beziehungsweise des Adenoms (Giacchetti et al. 2009) untersucht.

In der vorliegenden Studie zeigte sich in der univariaten Analyse der Genotyp und die immunhistochemische Färbung der HSD3B2 ausschlaggebend.

*KCNJ5*-Mutationen zeigten sich als supportiver Faktor für kompletten klinischen Therapieerfolg, während sich der Wildtyp-Genotyp als hinderlicher Faktor auswirkte. Arnesen et al. (2013) zeigten ebenfalls, dass Patienten mit einer Mutation im *KCNJ5*-Gen einen besseren Therapieerfolg aufwiesen, als Patienten ohne diese Mutation. Bei Einschluss der Mutation in das multivariate Modell verschwanden diese Effekte. Dies kann einerseits mit der damit einhergehenden Herabsetzung der Fallzahl im Regressionsmodell verbunden sein (s. Abschnitt 15.1). Auf der anderen Seite wurde weiter oben bereits gezeigt, dass mit Mutationen im *KCNJ5*-Gen das weibliche Geschlecht, ein eher niedrigerer systolischer Blutdruck, eine geringe Menge antihypertensiver Medikamente und ein relativ hoher ARQ verbunden ist. Patienten mit einer *KCNJ5*-Mutation neigten also zu klinischen und biochemischen Werten, die supportiv für einen kompletten klinischen Therapieerfolg sind. Hieraus lässt sich eine Kollinearität ableiten, welche auch die Abschwächung des Modells erklärt.

Wie in Unterabschnitt 16.2.2 beschrieben spielt die  $3\beta$ -HSD eine bedeutende Rolle in der Synthese der Steroidhormone. In Abschnitt 13.3 wurde beschrieben, dass es eine

positive Korrelation zwischen der Enzymexpression der HSD3B2 Isoform und dem ARQ gibt ( $\rho_s = 0,3129$ ,  $p = 0,0286$ , s. auch Tabelle 19). In der Literatur ist für die HSD-3B2 keine Verbindung mit dem Therapieerfolg beschrieben. Ebenso lässt sich aus der vorliegenden Arbeit kein kausaler Zusammenhang herleiten. Die Korrelation mit dem ARQ, welcher den Therapieerfolg beeinflusst, macht jedoch zumindest einen indirekten Einfluss denkbar.

**Beeinflussung des Therapieerfolges** Die im multivariaten Modell signifikanten Werte des Alters bei Adrenalektomie, des ARQ und der DDD sind zwischen den Geschlechtern signifikant unterschiedlich (s. hierzu Tabelle 8 und Tabelle 10). Infolgedessen zeigte sich in der Kombination jedes dieser Faktoren mit dem Geschlecht im selben multivariaten Modell eine deutliche Kollinearität und gegenseitige Abschwächung der Aussagekraft des Modells. Insofern ist fraglich, ob diese tatsächlich unabhängig sind und das Geschlecht selbst der Hauptprädiktor für den Therapieerfolg ist. Hierauf soll in Kapitel 17 genauer eingegangen werden.

Möglichen Einfluss auf den Therapieerfolg könnte zudem der BMI haben. Dieser ist in der hier untersuchten Kohorte bei Frauen deutlich niedriger, als bei Männern (vgl. Tabelle 10). Wie zuvor bereits erwähnt, findet sich in Individuen ohne manifesten PA eine positive Korrelation zwischen PAC und BMI (Rossi et al. 2008a).

**Biochemischer Therapieerfolg** In der Gruppe mit partiellem biochemischem Therapieerfolg fand sich ein Patient (1, 2%), ein Ausbleiben des biochemischen Therapieerfolges fand sich in 5 Patienten (6, 1%). Im Vergleich zu Kohorten anderer Arbeitsgruppen, die nach den gleichen Kriterien klassifiziert wurden, fanden sich ähnliche Zahlen von 4% (0 – 15%) für den partiellen und 2% (0% – 5%) für den ausbleibenden Therapieerfolg (Williams et al. 2017).

Auf Grund der geringen Fallzahl in diesen Therapieerfolgsgruppen war eine Regressionsanalyse nicht möglich. Statt dessen müsste bei den wenigen Patienten eine gezielte Ursachenanalyse durchgeführt werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.



## 17 Schlussfolgerungen und Ausblick

Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Aspekte wurden in vorangehenden Studien bereits isoliert betrachtet. So wurde untersucht, ob bspw. der Genotyp (Fernandes-Rosa et al. 2014) oder die Immunoexpression von CYP11B1 und CYP11B2 (Monticone et al. 2015) klinische Relevanz hat. In einer weiteren Studie wurde in APAs die mRNA-Expression der selben steroidogenen Enzyme wie in der vorliegenden Arbeit untersucht (Sakuma et al. 2013). Wie in Abschnitt 16.3 beschrieben, wurde bereits häufiger versucht, präoperative Parameter als Prädiktoren für den Therapieerfolg zu evaluieren.

Die vorliegende Arbeit bringt all diese Aspekte zusammen und charakterisiert eine Kohorte auf molekulargenetischer, histologischer und klinischer Ebene. Dies ermöglichte eine multidimensionale Datenanalyse, die zahlreiche Aspekte in einer einheitlichen Kohorte integriert. Zugleich wurden die neuesten internationalen Konsensus-Kriterien für den Therapieerfolg implementiert (Williams et al. 2017). Hierdurch können die Ergebnisse leicht mit kommenden Studien verglichen werden, die ebenfalls diese Kriterien anwenden. Obwohl das Design der vorliegenden Studie keine Kausalität der gefundenen Zusammenhänge nachweisen kann, so zeigen die Ergebnisse jedoch eine hohe interne Konsistenz und eine Übereinstimmung mit der Literatur.

### 17.1 Schlussfolgerungen

In diesem Abschnitt sollen nun die wichtigsten Schlussfolgerungen der Gewebecharakterisierung und Patienteneigenschaften dargelegt werden.

**Bedeutung der histologischen Charakterisierung und Immunhistochemie** Die Bedeutung postoperativ erhobener Parameter ergibt sich nur selten aus therapeutischen Konsequenzen. Sie dienen jedoch dem genaueren Verständnis der APA-Pathogenese. Insofern erscheint es sinnvoll im Rahmen der Forschung weiterhin NNR-Adenome mit verschiedensten Techniken zu charakterisieren, um neue Aspekte zu identifizieren.

Immunhistochemische Färbungen zeigten keine weitreichenden Einflüsse auf therapierelevante Faktoren oder Aspekte. In Hinblick auf die Diagnostik rücken immunhistochemische Verfahren jedoch zunehmend in den Fokus. So dient insbesondere die Anfärbung der Aldosteronsynthase dem Identifizieren des dominanten Aldosteron produzierenden Knotens oder dem Auffinden besonders kleiner NNR-Adenome. Dies sehen

auch andere Autoren so (Ito et al. 2017; Nakamura et al. 2016b; Nishimoto et al. 2017; Volpe et al. 2015). Hierdurch könnten zielgerichtet weitere diagnostische Methoden veranlasst werden, wie etwa differenzierte Mutationsanalysen in Aldosteron produzierenden Adenomabschnitten.

### **Die Auswirkung des Geschlechts auf Pathophysiologie, Klinik und Therapie von APAs**

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so erkennt man im Groben zwei „Cluster“ an Patienten, welche die Extreme der Studienkohorte abbilden.

Auf der einen Seite finden sich weibliche, junge Patientinnen, die nur einen milden Hypertonus und einen geringen Bedarf an antihypertensiver Medikation aufwiesen. Sie wurden kurz nach der Diagnose operiert und hatten in aller Regel ein gutes Outcome. Die Tumoren trugen oft *KCNJ5*-Mutationen und waren überdurchschnittlich groß.

Auf der anderen Seite finden sich ältere Männer, die lange Zeit und trotz vieler Medikamente an einem starken Bluthochdruck litten. Sie wurden erst einige Jahre nach der Diagnosestellung operiert und wiesen einen schlechten klinischen Therapieerfolg auf. In vielen Fällen ermöglichte die Adrenalectomie lediglich eine Reduktion der antihypertensiven Medikation. Die entnommenen Tumoren waren tendenziell kleiner und trugen eher Mutationen in den ATPasen oder *CACNA1D*.

Das Geschlecht zeigte sich als relevanter Faktor auf allen Ebenen dieser Studie, von der Genetik über die Histomorphologie, die Immunhistochemie und die funktionelle Charakterisierung bis hin zu präoperativen, klinischen Parametern und den Therapieerfolg. Dies zeigte sich nicht zuletzt in der Entwicklung des multivariaten logistischen Modells. Hier zeigte die Hinzunahme des Faktors Geschlecht in vielen Fällen eine deutliche Beeinflussung der übrigen Faktoren. Hieraus lässt sich auf eine gewisse Assoziation rückschließen.

Gleichwohl erlaubt das Design der Studie keine definitive Aussage zu kausalen Zusammenhängen. So könnte entweder die Mutation in *KCNJ5* bei weiblichen Patienten häufiger sein, als bei Männern. Alternativ wäre denkbar, dass diese Mutation in männlichen Patienten seltener klinisch apparent wird und somit seltener identifiziert wird. Es lässt sich zudem nicht klären, ob der unterschiedlichen klinischen Erscheinung eher Geschlechterunterschiede zu Grunde liegen, oder ob dies von der APA-Mutation beeinflusst wird. Zudem können weitere geschlechtsassoziierte Faktoren des Lebenswandels oder des Gesundheitsbewusstseins zu Unterschieden im Therapieerfolg führen.

Diese Sachverhalte müssen in eigenen, zielgerichteten Studien untersucht werden.

## 17.2 Ausblick

Das Conn-Syndrom hat in den letzten Jahren eine Renaissance erlebt und ist von einem seltenen Syndrom hin zur häufigsten Ursache endokriner Hypertension avanciert. Es ist in den Fokus einer aktiven und schnell fortschreitenden Forschung geraten. Hierdurch bleibt zu erwarten, dass in absehbarer Zeit große Schritte im Verständnis der Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie gemacht werden.

**Entwicklung des Krankheitsverständnisses des „Conn Syndroms“** Während bereits einige Mutationen identifiziert wurden, welche nach aktueller Ansicht die Aldosteronproduktion entkoppeln, wird zunehmend vermutet, dass dies nur einer der nötigen „Hits“ ist, die für die APA-Entstehung nötig sind. So ist bislang nicht ausreichend geklärt, wodurch die Zellproliferation zur Adenomentstehung geregelt wird. Mutationen in CTNNB1 oder ARMC5 werden hierfür in Betracht gezogen, jedoch treten diese bei weitem nicht in allen Adenomen auf.

Des Weiteren entwickelt sich die gängige Lehrmeinung dahin, dass NNR-Adenome sich in einem fließenden Spektrum zwischen Conn und Cushing einordnen lassen. Die früher etablierte Meinung, dass bspw. die Expression der Schlüsselenzyme CYP11B1 und CYP11B2 sich gegenseitig ausschließen und somit Adenome nur entweder Aldosteron oder Cortisol produzieren können, wird zunehmend revidiert (Arlt et al. 2017; Nakamura et al. 2016a). Arlt et al. (2017) verwenden hierfür auch den Begriff des „Connshing-Syndroms“. Auch in diesem Zusammenhang scheint es wichtig, durch eine tiefere Charakterisierung von Adenomen die unterschiedlichen Ausprägungen auf diesem „Connshing-Spektrum“ zu verstehen.

Es gibt zudem Hinweise, dass Aldosteron produzierende Adenome existieren, die (noch) keine nachweisbare Erhöhung der PAC bewirken. Diese könnten Ursache des Krankheitsbildes der „low renin essential hypertension“ sein, also einer essentiellen Hypertonie mit niedrigen Renin-Spiegeln, aber normaler PAC (Rossi et al. 2015). Eine gezielte Untersuchung dieses Krankheitsbildes durch beispielsweise eine Expressionsanalyse der Aldosteronsynthese könnten hier Klarheit bringen.

**Diagnostik und Therapie** Neben der molekularbiologischen und histopathologischen Aufschlüsselung der Adenome stellt sich in klinischer Hinsicht die Frage, ob präoperativ eine hinreichend sichere Diagnostik durchgeführt werden kann, um APAs von hormonell nicht aktiven Nebennieren-Adenomen oder einer NNR-Hyperplasie zu unterscheiden. In der klinischen Praxis wird nach aktuellen Leitlinien die Nebennierenvenen-

## 17 Schlussfolgerungen und Ausblick

Katheterisierung durchgeführt. Diese ist jedoch invasiv, birgt ein Komplikationsrisiko und unterliegt in der Aussagekraft der Erfahrung und Expertise des durchführenden Radiologen (Buffolo et al. 2017).

Reine Bildgebung mittels CT wird als suffiziente Alternative diskutiert, wobei sich die Meinungen der Experten hier deutlich teilen (Dekkers et al. 2016; Funder et al. 2016b; Puar et al. 2016; van der Wilt et al. 2016). Spezifische PET-Tracer, die an CYP11B2 binden, könnten eine nicht-invasive, untersucherunabhängige Lokalisation eines Aldosteron produzierenden Adenoms ermöglichen (Abe et al. 2016).

Andere Bestrebungen suchen nach Mitteln, APA-relevante Ziele zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken zu blockieren. So wurden kürzlich Stoffe identifiziert, die bspw. mutierte GIRK4-Kanäle (Scholl et al. 2017) oder  $Ca_v1.3$  (Xie et al. 2016) hemmen. Eine probatorische Gabe von Makroliden könnte bei entsprechender Reaktion der PAC einen starken Hinweis auf eine KCNJ5-Mutation liefern (Scholl et al. 2017). Für eine therapeutische Anwendung müsste für diese Stoffe jedoch zunächst eine Überlegenheit gegenüber den bisherigen MRAs nachgewiesen werden. Eine breite klinische Anwendung ist somit in absehbarer Zeit nicht wahrscheinlich.

Die zunehmende Verfügbarkeit von preisgünstigen Sequenzierungstechniken wird die Identifikation genetischer Faktoren beschleunigen. Nicht zuletzt könnten epigenetische Regulationen neue Aspekte in der Pathophysiologie eröffnen (Howard et al. 2014).

# **Teil V**

## **Anhang**

## A Literatur

- Abe, Tsutomu, Mitsuhide Naruse, William F. Young, Nobuya Kobashi, Yoshihiro Doi, Akihiro Izawa, Kei Akama, Yuki Okumura, Miho Ikenaga, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji, Kuniaki Mukai und Hiroki Matsumoto (2016). „A Novel CYP11B2-Specific Imaging Agent for Detection of Unilateral Subtypes of Primary Aldosteronism“. en. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101.3, S. 1008–1015. ISSN: 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2015-3431.
- Åkerström, Tobias, Joakim Crona, Alberto Delgado Verdugo, Lee F. Starker, Kenko Cupisti, Holger S. Willenberg, Wolfram T. Knoefel, Wolfgang Saeger, Alfred Feller, Julian Ip et al. (2012). „Comprehensive Re-Sequencing of Adrenal Aldosterone Producing Lesions Reveal Three Somatic Mutations near the KCNJ5 Potassium Channel Selectivity Filter.“ In: *PloS one* 7, e41926–e41926. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0041926.
- Åkerström, Tobias, Rajani Maharjan, Holger Sven Willenberg, Kenko Cupisti, Julian Ip, Ana Moser, Peter Ståhlberg, Bruce Robinson, K. Alexander Iwen, Henning Dralle, Martin K. Walz, Hendrik Lehnert, Stan Sidhu, Celso Gomez-Sanchez, Per Hellman und Peyman Björklund (2016). „Activating Mutations in CTNNB1 in Aldosterone Producing Adenomas.“ In: *Scientific reports* 6.August 2015, S. 19546–19546. DOI: 10.1038/SREP19546.
- Åkerström, Tobias, Holger Sven Willenberg, Kenko Cupisti, Julian Ip, Samuel Backman, Ana Moser, Rajani Maharjan, Bruce Robinson, K. Alexander Iwen, Henning Dralle, Cristina D Volpe, Martin Bäckdahl, Johan Botling, Peter Ståhlberg, Gunnar Westin, Martin K. Walz, Hendrik Lehnert, Stan Sidhu, Jan Zedenius, Peyman Björklund und Per Hellman (Okt. 2015). „Novel Somatic Mutations and Distinct Molecular Signature in Aldosterone-Producing Adenomas.“ In: *Endocrine-related cancer* 22, S. 735–744. DOI: 10.1530/ERC-15-0321.
- Albert, Maximilian, Joshua A. Andler, Tavmjong Bah, Pierre Barbry-Blot, Jean-François Barraud, Campbell Barton, Bill Baxter, John Beard, John Bintz, Arpad Biro et al. (2015). *Inkscape* (<http://www.inkscape.org>).
- Anastas, Jamie N. und Randall T. Moon (Jan. 2013). „WNT Signalling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer.“ In: *Nature reviews. Cancer* 13, S. 11–26. DOI: 10.1038/NRC3419.
- Arlt, Wiebke, Katharina Lang, Alice J. Sitch, Anna S. Dietz, Yara Rhayem, Irina Bancos, Annette Feuchtinger, Vasileios Chortis, Lorna C. Gilligan, Philippe Ludwig et al. (Apr. 2017). „Steroid Metabolome Analysis Reveals Prevalent Glucocorticoid Excess in Primary Aldosteronism.“ In: *JCI insight* 2. DOI: 10.1172/JCI.INSIGHT.93136.
- Armstrong, Richard A. (2014). „When to Use the Bonferroni Correction“. In: *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)* 34.5, S. 502–508. DOI: 10.1111/OPO.12131.
- Arnesen, Thomas, Nina Glomnes, Siri Strømsøy, Stian Knappskog, Anette Heie, Lars A. Akslen, Marianne Grytaas, Jan Erik Varhaug, Oliver Gimm und Michael Brauckhoff (Aug. 2013). „Outcome after Surgery for Primary Hyperaldosteronism May Depend on

- KCNJ5 Tumor Mutation Status: A Population-Based Study from Western Norway.“ In: *Langenbeck's archives of surgery* 398, S. 869–874. doi: 10.1007/S00423-013-1093-2.
- Aronova, Anna, Benjamin L. Gordon, Brendan M. Finnerty, Rasa Zarnegar und Thomas J. Fahey (2014). „Aldosteronoma Resolution Score Predicts Long-Term Resolution of Hypertension“. In: *Surgery (United States)* 156.6, S. 1387–1393. doi: 10.1016/J.SURG.2014.08.019.
- Assié, Guillaume, Rossella Libé, Stéphanie Espiard, Marthe Rizk-Rabin, Anne Guimier, Windy Luscap, Olivia Barreau, Lucile Lefèvre, Mathilde Sibony, Laurence Guignat, Stéphanie Rodriguez, Karine Perlemoine, Fernande René-Corail, Franck Letourneur, Bilal Trabulsi, Alix Poussier, Nathalie Chabbert-Buffet, Françoise Borson-Chazot, Lionel Groussin, Xavier Bertagna, Constantine A. Stratakis, Bruno Ragazzon und J Bertherat (Nov. 2013). „ARMC5 Mutations in Macronodular Adrenal Hyperplasia with Cushing's Syndrome.“ In: *The New England journal of medicine* 369, S. 2105–2114. doi: 10.1056/NEJMOA1304603.
- Azizan, Elena A. B., Brian Y. H. Lam, Stephen J. Newhouse, Junhua Zhou, Rhoda E. Kuc, Jennifer Clarke, Lisa Happerfield, Alison Marker, Gary J. Hoffman und Morris J. Brown (Mai 2012). „Microarray, qPCR, and KCNJ5 Sequencing of Aldosterone-Producing Adenomas Reveal Differences in Genotype and Phenotype between Zona Glomerulosa and Zona Fasciculata-like Tumors“. eng. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97.5, E819–829. ISSN: 1945-7197. doi: 10.1210/jc.2011-2965.
- Azizan, Elena A. B., Hanne Poulsen, Petronel Tuluc, Junhua Zhou, Michael V. Clausen, Andreas Lieb, Carmela Maniero, Sumedha Garg, Elena G. Bochukova, Wanfeng Zhao et al. (Sep. 2013). „Somatic Mutations in *ATP1A1* and *CACNA1D* Underlie a Common Subtype of Adrenal Hypertension“. en. In: *Nature Genetics* 45.9, S. 1055–1060. ISSN: 1546-1718. doi: 10.1038/ng.2716.
- Baig, Shahid M., Alexandra Koschak, Andreas Lieb, Mathias Gebhart, Claudia Dafinger, Gudrun Nürnberg, Amjad Ali, Ilyas Ahmad, Martina J. Sinnegger-Brauns, Niels Brandt, Jutta Engel, Matteo E. Mangoni, Muhammad Farooq, Habib U. Khan, Peter Nürnberg, Jörg Striessnig und Hanno J. Bolz (Jan. 2011). „Loss of Ca(v)1.3 (*CACNA1D*) Function in a Human Channelopathy with Bradycardia and Congenital Deafness.“ In: *Nature neuroscience* 14, S. 77–84. doi: 10.1038/NN.2694.
- Bandulik, S. (Juli 2017). „Of Channels and Pumps: Different Ways to Boost the Aldosterone?“ In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 220, S. 332–360. doi: 10.1111/APHA.12832.
- Barrett, Paula Q., Nick A. Guagliardo, Peter M. Klein, Changlong Hu, David T. Breault und Mark P. Beenhakker (Okt. 2016). „Role of Voltage-Gated Calcium Channels in the Regulation of Aldosterone Production from Zona Glomerulosa Cells of the Adrenal Cortex.“ In: *The Journal of physiology* 594, S. 5851–5860. doi: 10.1113/JP271896.
- Bassett, Mary H., Bobbie Mayhew, Khurram Rehman, Perrin C. White, Franco Mantero, Giorgio Arnaldi, Paul M. Stewart, Iwona Bujalska und William E. Rainey (Sep. 2005). „Expression Profiles for Steroidogenic Enzymes in Adrenocortical Disease“. eng. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90.9, S. 5446–5455. ISSN: 0021-972X. doi: 10.1210/jc.2005-0836.
- Bender, R. und S. Lange (2001). „Adjusting for Multiple Testing—When and How?“ In: 54.4, S. 343–349. doi: 10.1016/S0895-4356(00)00314-0.

- Berthon, Annabel, Coralie Drelon, Bruno Ragazzon, Sheerazed Boulkroun, Frédérique Tissier, Laurence Amar, Benoît Samson-Couterie, Maria-Christina Zennaro, Pierre-François Plouin, Seham Skah, Michelina Plateroti, Hervé Lefèbvre, Isabelle Sahut-Barnola, Marie Batisse-Lignier, Guillaume Assié, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Jerome Bertherat, Antoine Martinez und Pierre Val (Feb. 2014). „WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling Is Activated in Aldosterone-Producing Adenomas and Controls Aldosterone Production.“ In: *Human molecular genetics* 23.4, S. 889–905. DOI: 10.1093/HMG/DDT484.
- Berthon, Annabel, Isabelle Sahut-Barnola, Sarah Lambert-Langlais, Cyrille de Jousineau, Christelle Damon-Soubeyrand, Estelle Louiset, Mark M. Taketo, Frédérique Tissier, Jerome Bertherat, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Antoine Martinez und Pierre Val (Apr. 2010). „Constitutive  $\beta$ -Catenin Activation Induces Adrenal Hyperplasia and Promotes Adrenal Cancer Development.“ In: *Human molecular genetics* 19, S. 1561–1576. DOI: 10.1093/HMG/DDQ029.
- Beuschlein, Felix (2013). „Regulation of Aldosterone Secretion: From Physiology to Disease“. In: *European Journal of Endocrinology* 168.6, R85–R93. DOI: 10.1530/EJE-13-0263.
- Beuschlein, Felix, Sheerazed Boulkroun, Andrea Osswald, Thomas Wieland, Hang N. Nielsen, Urs D. Lichtenauer, David Penton, Vivien R. Schack, Laurence Amar, Evelyn Fischer et al. (2013). „Somatic Mutations in ATP1A1 and ATP2B3 Lead to Aldosterone-Producing Adenomas and Secondary Hypertension.“ In: *Nature genetics* 45.4, S. 440–442. DOI: 10.1038/NG.2550.
- Beuschlein, Felix, Martin Fassnacht, Guillaume Assié, Davide Calebiro, Constantine A. Stratakis, Andrea Osswald, Cristina L. Ronchi, Thomas Wieland, Silviu Sbiera, Fabio R. Faucz et al. (März 2014). „Constitutive Activation of PKA Catalytic Subunit in Adrenal Cushing’s Syndrome.“ In: *The New England journal of medicine* 370, S. 1019–1028. DOI: 10.1056/NEJM0A1310359.
- Boulkroun, Sheerazed, Felix Beuschlein, Gian-Paolo Rossi, José-Felipe Golib-Dzib, Evelyn Fischer, Laurence Amar, Paolo Mulatero, Benoit Samson-Couterie, Stefanie Hahner, Marcus Quinkler et al. (2012). „Prevalence, Clinical, and Molecular Correlates of KCNJ5 Mutations in Primary Aldosteronism“. In: *Hypertension*. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186478.
- Boulkroun, Sheerazed, Benoit Samson-Couterie, José Felipe Golib Dzib, Hervé Lefebvre, Estelle Louiset, Laurence Amar, Pierre François Plouin, Enzo Lalli, Xavier Jeunemaitre, Arndt Benecke, Tchao Meatchi und Maria Christina Zennaro (2010). „Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism“. In: *Hypertension* 56.5, S. 885–892. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158543.
- Budwit-Novotny, D. A., K. S. McCarty, E. B. Cox, J. T. Soper, D. G. Mutch, W. T. Creasman, J. L. Flowers und K. S. McCarty (1986). „Immunohistochemical Analyses of Estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody.“ In: *Cancer research* 46.10, S. 5419–5425.
- Buffolo, Fabrizio, Silvia Monticone, Tracy Williams, Denis Rossato, Jacopo Burrello, Martina Tetti, Franco Veglio und Paolo Mulatero (Apr. 2017). „Subtype Diagnosis of Primary Aldosteronism: Is Adrenal Vein Sampling Always Necessary?“ In: *International Journal of Molecular Sciences* 18.4, S. 848–848. DOI: 10.3390/IJMS18040848.



- Cali, Tito, Raffaele Lopreiato, Joshua Shimony, Marisa Vineyard, Martina Frizzarin, Gi-nevra Zanni, Giuseppe Zanotti, Marisa Brini, Marwan Shinawi und Ernesto Carafoli (Juni 2015). „A Novel Mutation in Isoform 3 of the Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Pump Impairs Cellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in a Patient with Cerebellar Ataxia and Laminin Subunit 1 $\alpha$  Mutations.“ In: *The Journal of biological chemistry* 290, S. 16132–16141. doi: 10.1074/JBC.M115.656496.
- Carney, J. Aidan, Charalampos Lyssikatos, Maya B. Lodish und Constantine A. Stratakis (Jan. 2015). „Germline PRKACA Amplification Leads to Cushing Syndrome Caused by 3 Adrenocortical Pathologic Phenotypes.“ In: *Human pathology* 46, S. 40–49. doi: 10.1016/J.HUMPATH.2014.09.005.
- Catterall, William A. (2011). „Voltage-Gated Calcium Channels“. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3.8, S. 1–23. doi: 10.1101/CSHPERSPECTA003947.
- Choi, M., U. I. Scholl, P. Yue, P. Bjorklund, B. Zhao, C. Nelson-Williams, W. Ji, Y. Cho, A. Patel, C. J. Men, E. Lolis, M. V. Wisgerhof, D. S. Geller, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Akerstrom, W. Wang, T. Carling und R. P. Lifton (2011). „K<sup>+</sup> Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension“. In: *Science* 331.6018, S. 768–772. doi: 10.1126/SCIENCE.1198785.
- Citton, Marilisa, Giovanni Viel, Gian Paolo Rossi, Franco Mantero, Donato Nitti und Maurizio Iacobone (Apr. 2015). „Outcome of Surgical Treatment of Primary Aldosteronism.“ In: *Langenbeck's archives of surgery* 400, S. 325–331. doi: 10.1007/S00423-014-1269-4.
- Conn, J. W. (Jan. 1955). „Presidential Address. I. Painting Background. II. Primary Aldosteronism, a New Clinical Syndrome.“ In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 45, S. 3–17.
- Daniil, Georgios, Fabio L. Fernandes-Rosa, Jean Chemin, Iulia Blesneac, Jacques Beltrand, Michel Polak, Xavier Jeunemaitre, Sheerazed Boulkroun, Laurence Amar, Tim M. Strom, Philippe Lory und Maria Christina Zennaro (2016). „CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism“. In: *EBioMedicine* 13, S. 225–236. doi: 10.1016/J.EBIOM.2016.10.002.
- Dekkers, T., M. ter Meer, J. W. M. Lenders, A. R. M. Hermus, L. Schultze Kool, J. F. Langenhuijsen, K. Nishimoto, T. Ogishima, K. Mukai, E. a. B. Azizan, B. Tops, J. Deinum und B. Küsters (Juli 2014). „Adrenal Nodularity and Somatic Mutations in Primary Aldosteronism: One Node Is the Culprit?“ eng. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99.7, E1341–1351. issn: 1945-7197. doi: 10.1210/jc.2013-4255.
- Dekkers, Tanja, Aleksander Prejbisz, Leo J. Schultze Kool, Hans J. M. M. Groenewoud, Marieke Velema, Wilko Spiering, Sylwia Kołodziejczyk-Kruk, Mark Arntz, Jacek Kądziała, Johannes F. Langenhuijsen, Michiel N. Kerstens, Anton H. van den Meiracker, Bert-Jan van den Born, Fred C. G. J. Sweep, Ad R. M. M. Hermus, Andrzej Januszewicz, Alike F. Ligthart-Naber, Peter Makai, Gert-Jan van der Wilt, Jacques W. M. Lenders, Jaap Deinum und S. P. A. R. T. A. C. U. S. Investigators (Sep. 2016). „Adrenal Vein Sampling versus CT Scan to Determine Treatment in Primary Aldosteronism: An Outcome-Based Randomised Diagnostic Trial.“ In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 4, S. 739–746. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30100-0.
- Doi, Masao, Fumitoshi Satoh, Takashi Maekawa, Yasuhiro Nakamura, Jean Michel Fustin, Motomi Tainaka, Yunhong Hotta, Yukari Takahashi, Ryo Morimoto, Kei Takase,

- Sadayoshi Ito, Hironobu Sasano und Hitoshi Okamura (2014). „Isoform-Specific Monoclonal Antibodies against  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase Family Provide Markers for Subclassification of Human Primary Aldosteronism“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99.2, S. 257–262. DOI: 10.1210/jc.2013-3279.
- El Wakil, Abeer und Enzo Lalli (Jan. 2011). „The Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Adrenocortical Development and Cancer.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 332, S. 32–37. DOI: 10.1016/J.MCE.2010.11.014.
- Fallo, F., V. Pezzi, L. Barzon, P. Mulatero, F. Veglio, N. Sonino und J. M. Mathis (Dez. 2002). „Quantitative Assessment of CYP11B1 and CYP11B2 Expression in Aldosterone-Producing Adenomas.“ In: *European journal of endocrinology* 147, S. 795–802.
- Faucz, Fabio R., Mihail Zilbermint, Maya B. Lodish, Eva Szarek, Giampaolo Trivellin, Ninet Sinaii, Annabel Berthon, Rossella Libé, Guillaume Assié, Stéphanie Espiard, Ludvine Drougat, Bruno Ragazzon, Jerome Bertherat und Constantine A. Stratakis (Juni 2014). „Macronodular Adrenal Hyperplasia Due to Mutations in an Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5) Gene: A Clinical and Genetic Investigation“. en. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99.6, E1113–E1119. ISSN: 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2013-4280.
- Felizola, Saulo J. A., Takashi Maekawa, Yasuhiro Nakamura, Fumitoshi Satoh, Yoshikiyo Ono, Kumi Kikuchi, Shizuka Aritomi, Keiichi Ikeda, Michihiro Yoshimura, Katsuyoshi Tojo und Hironobu Sasano (Okt. 2014). „Voltage-Gated Calcium Channels in the Human Adrenal and Primary Aldosteronism“. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144, S. 410–416. DOI: 10.1016/J.JSBMB.2014.08.012.
- Fernandes-Rosa, Fabio Luiz, Isabelle Giscos-Douriez, Laurence Amar, Celso E. Gomez-Sanchez, Tchao Meatchi, Sheerazed Boulkroun und Maria Christina Zennaro (2015). „Different Somatic Mutations in Multinodular Adrenals with Aldosterone-Producing Adenoma“. In: *Hypertension* 66.5, S. 1014–1022. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05993.
- Fernandes-Rosa, Fabio Luiz, Tracy Ann Williams, Anna Riester, Olivier Steichen, Felix Beuschlein, Sheerazed Boulkroun, Tim M. Strom, Silvia Monticone, Laurence Amar, Tchao Meatchi, Franco Mantero, M.-V. Cicala, Marcus Quinkler, Francesco Fallo, Bruno Allolio, Giampaolo Bernini, M. Maccario, Gilberta Giacchetti, Xavier Jeunemaitre, Paolo Mulatero, Martin Reincke und M.-C. Zennaro (Aug. 2014). „Genetic Spectrum and Clinical Correlates of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenoma“. In: *Hypertension* 64.2, S. 354–361. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03419.
- Funder, John W., Robert M. Carey, Franco Mantero, M. Hassan Murad, Martin Reincke, Hirotaka Shibata, Michael Stowasser und William F. Young (2016a). „The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101.5, S. 1889–1916. DOI: 10.1210/jc.2015-4061.
- Funder, John W. und Gian Paolo Rossi (Nov. 2016b). „Adrenal Vein Sampling versus CT Scanning in Primary Aldosteronism.“ In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 4, S. 886–886. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30240-6.

- Gallo-Payet, Nicole, Antoine Martinez und André Lacroix (2017). „Editorial: ACTH Action in the Adrenal Cortex: From Molecular Biology to Pathophysiology“. In: *Frontiers in Endocrinology* 8.JUN. DOI: 10.3389/FENDO.2017.00101.
- Gavrielides, Marios A., Brandon D. Gallas, Petra Lenz, Aldo Badano und Stephen M. Hewitt (2011). „Observer Variability in the Interpretation of HER2/Neu Immunohistochemical Expression with Unaided and Computer-Aided Digital Microscopy“. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 135.2, S. 233–242. DOI: 10.1043 / 1543 - 2165 - 135.2.233.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna S. Dietz, Anna Riester, Martin Reincke und Felix Beuschlein (März 2015a). „CaV1.3, HSD3B2 and CYP11B2 Immunoexpression in Aldosterone- Producing Adenoma Are Not Correlated with Post-Adrenalectomy Outcome in Primary Aldosteronism“. In: *58. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (Lübeck)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Constanze Hantel, Marion Schuster, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (2015b). „Immunoexpressions of CYP11B2 and HSD3B2 in Genetically Characterized Aldosterone Producing Adenomas.“ In: *17th European Congress of Endocrinology (Dublin, Irland)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Sep. 2015c). „CaV1.3, CYP11B2 and HSD3B2 Immunoexpressions in Aldosterone Producing Adenoma: Characteristics and Relation to Adrenalectomy Outcome.“ In: *3rd EYES Meeting (Modena, Italien)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Okt. 2015d). „Characterization of CYP11B2 and HSD3B2 in Aldosterone Producing Adenomas“. In: *14th annual YARE meeting (Berlin)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Nov. 2015e). „Characterization of Voltage-gated Calcium Channels CaV1.3 and CaV3.2 in Aldosterone Producing Adenoma“. In: *ENS@T 14th Scientific Meeting (München)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Juni 2015f). „Immunoexpression of CYP11B2 and Voltage-Gated Calcium Channels CaV1.3 and CaV3.2 in Aldosterone-Producing Adenoma.“ In: *Progress in Primary Aldosteronism 4 (München)*.
- Gebhard, Christian, Yara Rhayem, Tracy A. Williams, Christian Adolf, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Juli 2017). „Evaluation of Clinical, Genetic and Histological Predictors for Resolution of Hypertension after Adrenalectomy According to New International Consensus Definitions.“ In: *Progress in Primary Aldosteronism 5 (München)*.
- Giacchetti, Gilberta, Vanessa Ronconi, Silvia Rilli, Mario Guerrieri, Federica Turchi und Marco Boscaro (Apr. 2009). „Small Tumor Size as Favorable Prognostic Factor after Adrenalectomy in Conn’s Adenoma.“ In: *European journal of endocrinology* 160, S. 639–646. DOI: 10.1530/EJE-08-0902.

- Gomez-Sanchez, Celso E., Xin Qi, Carolina Velarde-Miranda, Maria W. Plonczynski, C. Richard Parker, William Rainey, Fumitoshi Satoh, Takashi Maekawa, Yasuhiro Nakamura, Hironobu Sasano und Elise P. Gomez-Sanchez (März 2014). „Development of Monoclonal Antibodies against Human CYP11B1 and CYP11B2.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 383, S. 111–117. doi: 10.1016/J.MCE.2013.11.022.
- Harrell Jr., Frank E., with contributions from Charles Dupont und Many Others (2016). *Hmisc: Harrell Miscellaneous* (<https://cran.r-project.org/package=Hmisc>).
- Hennings, J., S. Andreasson, J. Botling, A. Hägg, A. Sundin und P. Hellman (Feb. 2010). „Long-Term Effects of Surgical Correction of Adrenal Hyperplasia and Adenoma Causing Primary Aldosteronism.“ In: *Langenbeck's archives of surgery* 395, S. 133–137. doi: 10.1007/S00423-009-0498-4.
- Hong, A. Ram, Jung Hee Kim, Young Shin Song, Kyu Eun Lee, Soo Hyun Seo, Moon-Woo Seong, Chan Soo Shin, Sang Wan Kim und Seong Yeon Kim (2016). „Genetics of Aldosterone-Producing Adenoma in Korean Patients.“ In: *PloS one* 11, e0147590–e0147590. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0147590.
- Howard, Brandi, Yonghong Wang, Paraskevi Xekouki, Fabio R. Faucz, Meenu Jain, Lisa Zhang, Paul G. Meltzer, Constantine A. Stratakis und Electron Kebebew (2014). „Integrated Analysis of Genome-Wide Methylation and Gene Expression Shows Epigenetic Regulation of CYP11B2 in Aldosteronomas“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99.3, S. 536–543. doi: 10.1210/jc.2013-3495.
- Hu, Changlong, Craig G. Rusin, Zhiyong Tan, Nick A. Guagliardo und Paula Q. Barrett (Juni 2012). „Zona Glomerulosa Cells of the Mouse Adrenal Cortex Are Intrinsic Electrical Oscillators“. In: *Journal of Clinical Investigation* 122.6, S. 2046–2053. doi: 10.1172/JCI61996.
- Ito, Atsushi, Yuto Yamazaki, Hironobu Sasano, Daisuke Matsubara, Noriyoshi Fukushima, Mio Tamba, Kenichi Tabata, Kentaro Ashizawa, Akihito Takei, Masaru Koizumi, Yasunaru Sakuma, Naohiro Sata und Hisashi Oshiro (Apr. 2017). „A Case of Primary Aldosteronism Caused by Unilateral Multiple Adrenocortical Micronodules Presenting as Muscle Cramps at Rest: The Importance of Functional Histopathology for Identifying a Culprit Lesion.“ In: *Pathology international* 67, S. 214–221. doi: 10.1111/PIN.12521.
- Kaplan, N. M. (Juni 1967). „Hypokalemia in the Hypertensive Patient, with Observations on the Incidence of Primary Aldosteronism.“ In: *Annals of internal medicine* 66, S. 1079–1090.
- Kaplan, N. M. und F. C. Barter (Apr. 1962). „The Effect of ACTH, Renin, Angiotensin II, and Various Precursors on Biosynthesis of Aldosterone by Adrenal Slices.“ In: *The Journal of clinical investigation* 41, S. 715–724. doi: 10.1172/JCI104530.
- Käyser, Sabine C., Tanja Dekkers, Hans J. Groenewoud, Gert Jan van der Wilt, J. Carel Bakx, Mark C. van der Wel, Ad R. Hermus, Jacques W. Lenders und Jaap Deinum (2016). „Study Heterogeneity and Estimation of Prevalence of Primary Aldosteronism: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101.July, jc.2016–1472. doi: 10.1210/jc.2016-1472.
- Kim, Alex C., Anne L. Reuter, Mohamad Zubair, Tobias Else, Kerri Serecky, Nathan C. Bingham, Gareth G. Lavery, Keith L. Parker und Gary D. Hammer (Aug. 2008). „Targeted Disruption of  $\beta$ -Catenin in Sf1-Expressing Cells Impairs Development and Maintenance

- nance of the Adrenal Cortex.“ In: *Development (Cambridge, England)* 135, S. 2593–2602. DOI: 10.1242/DEV.021493.
- Kim, Ra Mi, Jandee Lee und Euy-Young Soh (Juli 2010). „Predictors of Resolution of Hypertension after Adrenalectomy in Patients with Aldosterone-Producing Adenoma.“ In: *Journal of Korean medical science* 25, S. 1041–1044. DOI: 10.3346/JKMS.2010.25.7.1041.
- Kim, Sunghwan, Paul A. Thiessen, Evan E. Bolton, Jie Chen, Gang Fu, Asta Gindulyte, Lianyi Han, Jane He, Siqian He, Benjamin A. Shoemaker, Jiyao Wang, Bo Yu, Jian Zhang und Stephen H. Bryant (2016). „PubChem Substance and Compound Databases“. In: *Nucleic Acids Research* 44.D1, S. D1202–D1213. DOI: 10.1093/NAR/GKV951.
- Kitamoto, Takumi, Sachiko Suematsu, Yuto Yamazaki, Yasuhiro Nakamura, Hironobu Sasano, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Masao Omura und Tetsuo Nishikawa (Feb. 2016). „Clinical and Steroidogenic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas With ATPase or CACNA1D Gene Mutations.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101, S. 494–503. DOI: 10.1210/jc.2015-3284.
- Koch, Gary G. und Stuart A. Gansky (1996). „Statistical Considerations for Multiplicity in Confirmatory Protocols“. In: *Drug Information Journal* 30, S. 523–533. DOI: 10.1177/009286159603000228.
- Konosu-Fukaya, Sachiko, Yasuhiro Nakamura, Fumitoshi Satoh, Saulo J. A. Felizola, Takashi Maekawa, Yoshikiyo Ono, Ryo Morimoto, Kazue Ise, Ken-ichiro Takeda, Koshin Katsu, Fumiyoshi Fujishima, Atsuko Kasajima, Mika Watanabe, Yoichi Arai, Elise P. Gomez-Sanchez, Celso E. Gomez-Sanchez, Masao Doi, Hitoshi Okamura und Hironobu Sasano (Juni 2015). „ $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoforms in Human Aldosterone-Producing Adenoma.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 408, S. 205–12. DOI: 10.1016/J.MCE.2014.10.008.
- Lacroix-Triki, Magali, Simone Mathoulin-Pelissier, Jean-Pierre Ghnassia, Gaetan Macgrogan, Anne Vincent-Salomon, Véronique Brouste, Marie-Christine Mathieu, Pascal Roger, Frédéric Bibeau, Jocelyne Jacquemier, Frédérique Penault-Llorca und Laurent Arnould (Nov. 2006). „High Inter-Observer Agreement in Immunohistochemical Evaluation of HER-2/Neu Expression in Breast Cancer: A Multicentre GEFPICS Study“. English. In: *European Journal of Cancer* 42.17, S. 2946–2953. ISSN: 0959-8049, 1879-0852. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.06.020.
- Lenzini, Livia, Giacomo Rossitto, Giuseppe Maiolino, Claudio Letizia, John W. Funder und Gian Paolo Rossi (Aug. 2015). „A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K(+) Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma.“ In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100.8, E1089–95. DOI: 10.1210/jc.2015-2149.
- Leva, Francesca Di, Teuta Domi, Laura Fedrizzi, Dmitry Lim und Ernesto Carafoli (Aug. 2008). „The Plasma Membrane  $Ca^{2+}$  ATPase of Animal Cells: Structure, Function and Regulation“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476.1, S. 65–74. DOI: 10.1016/J.ABB.2008.02.026.
- Lodish, Maya B., Bo Yuan, Isaac Levy, Glenn D. Braunstein, Charalampos Lyssikatos, Paraskevi Salpea, Eva Szarek, Alexander S. Karageorgiadis, Elena Belyavskaya, Margarita Raygada, Fabio Rueda Faucz, Louise Izzat, Caroline Brain, James Gardner, Martha Quezado, J. Aidan Carney, James R. Lupski und Constantine A. Stratakis (Juni 2015). „Germline PRKACA Amplification Causes Variable Phenotypes That May Depend on

- the Extent of the Genomic Defect: Molecular Mechanisms and Clinical Presentations.“ In: *European journal of endocrinology* 172, S. 803–811. DOI: 10.1530/EJE-14-1154.
- Lüllmann-Rauch, Renate, Hrsg. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart New York, NY: Thieme. ISBN: 978-3-13-129243-8.
- MacKenzie, Scott M., E. Marie Freel, John M. Connell, Robert Fraser und Eleanor Davies (2017). „Acth and Polymorphisms at Steroidogenic Loci as Determinants of Aldosterone Secretion and Blood Pressure“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18.3. DOI: 10.3390/IJMS18030579.
- Mancia, Giuseppe, Robert Fagard, Krzysztof Narkiewicz, Josep Redón, Alberto Zanchetti, Michael Böhm, Thierry Christiaens, Renata Cifkova, Guy De Backer, Anna Dominiczak et al. (2013). „2013 ESH/ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)“. In: *Journal of hypertension* 31.7, S. 1281–1357. DOI: 10.1097/01.HJH.0000431740.32696.CC.
- Miller, Walter L. und Richard J. Auchus (Feb. 2011). „The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders.“ In: *Endocrine reviews* 32.1, S. 81–151. DOI: 10.1210/er.2010-0013.
- Monticone, Silvia, Jacopo Burrello, Davide Tizzani, Chiara Bertello, Andrea Viola, Fabrizio Buffolo, Luisa Gabetti, Giulio Mengozzi, Tracy A. Williams, Franco Rabbia, Franco Veglio und Paolo Mulatero (Apr. 2017). „Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice.“ In: *Journal of the American College of Cardiology* 69.14, S. 1811–1820. DOI: 10.1016/J.JACC.2017.01.052.
- Monticone, Silvia, Isabella Castellano, Karine Versace, Barbara Lucatello, Franco Veglio, Celso E. Gomez-Sanchez, Tracy A. Williams und Paolo Mulatero (2015). „Immunohistochemical, Genetic and Clinical Characterization of Sporadic Aldosterone-Producing Adenomas“. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 411, S. 146–154. DOI: 10.1016/J.MCE.2015.04.022.
- Monticone, Silvia, Namita G. Hattangady, Koshiro Nishimoto, Franco Mantero, Beatrice Rubin, Maria Verena Cicala, Raffaele Pezzani, Richard J. Auchus, Hans K. Ghayee, Hirotaka Shibata, Isao Kurihara, Tracy A. Williams, Judith G. Giri, Roni J. Bollag, Michael A. Edwards, Carlos M. Isales und William E. Rainey (Aug. 2012). „Effect of KCNJ5 Mutations on Gene Expression in Aldosterone-Producing Adenomas and Adrenocortical Cells.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, E1567–E1572. DOI: 10.1210/jc.2011-3132.
- Mulatero, P., F. Schiavi, T. A. Williams, S. Monticone, G. Barbon, G. Opocher und F. Fallo (Juni 2016). „ARMC5 Mutation Analysis in Patients with Primary Aldosteronism and Bilateral Adrenal Lesions.“ In: *Journal of human hypertension* 30, S. 374–378. DOI: 10.1038/JHH.2015.98.
- Mulatero, Paolo, Michael Stowasser, Keh Chuan Loh, Carlos E. Fardella, Richard D. Gordon, Lorena Mosso, Celso E. Gomez-Sanchez, Franco Veglio und William F. Young (2004). „Increased Diagnosis of Primary Aldosteronism, Including Surgically Correctable Forms, in Centers from Five Continents“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89.3, S. 1045–1050. DOI: 10.1210/jc.2003-031337.

- Nakamura, Yasuhiro, Masaaki Kitada, Fumitoshi Satoh, Takashi Maekawa, Ryo Morimoto, Yuto Yamazaki, Kazue Ise, Celso E. Gomez-Sanchez, Sadayoshi Ito, Yoichi Arai, Mari Dezawa und Hironobu Sasano (Feb. 2016a). „Intratumoral Heterogeneity of Steroidogenesis in Aldosterone-Producing Adenoma Revealed by Intensive Double- and Triple-Immunostaining for CYP11B2/B1 and CYP17.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 422, S. 57–63. doi: 10.1016/J.MCE.2015.11.014.
- Nakamura, Yasuhiro, Takashi Maekawa, Saulo J. A. Felizola, Fumitoshi Satoh, Xin Qi, Carolina Velarde-Miranda, Maria W. Plonczynski, Kazue Ise, Kumi Kikuchi, William E. Rainey, Elise P. Gomez-Sanchez, Celso E. Gomez-Sanchez und Hironobu Sasano (Juli 2014). „Adrenal CYP11B1/2 Expression in Primary Aldosteronism: Immunohistochemical Analysis Using Novel Monoclonal Antibodies.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 392, S. 73–79. doi: 10.1016/J.MCE.2014.05.002.
- Nakamura, Yasuhiro, Yuto Yamazaki, Yuta Tezuka, Fumitoshi Satoh und Hironobu Sasano (2016b). „Expression of CYP11B2 in Aldosterone-Producing Adrenocortical Adenoma: Regulatory Mechanisms and Clinical Significance.“ In: *The Tohoku journal of experimental medicine* 240, S. 183–190. doi: 10.1620/TJEM.240.183.
- Nanba, Kazutaka, Andrew X. Chen, Kei Omata, Michelle Vinco, Thomas J. Giordano, Tobias Else, Gary D. Hammer, Scott A. Tomlins und William E. Rainey (2016). „Molecular Heterogeneity in Aldosterone-Producing Adenomas“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101.3, S. 999–1007. doi: 10.1210/jc.2015-3239.
- Nanba, Kazutaka, Mika Tsuiki, Kuniko Sawai, Kuniaki Mukai, Koshiro Nishimoto, Takeshi Usui, Tetsuya Tagami, Hiroshi Okuno, Tetsuro Yamamoto, Akira Shimatsu, Takuyuki Katabami, Ataru Okumura, Gen Kawa, Akiyo Tanabe und Mitsuhide Naruse (Apr. 2013). „Histopathological Diagnosis of Primary Aldosteronism Using CYP11B2 Immunohistochemistry“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98.4, S. 1567–1574. doi: 10.1210/jc.2012-3726.
- Nishimoto, Koshiro, Minae Koga, Tsugio Seki, Kenji Oki, Elise P. Gomez-Sanchez, Celso E. Gomez-Sanchez, Mitsuhide Naruse, Tomokazu Sakaguchi, Shinya Morita, Takeo Kosaka, Mototsugu Oya, Tadashi Ogishima, Masanori Yasuda, Makoto Suematsu, Yasuaki Kabe, Masao Omura, Tetsuo Nishikawa und Kuniaki Mukai (Feb. 2017). „Immunohistochemistry of Aldosterone Synthase Leads the Way to the Pathogenesis of Primary Aldosteronism.“ In: *Molecular and cellular endocrinology* 441, S. 124–133. doi: 10.1016/J.MCE.2016.10.014.
- Okamura, Takashi, Yasuyo Nakajima, Akiko Katano-Toki, Kazuhiko Horiguchi, Shunichi Matsumoto, Satoshi Yoshino, Eijiro Yamada, Takuya Tomaru, Sumiyasu Ishii, Tsugumichi Saito, Atsushi Ozawa, Nobuyuki Shibusawa, Tetsuro Satoh, Shuichi Okada, Rin Nagaoka, Daisuke Takada, Jun Horiguchi, Tetsunari Oyama und Masanobu Yamada (Jan. 2017). „Characteristics of Japanese Aldosterone-Producing Adenomas with KCNJ5 Mutations.“ In: *Endocrine journal* 64, S. 39–47. doi: 10.1507/ENDOCRJ.EJ16-0243.
- Oki, Kenji, Maria W. Plonczynski, Milay Luis Lam, Elise P. Gomez-Sanchez und Celso E. Gomez-Sanchez (2012). „Potassium Channel Mutant KCNJ5 T158A Expression in HAC-15 Cells Increases Aldosterone Synthesis“. In: *Endocrinology* 153.4, S. 1774–1782. doi: 10.1210/en.2011-1733.

- Omata, Kei, Yuto Yamazaki, Yasuhiro Nakamura, Sharath K. Anand, Justine A. Barletta, Hironobu Sasano, William E. Rainey, Scott A. Tomlins und Anand Vaidya (2017). „Genetic and Histopathologic Intertumor Heterogeneity in Primary Aldosteronism“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102.6, S. 1792–1796. DOI: 10.1210/jc.2016-4007.
- Ono, Yoshiaki, Yasuhiro Nakamura, Takashi Maekawa, Saulo J. A. Felizola, Ryo Morimoto, Yoshitsugu Iwakura, Masataka Kudo, Kazumasa Seiji, Kei Takase, Yoichi Arai, Celso E. Gomez-Sanchez, Sadayoshi Ito, Hironobu Sasano und Fumitoshi Satoh (2014). „Different Expression of 11beta-Hydroxylase and Aldosterone Synthase between Aldosterone-Producing Microadenomas and Macroadenomas“. In: *Hypertension* 64.2, S. 438–444. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02944.
- Pang, Tony C., Chris Bambach, Judith C. Monaghan, Stan B. Sidhu, Alex Bune, Leigh W. Delbridge und Mark S. Sywak (Sep. 2007). „Outcomes of Laparoscopic Adrenalectomy for Hyperaldosteronism.“ In: *ANZ journal of surgery* 77, S. 768–773. DOI: 10.1111/J.1445-2197.2007.04225.X.
- Pasquier, Ludwig, Medhi Kirouani, Florian Fanget, Claire Nomine, Cécile Caillard, Vincent Arnault, Jean Baptiste Finel, Niki Christou, Muriel Mathonnet, Christophe Trésallet, Antoine Hamy, Loïc de Calan, Laurent Brunaud, Fabrice Menegaux, Jean Christophe Lifante, Jean Benoit Hardouin, Delphine Drui, Éric Mirallié und Claire Blanchard (2017). „Assessment of the Aldosteronoma Resolution Score as a Predictive Resolution Score of Hypertension after Adrenalectomy for Aldosteronoma in French Patients“. In: *Langenbeck's Archives of Surgery* 402.2, S. 309–314. DOI: 10.1007/S00423-017-1557-X.
- Perneger, Thomas V. (1998). „What's Wrong with Bonferroni Adjustments?“ In: *Bmj* 316, S. 1236–1238. DOI: 10.1136/bmj.316.7139.1236.
- Pinggera, Alexandra, Andreas Lieb, Bruno Benedetti, Michaela Lampert, Stefania Monteleone, Klaus R. Liedl, Petronel Tuluc und Jörg Striessnig (Mai 2015). „CACNA1D de Novo Mutations in Autism Spectrum Disorders Activate Cav1.3 L-Type Calcium Channels.“ In: *Biological psychiatry* 77, S. 816–822. DOI: 10.1016/J.BIOPSYCH.2014.11.020.
- Proschan, Michael A. und Myron A. Waclawiw (2000). „Practical Guidelines for Multiplicity Adjustment in Clinical Trials“. In: *Controlled Clinical Trials* 21.6, S. 527–539. DOI: 10.1016/S0197-2456(00)00106-9.
- Puar, Troy H., Joan J. Khoo, Keng S. Ng, Jia W. Kam und Kuo W. Wang (Nov. 2016). „Adrenal Vein Sampling versus CT Scanning in Primary Aldosteronism.“ In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 4, S. 885–886. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30235-2.
- R Core Team (2015). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (<https://www.r-project.org/>).
- Rassow, Joachim, Rainer Deutzmann, Roland Netzker und Karin Hauser, Hrsg. (2012). *Biochemie: 67 Tabellen ; [Mit Stoffwechselweg-Animationen]*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-13-125353-8.
- Revelle, William (2016). *Psych: Procedures for Psychological, Pyschometric and Personality Research*. (<https://CRAN.R-project.org/package=psych>).
- Rhayem, Yara, Luis G. Perez-Rivas, Anna Dietz, Kerstin Bathon, Christian Gebhard, Anna Riester, Brigitte Mauracher, Celso Gomez-Sanchez, Graeme Eisenhofer, Thomas Schwarzmayer, Davide Calebiro, Tim M. Strom, Martin Reincke und Felix Beuschlein



- (Aug. 2016). „PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101.8, S. 3010–3017. DOI: 10.1210/jc.2016-1700.
- Rhayem, Yara, Luis G. Perez-Rivas, Anna Dietz, Kerstin Bathon, Christian Gebhard, Anna Riester, Brigitte Mauracher, Celso Gomez-Sanchez, Thomas Schwarzmayr, Davide Calebiro, Tim M. Strom, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Nov. 2015). „PRKACA Mutations in Aldosterone Producing Adenomas“. In: *ENS@T 14th Scientific Meeting (München)*.
- Rossi, Gian Paolo, Anna Belfiore, Giampaolo Bernini, Bruno Fabris, Graziella Caridi, Claudio Ferri, Gilberta Giacchetti, Claudio Letizia, Mauro Maccario, Massimo Mannelli, Gaetana Palumbo, Anna Patalano, Damiano Rizzoni, Ermanno Rossi, Achille C. Pessina, Franco Mantero und Primary Aldosteronism Prevalence in hYpertension Study Investigators (Juli 2008a). „Body Mass Index Predicts Plasma Aldosterone Concentrations in Overweight-Obese Primary Hypertensive Patients.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, S. 2566–2571. DOI: 10.1210/jc.2008-0251.
- Rossi, Gian Paolo, Giampaolo Bernini, Chiara Caliumi, Giovambattista Desideri, Bruno Fabris, Claudio Ferri, Chiara Ganzaroli, Gilberta Giacchetti, Claudio Letizia, Mauro Maccario, Francesca Mallamaci, Massimo Mannelli, Mee Jung Mattarello, Angelica Morretti, Gaetana Palumbo, Gabriele Parenti, Enzo Porteri, Andrea Semplicini, Damiano Rizzoni, Ermanno Rossi, Marco Boscaro, Achille Cesare Pessina und Franco Mantero (2006). „A Prospective Study of the Prevalence of Primary Aldosteronism in 1,125 Hypertensive Patients“. In: *Journal of the American College of Cardiology* 48.11, S. 2293–2300. DOI: 10.1016/J.JACC.2006.07.059.
- Rossi, Gian Paolo, Massimo Bolognesi, Damiano Rizzoni, Teresa M. Seccia, Anna Piva, Enzo Porteri, Guido A. M. Tiberio, Stefano M. Giulini, Enrico Agabiti-Rosei und Achille C. Pessina (Mai 2008b). „Vascular Remodeling and Duration of Hypertension Predict Outcome of Adrenalectomy in Primary Aldosteronism Patients.“ In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 51, S. 1366–1371. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.111369.
- Rossi, Gian Paolo, Francesca Gioco, Ambrogio Fassina und Celso E. Gomez-Sanchez (Dez. 2015). „Normoaldosteronemic Aldosterone-Producing Adenoma: Immunochemical Characterization and Diagnostic Implications.“ In: *Journal of hypertension* 33, S. 2546–2549. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000748.
- Rothman, Kenneth J. (1990). „No Adjustments Are Needed for Multiple Comparisons“. In: *Epidemiology* 1.1, S. 43–46. ISSN: 1044-3983.
- Ruggiero, Carmen und Enzo Lalli (2016). „Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes“. In: *Frontiers in Endocrinology* 7.MAR. DOI: 10.3389/FENDO.2016.00024.
- Sakuma, Ikki, Sachiko Suematsu, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Masao Omura, Takashi Maekawa, Yasuhiro Nakamura, Hironobu Sasano und Tetsuo Nishikawa (2013). „Characterization of Steroidogenic Enzyme Expression in Aldosterone-Producing Adenoma: A Comparison with Various Human Adrenal Tumors.“ In: *Endocrine journal* 60, S. 329–336.

- Sankoh, A. J., M. F. Huque und S. D. Dubey (Nov. 1997). „Some Comments on Frequently Used Multiple Endpoint Adjustment Methods in Clinical Trials“. eng. In: *Statistics in Medicine* 16.22, S. 2529–2542. ISSN: 0277-6715.
- Sasano, H. (Okt. 1994). „Localization of Steroidogenic Enzymes in Adrenal Cortex and Its Disorders.“ In: *Endocrine journal* 41, S. 471–482.
- Sato, Yusuke, Shigekatsu Maekawa, Ryohei Ishii, Masashi Sanada, Teppei Morikawa, Yui-chi Shiraishi, Kenichi Yoshida, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Tetsuichi Yoshizato, Hiromichi Suzuki, Yusuke Shiozawa, Keisuke Kataoka, Ayana Kon, Kosuke Aoki, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Haruki Kume, Satoru Miyano, Masashi Fukayama, Osamu Nureki, Yukio Homma und Seishi Ogawa (Mai 2014). „Recurrent Somatic Mutations Underlie Corticotropin-Independent Cushing’s Syndrome.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 344, S. 917–920. DOI: 10.1126/SCIENCE.1252328.
- Savitz, D. A. und A. F. Olshan (Nov. 1995). „Multiple Comparisons and Related Issues in the Interpretation of Epidemiologic Data.“ In: *American Journal of Epidemiology* 142.9, S. 904–908.
- Savitz, David A. und Andrew F. Olshan (1998). „Describing Data Requires No Adjustment for Multiple Comparisons: A Reply from Savitz and Olshan“. In: *American Journal of Epidemiology* 147.9, S. 813–814. DOI: 10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A009532.
- Schmidt, Robert F., Florian Lang und Manfred Heckmann, Hrsg. (2011). *Physiologie Des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-01651-6.
- Schneider, Caroline a, Wayne S. Rasband und Kevin W. Eliceiri (2012). „NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis“. In: *Nature Methods* 9.7, S. 671–675. DOI: 10.1038/NMETH.2089.
- Scholl, Ute I., Laura Abriola, Chengbiao Zhang, Esther N. Reimer, Mark Plummer, Barbara I. Kazmierczak, Junhui Zhang, Denton Hoyer, Jane S. Merkel, Wenhui Wang und Richard P. Lifton (2017). „Macrolides Selectively Inhibit Mutant KCNJ5 Potassium Channels That Cause Aldosterone-Producing Adenoma“. In: *The Journal of clinical investigation* 127.7, S. 1–12. DOI: 10.1172/JCI91733.
- Scholl, Ute I., Gerald Goh, Gabriel Stölting, Regina Campos de Oliveira, Murim Choi, John D. Overton, Annabelle L. Fonseca, Reju Korah, Lee F. Starker, John W. Kunstman et al. (Aug. 2013a). „Somatic and Germline CACNA1D Calcium Channel Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas and Primary Aldosteronism.“ In: *Nature genetics* 45.9, S. 1050–1054. DOI: 10.1038/NG.2695.
- Scholl, Ute I., James M. Healy, Anne Thiel, Annabelle L. Fonseca, Taylor C. Brown, John W. Kunstman, Matthew J. Horne, Dimo Dietrich, Jasmin Riemer, Seher Kücükköylü, Esther N. Reimer, Anna-Carina Reis, Gerald Goh, Glen Kristiansen, Amit Mahajan, Reju Korah, Richard P. Lifton, Manju L. Prasad und Tobias Carling (Dez. 2015a). „Novel Somatic Mutations in Primary Hyperaldosteronism Are Related to the Clinical, Radiological and Pathological Phenotype“. en. In: *Clinical Endocrinology* 83.6, S. 779–789. ISSN: 1365-2265. DOI: 10.1111/cen.12873.
- Scholl, Ute I. und Richard P. Lifton (März 2013b). „New Insights into Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Aldosteronism: Mutations in the K<sup>+</sup> Channel KCNJ5.“ In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 22, S. 141–147. DOI: 10.1097/MNH.0B013E32835CECF8.

- Scholl, Ute I., Gabriel Stölting, Carol Nelson-Williams, Alfred A. Vichot, Murim Choi, Erin Loring, Manju L. Prasad, Gerald Goh, Tobias Carling, C. Christofer Juhlin, Ivo Quack, Lars C. Rump, Anne Thiel, Marc Lande, Britney G. Frazier, Majid Rasoulopour, David L. Bowlin, Christine B. Sethna, Howard Trachtman, Christoph Fahlke und Richard P. Lifton (2015b). „Recurrent Gain of Function Mutation in Calcium Channel CACNA1H Causes Early-Onset Hypertension with Primary Aldosteronism“. In: *eLife* 4, e06315–e06315. DOI: 10.7554/ELIFE.06315.
- Shaikh, Lalarukh Haris, Junhua Zhou, Ada E. D. Teo, Sumedha Garg, Sudeshna Guha Neogi, Nichola Figg, Giles S. Yeo, Haixiang Yu, Janet J. Maguire, Wanfeng Zhao, Martin R. Bennett, Elena A. B. Azizan, Anthony P. Davenport, Grahame McKenzie und Morris J. Brown (Juni 2015). „LGR5 Activates Noncanonical Wnt Signaling and Inhibits Aldosterone Production in the Human Adrenal.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100, E836–E844. DOI: 10.1210/jc.2015-1734.
- Spät, András und László Hunyady (Apr. 2004). „Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways.“ In: *Physiological reviews* 84, S. 489–539. DOI: 10.1152/PHYSREV.00030.2003.
- Stafford, Nicholas, Claire Wilson, Delvac Oceandy, Ludwig Neyses und Elizabeth J. Cartwright (2017). „The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease“. In: *Physiological Reviews* 97.3, S. 1089–1125.
- Steichen, O., F. Zinzindohoué, P.-F. Plouin und L. Amar (März 2012). „Outcomes of Adrenalectomy in Patients with Unilateral Primary Aldosteronism: A Review.“ In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 44, S. 221–227. DOI: 10.1055/S-0031-1299681.
- Stindl, J., P. Tauber, C. Sterner, I. Tegtmeier, R. Warth und S. Bandulik (Dez. 2015). „Pathogenesis of Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas Carrying Mutations of the  $Na^+/K^+$ -ATPase“. In: *Endocrinology* 156.12, S. 4582–4591. DOI: 10.1210/en.2015-1466.
- Streiner, David L. und Geoffrey R. Norman (2011). „Correction for Multiple Testing: Is There a Resolution?“ In: *Chest* 140.1, S. 16–18. DOI: 10.1378/CHEST.11-0523.
- Taguchi, Ryo, Masanobu Yamada, Yasuyo Nakajima, Tetsuro Satoh, Koshi Hashimoto, Nobuyuki Shibusawa, Atsushi Ozawa, Shuichi Okada, Nana Rokutanda, Daisuke Takata, Yukio Koibuchi, Jun Horiguchi, Tetsunari Oyama, Izumi Takeyoshi und Masatomo Mori (Apr. 2012). „Expression and Mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese Patients with Aldosterone-Producing Adenomas.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, S. 1311–1319. DOI: 10.1210/jc.2011-2885.
- Tan, Geok Chin, Giulia Negro, Alexandra Pinggera, Nur Maya Sabrina Tizen Laim, Isa Mohamed Rose, Jiri Ceral, Ales Ryska, Long Kha Chin, Nor Azmi Kamaruddin, Norfilza Mohd Mokhtar, A. Rahman A Jamal, Norlela Sukor, Miroslav Solar, Joerg Striessnig, Morris Jonathan Brown und Elena Aisha Azizan (Juli 2017). „Aldosterone-Producing Adenomas: Histopathology-Genotype Correlation and Identification of a Novel CACNA1D Mutation.“ In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 70, S. 129–136. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09057.
- Tauber, Philipp, B. Aichinger, C. Christ, J. Stindl, Y. Rhayem, F. Beuschlein, R. Warth und S. Bandulik (Juni 2016). „Cellular Pathophysiology of an Adrenal Adenoma-Associated

- Mutant of the Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase ATP2B3“. In: *Endocrinology* 157.6, S. 2489–2499. DOI: 10.1210/en.2015-2029.
- Teo, Ada E. D., Sumedha Garg, Lalarukh Haris Shaikh, Junhua Zhou, Fiona E. Karet Frankl, Mark Gurnell, Lisa Happerfield, Alison Marker, Mariann Bienz, Elena A. B. Azizan und Morris J. Brown (Okt. 2015). „Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal CTNNB1 Mutations.“ In: *The New England journal of medicine* 373, S. 1429–1436. DOI: 10.1056/NEJMOA1504869.
- Thompson, John R. (1998). „Invited Commentary: Re: "Multiple Comparisons and Related Issues in the Interpretation of Epidemiologic Data".“ In: *American journal of epidemiology* 147.9, S. 801–806.
- Thomson, T. a, M. M. Hayes, J. J. Spinelli, E. Hilland, C. Sawrenko, D. Phillips, B. Dupuis und R. L. Parker (2001). „HER-2/Neu in Breast Cancer: Interobserver Variability and Performance of Immunohistochemistry with 4 Antibodies Compared with Fluorescent in Situ Hybridization.“ In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14.11, S. 1079–1086. DOI: 10.1038/MODPATHOL.3880440.
- Tissier, Frédérique, Catherine Cavard, Lionel Groussin, Karine Perlemoine, Gwladys Fumey, Anne-Marie Hagneré, Fernande René-Corail, Eric Jullian, Christine Gicquel, Xavier Bertagna, Marie-Cécile Vacher-Lavenu, Christine Perret und Jerome Bertherat (Sep. 2005). „Mutations of  $\beta$ -Catenin in Adrenocortical Tumors: Activation of the Wnt Signaling Pathway Is a Frequent Event in Both Benign and Malignant Adrenocortical Tumors.“ In: *Cancer research* 65.17, S. 7622–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0593.
- Utsumi, Takanobu, Koji Kawamura, Takashi Imamoto, Naoto Kamiya, Akira Komiya, Sawako Suzuki, Hidekazu Nagano, Tomoaki Tanaka, Naoki Nihei, Yukio Naya, Hiroyoshi Suzuki, Ichiro Tatsuno und Tomohiko Ichikawa (2012). „High Predictive Accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese Patients with Aldosterone-Producing Adenoma“. In: *Surgery* 151.3, S. 437–443. DOI: 10.1016/J.SURG.2011.08.001.
- van der Wilt, Gert-Jan, Tanja Dekkers, Jacques W. W. Lenders und Jaap Deinum (Nov. 2016). „Adrenal Vein Sampling versus CT Scanning in Primary Aldosteronism - Authors' Reply.“ In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 4, S. 886–887. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30236-4.
- Varghese, Frency, Amirali B. Bukhari, Renu Malhotra und Abhijit De (2014). „IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples“. In: *PLoS ONE* 9.5, e96801–e96801. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0096801.
- Verwoert, Germaine C., Johannes Hofland, Najaf Amin, Francesco U. S. Mattace-Raso, Eric J. G. Sijbrands, Albert Hofman, Anton H. Van Den Meiracker, André G. Uitterlinden, Cornelia M. Van Duijn, Frank H. De Jong und A. H. Jan Danser (2015). „Expression and Gene Variation Studies Deny Association of Human HSD3B1 Gene with Aldosterone Production or Blood Pressure“. In: *American Journal of Hypertension* 28.1, S. 113–120. DOI: 10.1093/AJH/HPU103.
- Volpe, Cristina, Bertil Hamberger, Anders Höög, Kuniaki Mukai, Jan Calissendorff, Hans Wahrenberg, Jan Zedenius und Marja Thorén (Mai 2015). „Primary Aldosteronism:

- Functional Histopathology and Long-Term Follow-up after Unilateral Adrenalectomy.“ In: *Clinical endocrinology* 82, S. 639–647. DOI: 10.1111/CEN.12645.
- Wang, Baojun, Xintao Li, Xu Zhang, Xin Ma, Luyao Chen, Yu Zhang, Xiangjun Lyu, Yuzhe Tang, Qingbo Huang, Yu Gao, Yang Fan und Jinzhi Ouyang (Apr. 2015). „Prevalence and Characterization of Somatic Mutations in Chinese Aldosterone-Producing Adenoma Patients.“ In: *Medicine* 94, e708–e708. DOI: 10.1097/MD.0000000000000708.
- Wang, Wei, WeiLie Hu, XiaoMing Zhang, BangQi Wang, Chen Bin und Hai Huang (2012). „Predictors of Successful Outcome after Adrenalectomy for Primary Aldosteronism.“ In: *International surgery* 97, S. 104–111. DOI: 10.9738/CC140.1.
- Warnes, Gregory R., Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber Andy Liaw, Thomas Lumley, Martin Maechler, Arni Magnusson, Steffen Moeller, Marc Schwartz und Bill Venables (2016). *Gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data* (<https://CRAN.R-project.org/package=gplots>).
- Warnes, Gregory R., Ben Bolker, Thomas Lumley und Randall C. Johnson. (2015). *Gmodels: Various R Programming Tools for Model Fitting* (<https://CRAN.R-project.org/package=gmodels>).
- Welsch, Ulrich (2010). *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer. ISBN: 978-3-437-44431-9.
- Wickham, Hadley (2007). „Reshaping Data with the Reshape Package“. In: *Journal of Statistical Software* 21.12. DOI: 10.18637/JSS.V021.I12.
- Wickham, Hadley (2009). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Williams, T. A., J. W. M. Lenders, J. Burrello, F. Beuschlein und M. Reincke (2015). „KCNJ5 Mutations: Sex, Salt and Selection“. In: *Hormone and Metabolic Research* 47.13, S. 953–958. DOI: 10.1055/S-0035-1565090.
- Williams, Tracy A., Jacques W. M. Lenders, Paolo Mulatero, Jacopo Burrello, Marietta Rottenkolber, Christian Adolf, Fumitoshi Satoh, Laurence Amar, Marcus Quinkler, Jaap Deinum et al. (2017). „Outcomes after Adrenalectomy for Unilateral Primary Aldosteronism: An International Consensus on Outcome Measures and Analysis of Remission Rates in an International Cohort“. In: *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. DOI: 10.1016/S2213-8587(17)30135-3.
- Williams, Tracy Ann, Silvia Monticone, Vivien R. Schack, Julia Stindl, Jacopo Burrello, Fabrizio Buffolo, Laura Annaratone, Isabella Castellano, Felix Beuschlein, Martin Reincke, Barbara Lucatello, Vanessa Ronconi, Francesco Fallo, Giampaolo Bernini, Mauro Maccario, Gilberta Giacchetti, Franco Veglio, Richard Warth, Bente Vilsen und Paolo Mulatero (Jan. 2013). „Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas“. In: *Hypertension*. ISSN: 0194-911X, 1524-4563. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01733.
- Worth, Patrick J., Nicholas R. Kunio, Issac Siegfried, Brett C. Sheppard und Erin W. Gilbert (2015). „Characteristics Predicting Clinical Improvement and Cure Following Laparoscopic Adrenalectomy for Primary Aldosteronism in a Large Cohort“. In: *The American Journal of Surgery* 210.4, S. 702–709. DOI: 10.1016/J.AMJSURG.2015.05.033.
- Wu, Vin-Cent, Kuo-How Huang, Kang-Yung Peng, Yao-Chou Tsai, Che-Hsiung Wu, Shuo-Meng Wang, Shao-Yu Yang, Lian-Yu Lin, Chin-Chen Chang, Yen-Hung Lin, Shuei-Liong

- Lin, Tzong-Shinn Chu und Kwan-Dun Wu (Juni 2015). „Prevalence and Clinical Correlates of Somatic Mutation in Aldosterone Producing Adenoma-Taiwanese Population.“ In: *Scientific reports* 5, S. 11396–11396. doi: 10.1038/SREP11396.
- Wu, Vin-Cent, Shuo-Meng Wang, Shih-Chieh Jeff Chueh, Shao-Yu Yang, Kuo-How Huang, Yen-Hung Lin, Jian-Jhong Wang, Rory Connolly, Ya-Hui Hu, Celso E. Gomez-Sanchez, Kang-Yung Peng und Kwan-Dun Wu (Jan. 2017). „The Prevalence of CTNNB1 Mutations in Primary Aldosteronism and Consequences for Clinical Outcomes.“ In: *Scientific reports* 7, S. 39121–39121. doi: 10.1038/SREP39121.
- Wu, Vin-Cent, Cho-Kai Wu, Yi-Cheng Chang, Guang-Huar Young, Shann-Ching Chen, Wei-Shiung Yang, Chien-Yuan Chen, Wei-Jie Wang, Chien-Yu Lin, Yen-Hung Lin, Shuei-Liong Lin, Shih-Chieh Chueh, Kwan-Dun Wu und T. A. I. P. A. I. study group (Juli 2013). „Association of the Variations in the HSD3 $\beta$  Gene with Primary Aldosteronism.“ In: *Journal of hypertension* 31.7, 1396–405, discussion 1405. doi: 10.1097/HJH.0B013E328360EF3C.
- Xie, Catherine B., Lalarukh Haris Shaikh, Sumedha Garg, Gizem Tanriver, Ada E. D. Teo, Junhua Zhou, Carmela Maniero, Wanfeng Zhao, Soosung Kang, Richard B. Silverman, Elena A. B. Azizan und Morris J. Brown (Apr. 2016). „Regulation of Aldosterone Secretion by Cav1.3“. eng. In: *Scientific Reports* 6, S. 24697. ISSN: 2045-2322. doi: 10.1038/srep24697.
- Xing, Yewei, Antonio M. Lerario, William Rainey und Gary D. Hammer (Juni 2015). „Development of Adrenal Cortex Zonation“. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 44.2, S. 243–274. doi: 10.1016/J.ECL.2015.02.001.
- Yamazaki, Yuto, Yasuhiro Nakamura, Kei Omata, Kazue Ise, Yuta Tezuka, Yoshikiyo Ono, Ryo Morimoto, Yukinaga Nozawa, Celso E. Gomez-Sanchez, Scott A. Tomlins, William E. Rainey, Sadayoshi Ito, Fumitoshi Satoh und Hironobu Sasano (2017). „Histopathological Classification of Cross-Sectional Image-Negative Hyperaldosteronism“. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102.4, S. 1182–1192. doi: 10.1210/jc.2016-2986.
- Zanni, G., T. Cali, V. M. Kalscheuer, D. Ottolini, S. Barresi, N. Lebrun, L. Montecchi-Palazzi, H. Hu, J. Chelly, E. Bertini, M. Brini und E. Carafoli (Aug. 2012). „Mutation of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase Isoform 3 in a Family with X-Linked Congenital Cerebellar Ataxia Impairs Ca<sup>2+</sup> Homeostasis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.36, S. 14514–14519. doi: 10.1073/PNAS.1207488109.
- Zarnegar, Rasa, William F. Young, James Lee, Matthew P. Sweet, Electron Kebebew, David R. Farley, Geoffrey B. Thompson, Clive S. Grant, Orlo H. Clark und Quan-Yang Duh (2008). „The Aldosteronoma Resolution Score“. In: *Annals of Surgery* 247.3, S. 511–518. doi: 10.1097/SLA.0B013E318165C075.
- Zennaro, Maria-Christina, Sheerazed Boulkroun und Fabio Fernandes-Rosa (Feb. 2015). „An Update on Novel Mechanisms of Primary Aldosteronism.“ In: *The Journal of endocrinology* 224, R63–R77. doi: 10.1530/JOE-14-0597.
- Zhang, Xiaohua, Zhaowei Zhu, Tianyuan Xu und Zhoujun Shen (2013). „Factors Affecting Complete Hypertension Cure after Adrenalectomy for Aldosterone-Producing Adenoma: Outcomes in a Large Series.“ In: *Urologia internationalis* 90, S. 430–434. doi: 10.1159/000347028.

## A Literatur

- Zheng, Fang-Fang, Li-Min Zhu, Ai-Fang Nie, Xiao-Ying Li, Jing-Rong Lin, Ke Zhang, Jing Chen, Wen-Long Zhou, Zhou-Jun Shen, Yi-Chun Zhu, Ji-Guang Wang, Ding-Liang Zhu und Ping-Jin Gao (Jan. 2015). „Clinical Characteristics of Somatic Mutations in Chinese Patients With Aldosterone-Producing Adenoma Novelty and Significance“. In: *Hypertension* 65.3, S. 622–628. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03346.
- Zilbermint, Mihail, Paraskevi Xekouki, Fabio R. Faucz, Annabel Berthon, Alexandra Gkourogiani, Marie Helene Schernthaner-Reiter, Maria Batsis, Ninet Sinaii, Martha M. Quezado, Maria Merino, Aaron Hodes, Smita B. Abraham, Rossella Libé, Guillaume Assié, Stéphanie Espiard, Ludivine Drougat, Bruno Ragazzon, Adam Davis, Samson Y. Gebreab, Ryan Neff, Electron Kebebew, Jerome Bertherat, Maya B. Lodish und Constantine A. Stratakis (Juni 2015). „Primary Aldosteronism and ARMC5 Variants.“ In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100, E900–E909. DOI: 10.1210/jc.2014-4167.

## B Akronyme

- ACE** Angiotensin I Konversionsenzym, engl. „angiotensin converting enzyme“  
**ACTH** Adrenocorticotropes Hormon  
**aHTM** antihypertensive Medikamente  
**AK** Antikörper  
**AngI** Angiotensin I  
**AngII** Angiotensin II  
**ANOVA** Varianzanalyse, engl. „Analysis of Variance“  
**APA** Aldosteron produzierendes Adenom  
**APCC** Aldosteron produzierender Zellhaufen, engl. „aldosterone producing cell cluster“  
**Aq. bidest.** doppelt destilliertes Wasser  
**ARQ** Aldosteron-Renin-Quotient  
**AT1** Angiotensin II Rezeptor Typ 1  
**ATP** Adenosintriphosphat
- BHD** Bluthochdruck  
**BMI** Körpermasseindex, engl. „body mass index“  
**bTE** biochemischer Therapieerfolg
- CRH** Corticotropin-Releasing-Hormon  
**CT** Computertomographie
- DAB** 3,3'-Diaminobenzidin  
**DDD** definierte Tagesdosen, engl. „defined daily doses“  
**DHEA** Dihydroepiandrosteron  
**DHEA-S** Dihydroepiandrosteron-Sulfat  
**DNA** Desoxyribonukleinsäure, engl. „Deoxyribonucleic acid“
- ED** Erstdiagnose  
**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure, engl. „Ethylenediaminetetraacetic acid“  
**ER** Endoplasmatisches Retikulum
- GIRK4** *G Protein-Coupled Inwardly-Rectifying Potassium Channel 4*
- HE** Hämatoxylin und Eosin  
**HPF** Haupt Gesichtsfeld, engl. „high-power field“  
**HRP** Meerrettichperoxidase, engl. „horseradish peroxidase“  
**H-Score** histologische Punktzahl, engl. „histological score“
- Ig** Immunglobuline  
**IHC** Immunhistochemie  
**IOV** Interobserver-Variabilität  
**IQA** Interquartilenabstand



## Akronyme

**K<sub>s</sub><sup>+</sup>** Kalium-Konzentration im Serum

**KI** Konfidenzintervall

**kTE** klinischer Therapieerfolg

**LI** Lateralisierungsindex

**MRA** Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten

**MW** Mittelwert

**NCBI** *National Center for Biotechnology Information*

**NNR** Nebennierenrinde

**OP** Operation

**OR** Quotenverhältnis, engl. „Odds ratio“

**PA** Primärer Hyperaldosteronismus, engl. „primary aldosteronism“

**PAC** Plasma Aldosteron-Konzentration, engl. „plasma aldosterone concentration“

**PBS** Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. „phosphat buffered saline“

**PCR** Polymerase-Kettenreaktion, engl. „polymerase chain reaction“

**PFA** Paraformaldehyd

**PMCA3** „plasma membrane calcium ATPase 3“

**RAAS** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

**RR<sub>dia</sub>** diastolischer Blutdruck

**RR<sub>sys</sub>** systolischer Blutdruck

**SD** Standardabweichung, engl. „standard deviation“

**StAR** *Steroid acute regulatory Protein*

**TBST** Tris-gepufferte Salzlösung, engl. „tris-buffered saline“

**TMA** *Tissue-Microarray*

**ZF** *Zona fasciculata*

**ZG** *Zona glomerulosa*

**ZR** *Zona reticularis*

## C Glossar

**AB Serum** Blutserum der Blutgruppe AB

**ABZ** Bezeichnet Adenome, deren Histomorphologie sich zu vergleichbaren Teilen aus *Zona glomerulosa*-ähnlichen und *Zona fasciculata*-ähnlichen Zellen zusammensetzt

**ATP1A1** Genabschnitt, der die  $\alpha_1$ -Untereinheit der Natrium-Kalium-ATPase kodiert

**ATP2B3** Genabschnitt, der die membranständige Kalzium-ATPase PMCA3 kodiert

**AZF** Bezeichnet Adenome, deren Histomorphologie sich überwiegend aus *Zona fasciculata*-ähnlichen Zellen zusammensetzt

**AZG** Bezeichnet Adenome, deren Histomorphologie sich überwiegend aus *Zona glomerulosa*-ähnlichen Zellen zusammensetzt

**Ca<sub>v</sub>1.3** Spannungsabhängiger L-Typ Kalzium Kanal

**Ca<sub>v</sub>3.2** Spannungsabhängiger T-Typ Kalzium Kanal

**CACNA1D** Genabschnitt, der die  $\alpha 1D$ -Untereinheit des Kalzium-Kanals Ca<sub>v</sub>1.3 kodiert

**CACNA1H** Genabschnitt, der die  $\alpha 1H$ -Untereinheit des Kalzium-Kanals Ca<sub>v</sub>3.2 kodiert

**CTNNB1** Genabschnitt, der  $\beta$ -Catenin kodiert

**CYP11B1** Cytochrom P450 CYP11B1, Steroid 11-beta-Hydroxylase

**CYP11B2** Cytochrom P450 CYP11B2, auch „Aldosteronsynthase“

**CYP17** Cytochrom P450 CYP17, Steroid 17-alpha-Hydroxylase

**CYP21** Cytochrom P450 CYP21, Steroid 21-Hydroxylase

**HSD3B1** 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Isoform 1

**HSD3B2** 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Isoform 2

**KCNJ5** Genabschnitt, der den einwärts rektifizierenden Kalium-Kanal GIRK4 kodiert

**PRKACA** Genabschnitt, der die  $\alpha$ -katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase kodiert

## D Danksagung

Prof. Dr. med. Martin Reincke, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München, und Prof. Dr. med. Felix Beuschlein, Leiter der Endokrinologischen Forschung, danke ich für die Bereitstellung des Themas und der Ressourcen, die zur Durchführung dieser Arbeit nötig waren.

Prof. Beuschlein hat mich von Beginn der Arbeit bis zur Fertigstellung in allen Fragen mit einem stets offenen und geduldigen Ohr betreut. Seine kritischen und konstruktiven Ratschläge waren maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt. Seiner engagierten Betreuung und Förderung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen verdanke ich eine stetige Erweiterung meines wissenschaftlichen und fachlichen Horizontes.

Der gesamten AG Beuschlein möchte ich meinen Dank aussprechen für die freundliche Aufnahme, sowie die professionelle und zugleich herzliche Zusammenarbeit. Hierbei herausgreifen und besonders danken möchte ich: Dr. Yara Rhayem für die Einarbeitung und umfassende fachliche Betreuung der Durchführung; Brigitte Mauracher und Petra Rank für die technische Assistenz, die Unterstützung in organisatorischen und anderen aufkommenden Fragen und die zahlreichen gemeinsamen Arbeitsstunden, die ich stets sehr genossen habe.

Ferner danke ich Dr. med. Anna Dietz für die Bereitstellung der klinischen Daten und Dr. med. vet. Marion Schuster, deren Expertise mir bei der Etablierung der immunhistochemischen Färbungen sehr geholfen hat. Prof. Celso E. Gomez-Sanchez danke ich herzlich für die Bereitstellung der Antikörper.

Meiner Freundin Julia Winkler danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, fachliche Kritik, sowie für die aufmunternden Worte und die Motivation nicht nur in anstrengenden Phasen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in meinem bisherigen Werdegang stets unterstützt haben.

## E Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen in die folgenden Fachartikel, Vorträge oder Poster eingeflossen.

### Artikel

Yara Rhayem, Luis G. Perez-Rivas, Anna Dietz, Kerstin Bathon, Christian Gebhard, Anna Riester, Brigitte Mauracher, Celso Gomez-Sanchez, Graeme Eisenhofer, Thomas Schwarzmayr, Davide Calebiro, Tim M. Strom, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Aug. 2016). „PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101.8, S. 3010–3017. DOI: 10.1210/jc.2016-1700

### Vorträge

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Nov. 2015e). „Characterization of Voltage-gated Calcium Channels CaV1.3 and CaV3.2 in Aldosterone Producing Adenoma“. In: *ENS@T 14th Scientific Meeting (München)*

Yara Rhayem, Luis G. Perez-Rivas, Anna Dietz, Kerstin Bathon, Christian Gebhard, Anna Riester, Brigitte Mauracher, Celso Gomez-Sanchez, Thomas Schwarzmayr, Davide Calebiro, Tim M. Strom, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Nov. 2015). „PRKACA Mutations in Aldosterone Producing Adenomas“. In: *ENS@T 14th Scientific Meeting (München)*

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Sep. 2015c). „CaV1.3, CYP11B2 and HSD3B2 Immunoexpressions in Aldosterone Producing Adenoma: Characteristics and Relation to Adrenalectomy Outcome.“ In: *3rd EYES Meeting (Modena, Italien)*

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Juni 2015f). „Immunoexpression of CYP11B2 and Voltage-Gated Calcium Channels CaV1.3 and CaV3.2 in Aldosterone-Producing Adenoma.“ In: *Progress in Primary Aldosteronism 4 (München)*

## *E Veröffentlichungen*

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Okt. 2015d). „Characterization of CYP11B2 and HSD3B2 in Aldosterone Producing Adenomas“. In: *14th annual YARE meeting (Berlin)*

### **Poster**

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna S. Dietz, Anna Riester, Martin Reincke und Felix Beuschlein (März 2015a). „CaV1.3, HSD3B2 and CYP11B2 Immunoexpression in Aldosterone-Producing Adenoma Are Not Correlated with Post-Adrenalectomy Outcome in Primary Aldosteronism“. In: *58. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (Lübeck)*

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Anna Dietz, Anna Riester, Constanze Hantel, Marion Schuster, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (2015b). „Immunoexpressions of CYP11B2 and HSD3B2 in Genetically Characterized Aldosterone Producing Adenomas.“ In: *17th European Congress of Endocrinology (Dublin, Irland)*

Christian Gebhard, Yara Rhayem, Tracy A. Williams, Christian Adolf, Anna Dietz, Anna Riester, Tim M. Strom, Celso Gomez-Sanchez, Martin Reincke und Felix Beuschlein (Juli 2017). „Evaluation of Clinical, Genetic and Histological Predictors for Resolution of Hypertension after Adrenalectomy According to New International Consensus Definitions.“ In: *Progress in Primary Aldosteronism 5 (München)*

## Eidesstattliche Versicherung

# Gebhard, Christian Alexander

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## Genetische und immunhistologische Marker als prognostische Faktoren in Aldosteron produzierenden Adenomen

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, 06.03.2018

---

Ort, Datum

Christian Gebhard

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand